

Gabriela Duarte Karasiak

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO
TRADUZIDA DO GENE *HLA-G* E INSERÇÃO *Alu*YHG EM
PACIENTES DE SANTA CATARINA COM HISTÓRICO DE
ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina.

**Florianópolis
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Karasiak, Gabriela Duarte

ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO
GENE *HLA-G* E INSERÇÃO *AluYHG* EM PACIENTES DE SANTA CATARINA
COM HISTÓRICO DE ARTRITE REUMATOIDE / Gabriela Duarte Karasiak ;
orientadora, Yara Costa Netto Muniz ; coorientadora, Ilíada Rainha de
Souza. - Florianópolis, SC, 2015.

132 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Autoimunidade. 3.
Genética. 4. Doenças. 5. Genética Epidemiológica. I. Muniz, Yara Costa
Netto. II. Souza, Ilíada Rainha de. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, onde realizei minha graduação em Ciências Biológicas e a pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Aos órgãos de fomento, FAPESC, CAPES e CNPq, pelo financiamento de minha bolsa de estudo de mestrado e pelos financiamentos dos projetos de pesquisa desenvolvidos no LAPOGE, um dos quais resultou nesta dissertação.

Aos pacientes, que cederam seu tempo para poder nos ajudar nessa pesquisa.

Aos funcionários e instituições que colaboraram com essa pesquisa, principalmente ao Dr. Ivânio Alves Pereira e à Dra. Adriana Fontes Zimmermann, médicos do Hospital Universitário, pela paciência e cooperação nesses últimos anos, sempre nos ajudando no contato com os pacientes.

À minha orientadora, Prof^a Yara Costa Netto Muniz, por acompanhar meu trajeto profissional ao longo desses anos, pela oportunidade de aprendizado, orientação e incentivo, pelos conhecimentos a mim repassados, pela paciência e também pela amizade.

À minha coorientadora, Prof^a Ilíada Rainha de Souza, por ter me recebido em seu laboratório, por toda sua colaboração para o aprimoramento do trabalho e especialmente pelos seus conselhos, que se estendem para muito além do laboratório.

Aos membros da banca, Prof^a. Dr^a. Andrea Rita Marrero, Dr^a Lia Kubelka de Carlos Back, Dr^a Sara Emelie Löfgren e Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa, por gentilmente aceitarem o convite para integrar esta banca e garantirem valiosas contribuições ao meu trabalho.

À Dr^a Sandra, por ter se disposto a ajudar neste trabalho, sequenciando muitas das amostras aqui utilizadas, e pela sua amizade e conselhos tanto para a vida profissional quanto pessoal.

À Ms^a. Bibiana, por ter disposto do seu tempo para auxiliar neste trabalho, por se preocupar e auxiliar na realização deste projeto.

À minha companheira de mestrado, Leili, pela ajuda, companhia, pelas horas dentro e fora do laboratório e por todos os anos de amizade.

Às “xuxus”, Amanda, Bruna Chê, Leili, May, Mille e Rafa (em ordem alfabética pra ninguém reclamar), por todos esses (sete) anos de amizade, e que apesar de toda a dificuldade, sempre dão um jeitinho de se encontrar e colocar a conversa em dia. Amo muito todas!

À minha família, que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos, sem dúvida, vocês foram peças fundamentais para que eu fosse bem sucedida nessa etapa da minha vida.

A todos aqueles que de algum modo colaboraram para que esse trabalho se concretizasse.

RESUMO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por inflamação crônica que causa erosões e deformidades nas articulações, podendo ter acometimento de órgãos como pulmão e coração. A molécula HLA-G está relacionada com a inibição de células do sistema imune, como células T e NK, conferindo proteção contra respostas inflamatórias. Entre os polimorfismos ligados à sua expressão, estão os localizados na região 3'UTR do gene *HLA-G*, que incluem dez sítios polimórficos descritos: um polimorfismo de inserção ou deleção (*InDel*) de um fragmento de 14pb e nove SNPs (+3001, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G, +3196 G/C e +3227 A/G). A partir disso, o objetivo desse estudo será realizar um estudo caso-controle e verificar a influência desses polimorfismos na manifestação da doença. A família *Alu* é o elemento móvel mais comum em genomas de primatas, com mais de 1,1 milhões de cópias no *Homo sapiens*. A inserção *AluHG* encontra-se entre os loci *HLA-A* e *HLA-G*, podendo ser um marcador da região. A partir disso, o objetivo desse estudo foi genotipar 115 pacientes e 115 controles (classificados por faixa etária) e verificar a influência desses polimorfismos na manifestação da doença. Para isso, foi realizado um levantamento de dados epidemiológicos e clínicos relacionados à manifestação da doença (hábito tabagista, fator reumatoide, proteína C-reativa e velocidade de hemossedimentação) e estes foram testados. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita por PCR e visualização em eletroforese em gel vertical de poliacrilamida em concentração de 7%, corado com nitrato de prata, no caso do polimorfismo de 14pb do *HLA-G*, e em gel de agarose 1%, corado com *GelRedTM*, no caso do polimorfismo *AluHG* (com 322pb). Os SNPs do *HLA-G* foram identificados por meio de sequenciamento pelo método de Sanger. Foram realizados cálculos das frequências alélicas e genotípicas, análises de associações e inferência de haplótipos. Após as análises foram encontrados valores significativos de associação dos polimorfismos e a manifestação de AR para os genótipos +3196*G*C (OR=2,387, $p=0,026$), *AluHG*In* (OR=0,524, $p=0,006$) *AluHG*Del* (OR=1,907, $p=0,006$), *AluHG*In*Del* (OR=0,441, $p=0,006$), *AluHG*Del*Del* (OR=2,466, $p=0,002$). Para os modelos de herança, foram encontradas associações com: +3010*G+GC (OR=0,658, $p=0,011$), +3010*C+GC (OR=1,519, $p=0,011$), +3142*G+GC (OR=1,435, $p=0,029$), +3142*C+GC (OR=0,697, $p=0,029$), *AluHG*DD+IDxII* (OR=0,402, $p=0,002$), *AluHG*I+ID* (OR=0,465,

$p=0,000$), *Alu*YG**D+ID* (OR=2,152, $p=0,000$). Para os dados clínicos, foram encontradas as seguintes associações: FR e +3010*GG (OR=4,685, $p=0,032$) e +3196*GC (OR=0,388, $p=0,049$), CRP e +3196*GC (OR=0,301, $p=0,011$) e +3196*CC (OR=2,713, $p=0,035$), VHS e +3003*C (OR=0,296, $p=0,042$) e +3003*T (OR=3,382, $p=0,042$). Para os haplótipos e combinações haplotípicas, foram encontrados: *UTR5* (OR=2,174, $p=0,048$), *UTR1+UTR5* (OR=5,532, $p=0,034$); nos modelos de herança *UTR5* (OR=2,346, $p=0,038$), *UTR1+Alu*YG**Ins* (OR=0,556, $p=0,047$), *UTR5+Alu*YG**Del* (OR=2,247, $p=0,050$). Em conclusão, este estudo permitiu investigar a possibilidade de associação do gene *HLA-G* em relação à Artrite Reumatoide, corroborando com dados encontrados na literatura e trazendo alguns dos resultados de associação com doenças autoimunes, que não haviam sido encontrados em nenhuma literatura até o momento. Mais estudos funcionais devem ser realizados para melhor compreender como os polimorfismos genéticos podem agir na patogênese da AR.

Palavras chave: Artrite Reumatoide. *HLA-G*. *Alu*YG. Doença autoimune. Estudo de associação. Genética epidemiológica.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammation causing erosions and deformity in the joints, and may be of involvement of organs such as lung and heart. The HLA-G is associated with the inhibition of immune cells, such as NK and T cells, conferring protection against inflammatory responses. Among the polymorphisms linked to its expression are the ones located in the 3'UTR region of the gene that include ten polymorphic sites described: a polymorphism of insertion or deletion (*InDel*) with a fragment of 14bp and nine SNPs (+3001C/T, +3003C/T, +3010C/G, +3027A/C, +3035C/T, +3142G/C, +3187A/G, +3196G/C and +3227A/G). From this, the objective of this study will be to conduct a case-control study and the influence of these polymorphisms in disease manifestation. *Alu* family is the most common mobile element in primate genomes, with more than 1.1 million copies in *Homo sapiens*. The insertion *AluHG* located between the loci *HLA-A* and *HLA-G*, may be a marker region. From this, the objective of this study was to genotype 115 patients and 115 controls (classified by age group) and the influence of these polymorphisms in the demonstration and development of the disease. For this, a survey was conducted of epidemiological and clinical data related to the development of the disease (smoking habits, rheumatoid factor, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate) and these were tested. DNA was extracted from whole blood by PCR and genotyping made and viewed in vertical gel electrophoresis in polyacrylamide concentration of 7% stained with silver nitrate in the case of polymorphism of 14bp of the *HLA-G*, and 1% agarose gel in *AluHG* case polymorphism (with 322pb). The *HLA-G* SNPs were identified through sequencing by the Sanger method. Calculations were made of the allele and genotype frequencies, analyzes of associations and haplotype inference. The analysis found associations of the polymorphisms and the risk of developing RA for genotypes +3196*G*C (OR=2,387, $p=0,026$), *AluHG*In* (OR=0,524, $p=0,006$) *AluHG*Del* (OR=1,907, $p=0,006$), *AluHG*In*Del* (OR=0,441, $p=0,006$), *AluHG*Del*Del* (OR=2,466, $p=0,002$). For heritage models, associations were found with: +3010*G+GC (OR=0,658, $p=0,011$), +3010*C+GC (OR=1,519, $p=0,011$), +3142*G+GC (OR=1,435, $p=0,029$), +3142*C+GC (OR=0,697, $p=0,029$), *AluHG*DD+IDxII* (OR=0,402, $p=0,002$), *AluHG*I+ID* (OR=0,465, $p=0,000$), *AluHG*D+ID* (OR=2,152, $p=0,000$). For the clinical data, the following associations were found: RF and +3010*GG (OR=4,685,

$p=0,032$) and $+3196*GC$ ($OR=0,388$, $p=0,049$), CRP and $+3196*GC$ ($OR=0,301$, $p=0,011$) and $+3196*CC$ ($OR=2,713$, $p=0,035$), ESR and $+3003*C$ ($OR=0,296$, $p=0,042$) and $+3003*T$ ($OR=3,382$, $p=0,042$). For haplotypes and haplotype combinations were found: *UTR5* ($OR=2,174$, $p=0,048$), *UTR1+UTR5* ($OR=5,532$, $p=0,034$); in heritage models: *UTR5* ($OR=2,346$, $p=0,038$), *UTR1+AluYG*Ins* ($OR=0,556$, $p=0,047$), *UTR5+AluYG*Del* ($OR=2,247$, $p=0,050$). In conclusion, this study allowed us to investigate the possible association of *HLA-G* gene in relation to rheumatoid arthritis, corroborating with the data in the literature and bringing some of the association results with autoimmune diseases who had not found any literature to date. More functional studies should be conducted to better understand how genetic polymorphisms can act in the pathogenesis of RA.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. *HLA-G*. *AluYG*. Autoimmune disease. Association study. Epidemiological genetics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Visão esquemática de uma articulação normal (a) e uma articulação afetada por AR (b). A articulação afetada pela AR (b) mostra o aumento da inflamação e da atividade celular.....23
- Figura 2:** Rede de citocinas em Artrite Reumatoide. Macrófagos e fibroblastos são adjacentes um ao outro no revestimento sinovial, produzindo citocinas que podem ativar as suas células vizinhas ou a própria célula.....24
- Figura 3.** A localização da região do MHC humano no cromossomo 6, a disposição dos genes dentro das classes II, III e I, e em amarelo destaque para o *locus HLA-G*.....26
- Figura 4.** Estrutura do gene *HLA-G* e sua expressão. O RNA transcrito primário e seus seis processamentos em mRNAs possíveis estão ilustrados, assim como a identificação dos éxons presentes e a localização de códons de parada. São geradas sete isoformas proteicas por processamento alternativo, sendo quatro aderidas à membrana e três solúveis.....28
- Figura 5.** Sequências de nucleotídeos da região 3' não traduzida do gene *HLA-G*, onde estão identificados 11 sítios de variações polimórficas. Em negrito os polimorfismos observados que podem influenciar a expressão do gene.....29
- Figura 6.** Localização da inserção *AluYHG* no bloco do MHC: (A) mapa do local e da distribuição de genes e pseudogenes *HLA* de classe I, incluindo os genes *HLA-A*, *HLA-H* e *HLA-G*; (B) mapa da localização do sítio de inserção *AluYHG* em relação aos *loci HLA-H* e *-G*; (C) A sequência *AluYHG* é representada pela caixa que é flanqueada por sequências de repetição direta (sublinhada).....34
- Figura 7.** Gel de poliácridamida corado com nitrato de prata. O gel digitalizado ilustram bandas que apresentam uma inserção (1), uma deleção (2) e uma inserção/deleção (3), devido a diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA.....46
- Figura 8** - Gel de agarose a 1%, na presença do corante fluorescente *GelRed™*. Podem-se visualizar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, 540pb (presença da inserção *AluYHG*) e 218pb (ausência da inserção *AluYHG*), após corrida eletroforética de 30 minutos, a 90V. O gel digitalizado ilustra a presença de uma deleção (raia 1), uma inserção (raia 2) e uma inserção/deleção (raia 3).....47
- Figura 9.** Cromatografia resultante do alinhamento de uma das amostras sequenciadas. Nesta ilustração, estão representados os SNPs +3003 (Y)

e +3010 (S). Para o primeiro SNP (Y), o indivíduo em questão é homocigoto (TT, cor vermelha) enquanto que, para o segundo SNP (S) é heterocigoto (GC, cores preta e azul, respectivamente).....50

Figura 10. Alguns miRNAs que podem influenciar a expressão do gene *HLA-G* ilustrados. Os sítios de variações da 3'UTR do gene *HLA-G* em negrito.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Criteria</i> para AR 2010 estabelecidos pelos ACR/EULAR...	21
Tabela 2: Classificação da amostra, de acordo com o sexo e idade, entre pacientes com artrite reumatoide (casos) e indivíduos sem a doença (controle).....	55
Tabela 3: Valores de p significativos para os cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento da artrite reumatoide.....	56
Tabela 4: Valores de p significativos para as análises de modelos de herança genética para os polimorfismos do gene <i>HLA-G</i> e inserção <i>AluyHG</i> em pacientes e indivíduos-controles.....	57
Tabela 5: Frequências dos dados clínicos fator reumatoide (FR), proteína C reativa (CRP) e velocidade de hemossedimentação (VHS) analisadas em pacientes com AR.....	57
Tabela 6: Valores de p significativos para as análises de dados clínicos e frequências alélicas e genóticas em pacientes com AR.....	58
Tabela 7: Probabilidade (p) do teste exato de desequilíbrio de ligação para os onze sítios polimórficos detectados em pacientes e indivíduos-controle ($p \leq 0,05$).....	59
Tabela 8: Diferenciação gênica e genotípica baseadas nos 11 <i>loci</i> estudados.....	60
Tabela 9: Valores de p significativos para os haplótipos inferidos para 3'UTR do <i>HLA-G</i> e o desenvolvimento da AR.....	61
Tabela 10: Valores de p significativos para as combinações haplotípicas para 3'UTR do <i>HLA-G</i> e o desenvolvimento da AR.....	61
Tabela 11: Valores de p significativos para as combinações haplotípicas para 3'UTR do <i>HLA-G</i> e o desenvolvimento da AR.....	62
Tabela 12: Valores de p significativos para as combinações haplotípicas para 3'UTR do <i>HLA-G</i> em conjunto com a inserção <i>AluyHG</i> e o desenvolvimento da AR.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês, <i>antigen-presenting cell</i>)
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AR	Artrite Reumatoide
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CRP	Proteína C-reativa (do inglês, <i>C-reactive protein</i>)
DEL	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido Etilenediaminotetraacético (do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
EXO	Exonuclease I
FR	Fator Reumatoide
g	Força centrípeta
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (do inglês, <i>human leukocyte antigen</i>)
HU	Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago
IC	Intervalo de Confiança
IL	Interleucina
INF	Interferon
INS	Inserção
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LD	Desequilíbrio de ligação
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LINE	Elementos longos intercalados (do inglês, <i>long interspersed elements</i>)
LTR	Repetições terminais longas (do inglês, <i>Long Terminal Repeat</i>)
mA	Mili Amperagem
miRNA	Micro RNA
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
	MEI

MHC	Inserção de elementos móveis (do inglês, <i>mobile element insertions</i>)
mRNA	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	(do inglês, <i>major histocompatibility complex</i>)
n	RNA mensageiro
OR	Células <i>Natural Killer</i>
PAGE	Número amostral
pb	Razão de Chance (do inglês, <i>odds ratio</i>)
QSP	Eletroforese em gel de poliacrilamida
ROS	Pares de Base
rpm	Quantidade Suficiente Para
SAP	Espécies reativas de oxigênio
SBR	Rotações Por Minuto
SINE	Fosfatase Alcalina de Camarão
SNP	Sociedade Brasileira de Reumatologia
UFSC	Elementos curtos intercalados (do inglês, <i>short interspersed elements</i>)
URR	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>)
UTR	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Região reguladora a montante (do inglês, <i>upper regulatory region</i>)
Th	Região não traduzida (do inglês, <i>untranslated region</i>)
TA	Ultravioleta
V	T auxiliares (do inglês, <i>T helper</i>)
VHS	Temperatura ambiente
W	Volts
WL	Velocidade de hemossedimentação
	Potência em watts
	Luz Branca (do inglês, <i>white light</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 ARTRITE REUMATOIDE.....	19
1.1.1 Epidemiologia.....	25
1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	25
1.3 GENE <i>HLA-G</i>	27
1.4 <i>HLA-G</i> E ARTRITE REUMATOIDE.....	31
1.5 INSERÇÃO <i>ALUYHG</i>	32
2 JUSTIFICATIVA.....	37
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	41
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	41
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	42
4.4 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO INDEL DA REGIÃO 3'UTR.....	43
4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase.....	43
4.4.2 Análise do Produto Amplificado.....	44
4.4.3 Coloração com Nitrato de Prata.....	45
4.4.4 Leitura dos Resultados no Gel.....	46
4.5 GENOTIPAGEM <i>AluyHG</i>	46
4.5.1 Leitura dos resultados no gel.....	47
4.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO 3'UTR.....	48
4.6.1 Purificação das Amostras.....	48
4.6.2 PCR para a Reação de Sequenciamento.....	48
4.6.3 Precipitação das Amostras.....	40
4.6.4 Leitura do Sequenciamento das Amostras.....	49
4.6.5 Análises das Sequências.....	50
4.7 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
4.7.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	50
4.7.2 Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas.....	51
4.7.3 Análises de Associação.....	51
4.7.4 Desequilíbrio de Ligação.....	52
4.7.5 Inferência de Haplótipos.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	55
5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	56

5.2.2	Frequências Alélicas, Genotípicas e Análises de Associação.....	56
5.3	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	59
5.4	DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES.....	60
5.5	INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS.....	60
6.	DISCUSSÃO	63
6.1	DADOS GÊNICOS E GENOTÍPICOS.....	63
6.2	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	65
6.3	DADOS CLÍNICOS E DADOS GÊNICOS E GENOTÍPICOS.....	65
6.4	DADOS HAPLOTÍPICOS.....	66
7.	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS.....	71
	APÊNDICE A.....	85
	APÊNDICE B.....	91
	APÊNDICE C.....	93
	APÊNDICE D.....	94
	APÊNDICE E.....	95
	APÊNDICE F.....	99
	APÊNDICE G.....	103
	APÊNDICE H.....	106
	APÊNDICE I.....	107
	APÊNDICE J.....	108
	APÊNDICE K.....	110
	APÊNDICE L.....	113
	APÊNDICE M.....	114
	ANEXO A.....	115
	ANEXO B.....	116
	ANEXO C.....	123
	ANEXO D.....	125
	ANEXO E.....	130

1. INTRODUÇÃO

Uma doença autoimune ocorre quando o sistema imune começa a atacar e destruir tecidos saudáveis próprios. As doenças autoimunes incluem mais de 80 diferentes distúrbios que afetam aproximadamente 5% da população dos países ocidentais. Elas apresentam uma grande variabilidade em termos de tecidos alvo, idade de manifestação e resposta a tratamentos com imunossuppressores (Lleo *et al.*, 2010; Selmi *et al.*, 2004; Selmi & Gershwin, 2009; USNLM, 2013).

As células brancas do sangue, pertencentes ao sistema imunitário humano, ajudam a proteger contra substâncias nocivas, como bactérias, vírus, toxinas, células cancerosas e outros invasores estranhos ao corpo. Isto porque, estes invasores contêm antígenos e o sistema imune produz anticorpos contra estes antígenos, assim permitindo que estas substâncias nocivas sejam destruídas. Quando se tem uma doença autoimune, o sistema imunitário não faz distinção entre tecidos saudáveis e antígenos, tendo como resultado o desencadeamento de uma reação que destrói os tecidos normais. A causa exata das desordens autoimunes é desconhecida, mas há teorias de que alguns microorganismos (tais como bactérias ou vírus) ou drogas possam ajudar a provocar alterações que confundam o sistema imunológico. Sabe-se ainda que isso pode acontecer com mais frequência em pessoas que têm genes que as tornam mais propensas a doenças autoimunes (Lleo *et al.*, 2010; Selmi *et al.*, 2004; Selmi & Gershwin, 2009; USNLM, 2013).

Uma característica compartilhada das doenças autoimunes é a contribuição de ambas as respostas imunes, tanto humoral quanto celular, à lesão tecidual (Lleo *et al.*, 2010; Selmi *et al.*, 2004; Selmi & Gershwin, 2009; USNLM, 2013).

1.1 ARTRITE REUMATOIDE

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune, sistêmica e inflamatória crônica que acomete principalmente as articulações, causando inflamação da sinóvia - um dos tecidos que envolvem as articulações - podendo levar à destruição óssea e cartilaginosa nesses locais. Por possuir natureza sistêmica, além do processo inflamatório que ocorre nas articulações, a AR pode apresentar manifestações extra-articulares, como acometimento pulmonar,

cardíaco, ocular e esquelético, que atingem até 40% dos pacientes, estando relacionadas a uma manifestação da doença mais severa (Klareskog *et al.*, 2009; McInnes & Schett, 2011; Myasoedova *et al.*, 2011; Prete *et al.*, 2011; Turesson *et al.*, 2007). As membranas sinoviais e estruturas articulares inflamadas levam a sintomas como dor, hiperplasia (inchaço) e rigidez, e com a progressão da doença, os pacientes desenvolvem deformidades irreversíveis nas articulações, causando a incapacidade para realização de suas atividades cotidianas e redução da qualidade de vida (ANVISA, 2012; McInnes & Schett, 2011; Mota *et al.*, 2012). A AR avançada pode ocasionar uma menor sobrevida do paciente, o que apenas confirma a gravidade dessa doença (ANVISA, 2012; Mota *et al.*, 2012).

Usualmente o diagnóstico para a doença é feito baseado nos critérios estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) e o *European League Against Rheumatism* (EULAR), onde uma pontuação mínima, de acordo com tais critérios, determina o diagnóstico da doença (Tabela 1). Estes critérios substituíram os definidos em 1987, que eram limitados por serem pouco sensíveis e inespecíficos para detectar casos precoces da doença, sendo modificados então para critérios capazes de identificar a doença tanto precoce como estabelecida (ACR, 2010; EULAR & ACR, 2010; Scott *et al.*, 2010).

Apesar de possuir causa desconhecida, sabe-se que existem fatores genéticos, ambientais (como tabagismo) e hormonais que influenciam no desenvolvimento da doença (Choy, 2012). Alguns biomarcadores foram identificados, como o alelo *HLA-DRB1*, considerado o fator de risco mais associado à doença encontrado até o momento, e alguns outros genes de moléculas não-HLA, como *PTPN22*, *TNF α* , *STAT4*, *IL2*, entre outros (Choy, 2012; Foti *et al.*, 2014; McInnes & Schett, 2011).

O hábito tabagista é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da AR (Oliver & Silman., 2006). Além de o hábito de fumar cigarros aumentar a chances de desenvolver a doença, com um risco até 13 vezes maior para ambos os sexos, um ex-fumante reduz suas chances de desenvolver a doença consideravelmente (Oliver & Silman, 2006). Considerando que a doença pode ter envolvimento de fatores ambientais, não é de se surpreender que as substâncias do cigarro (que inclui aproximadamente 4,7 mil substâncias tóxicas, como monóxido de carbono, cianetos, hidrazina, hidro-quinona, entre outros) exerçam uma atividade sobre a manifestação da doença (Ghaussy *et al.*,

2003; Ministério da Saúde, 2012; Oliver & Silman, 2006; Pyatt & Stillman, 1998).

Tabela 1: *Criteria* para AR 2010 estabelecidos pelos ACR/EULAR.

1- Envolvimento de articulações^{a, b}:	Pontos
a) Uma articulação média a larga	0
b) Duas a dez articulações médias a largas	1
c) Uma a três pequenas articulações	2
d) Quatro a dez pequenas articulações	3
e) Mais de dez articulações (pelo menos uma pequena articulação)	5
2- Sorologia	
a) RF e ACPA negativos	0
b) FR baixo positivo ou ACPA baixo positivo	2
c) FR alto positivo ou ACPA alto positivo	3
3- Reagentes de fase aguda	
a) CRP normal e VHS normal	0
b) CRP anormal ou VHS anormal	1
4- Duração dos sintomas	
a) Menor de 6 semanas	0
b) Igual ou maior que 6 semanas	1

Pontuação de corte de 6 pontos ou mais para a artrite reumatoide*. Os pacientes também podem ser classificados como tendo artrite reumatoide se apresentarem: (a) erosões típicas; (b) doença de longa data prévia que satisfaz os critérios de classificação.

* uma pontuação ≥ 6 indica diagnóstico de AR;

^adefinição de pequenas articulações: metacarpofalangeal, interfalangeal proximal, 2º ao 5º metatarsofalangeal e articulações interproximais do polegar e pulsos;

^bdefinição de grandes articulações: ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos.

ACPA – anticorpo anti-proteína citrulinada; CRP – proteína C-reativa; FR – fator reumatoide; VHS – velocidade de hemossedimentação.

Adaptado de: European League Against Rheumatism & American College of Rheumatology, 2010, Rheumatoid Arthritis Classification.

A AR é caracterizada pela produção de autoanticorpos, onde uma variedade desses estão presentes no soro e líquido sinovial de pacientes (McInnes & Schett, 2011). Entre eles, podemos destacar o fator reumatoide (FR), que é um anticorpo contra a porção Fc do IgG,

sendo encontrado no soro de cerca de 70% dos pacientes com AR e se correlacionando na predição de um pior prognóstico (Mota *et al.*, 2009; Mota *et al.*, 2011; Reudineau *et al.*, 2005; Visser & Coussens, 2005). O diagnóstico do FR pode variar ao longo do curso da doença, onde no início do quadro podem ser soronegativos, porém a negatividade do FR não exclui o diagnóstico de AR, e a sua positividade precisa ser cuidadosamente interpretada de acordo com demais achados clínicos (Mota *et al.*, 2009; Mota *et al.*, 2011; Reudineau *et al.*, 2005).

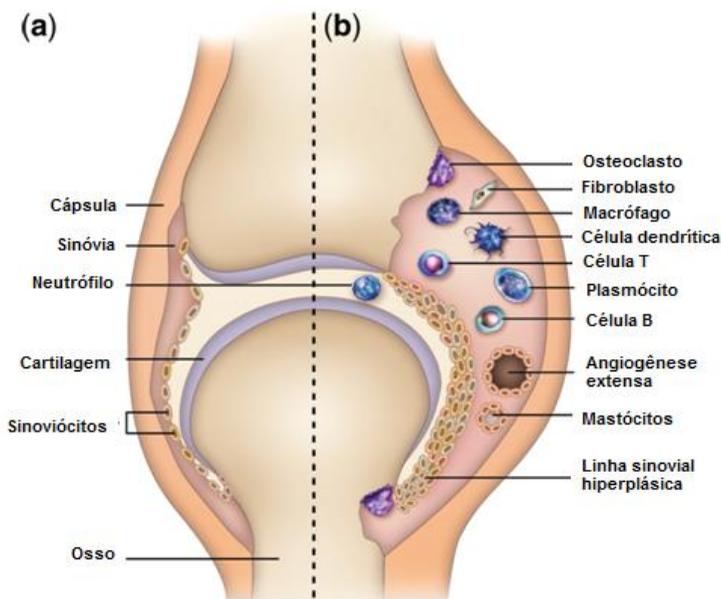
Por ser uma doença de característica inflamatória, fazer a detecção de marcadores inflamatórios se torna essencial para um melhor prognóstico e diagnóstico de AR. Um marcador da atividade inflamatória é o teste da velocidade de hemossedimentação (VHS), que mede a velocidade em que os eritrócitos se sedimentam no plasma, medindo indiretamente o aumento de fibrinogênio na corrente sanguínea, sendo uma ferramenta para detecção de inflamações (Aguiar *et al.*, 2013; Junior *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Neto & Carvalho, 2009; Piccirillo *et al.*, 2004). A proteína C-reativa (CRP) cuja concentração aumenta na fase aguda também é utilizada para detectar inflamação, e sua concentração sérica altera-se mais rapidamente e com uma variação mais ampla que a VHS (Aguiar *et al.*, 2013; Junior *et al.*, 2006; Neto & Carvalho, 2009; Piccirillo *et al.*, 2004). Ambos os testes são inespecíficos, detectando a presença de um processo inflamatório, porém sem determinar sua origem, sendo inespecíficos se avaliados sem um contexto clínico. Mais do que critérios para o diagnóstico de AR, os testes servem também para avaliar o prognóstico e monitorar a eficácia do tratamento para a doença (Aguiar *et al.*, 2013; Junior *et al.*, 2006; Neto & Carvalho, 2009; Piccirillo *et al.*, 2004)

O processo inflamatório das membranas sinoviais, uma vez estabelecido, permite que mecanismos de amplificação da resposta imune - como secreção de citocinas por linfócitos T - contribuam para manutenção da inflamação da sinóvia, que se torna persistente e promove alterações na membrana sinovial (Choy, 2012; Scott *et al.*, 2010; Strand *et al.*, 2007). Em uma articulação normal, essa membrana possui uma única camada celular, enquanto que na inflamação, como no caso da AR, essa membrana começa a apresentar várias camadas de células (Choy, 2012; Scott *et al.*, 2010). Na interface entre a cartilagem e o osso verifica-se intensa atividade do tecido sinovial, que se torna bastante invasivo e passa a ser chamado *pannus* (Culshaw *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2010). Ocorre ainda, intensa angiogênese e infiltração por

diversos subtipos de leucócitos (Choy, 2012; McInnes & Schett, 2011) (Figura 1).

Os linfócitos B, que fazem parte da imunidade humoral, possuem diversas funções no desenvolvimento e manutenção da AR, incluindo a ativação de linfócitos T, secreção de citocinas e produção de autoanticorpos (Firestein, 2003; Mandik-Nayak, *et al.*, 2008; McInnes & Schett, 2011). A secreção de citocinas pode ser realizada por diversos tipos celulares como macrófagos, fibroblastos e células T. Esses tipos celulares, quando infiltrados na articulação inflamada, são responsáveis pela liberação de: IL1, IL2, IL4, IL6, IL10, IL13, IL15, IL17, IL18, IL22, IL33, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) (Fig 2) (Firestein, 2003; McInnes & Schett, 2011).

Figura 1. Visão esquemática de uma articulação normal (a) e uma articulação afetada por AR (b). A articulação afetada pela AR (b) mostra o aumento da inflamação e da atividade celular.

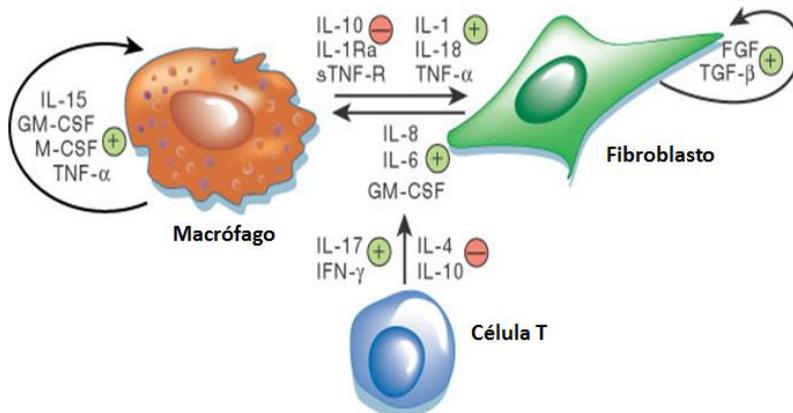


Fonte: adaptado de Choy, 2012.

As citocinas estão altamente relacionadas aos mecanismos da patogênese da AR. Elas regulam a diferenciação dos linfócitos T entre

as populações *T helper 1* (Th1) e *T helper 2* (Th2). De acordo com o padrão de citocinas produzido, a AR foi considerada por muitos anos uma doença dominada por linfócitos do tipo Th1, o qual a resposta promove a ativação de células como macrófagos e neutrófilos. Os produtos liberados por essas células, como espécies reativas de oxigênio (ROS), podem provocar a lesão tecidual que é verificada na AR (Boissier, 2011; Firestein, 2003; McInnes & Schett, 2011).

Figura 2: Rede de citocinas em Artrite Reumatoide. Macrófagos e fibroblastos são adjacentes um ao outro no revestimento sinovial, produzindo citocinas que podem ativar as suas células vizinhas ou a própria célula.



Legenda: (-) citocinas anti-inflamatórias; (+) citocinas pró-inflamatórias

Fonte: adaptado de Firestein, 2003.

A imunidade adaptativa e seus fatores parecem desempenhar um papel chave na patogênese da AR, o que pode ser verificado pela presença de autoanticorpos e associações com inúmeros genes envolvidos no sistema imune adaptativo (McInnes & Schett, 2011). A noção de que as células T participam da etiologia e patogenia da AR foi um avanço intelectual fundamental em nossa compreensão da doença (Firestein, 2003).

Apesar de todos os avanços obtidos no tratamento da doença, os fatores que desencadeiam a perda de tolerância e direcionam o processo inflamatório para as articulações não estão totalmente esclarecidos (McInnes & Schett, 2011).

1.1.1 – EPIDEMIOLOGIA

A AR acomete de duas a três vezes mais mulheres que homens, afetando de 0,5- 1,0% da população mundial, sendo uma das condições reumatológicas mais frequentes na clínica médica (Jacob & Jacob, 2012; Mota *et al.*, 2012; Pereira, 2007). Essa prevalência do gênero feminino e o pior prognóstico de AR indica que o envolvimento hormonal seria importante no desenvolvimento da doença (Alamanos & Drosos, 2005; Alamanos *et al.*, 2006; Carmona *et al.*, 2010; Symmons, 2002; Tobón *et al.*, 2010). A idade média de manifestação da AR é entre a 4ª e 5ª década de vida, porém pode se manifestar em qualquer faixa etária, sendo que a AR prematura tende a possuir um maior acometimento sistêmico (Alamanos *et al.*, 2006; Foti *et al.*, 2014; Tóbon *et al.*, 2010).

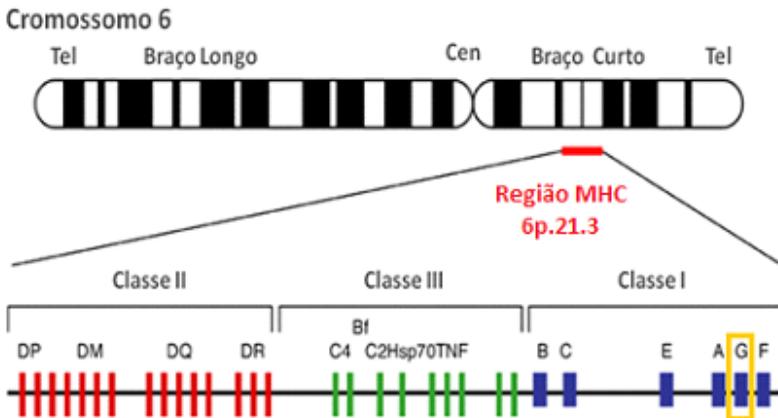
Em relação à população geral, a taxa de mortalidade é duas vezes maior e a expectativa de vida é reduzida. Os pacientes com AR vivem de 3 a 10 anos menos que a média populacional. Além disso, possuem um risco mais elevado de desenvolver um grande número de comorbidades associadas, como: hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e osteoporose (Gullick & Scott, 2011; Prete *et al.*, 2011).

1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

A descoberta da função do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), fundamental no reconhecimento dos antígenos pelas células T CD4 e CD8 (grupamento de diferenciação, do inglês *cluster of differentiation*) revolucionou o campo da imunologia na compreensão da ativação e das funções dos linfócitos. Em humanos, no MHC, encontram-se genes denominados como Antígeno Leucocitário Humano (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*), que se localizam no braço curto do cromossomo seis, mais especificamente na posição 6p21.3, ocupando uma região cromossômica de aproximadamente 3,6 megabases de DNA (ácido desoxirribonucleico) que contém mais de 200 genes, muitos com importante papel no sistema imune (Aguado *et al.* 1999; Castelli *et al.*, 2011; Dawkins *et al.* 1999; Donadi *et al.*, 2011; Parham, 2005; Rhodes & Trowsdale 1999). A região do complexo MHC pode ser didaticamente subdividida em três, de acordo com a estrutura e função dos produtos moleculares codificados por seus genes (Figura 3) (Horton *et al.*, 2004).

A região de classe I contém seis *loci* gênicos, que são divididos em clássicos (ou classe Ia) e não clássicos (ou classe Ib). Os genes clássicos incluem *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, que possuem expressão constitutiva na membrana celular de quase todas as células nucleadas. Os genes não clássicos, que são menos polimórficos que os de classe Ib, incluem *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*. Os genes *HLA-E* e *HLA-F* também apresentam expressão constitutiva, porém em níveis mais baixos quando comparados aos genes clássicos. O *HLA-G* por sua vez apresenta expressão celular restrita, sendo o objeto desse estudo. Além destes, existem os *loci* *HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K*, *HLA-L*, *HLA-P*, *HLA-T*, *HLA-U*, *HLA-V*, *HLA-W*, *HLA-X*, *HLA-Y*, entre outros, sem produto proteico associado e, portanto, classificados de pseudogenes (IMGT, 2015; Rizzo *et al.*, 2012).

Figura 3. A localização da região do MHC humano no cromossomo 6, a disposição dos genes dentro das classes II, III e I, e em amarelo destaque para o *locus* *HLA-G*.



Fonte: adaptado de Mehra & Kaur, 2003.

As moléculas de classe II estão contidas no *HLA-D*, que foi subdividido nas sub-regiões *DP*, *DM*, *DQ* e *DR*. Outros genes são encontrados nessa região (como *TAP1* e *TAP2* e *LMP2*, entre outros), contudo nem todos codificam produtos moleculares do grupo de antígenos de histocompatibilidade (Graham *et al.*, 2002; Lewin, 2009).

Na região de classe III (localizada entre as regiões I e II), encontram-se genes importantes para a imunidade inata, como genes que

atuam na ativação do sistema complemento, como *Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*, genes que codificam citocinas, como *TNF α* e *LT β* , entre outros (Graham *et al.*, 2002; Lewin, 2009).

1.3 – GENE *HLA-G*

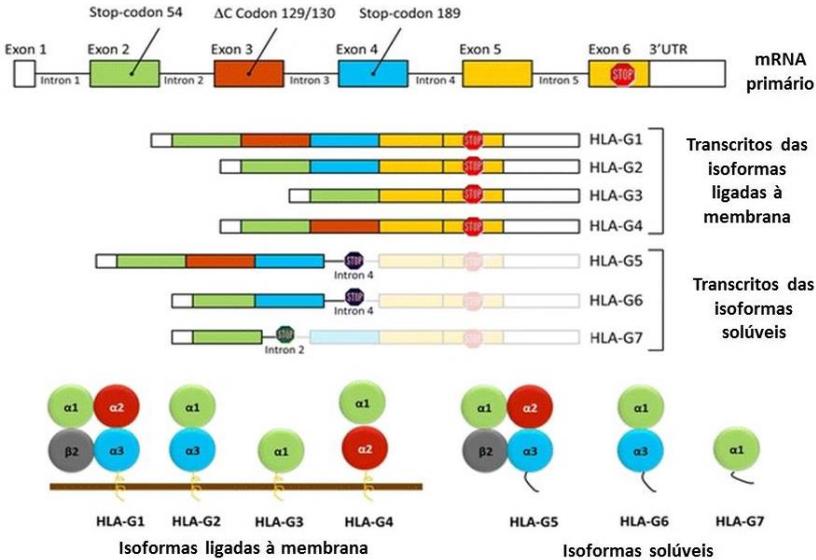
O *HLA-G* possui 4.396 pares de base (pb) em sua estrutura, que são divididos em sete íntrons e oito éxons (Figura 4) (Castelli *et al.*, 2011; Donadi *et al.*, 2011; Moreau *et al.*, 2009). O éxon 1 transcreve para o peptídeo sinal, os éxons 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares da proteína ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, respectivamente), o éxon 5 codifica o domínio transmembranar, portanto ausente nas isoformas solúveis. O éxon 6 é responsável por codificar a cauda citoplasmática da molécula, o códon de parada está presente no segundo códon desse éxon, o que resulta em uma cauda mais curta em comparação às moléculas de HLA I clássicas (Ia). Por último, o éxon 7, embora chamado de éxon, por seguir a classificação dos *HLA* clássicos, não se apresenta no RNA mensageiro (mRNA) maduro, pois é removido durante o processamento do RNA. O éxon 8 não é traduzido, sendo considerado como parte integrante da região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA (Donadi *et al.*, 2011; Larsen & Hviid, 2009; Moreau *et al.*, 2009).

Apesar das funções das isoformas ainda serem pouco compreendidas, tem sido proposto que elas podem estar envolvidas na modulação da resposta imune em diversas situações fisiológicas. A produção das diferentes isoformas de *HLA-G* é direcionada por mecanismos de regulação e, dependendo da situação fisiológica e do tipo celular envolvido, algumas isoformas são expressas e outras não (Campbell *et al.*, 2012).

Os genes do MHC de classe I e II são os mais polimórficos presentes no genoma, com um número estimado total de cerca de 13.400 alelos na população (IMGT, 2015). O *HLA-G*, comparado com os outros genes do HLA, é pouco polimórfico, possuindo 50 alelos descritos, que codificam 16 proteínas distintas (Castelli *et al.*, 2014; Donadi *et al.*, 2011; Larsen & Hviid, 2009). Nas regiões 5'URR (região 5' reguladora, que compõe a região promotora) e 3'UTR, o grau de variações nucleotídicas é relativamente mais alto (Donadi *et al.*, 2011). Na região promotora do *HLA-G* foram identificados, até o ano de 2011, 32 SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *single nucleotide polymorphism*) (Castelli *et al.*, 2011; Castelli *et al.*, 2014). Essas

variações podem implicar, diretamente, na regulação da expressão desse gene, uma vez que, muitos desses polimorfismos estão dentro ou próximos de conhecidos ou supostos elementos reguladores da transcrição (Moreau *et al.*, 2009).

Figura 4. Estrutura do gene *HLA-G* e sua expressão. O RNA transcrito primário e seus seis processamentos em mRNAs possíveis estão ilustrados, assim como a identificação dos éxons presentes e a localização de códons de parada. São geradas sete isoformas proteicas por processamento alternativo, sendo quatro aderidas à membrana e três solúveis.



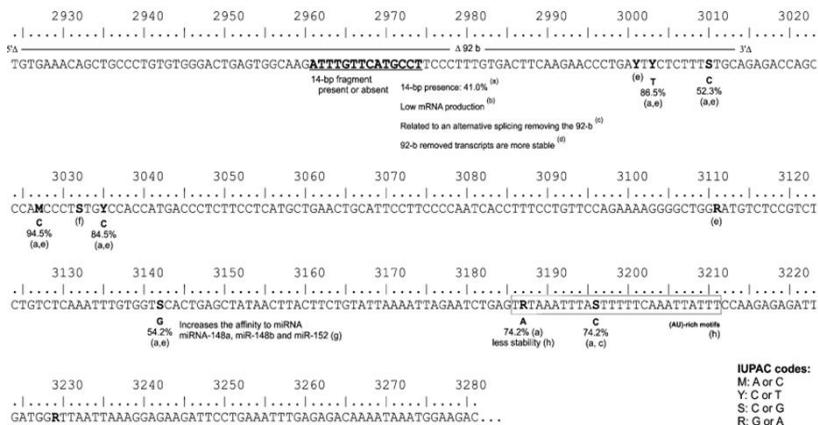
Fonte: adaptado de Donadi *et al.*, 2011.

A região 3'UTR do *HLA-G* possui pelo menos onze sítios polimórficos descritos: um polimorfismo de presença (que aqui chamaremos de inserção, ou *Ins*) ou ausência (que aqui chamaremos de deleção, ou *Del*) de um fragmento de 14pb (*14pb InDel*) e nove SNPs (+3001, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G, +3196 G/C e +3227 A/G) (Figura 5) (Larsen & Hviid, 2009; Menier *et al.*, 2010; Moreau *et al.*, 2009).

Ao menos três desses sítios polimórficos foram associados à regulação dos níveis de expressão do *HLA-G*: (1) o polimorfismo de *14pb InDel*; (2) o SNP na posição +3142; (3) e o na posição +3187 (Larsen & Hviid, 2009; Menier *et al.*, 2010; Moreau *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que o SNP na posição +3142 pode ser um alvo para determinados microRNAs (miRNAs), e o polimorfismo pode estar envolvido a uma maior ou menor degradação do mRNA do *HLA-G* por esta via de miRNAs; o SNP na posição +3187 está relacionado com a estabilidade do mRNA, regulando também sua degradação; e por fim o polimorfismo *14pb InDel* pode estar associado com o controle da produção de HLA-G, podendo também modular a estabilidade do mRNA (O'Brien *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2007; Yie *et al.*, 2008). Os mecanismos que estão envolvidos nesses processos ainda não estão totalmente elucidados (Donadi *et al.*, 2011).

Figura 5. Sequências de nucleotídeos da região 3' não traduzida do gene *HLA-G*, onde estão identificados 11 sítios de variações polimórficas. Em negrito os polimorfismos observados que podem influenciar a expressão do gene.



Fonte: adaptado de Donadi *et al.*, 2011.

A molécula HLA-G foi primeiramente descrita na interface materno-fetal conferindo proteção ao feto, mais especificamente na superfície de células do trofoblasto, células fetais endoteliais e fluido amniótico, conferindo uma proteção imunológica ao feto (Blaschitz *et al.*, 2011; Carosella & Horuzsko, 2007; Hammer *et al.*, 1997).

A expressão dessa molécula se encontra restrita a alguns tecidos específicos, como trofoblasto, córnea, timo, ilhas pancreáticas, precursores endoteliais, eritroblastos, células dendríticas, células apresentadoras de antígenos e macrófagos (Carosella *et al.*, 2015; Curigliano *et al.*, 2013).

Dependendo da situação fisiológica ou clínica, a expressão de HLA-G pode ser benéfica ou prejudicial ao organismo. Em algumas condições patológicas, como nos casos de câncer e nas doenças virais crônicas, nas quais uma resposta imune vigorosa e prolongada é necessária, a expressão de HLA-G é prejudicial. Contrário a isso, nos casos em que uma resposta imune vigorosa é indesejável, a presença de HLA-G é vantajosa, como nos casos de transplantes e de doenças autoimunes (Carosella *et al.*, 2015; Donadi *et al.*, 2011).

Tanto nestes casos quanto em condições saudáveis, as moléculas HLA-G interagem com determinados receptores de membrana, presentes em diversos tipos celulares, inibindo as respostas do sistema imune. Os três receptores, atualmente descritos, relacionados à atividade de HLA-G são: os receptores de leucócitos semelhantes às imunoglobulinas, ILT2 (ILT2/CD85j/LILRB1) e ILT4 (ILT4/CD85d/LILRB2) e o receptor de célula NK (do inglês, *natural killer*) semelhante à imunoglobulina, KIR2DL4 (KIR2DL4/ CD158d) (Campbell *et al.*, 2012; Moreau *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2013). O receptor ILT2 é expresso por linfócitos B, linfócitos T, células NK, células dendríticas, monócitos e macrófagos. O receptor ILT4, por outro lado, é especificamente mieloide, sendo expresso somente por células dendríticas, monócitos e macrófagos. O receptor KIR2DL4 tem sua expressão limitada à subpopulação de NK CD56^{bright}, células essas que constituem uma pequena parcela das células NK periféricas (Carosella *et al.*, 2008; Carosella *et al.*, 2015; Donadi *et al.*, 2011).

Estes três receptores são expressos de maneira diferenciada por cada um dos tipos celulares descritos, e os efeitos das suas interações com HLA-G têm sido demonstrados. A molécula completa de HLA-G apresenta a mesma estrutura extracelular dos HLA clássicos, no entanto a sua principal função não é a apresentação de antígeno, mas a inibição de outras células como as TCD8 e NK, por intermédio da interação direta com receptores como ILT-2 (LILRB1 e CD158j), ILT-4 (LILRB2 e CD58d), e KIR2DL4 (CD158d) (Colonna 1997; Contini *et al.*, 2003; Donadi *et al.* 2011; Gao *et al.* 2000; Ponte *et al.* 1999; Rajagopalan & Long 1999; Santos *et al.*, 2013; Shiroishi *et al.* 2006).

A molécula HLA-G pode inibir, por exemplo, as funções citolíticas das células NK; a maturação de células dendríticas; as funções citolíticas antígenos-específicas das células T CD8, as respostas aloproliferativas das células T CD4; a produção de citocinas por células T, além de induzir a apoptose celular (Donadi. *et al.*, 2011), tendo assim a capacidade de atuar diretamente na atividade das células participantes

da resposta imune. Esta característica tem feito desta molécula um alvo atrativo de estudos para a compreensão dos mecanismos de diversas situações clínicas como, por exemplo: gravidez e suas complicações, transplantes, cânceres, infecções virais e doenças inflamatórias e autoimunes (Carosella *et al.*, 2008; Carosella *et al.*, 2011; Carosella *et al.*, 2015; Donadi *et al.*, 2011).

1.4 HLA-G E ARTRITE REUMATOIDE

A AR é uma doença que implica em uma patogenicidade multifatorial e multigênica. Os genes do HLA constituem uma importante região genética, e sabe-se que contribui para aproximadamente metade da susceptibilidade para AR identificada até o momento (Choy, 2012; Foti *et al.*, 2014; McInnes & Schett, 2011; Veit *et al.*, 2014).

As interações entre a molécula HLA-G e determinados receptores celulares produzem efeitos inibitórios na atividade de algumas células e, conseqüentemente, redução da resposta imune (Carosella *et al.*, 2008; Carosella *et al.*, 2011; Carosella *et al.*, 2015). Estudos demonstram associação de determinados alelos no gene *HLA-DRB1* com o desenvolvimento da doença, mas como tais alelos nem sempre são encontrados nos casos de doenças, outros genes devem estar envolvidos (Catamo, 2014; Choy, 2012; Foti *et al.*, 2014; McInnes & Schett, 2011; Viet *et al.*, 2014).

Muitos dos alelos *HLA-DRB1* que conferem susceptibilidade à doença codificam um motivo compartilhado de cinco aminoácidos, localizados na região de *HLA-DRB1* relacionada à apresentação de antígenos. Esta sequência de aminoácidos, denominada “epítipo compartilhado” (HLA-SE, do inglês HLA-Shared Epitope), foi associada à AR em diferentes populações no grupo ACPA-positivo, tendo sido demonstrado que peptídeos citrulinados podem se ligar com maior afinidade a moléculas contendo o epítipo compartilhado (Alvarez *et al.*, 2008; Bax *et al.*, 2011; Hill *et al.*, 2003; Louzada-Júnior *et al.*, 2008).

A expressão de *HLA-G* fornece um mecanismo de proteção tecidual contra inflamações de origem autoimune. As variações da expressão do gene *HLA-G*, por exemplo, que podem ser decorrentes de polimorfismos do gene, têm sido relacionadas a diversas condições patológicas, como: infecções virais crônicas, tumores, doenças autoimunes e doenças inflamatórias (Donadi *et al.*, 2011; Larsen &

Hviid, 2009). Para essas últimas, dentre as quais está incluída a artrite reumatoide, tem sido proposto que a expressão do *HLA-G* é um possível mecanismo de proteção tecidual contra respostas inflamatórias (Consiglio *et al.*, 2011).

Em pacientes com AR, os níveis plasmáticos solúveis de *HLA-G* (sHLA-G) foram relatados menores do que nos indivíduos controles. Foram também relatadas associações do polimorfismo de 14 pb do *HLA-G* com a produção de auto-anticorpos em outras doenças reumáticas como a artrite idiopática juvenil e resposta ao metotrexato em pacientes com AR. Além disso, as moléculas de *HLA-G* demonstraram se expressar constitutivamente em fibroblastos sinoviais. Estes dados corroboram a função imunomoduladora de *HLA-G*, que também inclui a inibição de células NK e as células T CD8 mediada por citotoxicidade, à inibição de expansão das células T CD4, a maturação de células dendríticas e indução de células apresentadoras de antígeno (Mariaselvam *et al.*, 2015).

1.5 INSERÇÃO *Alu*YG

Além dos *loci* de regiões codificadoras, muitas sequências não-codificadoras foram identificadas no MHC, incluindo os membros da família *Alu*, que possuem sequências repetitivas de DNA dispersas pelo genoma (García-Obregón *et al.*, 2012). Essas sequências de DNA são transponíveis, ou seja, possuem a capacidade de trocar de posição no genoma, podendo apresentar polimorfismos de sítios de inserção e uma variabilidade no número de cópias dentro e entre espécies (Capy *et al.*, 1998). Os elementos transponíveis desempenham um papel significativo na geração de diversidade de sequências de DNA durante a evolução dos primatas (Ullu & Tschudi, 1984).

Os elementos móveis podem ser classificados em aqueles que transpõem diretamente como DNA (transposons do DNA), e aqueles que transpõem através de um intermediário de RNA (retrotransposons). O último grupo pode ser dividido em virais e não virais. (Batzer & Deininger, 2002).

Entre os retrotransposons não virais, os elementos mais abundantes em mamíferos são os que não possuem repetições terminais longas (LTR, do inglês *Long Terminal Repeat*) e são divididos em duas classes: os elementos de inserção longos (LINEs, do inglês *Long Interspersed Element*) e elementos de inserção curtos (SINEs, do inglês *Short Interspersed Element*). Nos seres humanos, os LINEs têm

aproximadamente 6 kb de comprimento e 300 pb. Enquanto que os SINEs constituem 13% do genoma humano e seu comprimento varia entre 100 e 400 pb, a maior parte de 300 pb (Batzer & Deininger, 2002).

Retrotransposons são remanescentes de eventos de retrotransposições antigas, e não são mais capazes de retrotranspor (Capy *et al.*, 1998). No entanto, uma fração de elementos móveis (<0,05%) permanece ativa e contribui para a variação entre indivíduos na população humana. Estes elementos ativos pertencem quase exclusivamente às subfamílias *Alu*, LINE (subfamília L1) e elementos SVA (SINE/VNTR/*Alu*). Este último, uma família de elementos retrotransposons mais jovens na ordem dos primatas, um elemento repetitivo composto, nomeado depois de seus principais componentes: SINE, VNTR e sequências *Alu* (Mills *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005).

As características vantajosas dos elementos *Alu* em estudos moleculares com perspectivas evolutivas foram exaustivamente analisadas por diversos autores (Batzer & Deininger, 2002; Foti *et al.*, 2014; Gómez-Pérez *et al.*, 2011; Lander *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2013; Terreros *et al.*, 2009). Essencialmente, essas características são: (1) a neutralidade seletiva de inserções *Alu* polimórficas, (2) possibilidade de conhecer o estado ancestral (falta de inserção), (3) a existência de uma única mutação comum para todos os cromossomos com a mesma inserção (identidade por descendência e não apenas por estado), (4) e não existir mecanismo conhecido para a remoção completa e específica de um elemento *Alu*. *Loci* do tipo *Alu* podem ser considerados como marcadores estáveis e conservados que refletem eventos evolutivos únicos e com utilidade na reconstrução da história humana demográfica e evolutiva (García-Obregón *et al.*, 2012).

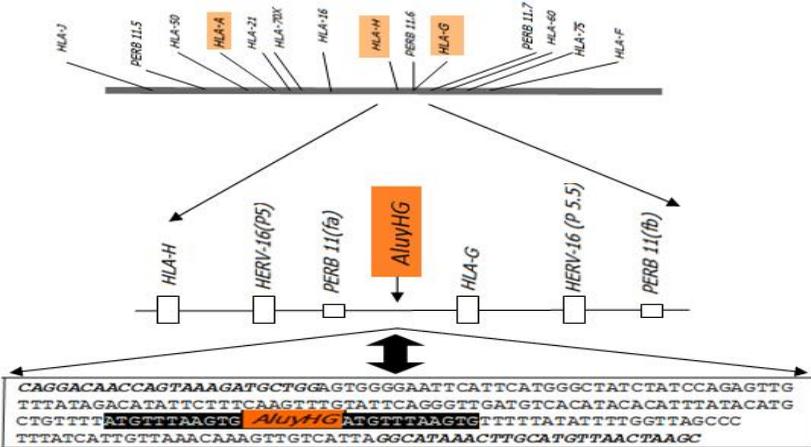
Como consequência do acúmulo de eventos de inserção ao longo do tempo evolutivo, elementos transponíveis constituem atualmente cerca de metade do genoma humano. As famílias de elementos móveis *Alu*, L1, e SVA ainda estão duplicando, gerando variação entre genomas individuais. Inserções de elementos móveis (MEI) foram identificadas como causas de doenças genéticas, incluindo a hemofilia, neurofibromatose e vários cânceres (Stewart *et al.*, 2011).

A família *Alu* é o elemento móvel mais comum em genomas de primatas, com mais de 1,1 milhões de cópias no *Homo sapiens* (Kriegs *et al.*, 2007; Rhead *et al.*, 2010). O comprimento total da sequência de uma inserção *Alu* é de cerca de 300 pb. Elementos *Alu* são classificados em uma gama de sub-famílias, que têm inclinações diferentes para a retrotransposição, e são identificadas de acordo com as

alterações de sequência. Várias sub-famílias de *AluY* estão ativas e são responsáveis pela maior parte da variação de MEI em *Homo sapiens*. O genoma humano de referência contém mais de 140.000 elementos *AluY* anotados (Stewart *et al.*, 2011).

Durante uma análise comparativa da sequência genômica do bloco *HLA* de classe I, Kulski *et al.* (1999) identificaram um novo membro da subfamília *AluYb8*, que foi designado *AluYHG*, alocado entre o *HLA-A* e o *HLA-G*, a aproximadamente 88Kb do gene *HLA-A* (Figura 6) (Kulski *et al.*, 2001).

Figura 6. Localização da inserção *AluYHG* no bloco do MHC: (A) mapa do local e da distribuição de genes e pseudogenes *HLA* de classe I, incluindo os genes *HLA-A*, *HLA-H* e *HLA-G*; (B) mapa da localização do sítio de inserção *AluYHG* em relação aos *loci* *HLA-H* e *-G*; (C) A sequência *AluYHG* é representada pela caixa que é flanqueada por sequências de repetição direta (sublinhada).



Fonte : adaptado de Kulski *et al.*, 2001.

Marcadores do tipo MEI, como as *Alu*, são interessantes para a genética de populações por dois motivos: (a) é extremamente pequena a probabilidade de que uma determinada sequência ocorra no mesmo local em duas pessoas diferentes, salvo quando estas pessoas compartilham um ancestral comum, uma vez que a taxa de inserção dos elementos *Alu* é muito baixa e há muitos locais em que esses elementos podem se inserir (Batzer & Deininger, 1991), e (b) o estado ancestral do locus é a ausência de inserção (Batzer *et al.*, 1994; Whitherspoon *et al.*,

2006). Além disso, diferentes inserções *Alu* cujas distribuições geográficas são conhecidas podem ser utilizadas em conjunto para indicar afinidade geográfica de uma amostra (Cordeaux *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

A AR é uma doença inflamatória autoimune, enquanto a molécula de HLA-G apresenta funções anti-inflamatórias estabelecendo um estado de imunotolerância, sendo assim, é possível criar a hipótese de que indivíduos portadores de alelos que diminuam a expressão de *HLA-G* ou a estabilidade do mRNA apresentem susceptibilidade diferenciada para o desenvolvimento da doença.

Considerando a característica da molécula HLA-G de modular a função de algumas células efectoras do sistema imunitário, a sua expressão em patologias inflamatórias crônicas, como é o caso da AR, poderia promover um efeito inibitório da resposta imune, auxiliando na redução do processo inflamatório dessa doença. Essa proteção poderia variar de acordo com a variação da expressão do gene influenciados por polimorfismos que aumentem ou diminuam a estabilidade do RNA mensageiro, como por exemplo, os polimorfismos presentes na 3'UTR. Diversos aspectos relacionados à doença e aos polimorfismos da 3'UTR do HLA-G permanecem desconhecidos e controversos, fazendo-se necessária a complementação com estudos que auxiliem na elucidação dos mecanismos de regulação da expressão desse gene. Essas associações entre a AR e determinados polimorfismos do gene *HLA-G* podem, no futuro, auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e no direcionamento de terapias para essa patologia.

A sequência *AluYG* encontra-se na região intergênica, flanqueada pelos loci *HLA-A* e *HLA-G*. Um possível desequilíbrio de ligação entre essa região e os loci vizinhos pode ser um potencial marcador para essa região, ajudando no diagnóstico de doenças. Essas associações entre AR, o polimorfismo do gene *HLA-G* e a inserção do *AluYG* podem também, no futuro, auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e no direcionamento de terapias para essa patologia.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar polimorfismos da região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *HLA-G* em 115 pacientes com artrite reumatoide e em 115 controles pareados por idade e sem histórico de AR, no estado de Santa Catarina, para melhor compreensão da ação desse gene na patogênese da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a variabilidade da 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com AR e indivíduos-controle do estado de Santa Catarina.
- Calcular as frequências alélicas e genóticas de todos os pontos de variação encontrados na 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com artrite reumatoide e em indivíduos-controle.
- Inferir os haplótipos envolvendo estes *loci* analisados em pacientes com artrite reumatoide e em indivíduos-controle.
- Verificar se há associação entre os alelos, genótipos, haplótipos, dados clínicos e epidemiológicos com a doença estudada.
- Relacionar os dados encontrados neste estudo com a patogênese da artrite reumatoide.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho integra de um projeto maior, intitulado “Genética da Autoimunidade: Polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH/UFSC) em 26 de julho de 2006, através do parecer nº 172/06, com prorrogação aprovada pelo CEPSH/UFSC até 30 de junho de 2016, em parecer consubstanciado de número 423.535 de 23 de setembro de 2013 (Anexo A).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 115 pacientes diagnosticados com Artrite Reumatoide, atendidos pelo Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU) e de 115 indivíduos-controles, sem diagnóstico nem histórico familiar para a patologia em estudo, que são participantes de projetos realizados paralelamente pela equipe do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os dados epidemiológicos e familiares, dos pacientes e dos indivíduos-controles, foram obtidos através de entrevistas realizadas com questionários estruturados (Anexos B e D), após a assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido (Anexos C e E) pelos voluntários. Após as entrevistas, as amostras de sangue periférico (cerca de 8 ml) foram coletadas através de punção venosa, para extração do DNA genômico e obtenção dos dados genéticos, e armazenadas e transportadas a 4°C para o posterior processamento no LAPOGE.

As amostras biológicas e os questionários obtidos foram catalogados e constituem um banco de dados e amostras, de pacientes com AR e de indivíduos-controles, armazenado no LAPOGE.

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir dos prontuários médicos, cujas informações clínicas datavam do dia da coleta e consulta. Os dados laboratoriais de pacientes com AR foram considerados: FR positivo (valores superiores a 20IU/mL), elevados níveis de CRP (acima de 5mg/L) e VHS superior a 19mm/h.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas (*Centrifuge 206 BL Excelsa II*®) a 3000g (1835rpm) durante 20min a temperatura ambiente (TA), para a separação dos componentes sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos, e feito alíquotas, que foram identificadas e estocadas a -20°C. Os leucócitos foram utilizados para a extração do DNA genômico. O plasma e o concentrado de hemácias foram armazenados para futuras pesquisas.

Reagentes e Soluções

- 1) Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; Sacarose 0,32M, Merck®; MgCl₂ 0,0025M; Triton X 100 – 1%, Nuclear®);
- 2) Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; KCl 0,05M, Vetec®); MgCl₂ 0,0025M, Nuclear®); Nonidet – 1%, Amresco®; TWEEN 20 – 1%, Amresco®);
- 3) SDS 10%(Amresco®);
- 4) Solução de Perclorato de Sódio 5,0M (Vetec®);
- 5) Solução Saturada de NaCl 6,0M (Nuclear®);
- 6) TE (Tris-HCl 1M, Amresco®; EDTA 0,5M, Vetec®);
- 7) Álcool Isopropílico Absoluto (Merck®);
- 8) Etanol 70% (Merck®).

Procedimento

A extração de DNA foi realizada através de um método de *Salting Out* modificado, baseado em Miller *et al.* (1988). Para cada amostra, foram colocados 100µL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5mL (tipo *ependorf*), utilizando-se uma micropipeta e ponteiros estéreis. Em seguida, adicionou-se 1,0mL de Solução de Lise I em cada um desses microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (*Centrifuge 5415D, Eppendorf*®) a 13400g (12000 rpm) durante 5 min à TA. O sobrenadante foi descartado e, este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando a presença dos glóbulos brancos. Posteriormente, foram acrescentados ao precipitado de leucócitos 300µL de Solução de Lise II, 10µL de SDS 10% e 75µL de Perclorato de Sódio 5M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos, do tipo *vórtex*, e a cada tubo foram acrescentados 130µL de NaCl 6M e, a seguir, as amostras foram

centrifugadas a 13400g por 5 min a TA. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para esses, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300µL de Álcool Isopropílico Absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 13400g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram acrescentados 300µL de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, à TA, *overnight*. Após a secagem dos precipitados, foram adicionados a cada tubo 100µL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 min e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

4.4 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO INDEL DA REGIÃO 3'UTR

A genotipagem do polimorfismo *InDel*, de 14pb (rs1704), da região 3'UTR do gene *HLA-G* (ID:3135), foi realizada através da amplificação dessa região pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), (2) seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida para migração dos fragmentos de DNA amplificados, (3) com a visualização dos mesmos no gel após coloração com Nitrato de Prata.

4.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase

Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura;
- 2) dNTPs 0,2mM de cada (100mM, Invitrogen®);
- 3) MgCl₂ 1,5mM (50mM, Invitrogen®);
- 4) Tampão de PCR 10X (0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; Invitrogen®);
- 5) Primer Reverse 10pmol (HLAGR, 5'- TCT TCT GAT AAC ACA GGA ACT TC -3'; IDT®);
- 6) Primer Forward 10pmol (HLAGF, 5'- TGT GAA ACA GCT GCC CTG T -3'; IDT®);
- 7) Taq DNA Polymerase Platinum (0,5U/µL; Invitrogen®).

Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados, em tubos de 0,2µL (tipo *ependorf*): 7,40µL de água; 0,25µL de dNTPs; 0,75µL de

MgCl₂; 3,5µL de Tampão de PCR; 0,5µL de *Primer R*; 0,5µL de *Primer F*; 0,10µL de *Taq Platinum*® e 2µL de DNA (em torno de 200ng). Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5min e, em seguida, a 30 ciclos de: 95°C por 45s, 56°C por 45s e 72°C por 60s; e um passo de extensão final a 72°C por 7 min (Castelli *et al.*, 2010).

4.4.2 Análise do Produto Amplificado

Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura;
- 2) Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1 - 29g de acrilamida, Bioamerica®, e 1g de bis-acrilamida, Amresco®, diluídas em 100mL H₂O);
- 3) Tampão TBE 10X (Tris base 0,89M, Amresco®; Ácido Bórico 0,89M, Vetec®; EDTA 0,2M, Vetec®);
- 4) Tampão TBE 1X (100mL do Tampão TBE 10X; 900mL H₂O);
- 5) TEMED: tetrametiletilenodiamina (Amresco®);
- 6) Persulfato de Amônio 10% (Hexapur®);
- 7) Tampão de Aplicação de Amostras (900µL de Bromofenol, Merck®; 900µL Xilenocianol, Sigma-Aldrich®; 900µL TBE; 4,5mL Ficoll 30% diluído em H₂O, Sigma-Aldrich®; 1,8mL EDTA 0,5M pH 8,0, Vetec®; 3,6g Sacarose, Merck®);
- 8) Formaldeído (Amresco®);
- 9) Peso Molecular de 100pb (BioLabs®).

Procedimento

Os produtos amplificados (nos tamanhos de 597 pb para as deleções e de 611 pb para as inserções) foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 7%. Estes géis foram feitos adicionando: 21mL de H₂O; 6mL de Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida; 3mL de TBE 10%; 35µL de TEMED e 350µL de Persulfato de Amônio 10%. Essa solução foi colocada entre as placas de vidro e, após a polimerização do gel, as placas foram encaixadas na cuba de eletroforese. As amostras foram preparadas da seguinte forma: 5µL de produto de PCR; 2µL de Tampão de Aplicação de Amostras e 3µL de H₂O; e, posteriormente, aplicadas no gel. No primeiro poço foi colocado o padrão de peso molecular de 100 pb para, posteriormente, ser comparado com as bandas amplificadas. A corrida foi realizada, durante

3 horas, e a fonte de eletroforese (CBS, Scientific Company, Modelo EPS 4000) foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 160 e, a Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres.

4.4.3 Coloração com Nitrato de Prata

Os géis foram retirados das cubas e corados com Nitrato de Prata para a visualização dos fragmentos de DNA.

Reagentes e Soluções

1) *Solução de Nitrato de Prata* (10g de Nitrato de Prata, Vetec®; 100mL de H₂O. Dissolver o nitrato de prata em uma parte da água e depois completar com o restante, manter a solução ao abrigo da luz - volume final 100mL);

2) *Solução Fixadora* (160mL de Etanol Absoluto, Merck®, 7mL de Ácido Acético Glacial, Nuclear® e 833mL de H₂O - volume final 1L);

3) *Solução Reveladora* (22,5g de NaOH, Merck®; 1L de H₂O. Dissolver em um agitador o Hidróxido de Sódio em uma parte da água e depois completar com o restante - volume final 1L. Na hora da coloração adicionar 1mL de Formaldeído para cada 100mL da solução).

Procedimento

1) *Fixação*: Após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 100mL de Solução Fixadora por 10 min;

2) *Impregnação com Nitrato de Prata*: Adicionou-se 2,0mL de Solução de Nitrato de Prata, e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água quente por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água;

3) *Revelação*: A Solução Reveladora foi adicionada cuidadosamente no recipiente contendo o gel, que foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução foi pré-aquecida em estufa a 65°C, para facilitar a reação de coloração;

4) *Bloqueio da Reação*: Após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 100mL de Solução Fixadora;

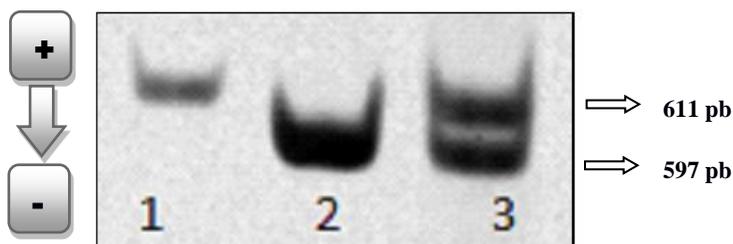
5) *Secagem do Gel*: Após a leitura, todos os géis passaram por um processo de secagem simples para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas de papel celofane foram molhadas; uma placa de vidro, com a área maior que a do gel, foi coberta com uma das folhas; o gel foi colocado sobre a placa com o

celofane sem deixar bolhas; o gel foi então bem molhado e coberto com a outra folha de celofane, também com cuidado de não deixar bolhas; este gel foi deixado secando à TA por dois ou três dias até a secagem completa, sendo então destacado, devidamente identificado e arquivado.

4.4.4 Leitura dos Resultados no Gel

O modo de visualização dos fragmentos de DNA, para a detecção e anotação do polimorfismo de 14pb do gene HLA-G, está representado na figura 7. Nessa figura, é possível observar a presença de uma inserção (1), uma deleção (2) e uma inserção/deleção (3).

Figura 7. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. O gel digitalizado ilustram bandas que apresentam uma inserção (1), uma deleção (2) e uma inserção/deleção (3), devido a diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA.



4.5 GENOTIPAGEM ALUYHG

Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura *qsp.* 25 μ L;
- 2) dNTPs 0,2mM de cada (100mM, Invitrogen®);
- 3) MgCl₂ 1,5mM (50mM, Invitrogen®);
- 4) DMSO 5% (98%, dimetilsulfóxido Merk®);
- 5) Tampão de PCR 0,8X (10X, 0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; Invitrogen®);
- 6) Primer Forward 3pmol (10pmol AluyHGR, IDT®);
- 7) Primer Reverse 3pmol (10pmol AluyHGF, IDT®);
- 8) Taq DNA Polymerase Platinum 1U/ μ L (5U/ μ L; Invitrogen®).

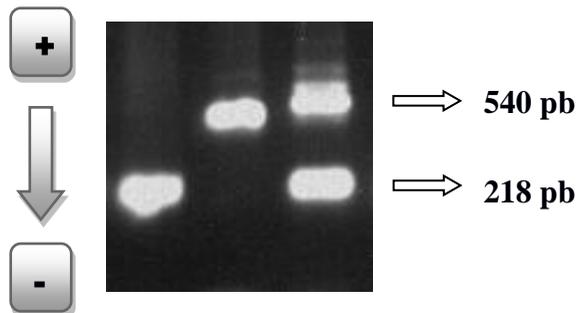
Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionadas as concentrações mencionadas acima em tubos de 0,6mL (tipo *eppendorf*) e adicionados 2 μ L de DNA genômico da amostra desejada. Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, em seguida, a 30 ciclos de: 95°C por 45s, 56°C por 45s e 72°C por 60s; e um passo de extensão final a 72°C por 7 minutos (Castelli *et al.*, 2010).

4.5.1 Leitura dos resultados no gel

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose em concentração de 1% (95V, 30 minutos) em presença do corante fluorescente *GelRed*TM. Para a corrida eletroforética se utilizou: tampão TBE 0,5X (50mL de TBE 10X; 950mL de água), sendo que as mesmas concentrações foram utilizadas para preparação do gel. Após a eletroforese o gel foi submetido à luz UV para visualização da região gênica amplificada, tendo posteriormente suas imagens capturadas pelo fotodocumentador *DNR-Bio-Imaging Systems MiniBIS PRO*® através do software *GelCapture*®, que foram então analisadas (Figura 8).

Figura 8 - Gel de agarose a 1%, na presença do corante fluorescente *GelRed*TM. Podem-se visualizar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, 540 pb (presença da inserção *AluyHG*) e 218 pb (ausência da inserção *AluyHG*), após corrida eletroforética de 30 minutos, a 90V. O gel digitalizado ilustra a presença de uma deleção (raia 1), uma inserção (raia 2) e uma inserção/deleção (raia 3).



4.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE DNA DA REGIÃO 3'UTR

4.6.1 Purificação das Amostras

Reagentes e Soluções

- 1) *Exonuclease I (EXO, 10u/μL, GE Healthcare®)*;
- 2) *Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP, do inglês Shrimp Alkaline Phosphatase, 1U/μL, GE Healthcare®)*;

Procedimento

Os produtos de PCR foram purificados através do uso das enzimas Exonuclease I (EXO) e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) para a degradação do excesso de *primers* e para desfosforilar os dNTPs não incorporados. Para isso foram adicionados, em um tubo de 0,2μL (tipo *epENDORF*), 0,5μL de EXO, 0,5μL de SAP, e 9μL de produto de PCR. As amostras foram colocadas em um termociclador e submetidas a um ciclo de reação de 37°C por 60min e 75°C por 15 minutos.

4.6.2 PCR para a Reação de Sequenciamento

A reação de PCR foi realizada utilizando o reagente *BigDye®* versão 3.1 e o *primer* reverso (HLAG8R), anteriormente descrito. Este último foi utilizado, devido ao polimorfismo InDel, com o intuito de evitar o desalinhamento das sequências em amostras heterozigotas para esse polimorfismo.

Reagentes e Soluções

- 1) *Água Ultrapura*;
- 2) *Primer Reverse diluído 5pM (HLAGR, 5'- TCT TCT GAT AAC ACA GGA ACT TC -3')*;
- 3) *Corante BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems®)*;
- 4) *Tampão BigDye® Terminator Sequencing Buffer 5X (Applied Biosystems®)*;

Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços: 1,0μL de Primer R diluído; 1,0μL de fluoróforo *BigDye®*, 1,5μL Tampão *BigDye®* e 6,5μL de produto de PCR purificado. Essas amostras foram colocadas em um termociclador

(Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 96°C por 10s e, a seguir, a 25 ciclos de: 96°C por 10s; 50°C por 5s e 60°C por 4min.

4.6.3 Precipitação das Amostras

Reagentes e Soluções

- 1) Solução de Acetato de Sódio/EDTA, TA; (Acetato de Sódio 125mM, Sigma-Aldrich®; pH 8,0);
- 2) Etanol Absoluto, TA (Merck®);
- 3) Etanol 70%, TA (Merck®).

Procedimento

A precipitação dos produtos de PCR purificados foi feito da seguinte maneira: em cada poço (nos quais estavam os 10µL da PCR de sequenciamento) foram adicionados 2,5µL da Solução de Acetato de Sódio /EDTA, a placa foi agitada e, em seguida, foram adicionados 25µL de Etanol Absoluto. Em seguida, a placa foi centrifugada (*Centrifuge 5804R, Eppendorf®*) a 2880g (4000 rpm) por 45 minutos a TA. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido por inversão e, posteriormente, foram adicionados 150µL de etanol 70% em cada poço. A placa foi agitada e submetida a uma nova centrifugação a 2880g (4000 rpm) durante 15 minutos a TA. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa foi deixada no escuro, *overnight*, para que todo o etanol evaporasse.

4.6.4 Leitura do Sequenciamento das Amostras

Reagentes e Soluções

- 1) Formamida Hi-Di (Invitrogen®).

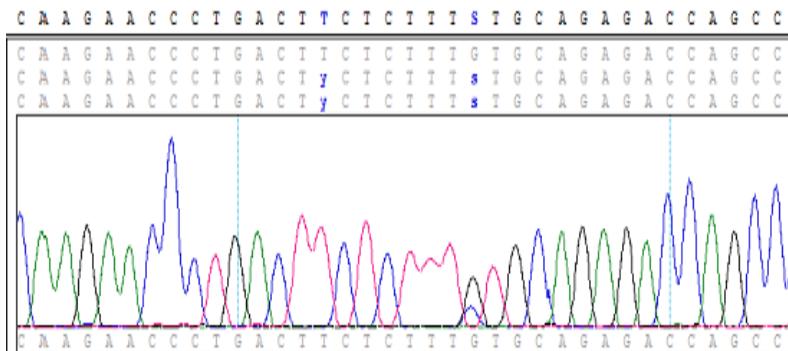
Procedimento

Em cada poço da placa, foram adicionados 10µL de Formamida e a placa foi centrifugada (*Centrifuge 5804R, Eppendorf®*) a 500g (800 rpm) por 5min a TA. Em seguida, as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação, em termociclador (*Mastercycler, Eppendorf®*), a 95°C durante 20 minutos. Após a desnaturação, a placa foi colocada no sequenciador para ser lida. As amostras foram sequenciadas em um sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems®*).

4.6.5 Análises das Sequências

A análise direta das sequências de DNA, da região 3'UTR, foi realizada, através do software *Chromas Lite*®, para a investigação de todos os pontos de variação existentes na região. As variações mais conhecidas para essa região são os polimorfismos SNPs: +3001 T/C (rs567747016), +3003 T/C (rs1707), +3010 C/G (rs1710), +3027 A/C (rs17179101), +3035 C/T (rs17179108), +3142 G/C (rs1063320), +3187 A/G (rs9380142), +3196 G/C (rs1610696) e +3227 A/G (rs1233331). A identificação dos polimorfismos foi realizada através da interpretação dos cromatogramas (Figura 9). Os SNPs de cada amostra foram anotados individualmente em uma planilha de Excel para as análises posteriores.

Figura 9. Cromatografia resultante do alinhamento de uma das amostras sequenciadas. Nesta ilustração, estão representados os SNPs +3003 (Y) e +3010 (S). Para o primeiro SNP (Y), o indivíduo em questão é homocigoto (TT, cor vermelha) enquanto que, para o segundo SNP (S) é heterocigoto (GC, cores preta e azul, respectivamente).



4.7 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.7.1 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Na qual:

x_i^2 é a frequência esperada dos homozigotos do alelo i ;

$2x_i x_j$ é a frequência esperada do heterozigoto ij ;

$2x_j^2$ é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

A aderência das frequências genóticas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada através do programa GENEPOP®, versão 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). Foram realizados três testes baseados na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, teste para detecção da deficiência e para detecção do excesso de heterozigotos.

No teste exato de probabilidade, o valor de p corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado. O segundo e o terceiro são testes mais sensíveis do que o de probabilidade e utilizam uma hipótese alternativa (H1) de excesso ou de deficiência de heterozigotos, respectivamente.

4.7.2 Estimativas das Frequências Alélicas e Genóticas

As frequências alélicas (x_i) e genóticas (X_{ii}) de cada *locus*, em casos e controles foram estimadas utilizando-se o programa GENEPOP® (Raymond & Rousset, 1995) versão 3.4 (disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>), de acordo com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad \text{e} \quad X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Nas quais:

x_i é a frequência do alelo “ i ”;

X_{ii} é a frequência do genótipo “ ii ”;

n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i , respectivamente;

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

4.7.3 Análises de Associação

A associação dos genótipos e haplótipos com a

susceptibilidade à AR foi verificada com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador de *Odds Ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se um Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se $p=0,05$ como o valor limite de significância (Woolf, 1955). A OR foi calculada por meio da seguinte equação:

$$OR = (ad)/(bc)$$

Na qual:

a é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco e o resultado de interesse;

b é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco, mas não o resultado de interesse;

c é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco, mas apresentam o resultado de interesse;

d é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco nem o resultado de interesse.

A OR é utilizada para representar o aumento das chances de determinado resultado devido à presença de um fator de risco. Para este teste foi utilizado o software HDS *Epimax Table Calculator* (Health Decision Strategies, 2012).

4.7.4 Desequilíbrio de Ligação

A análise de desequilíbrio de ligação (LD, do inglês *Linkage Disequilibrium*), combinação não ao acaso de alelos em diferentes *loci*, foi realizada utilizando-se o programa GENESPOP®, versão 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). A hipótese nula é a de que a distribuição genotípica em um *locus* é independente da distribuição em outro *locus*. A verificação da ocorrência não aleatória de certas combinações alélicas foi realizada pela seguinte fórmula:

$$\Delta_{ab} = p_{ab} - p_a p_b$$

Na qual:

Δ_{ab} é o valor do desequilíbrio de ligação;

p_{ab} é a frequência observada de um haplótipo;

p_a é a frequência observada do alelo *a* de um dado locus;

p_b é a frequência observada do alelo *b* de um outro locus;

$p_a p_b$ é a frequência esperada de um haplótipo *ab*.

O desequilíbrio de ligação pode assumir valores no intervalo de -1,0 a +1,0, sendo que os valores negativos indicam a repulsão entre os alelos em questão, os valores positivos indicam o acoplamento e, o valor zero indica a ausência de desequilíbrio de ligação.

4.7.5 Inferência de Haplótipos

A inferência de haplótipos (h), equivalente à heterozigose em dados diploides, foi estimada considerando a frequência dos haplótipos. As fórmulas da inferência de haplótipos (h) e seu desvio padrão (DP) são:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$DP = \left\{ \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum p_i^3 - \left(\sum p_i^2 \right)^2 \right] + \sum p_i^2 - \left(\sum p_i^2 \right)^2 \right\} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Nas quais:

p_i é a frequência do haplótipo i ;

n é o número de cromossomos da amostra;

k é o número de haplótipos.

Os cálculos foram realizados através do programa PHASE (Stephens *et al.*, 2001). Para esses cálculos, foram considerados apenas os haplótipos cuja probabilidade foi maior ou igual a 90%. As amostras que não apresentaram esse valor foram excluídas das análises. As frequências haplotípicas foram calculadas da mesma forma que as alélicas e genotípicas.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os 230 indivíduos que compõem a amostra deste estudo, sendo 115 pacientes e 115 indivíduos-controle, residem no estado de Santa Catarina. Nos casos em que dois indivíduos possuíam algum grau de parentesco, um deles foi excluído desse estudo. Os dois grupos, pacientes e indivíduos-controle, para a realização dos testes estatísticos, de acordo com a faixa etária e se procurou equilibrar o gênero entre os grupos, conforme a tabela 2.

Tabela 2: Classificação da amostra, de acordo com o sexo e idade, entre pacientes com artrite reumatoide (casos) e indivíduos sem a doença (controle).

Dados Epidemiológicos	Casos (n=115)	Controles (n=115)
Gênero		
Feminino	102	97
Masculino	13	18
Faixa etária		
(Média ± SD)	54,42 ± 12,65	52,50 ± 12,34

n: número amostral; Média: média entre as amostras; SD: desvio padrão da média.

5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Através da análise das sequências de DNA, da 3'UTR do gene *HLA-G* foram observados dez sítios polimórficos (14pb *Del/In*, +3001 C/T, +3003 C/T, +3010 G/C, +3027 A/C, +3035C/T, +3142 G/C, +3187 A/G, +3196 G/C e +3227 A/G) e um polimorfismo de presença/ausência (que chamaremos de inserção/deleção, respectivamente) da região intergênica *AluγHG*, em pacientes e indivíduos-controle. A partir disso, foram realizadas as seguintes análises estatísticas: equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, frequências alélicas e genotípicas (para casos e controles), análises de associação para os dados genéticos e presença ou ausência dos fatores de risco na população de casos, desequilíbrio de ligação, diferenciação de populações, inferência de haplótipos e análises de associação.

5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As distribuições das frequências dos sítios polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* em casos e controles estavam de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW), exceto o *locus 14pb In/Del* para o grupo de pacientes ($p=0,023$) e o *locus AluYHG In/Del*, que apresentou desvio significativo para o grupo controle ($p=0,018$) (apêndice A).

5.2.2 Frequências Alélicas, Genotípicas e Análises de Associação

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas de casos e controles estão descritos na tabela 3. Os valores significativos obtidos são mostrados na tabela 4, os demais resultados, incluindo frequências alélicas e genotípicas, são representados no apêndice A.

Tabela 3: Valores de p significativos para os cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento da artrite reumatoide.

Polimorfismo	OR	p	IC
+3196 (rs1610696)			
<i>GC</i>	2,387	0,026*	1,101-5,228
<i>AluYHG</i> (AF055066)			
<i>Ins</i>	0,524	0,006*	0,328-0,836
<i>Del</i>	1,907	0,006*	1,196-3,048
<i>InsDel</i>	0,441	0,006*	0,244-0,795
<i>DelDel</i>	2,466	0,002*	1,371-4,445

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p : probabilidade.

Foi realizada a análise de modelos de herança com o objetivo de identificar mecanismos envolvidos com o risco da presença desses polimorfismos e o desenvolvimento da AR. Dois modelos foram analisados: o modelo aditivo, onde se considera a presença do alelo tanto em homocigotos como em heterocigotos; e o modelo multiplicativo, o qual também considera a presença do alelo em ambos, homocigoto e heterocigoto, porém dá mais peso para a presença em homocigose. Os resultados significativos dos modelos genéticos de

adição e multiplicativo são mostrados na tabela 4, a tabela completa está apresentada no apêndice B.

Entre os dados epidemiológicos, o hábito tabagista é considerado um fator de risco para a manifestação da AR. Sua análise foi realizada nesse estudo e está descrita no apêndice C.

Os dados clínicos considerados, neste estudo, como fator reumatoide (FR), proteína C reativa (CRP) e velocidade de hemossedimentação (VHS), fatores de risco para o desenvolvimento e a gravidade da AR, estão descritos na tabela 5.

Tabela 4: Valores de *p* significativos para as análises de modelos de herança genética para os polimorfismos do gene *HLA-G* e inserção *Alu*yHG em pacientes e indivíduos-controles.

Gene/SNP	Modelo de Herança	Análise			
		OR	<i>p</i>	IC(95%)	
+3010	Multiplicativo	2*2*G+GC	0,658	0,011*	0,476 - 0,909
		2*2*C+GC	1,519	0,011*	1,100 - 2,099
+3142	Multiplicativo	2*2*G+GC	1,435	0,029*	1,036-1,988
		2*2*C+GC	0,697	0,029*	0,503 - 0,965
<i>Alu</i> yHG	Aditivo	DD+IDxII	0,402	0,002*	0,266 - 0,714
	Multiplicativo	2*2*I+ID	0,465	0,000*	0,306 - 0,704
		2*2*D+ID	2,152	0,000*	1,421 - 3,264

Associações (GENEPOP e HDS Epimax); OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade.

Tabela 5: Frequências dos dados clínicos fator reumatoide (FR), proteína C reativa (CRP) e velocidade de hemossedimentação (VHS) analisadas em pacientes com AR.

	Positivo	Frequência	Negativo	Frequência	Total
FR	51	54,255	43	45,745	94
CRP	48	50,000	48	50,000	96
VHS	65	66,327	33	33,673	98

Critérios de classificação para positividade: FR superior a 20 IU/mL; CRP superior a 5 mg/L; VHS superior a 19 mm/h (hora).

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas, na população de casos, dos dados clínicos que indicam a

gravidade da AR (fator reumatóide, proteína C-reativa e velocidade de hemossedimentação) que obtiveram dados significativos estão representados na tabela 6. As tabelas com resultados completos estão representados nos apêndices E, F e G, respectivamente.

Tabela 6: Valores de p significativos para as análises de dados clínicos e frequências alélicas e genotípicas em pacientes com AR.

Dado Clínico	Polimorfismo	OR	p	IC
FR	+3010 (rs1710)	4,685	0,032*	1,114- 22,660
	<i>GG</i>			
	+3196 (rs1610696)	0,388	0,049*	0,150- 0,996
	<i>GC</i>			
CRP	+3196 (rs1610696)	0,301	0,011*	0,115- 0,781
	<i>GC</i>			
	<i>CC</i>	2,713	0,035*	1,065- 6,986
VHS	+3003 (rs1707)	0,296	0,042*	0,088- 0,966
	<i>C</i>			
	<i>T</i>	3,382	0,042*	1,035- 11,342

Crítérios de classificação para positividade: FR superior a 20 IU/mL; CRP superior a 5 mg/L; VHS superior a 19 mm/h (hora).

5.3 Desequilíbrio de Ligação

A análise das probabilidades de segregação entre sítios polimórficos foi realizada pelo teste de desequilíbrio de ligação (LD). Os onze sítios polimórficos, considerados par a par, permitiram 55 comparações em ambos os grupos. No total, em 26 comparações não foram observadas associações entre os *loci* e em 29 foram observadas associações (tabela 7).

Tabela 7: Probabilidade (p) do teste exato de desequilíbrio de ligação para os onze sítios polimórficos detectados em pacientes e indivíduos-controle ($p \leq 0,05$).

Polimorfismos	<i>14pb ID</i>	<i>+3001 C/T</i>	<i>+3003 C/T</i>	<i>+3010 G/C</i>	<i>+3027 A/C</i>	<i>+3035 C/T</i>	<i>+3142 G/C</i>	<i>+3187 A/G</i>	<i>+3196 G/C</i>	<i>+3227 A/G</i>	<i>AluyHG ID</i>
<i>14pb ID</i>	-										
<i>+3001 C/T</i>	0,708	-									
<i>+3003 C/T</i>	0,001*	1,000	-								
<i>+3010 G/C</i>	<0,001*	0,122	<0,001*	-							
<i>+3027 A/C</i>	0,003*	1,000	0,903	0,350	-						
<i>+3035C/T</i>	<0,001*	0,195	0,637	<0,001*	<0,001*	-					
<i>+3142 G/C</i>	<0,001*	0,100	<0,001*	<0,001*	0,064	<0,001*	-				
<i>+3187 A/G</i>	<0,001*	1,000	0,028*	<0,001*	0,231	0,003*	<0,001*	-			
<i>+3196 G/C</i>	<0,001*	1,000	0,607	<0,001*	0,164	<0,001*	<0,001*	<0,001*	-		
<i>+3227 A/G</i>	0,128	1,000	1,000	0,046*	0,238	0,805	0,057	0,104	0,190	-	
<i>AluyHG ID</i>	<0,001*	1,000	0,015*	<0,001*	0,413	0,033*	<0,001*	<0,001*	0,019*	0,204	-

Desequilíbrio de ligação (GENEPOP). Os valores significativos estão anotados com *.

5.4 DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES

A diferenciação genética entre as populações de casos e controles foi testada a partir dos onze *loci* polimórficos, dos quais o *loci AluHG* apresentou resultado estatisticamente significativo em relação à distribuição das frequências gênicas ($p=0,008$) e em relação à distribuição genotípica ($p=0,004$) (Tabela 8).

Tabela 8: Diferenciação gênica e genotípica baseadas nos 11 *loci* estudados.

<i>Loci</i>	Casos x Controles	
	Diferenciação gênica (p)	Diferenciação genotípica (p)
14pb	0,564	0,557
+3001	0,342	0,341
+3003	0,874	0,879
+3010	0,137	0,105
+3027	0,182	0,173
+3035	0,893	0,892
+3142	0,201	0,184
+3187	0,299	0,267
+3196	0,278	0,286
+3227	0,786	0,778
AluHG	0,008*	0,004*

*Valores significativos ($p<0,05$).

5.5 INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS

Devido ao número reduzido de leituras para os polimorfismos +3001, +3196 e +3227, os quais foram parcialmente sequenciados para o grupo de indivíduos-controle por trabalho anterior no mesmo grupo de pesquisa, a inferência de haplótipos foi realizada através de métodos probabilísticos levando-se em consideração oito dos onze sítios polimórficos (14pb *Del/Ins*, +3003 *T/C*, +3010 *C/G*, +3027 *C/A*, +3035 *C/T*, +3142 *C/G*, +3187 *A/G* e *AluHG Del/Ins*). O método PHASE foi utilizado para a dedução dos haplótipos e estes foram nomeados de acordo com a literatura existente.

Para os polimorfismos analisados, algumas UTRs apresentam a mesma configuração, como: UTRs 6, 12 e 19; UTRs 3, 10 e 20; UTRs 2 e 15; UTRs 16, 17 e 21. Vamos considerar aqui a UTR com nomenclatura da primeira descrição, ou seja, a de menor número.

Os haplótipos observados e as suas frequências, em casos e controles, estão descritos com os polimorfismos do *HLA-G* na tabela do apêndice H e no apêndice J os dados em conjunto com a região intergênica *AluYHG*. Após a inferência de haplótipos, foi realizada a análise das combinações haplotípicas de cada indivíduo, que são apresentadas nas tabelas dos apêndices I, apenas SNPs do *HLA-G*, e K, em conjunto com o *loci AluYHG*. Os resultados significativos para as associações entre haplótipo e combinações haplotípicas com o desenvolvimento de AR estão apresentados nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9: Valores de p significativos para os haplótipos inferidos para 3'UTR do *HLA-G* e o desenvolvimento da AR.

UTR	Haplótipo	OR	p	IC
UTR5	InsTCCTGA	2,174	0,048*	1,006 - 4,761

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p : probabilidade

Tabela 10: Valores de p significativos para as combinações haplotípicas para 3'UTR do *HLA-G* e o desenvolvimento da AR.

Combinação Haplótópica	OR	p	IC
UTR1 + UTR5	5,532	0,034*	1,098 - 37,579

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; p : probabilidade

As análises de associação entre os haplótipos e combinações haplotípicas em conjunto com a inserção *AluYHG* não apresentaram nenhum valor significativos. A tabela completa com os resultados está apresentada nos apêndices I e K, respectivamente.

Foi realizada a análise do modelo genético de herança de adição para esclarecer melhor os mecanismos que envolvem os conjuntos dos polimorfismos encontrados nos indivíduos e o desenvolvimento da AR. Os resultados significativos para o modelo genéticos de adição são mostrados nas tabelas 11 e 12, as tabelas completas estão apresentadas nos apêndices L e M.

Tabela 11: Valores de *p* significativos para as combinações haplotípicas para 3'UTR do *HLA-G* e o desenvolvimento da AR.

UTR	Modelo de Herança	Análise		
		OR	<i>p</i>	IC(95%)
UTR5	Aditivo 55+5U x UU	2,346	0,038*	1,043 - 5,341

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade; U: outra UTR qualquer que não a destacada.

Tabela 12: Valores de *p* significativos para as combinações haplotípicas para 3'UTR do *HLA-G* em conjunto com a inserção *Alu*YG e o desenvolvimento da AR.

UTR+ <i>Alu</i> YG	Modelo de Herança	Análise		
		OR	<i>p</i>	IC(95%)
UTR1 + * <i>Ins</i>	Aditivo <i>1Ins1Ins+1InsUA</i> x UUAU	0,556	0,047*	0,311 - 0,993
UTR5 + * <i>Del</i>	Aditivo <i>5Del5Del+5DelUA</i> x UUAU	2,247	0,050*	0,998 - 5,123

OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade; UA: outro conjunto de UTR e *Alu*YG qualquer que não o destacado.

6 DISCUSSÃO

6.1 DADOS GÊNICOS E GENOTÍPICOS

O genótipo heterozigoto $+3196*GC$ apresentou risco para o desenvolvimento de AR, como exposto na tabela 3. Dos estudos publicados até o presente momento, o alelo $+3196*G$ foi associado com a presença de rash discoide em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Catamo *et al.*, 2015). Sugere-se que o alelo $*G$ seja responsável por uma menor produção de HLA-G na pele onde se encontra o rash discoide, com uma regulação negativa no local da inflamação. É importante ressaltar que o número de homozigotos $+3196*GG$ é baixo no presente estudo (6 pacientes e 5 controles, Apêndice A), o que dificulta a associação estatística, caso ela exista.

Sabe-se que o polimorfismo $+3196$ se encontra próximo a uma região com motivos ricos em AU, região onde proteínas interagem e atuam na regulação e estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) (Figura 10). Bases próximas aos motivos ricos em AU podem afetar a ligação dessas proteínas, degradando o mRNA mais rapidamente e, conseqüentemente, diminuindo a expressão do HLA-G (Catamo *et al.*, 2015; Porto *et al.*, 2015; Yie *et al.*, 2008). Embora este polimorfismo tenha sido pouco avaliado em estudos de associação com doenças autoimunes, ou mesmo outras doenças, a associação encontrada no presente estudo, somada ao resultado de associação com LES, pode ser um indicativo de que este polimorfismo pode afetar esta região e sua ligação com proteínas e, conseqüente estabilidade do mRNA. Porém, mais estudos e com um tamanho amostral maior são interessantes para esclarecer melhor a associação do alelo $+3196*G$ ou seu genótipo homozigoto com a expressão da molécula HLA-G. Os dados indicam provável ação na redução da estabilidade do mRNA e conseqüentemente baixa expressão da molécula.

A região intergênica *AluyHG* apresentou risco para o desenvolvimento da doença com o alelo $*Del$, genótipo homozigoto $*DelDel$ e no modelo multiplicativo $*Del+InsDel$, como demonstrado nas tabelas 3 e 4. O polimorfismo de inserção apresentou resultados de proteção contra o desenvolvimento da doença, com as associações: alelo $*Ins$, genótipo heterozigoto $*InsDel$, modelo aditivo $*DelDel+InsDel \times InsIns$ e modelo multiplicativo $*Ins+InsDel$.

Por ser uma região intergênica, o *AluyHG* não teria nenhum tipo de produto gênico, como RNA ou proteína, devendo as associações encontradas estarem relacionadas com outras regiões próximas a essa região. Segundo

Castelli 2009, a inserção do elemento *Alu**YG* está em desequilíbrio de ligação com a *UTR1*, assim, seria possível hipotetizar que a proteção encontrada está associada a *UTR1* e não à região intergênica, sendo que essa *UTR* protegeria o indivíduo para o desenvolvimento da doença enquanto que as demais *UTRs*, em geral, confeririam risco. Como será ainda discutido, foi encontrada associação com a *UTR1*, quando em conjunto com a presença da inserção da região *Alu**YG*. Embora não possamos descartar que esta associação possa ser devido a desequilíbrio de ligação com outros genes e regiões próximos.

O polimorfismo +3010*GC, localizado próximo ao códon de parada do mRNA, apresentou associação para o desenvolvimento da doença no modelo multiplicativo, com proteção para *G+GC e risco para *C+GC. Os micro RNAs (miRNA) possuem a capacidade de se ligar ao mRNA, onde podem desestabilizar ou até mesmo clivar este, reduzindo a sua expressão (Bartel, 2009; Fabian *et al.*, 2010). Foram identificados *in silico* alguns miRNAs que poderiam se ligar a essa região, como o miR-193a-5p, miR-5001-5p e miR-6510-5p, com uma maior afinidade pelo nucleotídeo *C (Figura 10) (Foti *et al.*, 2014).

Para o polimorfismo +3142*GC, foram encontradas associações com o modelo multiplicativo para *G+GC, com risco, e *C+GC, com proteção para o desenvolvimento de AR. O alelo *G foi associado com o risco para o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico (LES), com o pressuposto de que a região se torna mais suscetível à ligação de miRNAs quando esse polimorfismo está presente, tornando o mRNA do HLA-G menos estável e reduzindo sua expressão (Tan *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014). Entre miRNAs que podem se ligar à região, temos: miR-152, miR-148a-3p e miR-148b-3p, todos com maior afinidade pelo alelo *G (Figura 10) (Foti *et al.*, 2014).

Sabe-se que a AR está bastante relacionada à atividade inflamatória, e moléculas que reduzem esta resposta, como o HLA-G, poderiam estar associadas com a proteção à AR (Foti *et al.*, 2014; McInnes & Schett, 2011). Assim, estes dados suportariam a hipótese de associação encontrada no presente estudo, mostrando que polimorfismos com maior interação com miRNAs (+3110*C e +3142*G), que possivelmente desestabilizam o mRNA, reduzindo a tradução, estão associados ao risco de desenvolvimento da doença. Enquanto que, polimorfismos com menor afinidade a miRNAs (+3110*G e +3142*C), que provavelmente estão associados com um mRNA mais estável e, consequentemente, maior tradução, estão associação com a proteção à AR (Porto *et al.*, 2015).

6.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Apesar de não termos encontrado uma associação entre o hábito tabagista e a AR neste estudo e em anteriores de nosso grupo de pesquisa (Farias *et al.*, 2013), sabe-se que existe uma estreita relação entre ambos. Fumar é o principal fator de risco ambiental, para diversas doenças autoimunes, inclusive para AR, onde os fumantes apresentam títulos mais altos de FR e pior prognóstico em termos de incapacidade, dano radiográfico e resposta ao tratamento (Boyer *et al.*, 2011). Acredita-se que as toxinas contidas no cigarro modulem o sistema imune, causando uma redução na quantidade de células NK, deprimindo a imunidade mediada por células e levando a uma disfunção dos linfócitos do tipo T (Másdóttir *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2013; Sugiyama *et al.*, 2010).

Assim, sabendo-se que a redução de células NK periféricas (subpopulação de NK CD56^{bright}) possa se dar pela relação direta de seus receptores KIR2DL4 com moléculas HLA-G, estudos com um maior controle na obtenção destes dados, principalmente com relação a ex-fumantes, poderiam, ou não, revelar uma associação positiva com o polimorfismo do gene *HLA-G* (Carosella *et al.*, 2008; Donadi *et al.*, 2011).

6.3 DADOS CLÍNICOS E DADOS GÊNICOS E GENOTÍPICOS

Os testes de fase aguda (FR, CRP e VHS) são marcadores de inflamação utilizados no monitoramento da atividade da doença e resposta a tratamento (Farnig & Friedrich, 2011). Neste estudo os elevados valores de FR, CRP e VHS estão presentes em 54,25%, 50% e 66,33% dos pacientes de AR, no entanto estas frequências são inferiores a outro estudo no qual VHS e CRP estão presentes em mais de 70% dos pacientes com AR (Mota *et al.*, 2010).

Dentre os dados clínicos analisados, foram encontradas as seguintes associações: para o FR positivo, risco para o agravamento da doença com o genótipo +3010*GG e proteção para o genótipo heterozigoto +3196*GC; para a CRP positiva, risco com o genótipo +3196*CC e proteção para +3196*GC; e para a VHS, risco com o alelo +3003*T e proteção para +3003*C.

Alguns dados podem parecer controversos, como o risco para o genótipo +3010*GG no FR positivo, enquanto que o alelo +3010*G conferiu proteção (descrito acima). Podemos supor que esse polimorfismo, apesar de não estar envolvido no desenvolvimento e manifestação da doença, colabore com formação da inflamação e no agravamento dos sintomas de fase aguda.

O polimorfismo +3196 com o genótipo heterozigoto *GC apresentou risco para a manifestação e o desenvolvimento da doença e proteção para a presença dos dados clínicos FR e CRP. Esses dados poderiam indicar que o polimorfismo está associado ao desenvolvimento da doença, mas não o seu agravamento. O fato do genótipo heterozigoto ter sido associado pode ser relacionado ao número amostral do trabalho, como discutido acima, e para que pudéssemos detectar uma associação alélica ou com genótipos homozigotos, seria ideal aumentar o esforço amostral.

Durante a análise dos dados gerados por este trabalho, notamos que existe uma falta de padronização na coleta de dados clínicos dos prontuários dos pacientes, pelo simples fato de que esses indivíduos realizam inúmeros exames laboratoriais para o monitoramento da doença. Da mesma forma, a bibliografia disponível que sugere o uso destes dados em estudos de associação genética não deixa claro como os mesmos são coletados e não discutem com exames que são realizados de forma recorrente e que apresentam dados bastante variados, dependendo do estado pontual da doença no paciente, devam ser considerados. Assim, a falta de padronização nessa coleta pode levar a associações espúrias, e a falta de comparação com dados da literatura deixa claro que precisamos analisar estes dados com cautela.

6.4 DADOS HAPLOTÍPICOS

Após a inferência de haplótipos, foram identificadas 8 diferentes UTRs na população analisada, UTR1, UTR2, UTR3, UTR4, UTR5, UTR6, UTR7 e UTR8. As UTRs encontradas são as mais frequentes na população brasileira (frequência maior que 1%) (Castelli *et al.*, 2010).

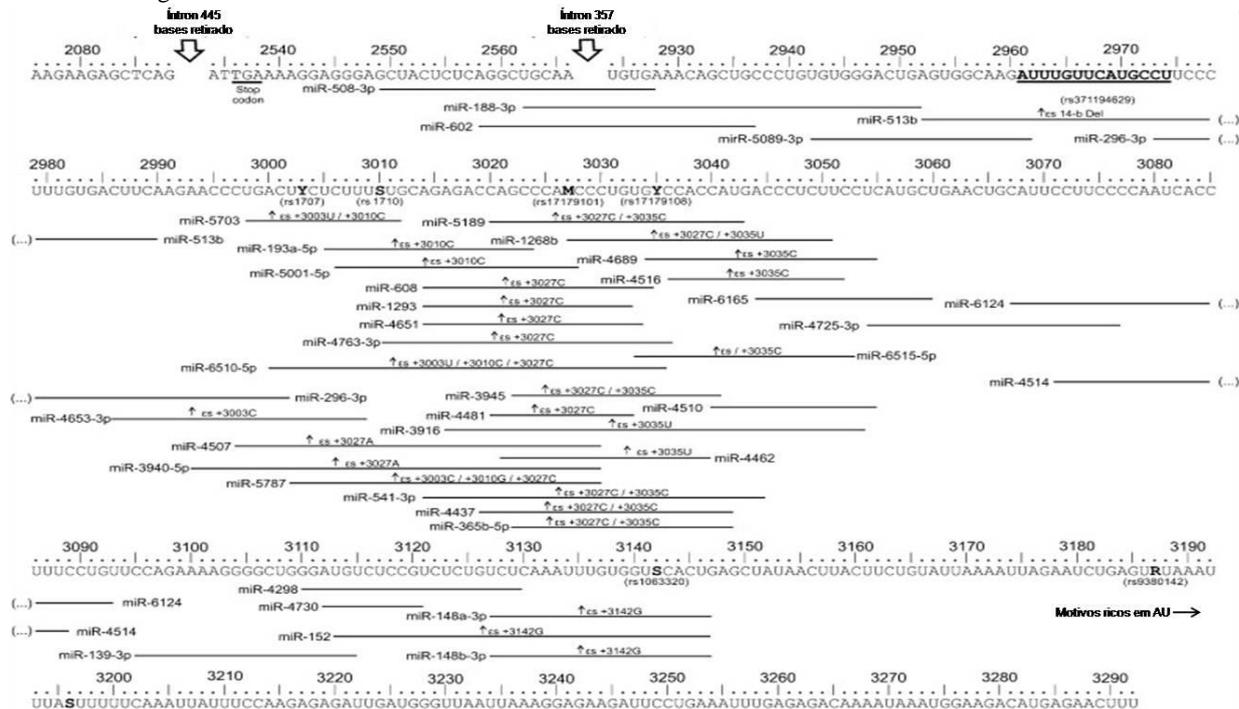
A UTR1, quando em conjunto com a presença da inserção da região *AluyHG*, conferiu proteção para o desenvolvimento da doença. Como descrito anteriormente, a inserção conferia proteção para o desenvolvimento da doença, porém, por se tratar de uma região intergênica, seria plausível supor que essa estaria ligada a outra região codificante (Castelli *et al.*, 2009). Apesar de ter sido conferida a associação com a UTR1, essa só foi constatada na presença do alelo *AluyHG*Ins*, sendo que a *UTR1 + AluyHG*Del* ou a *UTR1* por si só não foram associados a doença. A região *AluyHG*, então, pode estar associada a outra região, codificante ou UTR, do *HLA* ou até mesmo a outro gene próximo.

Para a UTR5 foi verificada associação de risco para o desenvolvimento da doença, também com risco para a combinação haplotípica UTR1+UTR5 e no modelo aditivo para UTR5 e UTR5 + *AluyHG*Del*.

A UTR5 se diferencia da UTR7 apenas no polimorfismo +3027 (UTR5*C e UTR7*A), e para a UTR2 apenas no +3035 (UTR5*T e UTR2*C), podendo o conjunto +3027*C e +3035*T ser um alvo de microRNAs ou outros fatores que diminuiriam a expressão da molécula. Dentre alguns miRNAs que se ligam preferencialmente a essa combinação temos: mir-1224-5p e mir-187* (Figura 10) (Foti *et al.*, 2014). Os polimorfismos +3027 e +3035 não foram profundamente discutidos, não se sabendo as suas influências diretas na expressão e modulação do mRNA.

Outra possibilidade para a UTR5 é a presença do polimorfismo +3142*G, o qual foi associado ao desenvolvimento de LES, como descrito acima, reduzindo a estabilidade do mRNA do *HLA-G* pela ligação preferencial de alguns miRNAs (Figura 10) (Foti *et al.*, 2014).

Figura 10. Alguns miRNAs que podem influenciar a expressão do gene HLA-G ilustrados. Os sítios de variações da 3'UTR do gene *HLA-G* em negrito.



Fonte: adaptado de Porto *et al.*, 2015.

7. CONCLUSÕES

As pesquisas com *HLA-G* são recentes, e a descrição da 3'UTR e seus polimorfismos foi feita em 2010, assim ainda há poucos estudos e muitos polimorfismos desta (e de outras regiões reguladoras) que continuam sem o devido esclarecimento em relação às suas influências na regulação gênica e estabilidade do mRNA (Castelli *et al.*, 2010).

Estudos que identifiquem fatores que modulam a expressão do mRNA do *HLA-G* devem ser aprofundados e investigados *in vivo*, como a influência e interação dos miRNA, para que se possa compreender melhor os mecanismos que agem sobre essas moléculas.

É preciso também entender os fatores ligados à região rica em AU próxima aos polimorfismos +3187, +3196 e +3227, para que se possa estabelecer a relação desses SNPs com essas moléculas e como elas afetam a estabilidade da molécula.

O presente trabalho apresentou dados que corroboraram com a literatura existente até o momento, como o risco para o alelo +3142*G no desenvolvimento da doença, o genótipo +3196*GC com risco e o alelo *G associado a inflamação em LES, as frequências das UTRs na população brasileiro e o desequilíbrio de ligação da UTR1 e a inserção do *AluYHG*. Alguns desses resultados demonstram que, possivelmente, existe uma relação entre o gene analisado e sua influência em doenças autoimunes como a AR.

Ressaltamos que alguns dos resultados de associação com doenças autoimunes, não haviam sido encontrados até o momento, como a associação do polimorfismo +3010, a proteção para a UTR1 e o risco para a UTR5, o desequilíbrio de ligação entre a UTR1 e o *AluYHG*, se tornando um possível marcador para a região. Assim, o presente estudo pode colaborar com uma maior compreensão tanto da relação que os polimorfismos possuem com as doenças autoimunes como os seus papéis dentro da regulação dessa região.

Com relação à associação com as características clínicas, percebeu-se que a coleta desses dados nos prontuários deve ser padronizada e melhor discutida, pois existe uma grande variação de resultados de um mesmo paciente dependendo da fase em que este se encontra da doença. Para que se diminua essa variação e os dados possam ser comparados efetivamente com outros estudos, uma avaliação dos resultados do momento em que esse paciente foi diagnosticado pode

trazer uma base mais confiável para análise e diminuir associações espúrias nas análises.

De forma geral, este estudo permitiu investigar a possibilidade de associação do gene *HLA-G* em relação à Artrite Reumatoide, relacionando-o tanto com questões epidemiológicas como clínicas na população brasileira. Além disso, este tipo de estudo tem sido muito importante na procura de um melhor entendimento da patologia e de suas condições clínicas heterogêneas, buscando identificar possíveis marcadores genéticos relacionados às doenças autoimunes, o que auxiliaria na identificação mais precisa das diversas doenças, apontando para um tratamento mais eficiente aos pacientes. Estudos funcionais devem ser realizados para melhor compreender como os polimorfismos genéticos podem agir na patogênese da AR.

REFERÊNCIAS

- ACR - AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. **Rheumatoid Arthritis Classification**, 2010. Disponível em <https://www.rheumatology.org/practice/clinical/classification/ra/ra_2010.asp>. Acessado em 20 de maio de 2015.
- AGUADO, B.; BAHRAM, S.; BECK, S.; CAMPBELL, R. D.; FORBES, S. A.; GERAGHTY, D.; GUILLAUDEUX, T. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. **Nature**, v. 401, p. 921-3, 1999.
- AGUIAR, F. J. B.; FERREIRA-JÚNIOR, M.; SALES, M. M.; CRUZ-NETO, L. M.; FONSECA, L. A. M.; SUMITA, N. M.; DUARTE, N. J. C.; LICHTENSTEIN, A.; DUARTE, A. J. S. Proteína C reativa - aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.59, n.1, p.85-92, 2013.
- ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 3, p. 130-6, 2005.
- ALAMANOS, Y.; VOULGARI, P. V.; DROSOS, A. A. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 3, p. 182-8, 2006.
- ALVAREZ, I.; COLLADO, J.; DAURA, X.; COLOMÉ, N.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.; GALLART, T.; CANALS, F.; JARAQUEMADA, D. The Rheumatoid Arthritis-Associated Allele HLA-DR10 (DRB1*1001) Shares Part of Its Repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n.6, p. 1630-9, 2008.
- ANVISA. Medicamentos Biológicos para o tratamento da artrite reumatoide. **BRATS**, Ano VI, n.19, 2012.
- BARTEL, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v.136, n.2, p.215-33, 2009.
- BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. A human-specific subfamily of Alu sequences. **Genomics**, v. 9, p. 481-7, 1991.
- BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. Alu repeats and human genomic diversity. **Nat. Rev. Genet.**, v.3, n.5, p.370-9, 2002.
- BATZER, M. A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D. H.; SHAIKH, T. H.; NOVICK, G. E.; IOANNOU, P. A.; SCHEER, D. W.; HERRERA, R. J.; DEININGER, P. L. African origin of human-specific Alu insertions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 12288-292, 1994.

BAX, M.; VAN-HEEMST, J.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned?

Immunogenetics, v. 63, n. 8, p. 459-66, 2011.

BLASCHITZ, A.; GAUSTER, M.; FUCHS, D.; LANG, I.; MASCHKE, P.; ULRICH, D.; KARPFF, E.; TAKIKAWA, O.; SCHIMEK, M. G.; DOHR, G.; SEDLMAYR, P. Vascular endothelial expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the feto-maternal interface. **Plos One**, v. 6, n. 7, p. e21774, 2011.

BOISSIER, M. C. Cell and cytokine imbalances in rheumatoid synovitis. **Joint Bone Spine**, v.78, n.3, p.230-4, 2011.

BOYER, J. F.; GOURRAUD, P. A.; CANTAGREL, A.; DAVIGNON, J. L.; CONSTANTIN, A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. **Joint, Bone Spine**, v. 78, n. 2, p. 179-83, 2011.

CAMPBELL, E. C.; ANTONIOU, A. N.; POWIS, S. J. The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. **Immunology**, v. 136, p. 380-4, 2012.

CAPY, P.; BAZIN, D.C.; LANGIN, T. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? **Heredity**, v. 85, p. 101-6, 1998.

CARMONA, L.; CROSS, M.; WILLIAMS, B.; LASSERE, M.; MARCH, L. Rheumatoid arthritis. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v.24, n.6, p.733-45, 2010.

CAROSELLA, E. D.; HORUZSKO, A. HLA-G and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 6, p. 411-2, 2007.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends in Immunology**, v. 29, p. 125-32, 2008.

CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N.; ROUX, D. T.-L.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. **Advances in Immunology**, v. 127, p. 33-144, 2015.

CAROSELLA, E.; GREGORI, S.; ROUAS-FREISS, N.; LEMAOULT, J.; MENIER, C.; FAVIER, B. The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 353-68, 2011.

CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DEGHAIDE, N. H.; DE ALBUQUERQUE, R. S.; MUNIZ, Y. C.; SIMÕES, R. T.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; DONADI, E. A. The genetic

structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, v. 11, p. 134-41, 2010.

CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; VEIGA-CASTELLI, L. C.; ROGER, M.; MOREAU, P.; DONADI, E. A. Research article a comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 3069–86, 2011.

CASTELLI, E. C.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A.; MENDES-JUNIOR, C. T.; VEIGA-CASTELLI, L. C.; YAGHI, L.; GIULIATTI, S.; CAROSELLA, E. D.; DONADI, E. A. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Human Immunology**, v. 70, n. 12, p. 1020-5, 2009.

CASTELLI, E. C.; RAMALHO, J.; PORTO, I. O. P.; LIMA, T. H. A.; FELÍCIO, L. P.; SABBAGH, A.; DONADI, E. A.; MENDES-JUNIOR, C. T. Insights into HLA-G genetics provided by worldwide haplotype diversity. **Frontiers Immunology**, v. 5, p. 476, 2014.

CATAMO, E.; ADDOBBATI, C.; SEGAT, L.; SOTERO FRAGOSO, T.; DOMINGUES BARBOSA, A.; TAVARES DANTAS, A.; DE ATAÍDE MARIZ, H.; DA ROCHA JR, L. F.; BRANCO PINTO DUARTE, A. L.; MONASTA, L.; SANDRIN-GARCIA, P.; CROVELLA, S. HLA-G gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients. **Tissue Antigens**, v. 84, p. 308–15, 2014.

CATAMO, E.; ADDOBBATI, C.; SEGAT, L.; SOTERO FRAGOSO, T.; TAVARES DANTAS, A.; DE ATAÍDE MARIZ, H.; FERREIRA DA ROCHA JUNIOR, L.; BRANCO PINTODUARTE, A. L.; COELHO, A. V.; DE MOURA, R. R.; POLESELLO, V.; CROVELLA, S.; SANDRIN GARCIA, P. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5'urr and 3'utr regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 85, n. 6, p. 458-65, 2015.

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

COLONNA, M.; NAVARRO, F.; BELLÓN, T.; LLANO, M.; GARCÍA, P.; SAMARIDIS, J.; ANGMAN, L.; CELLA, M.; LÓPEZ-BOTET, M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic

cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 11, p. 1809-18, 1997.

CONSIGLIO, C. R.; VEIT, T. D.; MONTICIELOO. A.; MUCENIC, T.; XAVIER, R. M.; BRENOL, J. C. T.; CHIES, J. A. B. Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 77, p. 540-5, 2011.

CONTINI, P.; GHIO, M.; POGGI, A.; FILACI, G.; INDIVERI, F.; FERRONE, S.; PUPPO, F. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur. J. Immunol.*, v.33, n.1, p.125-34, 2003.

CORDEAUX, R.; SRIKANTA, D.; LEE, J.; STONEKING, M.; BATZER, M. A. In search of polymorphic Alu insertions with restricted geographic distributions. **Genomics**, v. 90, p. 154-8, 2007.

CURIGLIANO, G.; CRISCITIELLO, C.; GELAO, L.; GOLDHIRSCH, A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clinical Cancer Research*, v. 19, n. 20, p. 5564-71, 2013.

CULSHAW, S.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. What can the periodontal community learn from the pathophysiology of rheumatoid arthritis? **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, s.1, p.106-13, 2011.

DAWKINS, R.; LEELAYUWAT, C.; GAUDIERI, S.; TAY, G.; HUI, J.; CATTLEY, S.; MARTINEZ, P.; KULSKI, J. Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. **Immunology Review**, v. 167, p. 275–304, 1999.

DONADI, E. A.; CASTELLI, E. C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 369-95, 2011.

EULAR EUROPEAN LEAGUE AGAINST RHEUMATISM & AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. Rheumatoid Arthritis Classification, 2010 .

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.; FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 351-79, 2010.

FARIAS, T. D. J.; CANTO, L. M. DO; MEDEIROS, M. D.; SEREIA, A. F. R.; BACK, L. K. F. DE C.; MELLO, F. M. DE M.; ZIMMERMANN, A. F.; PEREIRA, I. A.; MUNIZ, Y. C. N.; MARRERO, A. R.; SOUZA, I. R. DE. Lack of association between

interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 2, p. 199-204, 2013.

FARNG, E.; FRIEDRICH, J. B. Laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis. **Journal of Hand Surgery**, v. 36. n. 5, p.926-7, 2011.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v.423, n.6937, p.356-61, 2003.

FOTI, D. P.; GRECO, M.; PALELLA, E.; GULLETTA, E. New laboratory markers for the management of rheumatoid arthritis patients. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.52, n.12, p.1729-37, 2014.

GAO, G. F.; WILLCOX, B. E.; WYER, J. R.; BOULTER, J. M.; O'CALLAGHAN, C. A.; MAENAKA, K.; STUART, D. I.; JONES, E. Y.; VAN DER MERWE, P. A.; BELL, J. I.; JAKOBSEN, B. K. Classical and nonclassical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8alpha. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 15232–8, 2000.

GARCÍA-OBREGÓN, S.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ-MIRANDA, A. M.; GÓMEZ-PÉREZ, L.; DE PARCORBO, M. M.; PEÑA, J. A. Ancestry markers from the human chromosome 6: Alu repeats from the MHC in autochthonous Basques. **Human Immunology**, v. 73, p. 720-5, 2012.

GHAUSSY, N.O.; SIBBIT, W.; BANKHURST, A.D.; QUALLS, C.R. Cigarette smoking and disease activity in systemic lupus erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v.30, p.1215-21, 2003.

GÓMEZ-PÉREZ, L.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; SÁNCHEZ, D.; GARCÍA-OBREGÓN, S.; ESPINOSA, I.; MARTÍNEZ-JARRETA, B.; DE PANCORBO, M. M.; PEÑA, J. A. Alu polymorphism in the Waorani Tribe from the Ecuadorian Amazon reflect the effects of isolation and genetic drift. **American Journal of Human Biology**, v. 23, p. 790-5, 2011.

GRAHAM, R. R.; ORTMANN, W. A; LANGEFELD, C. D.; JAWAHEER, D.; SELBY, S. A; RODINE, P. R.; BAECHLER, E. C.; ROHLF, K. E.; SHARK, K. B.; ESPE, K. J.; GREEN, L. E.; NAIR, R. P.; STUART, P. E.; ELDER, J. T.; KING, R. A.; MOSER, K. L.; GAFFNEY, P. M.; BUGAWAN, T. L.; ERLICH, H.A.; RICH, S. S.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. **The American Journal of Human Genetics**, v. 73, p. 543–53, 2002.

GULLICK, N. J.; SCOTT, D. L. Co-morbidities in established rheumatoid arthritis. Best Practice & Research. **Clinical Rheumatology**, v.25, n.4, p.469-83, 2011.

HAMMER, A.; HUTTER, H.; DOHR, G. HLA class I expression on the materno-fetal interface. *Am J Reprod Immunol*, v. 38, n. 3, p. 150-7, 1997.

HEALTH DECISION STRATEGIES. EpiMax Table Calculator. Disponível em : <<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>>. Acesso em: março de 2015.

HILL, J. A.; SOUTHWOOD, S.; SETTE, A.; JEVNIKAR, A. M.; BELL, D. A.; CAIRNS, E. 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 Immunology**, n. 171, p. 538-541, 2003.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M. J.; POVEY, S.; TALBOT, C. C. JR.; WRIGHT, M. W.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 889-99, 2004.

IMGT. Banco de dados 3.14.0. Disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>>. Acessado em junho de 2015.

JACOB, N.; JACOB, C. O. Genetics of rheumatoid arthritis: an impressionist perspective. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 38, n. 2, p. 243-57, 2012.

JÚNIOR, L. H. C.; SANTOS, R. L. S.; MENDONÇA, C. J. A.; CAMPOS, C. T.; ANDRADE, M. A. P. Avaliação da variação da temperatura cutânea, proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação na artroplastia total do joelho primária, isenta de complicações. **Acta. Ortop. Bras.**, v.14m n.3, p.161-4, 2006.

KLARESKOG, L.; CATRINA, A. I.; PAGET, S. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v.373, p.659-72, 2009.

KRIEGS, J. O.; CHURAKOV, G.; JURKA, J.; BROSIUS, J.; SCHMITZ, J. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. **Trends Genetcis**, v. 23, p. 158–61, 2007.

KULSKI, J. K.; GAUDIERI, S.; MARTIN, A.; DAWKINS, R. L. Coevolution of PERB11 (MIC) and HLA class I genes with HERV-16 and retro- elements by extended genomic duplication. **Journal of Molecular Evolution**, v. 49, p. 84–97, 1999.

KULSKI, J. K.; MARTINEZ, P.; LONGMAN-JACOBSEN, N.; WANG, W.; WILLIAMSON, J.; DAWKINS, R. L.; SHIINA, T.; NARUSE, T.; INOKO, H. The association between HLA-A alleles and an Alu dimorphism near HLA-G. **Journal of Molecular Evolution**, v. 53, p. 114-23, 2001.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; *et al.*; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860-921, 2001.

LARSEN, M.; HVIID, T. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Human immunology**, v. 70, p. 1026-34, 2009.

LEE, Y. H.; BAE, S. C.; SONG, G. G. Meta-analysis of associations between functional HLA-G polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v. 35, n. 6, p. 953-61, 2014.

LLEO, A.; INVERNIZZI, P.; GAO, B.; PODDA, M.; GERSHWIN, M. E. Definition of human autoimmunity--autoantibodies versus autoimmune disease. **Autoimmun. Rev.**, v.9, n.5, p.A259-66, 2010.

LEWIN, S. N.; AGHAJANIAN, C.; MOREIRA, A. L.; SOSLOW, R. A. Extrauterine epithelioid trophoblastic tumors presenting as primary lung carcinomas: morphologic and immunohistochemical features to resolve a diagnostic dilemma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 33, n. 12, p. 1809-14, 2009.

LOUZADA-JÚNIOR, P.; FREITAS, M. V.; OLIVEIRA, R. D.; DEGHAIDE, N. H.; CONDE, R. A.; BERTOLO, M. B.; DONADI, E. A. A majority of Brazilian patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1 alleles carry both the HLA-DRB1 shared epitope and anti-citrullinated peptide antibodies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 6, p. 493-9, 2008.

MANDIK-NAYAK, L.; RIDGE, N.; FIELDS, M.; PARK, A. Y.; ERIKSON, J. Role of B cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Curr. Opin. Immunol.**, v.20, n.6, p.639-45, 2008.

MARIASELVAM, C. M.; CHAABEN, A. B.; SALAH, S.; CHARRON, D.; KRISHNAMOORTHY, R.; TAMOUZA, R.; NEGI, V. S. Human leukocyte antigen-G polymorphism influences the age of onset and autoantibody status in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 85, p. 182-9, 2015.

- MARTINS, G. S.; CARDOSO, V. A.; MARCONDES, G. A. Erythrocyte sedimentation and erythrocyte aggregation using ESR (erythrocyte sedimentation rate) and UV-Vis spectrophotometry. **Rev. Matéria**, v.12, n.1, p.206-14, 2007.
- MASDOTTIR, B.; JÓNSSON, T.; MANFREDSDOTTIR, V.; VÍKINGSSON, A.; BREKKAN, A.; VALDIMARSSON, H. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 39, n. 11, p. 1202-5, 2000.
- McINNES, I. B.; SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v.365, n.23, p.2205-19, 2011.
- MEHRA, N. K.; KAUR, G. MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-17, 2005.
- MENIER, C.; ROUAS-FREISS, N.; FAVIER, B.; LEMAULT, J.; MOREAU, P.; CAROSELLA, E. D. Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. **Tissue antigens**, v. 75, p. 201-6, 2010.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MILLS, R. E.; BENNETT, E. A.; ISKOW, R. C.; DEVINE, S. E. Which transposable elements are active in the human genome? **Trends in Genetics**, v. 23, p. 183-91, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tabagismo: Você sabia? Fonte: <<http://www.saude.gov.br>>. Acessado em: 12 de abril de 2015.
- MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E. D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, p. 2973-89, 2009.
- MOTA, L. M.; SANTOS NETO, L. L.; CARVALHO, J. F. Autoantibodies and other serological markers in rheumatoid arthritis: predictors of disease activity? **Clin. Rheumatol.**, v. 28n.10, p.1127-34, 2009.
- MOTA, L. M.; DOS SANTOS NETO, L. L.; BURLINGAME, R.; MÉNARD, H. A.; LAURINDO, I. M. Laboratory characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 375-88, 2010.
- MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; FRONZA, L. S. R.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C.; SILVA N. A.; LOUZADA-JUNIOR, P.; GIORGIX, R. D. N.; LIMA, R. A. C.; PINHEIRO, G. R. C. Consenso da Sociedade Brasileira de

Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, vol.51, n.3, p.207-19, 2011.

MOTA, L. M.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; REZENDE-FRONZA, L. S.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V.; SILVA, N. A.; LOUZADA-JÚNIOR, P.; GIORGI, R. D.; LIMA, R. A.; PINHEIRO, G. R. C.; BRAZILIAN SOCIETY OF RHEUMATOLOGY. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.52, n.2, p.152-74, 2012.

MYASOEDOVA, E.; CROWSON, C. S.; TURESSON, C.; GABRIEL, S. E.; MATTESON, E. L. Incidence of extraarticular rheumatoid arthritis in Olmsted County, Minnesota, in 1995-2007 versus 1985-1994: a population-based study. **J. Rheumatol.**, v.38, n.6, p.983-9, 2011.

NETO, N. S. R.; CARVALHO, J. F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.49, n.4, p.413-30, 2009

O'BRIEN, M.; MCCARTHY, T.; JENKINS, D.; PAUL, P.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 12-13, p.1943-9, 2001.

OLIVER, J. E.; SILMAN, A. J. Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, v.35, p.169-74, 2006.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nature Immunology**, v. 5, p. 201-14, 2005.

PEREIRA, I. A. Artrite Reumatoide. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.36, n.3, 2007.

PICCIRILLO, L. J.; GONÇALVES, M. F.; CLEMENTE, E. L.; GOMES, M. B. Markers of inflammation in type 1 diabetic patients. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.48, n.2, p.253-60, 2004.

PONTE, M.; CANTONI, C.; BIASSONI, R.; TRADORI-CAPPAL, A.; BENTIVOGLIO, G.; VITALE, C.; BERTONE, S.; MORETTA, A.; MORETTA, L.; MINGARI, M. C. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5674-9, 1999.

PORTO, I. O.; MENDES-JUNIOR, C. T.; FELÍCIO, L. P.; GEORG, R. C.; MOREAU, P.; DONADI, E. A.; CHIES, J. A.; CASTELLI, E. C. MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. **Molecular Immunology**, v. 65, n. 2, p. 230-41, 2015.

PRETE, M. *et al.* Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 2, p. 123-31, 2011.

PYATT, D. W.; STILLMAN, W. S.; IRONS, R. D. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.84, p.149-78, 1998.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 7, p. 1093-100, 1999.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-9, 1995.

RENAUDINEAU, Y.; JAMIN, C.; SARAUX, A.; YOUINOU, P. Rheumatoid factor on a daily basis. **Autoimmunity**, v.38, p.11-6, 2005.

RHEAD, B.; KAROLCHIK, D.; KUHN, R. M.; HINRICHS, A. S.; ZWEIG, A. S.; FUJITA, P. A.; DIEKHANS, M.; SMITH, K. E.; ROSENBLOOM, K. R.; RANEY, B. J.; POHL, A.; PHEASANT, M.; MEYER, L. R.; LEARNED, K.; HSU, F.; HILLMAN-JACKSON, J.; HARTE, R. A.; GIARDINE, B.; DRESZER, T. R.; HIRAM CLAWSON, H.; BARBER, G. P.; HAUSSLER, D.; KENT, W. J. The UCSC Genome Browser database: update 2010. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D613–9, 2010.

RHODES, D. A.; TROWSDALE, J. Genetics and molecular genetics of the MHC. **Review Immunogenetics**, v. 1, p. 21–31, 1999.

RIZZO, R.; BORTOLOTTI, D.; BEN FREDJ, N.; ROTOLA, A.; CURA, F.; CASTELLAZZI, M.; TAMBORINO, C.; SERACENI, S.; BALDI, E.; MELCHIORRI, L.; TOLA, M. R.; GRANIERI, E.; R. BARICORDI, O. R.; FAINARDI, E. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Human Immunology**, v. 73, p. 5-11, 2012.

SANTOS, K. E.; LIMA, T. H.; FELÍCIO, L. P.; MASSARO, J. D.; PALOMINO, G. M.; SILVA, A.C.; OLIVEIRA, S. F.; SABBAGH,

A.; GARCIA, A.; MOREAU, P.; DONADI, E. A.; MENDES-JUNIOR, C. T.; CASTELLI, E. C. Insights on the HLA-G evolutionary history provided by a nearby Alu insertion. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 11, p. 2423-34, 2013.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v.376, n.9746, p.1094-108, 2010.

SCOTT, I. C.; SEEOBIN, S. D.; STEER, S.; TAN, R.; FORABOSCO, P.; HINKS, A.; EYRE, S.; MORGAN, A. W.; WILSON, A. G.; HOCKING, L. J.; WORDSWORTH, P.; BARTON, A.; WORTHINGTON, J.; COPE, A. P.; LEWIS, C. M. Predicting the Risk of Rheumatoid Arthritis and Its Age of Onset through Modelling Genetic Risk Variants with Smoking. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 9, 2013.

SELMI, C.; MAYO, M. J.; BACH, N.; ISHIBASHI, H.; INVERNIZZI, P.; GISH, R. G.; GORDON, S. C.; WRIGHT, H. I.; ZWEIBAN, B.; PODDA, M.; GERSHWIN, M. E. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. **Gastroenterology**, v.127, p.485–92, 2004.

SELMI C, GERSHWIN ME. The role of environmental factors in primary biliary cirrhosis. **Trends Immunol.**; v.30, p.415–20, 2009.

SHIROISHI, M.; KUROKI, K.; TSUMOTO, K.; YOKOTA, A.; SASAKI, T.; AMANO, K.; SHIMO-JIMA, T.; SHIRAKIHARA, Y.; RASUBALA, L.; VAN DER MERWE, P.A.; KUMAGAI, I.; KOHDA, D.; MAENAKA, K. Entropically driven MHC class I recognition by human inhibitory receptor leukocyte Ig-like receptor B1 (LILRB1/ILT2/CD85j). **Journal of Molecular Biology**, v. 355, n. 2, p. 237–48, 2006.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 978-89, 2001.

STEWART, C.; KURAL, D.; STRÖMBERG, M.; WALKER, J.; KONKEL, M.; STÜTZ, A.; URBAN, A.; GRUBERT, F.; LAM, H. Y. K.; LEE, W.-P.; BUSBY, M.; INDAP, A. R.; GARRISON, E.; HUFF, C.; XING, J.; SNYDER, M.; JORDE, L. B.; BATZER, M.; KORBEL, J. A Comprehensive Map of Mobile Element Insertion Polymorphisms in Humans. **Plos Genetics**, v. 7, p. 1-19, 2011.

STRAND, V.; KIMBERLY, R.; ISAACS, J. D. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. **Nature Reviews: Drug discovery**, v. 6, n. 1, p. 75-92, jan. 2007.

SUGIYAMA, D.; NISHIMURA, K.; TAMAKI, K.; TSUJI, G.; NAKAZAWA, T.; MORINOBU, A.; KUMAGAI, S. Impact of smoking

as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 1, p. 70-81, 2010.

SYMMONS DP. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. **Best Pract Res Clin Rheumatol.**, v.16, n.5, p.707-22, 2002.

TAN, Z.; RANDALL, G.; FAN, J.; CAMORETTI-MERCADO, B.; BROCKMAN-SCHNEIDER, R.; PAN, L.; SOLWAY, J.; GERN, J. E.; LEMANSKE, R. F.; NICOLAE, D.; OBER, C. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 4, p. 829–34, 2007.

TAYLOR, P. C.; MEHTA, P.; TULL, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. **Medicine**, v. 38, n. 4, p. 163-6, 2010.

TERREROS, M. C.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; NOVICK, G. E.; LUIS, J. R.; LACAU, H.; LOWERY, R.K.; REGUEIRO, M.; HERRERA, R. J. Insights on human evolution: an analysis of Alu insertion polymorphisms. **Journal of Human Genetics**, v. 54, p. 603-11, 2009.

TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: **Rheumatoid arthritis. J. Autoimmun.** v.35, n.1, p.10-4, 2010.

TURESSON, C.; JACOBSSON, L. T.; STURFELT, G.; MATTESSON, E. L.; MATHSSON, L.; RÖNNELID, J. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v.66, n.1, p.59-64, 2007.

ULLU, E. & TSCHIDI, C. Alu sequences are processed 7SL RNA genes. **Nature**, v. 8, p. 171-2, 1984.

USNLM – United States National Library of Medicine. Autoimmune disorders, 2013. Disponível em <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000816.htm>>

VEIT, T. D.; DE LIMA, C. P. S.; CAVALHEIRO, L. C.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BRENOL, C. V.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; DA CUNHA SAUMA, M. F. L.; DOS SANTOS, E. J. M.; CHIES, J. A. B. HLA-G +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil. **Tissue Antigens**, v. 83, p. 260–6, 2014.

VISSER, K. E.; COUSSENS, L. M. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 54, n. 11, p. 1143–52, 2005.

WANG, H.; XING, J.; GROVER, D.; HEDGES, D. J.; HAN, K.; WALKER, J. A.; BATZER, M. A. SVA elements: a hominid-specific retroposon family. **Journal of Molecular Biology**, v. 354, n. 4, p. 994-1007, 2005.

WITHERSPOON, D. J.; MARCHANI, E. E.; WATKINS, W. S.; OSTLER, C. T.; WOODING, S. P.; ANDERS, B.; FOWLKES, J. D.; BOISSINOT, S.; FURANO, V.; RAY, D.; ROGERS, R.; BATZER, M.; JORDE, L. B. Human population genetic structure and diversity inferred from polymorphic L1(LINE-1) and Alu insertions. **Human Heredity**, v. 62, p. 30-46, 2006.

WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**, v. 19, n. 4, p. 251-3, 1955.

YIE, S. M.; LI, L. H.; XIAO, R.; LIBRACH, C.L. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, p. 649-53, 2008.

APÊNDICE A

Frequências alélicas e genotípicas para pacientes e indivíduos-controle, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento da artrite reumatoide, valores de intervalo de confiança (IC 95%), p para OR e p para Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)	OR	p	IC
14pb (rs1704)			0,023*			0,850			
In	99	43,421		93	40,43		1,131	0,580	0,766-1,668
Del	129	56,579		137	59,57		0,885	0,580	0,600-1,305
Total de Alelos	228			230					
InIn	15	13,158		18	15,65		0,816	0,727	0,366-1,816
InDel	69	60,526		57	49,57		1,560	0,125	0,893-2,728
DelDel	30	26,316		40	34,78		0,670	0,213	0,365-1,226
Total de Indivíduos	114			115					

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)	OR	p	IC
+3001 (rs567747016)			1,000			SI			
C	227	98,696		110	100,00		0,294	0,749	0,000-4,892
T	3	1,304		0	0,00		3,400	0,749	0,204- 2002,375
Total de Alelos	230			110					
CC	112	97,391		55	100,00		0,290	0,744	0,000-4,928
CT	3	2,609		0	0,00		3,453	0,744	0,203- 2047,446
TT	0	0,000		0	0,00		0,481	1,000	0,000- 498,144
Total de Indivíduos	115			55					
+3003 (rs1707)			0,194			0,235			
C	20	8,696		21	9,292		0,930	0,953	0,467-1,848
T	210	91,304		205	90,708		1,706	0,953	0,541-2,140
Total de Alelos	230			226					
CC	2	1,739		2	1,770		0,982	1,000	0,097-9,977
CT	16	13,913		17	15,044		0,913	0,957	0,410-2,028
TT	97	84,348		94	83,186		1,089	0,954	0,509-2,331
Total de Indivíduos	115			113					

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)	OR	p	IC
+3010 (rs1710)			0,187			0,190			
G	97	42,544		112	50,000		0,740	0,135	0,502-1,091
C	131	57,456		112	50,000		1,351	0,135	0,916-1,991
Total de Alelos	228			224					
GG	17	14,912		24	21,429		0,643	0,273	0,306-1,342
GC	63	55,263		64	57,143		0,926	0,881	0,529-1,622
CC	34	29,825		24	21,429		1,558	0,196	0,817-2,981
Total de Indivíduos	114			112					
+3027 (rs17179101)			1,000			1,000			
A	14	6,087		7	3,043		2,065	0,180	0,763-5,769
C	216	93,913		223	96,957		0,484	0,180	0,173-1,311
Total de Alelos	230			230					
AA	0	0,000		0	0,000		-	-	-
AC	14	12,174		7	6,087		2,139	0,170	0,768-6,132
CC	101	87,826		108	93,913		0,468	0,170	0,163-1,302
Total de Indivíduos	115			115					

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)	OR	p	IC
+3035 (rs17179108)			0,697			0,407			
C	196	85,965		198	86,842		0,928	0,892	0,525-1,639
T	32	14,035		30	13,158		1,078	0,892	0,610-1,904
Total de Alelos	228			228					
CC	83	72,807		87	76,316		0,831	0,648	0,438-1,574
CT	30	26,316		24	21,053		1,339	0,436	0,694-2,589
TT	1	0,877		3	2,632		0,327	0,613	0,013-3,596
Total de Indivíduos	114			114					
+3142 (rs1063320)			0,052			0,347			
G	128	57,143		114	50,893		1,287	0,218	0,871-1,900
C	96	42,857		110	49,107		0,777	0,218	0,526-1,148
Total de Alelos	224			224					
GG	31	27,679		26	23,214		1,266	0,539	0,664-2,418
GC	66	58,929		62	55,357		1,157	0,685	0,658-2,035
CC	15	13,393		24	21,429		0,567	0,159	0,263-1,212
Total de Indivíduos	112			112					

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)	OR	p	IC
+3187 (rs9380142)			0,812			0,057			
A	157	72,685		155	67,982		1,253	0,328	0,816-1,926
G	59	27,315		73	32,018		0,798	0,328	0,519-1,225
Total de Alelos	216			228					
AA	56	51,852		48	42,105		1,481	0,187	0,842-2,606
AG	45	41,667		59	51,754		0,666	0,170	0,378-1,171
GG	7	6,481		7	6,140		1,059	1,000	0,320-3,506
Total de Indivíduos	108			114					
+3196 (rs1610696)			0,242			0,109			
G	63	28,899		24	23,077		1,355	0,334	0,763-2,417
C	155	71,101		80	76,923		0,738	0,334	0,414-1,311
Total de Alelos	218			104					
GG	6	5,505		5	9,615		0,548	0,527	0,139-2,198
GC	51	46,789		14	26,923		2,387	0,026*	1,101-5,228
CC	52	47,706		33	63,462		0,525	0,088	0,252-1,091
Total de Indivíduos	109			52					

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	EHW (p)	Controles (n)	Frequência	EHW (p)	OR	p	IC
+3227 (rs1233331).			1,000			1,000			
A	10	4,762		4	3,922		1,225	0,965	0,342-4,765
G	200	95,238		98	96,078		0,816	0,965	0,210-2,923
Total de Alelos	210			102					
AA	0	0,000		0	0,000		0,488	1,000	0,000-506,614
AG	10	9,524		4	7,843		1,237	0,964	0,332-4,977
GG	95	90,476		47	92,157		0,809	0,964	0,201-3,012
Total de Indivíduos	105			51					
AluYHG (AF055066)			0,553			0,018*			
In	40	19,802		73	32,018		0,524	0,006*	0,328-0,836
Del	162	80,198		155	67,982		1,907	0,006*	1,196-3,048
Total de Alelos	202			228					
InIn	3	2,970		6	5,263		0,551	0,619	0,106-2,567
InDel	34	33,663		61	53,509		0,441	0,006*	0,244-0,795
DelDel	64	63,366		47	41,228		2,466	0,002*	1,371-4,445
Total de Indivíduos	101			114					

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); n: número amostral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; p: probabilidade; SI: sem informação; EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores significativos estão anotados com *.

APÊNDICE B

Polimorfismos do gene *HLA-G* e inserção *Alu**YG* e os modelos de herança analisados em pacientes e indivíduos-controles.

Gene/ SNP	Modelo de Herança		Análise		
			OR	<i>p</i>	IC(95%)
14pb	Aditivo	II+ID x DD	1,42	0,269	0,789 - 2,558
		DD+ID x II	1,130	0,886	0,517 - 2,479
	Multiplicativo	2*2*I+ID	1,148	0,431	0,830 - 1,589
		2*2*D+ID	0,871	0,431	0,629 - 1,205
+3001	Aditivo	TT+CT x CC	3,45	0,744	0,203 - 2047,446
		CC+CT x TT	2,06	1,000	0,002 - 2120,372
	Multiplicativo	2*2*C+CT	0,293	0,742	0,000 - 4,820
		2*2*T+CT	3,419	0,742	0,207 - 2006,628
+3003	Aditivo	TT+CT x CC	1,024	1,000	0,102 - 10,266
		CC+CT x TT	0,923	0,952	0,446 - 1,909
	Multiplicativo	2*2*C+CT	0,934	0,933	0,505 - 1,725
		2*2*T+CT	1,071	0,933	0,580 - 1,979
+3010	Aditivo	CC+GC x GG	1,651	0,192	0,805 - 3,404
		GG+GC x CC	0,611	0,134	0,325 - 1,146
	Multiplicativo	2*2*G+GC	0,658	0,011*	0,476 - 0,909
		2*2*C+GC	1,519	0,011*	1,100 - 2,099
+3027	Aditivo	CC+AC x AA	0,969	1,000	0,001 - 995,466
		AA+AC x CC	2,139	0,170	0,768 - 6,132
	Multiplicativo	2*2*A+AC	2,100	0,162	0,785 - 5,801
		2*2*C+AC	0,476	0,162	0,172 - 1,273
+3035	Aditivo	TT+CT x CC	1,118	0,820	0,600 - 2,084
		CC+CT x TT	2,970	0,629	0,274 - 73,433
	Multiplicativo	2*2*C+CT	1,030	1,000	0,614 - 1,730
		2*2*T+CT	0,971	1,000	0,578 - 1,629
+3142	Aditivo	CC+GC x GG	0,732	0,373	0,390 - 1,373
		GG+GC x CC	1,796	0,133	0,855 - 3,802
	Multiplicativo	2*2*G+GC	1,44	0,029*	1,036-1,988
		2*2*C+GC	0,697	0,029*	0,503 - 0,965

Gene/ SNP	Modelo de Herança		Análise		
			OR	<i>p</i>	IC(95%)
+3187	Aditivo	GG+AG x AA	0,693	0,206	0,400 - 1,199
		AA+AG x GG	1,013	1,000	0,311 - 3,300
	Multiplicativo	2*2*A+AG	1,277	0,208	0,881 - 1,851
		2*2*G+AG	0,783	0,208	0,540 - 1,134
+3196	Aditivo	CC+GC x GG	1,615	0,650	0,412 - 6,208
		GG+GC x CC	1,666	0,161	0,836 - 3,329
	Multiplicativo	2*2*G+GC	1,243	0,406	0,772 - 2,007
		2*2*C+GC	0,804	0,406	0,498 - 1,295
+3227	Aditivo	GG+AG x AA	2,036	1,000	0,002 - 2098,163
		AA+AG x GG	1,649	0,964	0,392 - 7,968
	Multiplicativo	2*2*A+AG	1,231	0,953	0,350 - 4,722
		2*2*G+AG	0,813	0,953	0,212 - 2,858
AluyHG	Aditivo	II+ID x DD	2,090	0,475	0,455 - 10,745
		DD+ID x II	0,402	0,002*	0,266 - 0,714
	Multiplicativo	2*2*I+ID	0,465	0,000*	0,306 - 0,704
		2*2*D+ID	2,152	0,000*	1,421 - 3,264

Associações (GENEPOP e HDS Epimax); OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. Os valores significativos estão anotados com *.

APÊNDICE C

Frequências de indivíduos fumantes (sim), ex-fumantes (ex) e não fumantes (não) para casos e controles e análises de associação.

		Casos (n=110)	Frequências	Controles (n=104)	Frequências	OR	p	IC
Tabagismo	Sim	23	20,909	15	14,423	1,569	0,289	0,727-3,406
	Ex	18	16,364	22	21,154	0,729	0,470	0,346-1,534
	Não	69	62,727	67	64,423	0,929	0,908	0,512-1,685

n: número amostral; freq.: frequência; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; p: probabilidade.

APÊNDICE D

Frequências dos dados clínicos fator reumatoide (FR), proteína C reativa (CRP) e velocidade de hemossedimentação (VHS) analisados em pacientes de AR.

	Positivo	Frequência	Negativo	Frequência	Total
FR	51	54,255	43	45,745	94
CRP	48	50,000	48	50,000	96
VHS	65	66,327	33	33,673	98

Critérios de classificação para positividade: FR superior a 20 IU/mL; CRP superior a 5 mg/L; VHS superior a 19 mm/h (hora).

APÊNDICE E

Frequências alélicas e genotípicas em conjunto com fator reumatoide (FR), cálculos de associação (OR) entre a presença do polimorfismo e a positividade do FR, valores de intervalo de confiança (95%) e p para OR.

Polimorfismo	FR+	Freq	FR-	Freq	OR	p	IC
14pb (rs1704)							
In	40	39,216	37	44,048	0,820	0,605	0,437-1,536
Del	62	60,784	47	55,952	1,220	0,605	0,651-2,288
Total de Alelos	102		84				
InIn	7	13,725	4	9,524	1,511	0,763	0,358-6,739
InDel	26	50,980	29	69,048	0,466	0,120	0,181-1,189
DelDel	18	35,294	9	21,429	2,000	0,217	0,717-5,666
Total de Indivíduos	51		42				
+3001 (rs567747016)							
C	99	97,059	86	100,000	0,164	0,399	0,000-2,773
T	3	2,941	0	0,000	6,085	0,399	0,361-3598,560
Total de Alelos	102		86				
CC	48	94,118	43	100,000	0,000	1,000	0,955-440,845
CT	3	5,882	0	0,000	6,278	0,393	0,359-3753,590
TT	0	0,000	0	0,000	0,159	0,393	0,000-2,786
Total de Indivíduos	51		43				

Polimorfismo	FR+	Freq	FR-	Freq	OR	p	IC
+3003 (rs1707)							
C	8	7,843	7	8,140	0,660	1,000	0,300-3,102
T	94	92,157	79	91,860	1,041	1,000	0,322-3,337
Total de Alelos	102		86				
CC	1	1,961	1	2,326	0,840	1,000	0,022-31,725
CT	6	11,765	5	11,628	1,013	1,000	0,247-4,221
TT	44	86,275	37	86,047	1,019	1,000	0,272-3,778
Total de Indivíduos	51		43				
+3010 (rs1710)							
G	48	48,000	34	39,535	1,412	0,312	0,756-2,641
C	52	52,000	52	60,465	0,708	0,312	0,379-1,323
Total de Alelos	100		86				
GG	13	26,000	3	6,977	4,685	0,032*	1,114-22,660
GC	22	44,000	28	65,116	0,421	0,067	0,166-1,057
CC	15	30,000	12	27,907	1,107	1,000	0,411-2,996
Total de Indivíduos	50		43				
+3027 (rs17179101)							
A	3	2,941	3	3,488	0,838	1,000	0,131-5,368
C	99	97,059	83	96,512	1,193	1,000	0,186-7,639
Total de Alelos	102		86				
AA	0	0,000	0	0,000	0,845	1,000	0,001-882,552
AC	3	5,882	3	6,977	0,833	1,000	0,125-5,556
CC	48	94,118	40	93,023	1,200	1,000	0,180-8,007
Total de Indivíduos	51		43				

Polimorfismo	FR+	Freq	FR-	Freq	OR	p	IC
+3035 (rs17179108)							
C	86	86,000	73	84,884	1,094	0,995	0,449-2,661
T	14	14,000	13	15,116	0,914	0,995	0,376-2,228
Total de Alelos	100		86				
CC	36	72,000	31	72,093	0,912	1,000	0,328-2,530
CT	14	28,000	11	25,581	1,131	0,978	0,409-3,143
TT	0	0,000	1	2,326	0,281	0,916	0,000-8,499
Total de Indivíduos	50		43				
+3142 (rs1063320)							
G	51	52,041	50	59,524	0,738	0,388	0,392-1,387
C	47	47,959	34	40,476	1,355	0,388	0,721-2,551
Total de Alelos	98		84				
GG	13	26,531	11	26,190	1,018	1,000	0,362-2,870
GC	25	51,020	28	66,667	0,521	0,195	0,203-1,326
CC	11	22,449	3	7,143	3,763	0,084	0,871-18,599
Total de Indivíduos	49		42				
+3187 (rs9380142)							
A	64	68,085	59	71,951	0,832	0,694	0,413-1,671
G	30	31,915	23	28,049	1,202	0,694	0,599-2,420
Total de Alelos	94		82				
AA	21	44,681	21	51,220	0,769	0,690	0,490-3,158
AG	22	46,809	17	41,463	1,242	0,773	0,490-3,158
GG	4	8,511	3	7,317	1,178	1,000	0,204-7,181
Total de Indivíduos	47		41				

Polimorfismo	FR+	Freq	FR-	Freq	OR	<i>p</i>	IC
+3196 (rs1610696)							
G	23	23,958	24	29,268	0,761	0,528	0,370-1,565
C	73	76,042	58	70,732	1,313	0,528	0,639-2,701
Total de Alelos	96		82				
GG	3	6,250	0	0,000	6,385	0,386	0,364-3821,828
GC	17	35,417	24	58,537	0,388	0,049*	0,150-0,996
CC	28	58,333	17	41,463	1,976	0,170	0,781-5,041
Total de Indivíduos	48		41				
+3227 (rs1233331).							
A	5	5,682	3	3,659	1,586	0,795	0,316-8,712
G	83	94,318	79	96,341	0,630	0,795	0,115-3,161
Total de Alelos	88		82				
AA	0	0,000	0	0,000	0,933	1,000	0,001-976,456
AG	5	11,364	3	7,317	1,624	0,790	0,307-9,348
GG	39	88,636	38	92,683	0,616	0,790	0,107-3,261
Total de Indivíduos	44		41				
AluYHG (AF055066)							
In	72	76,596	56	80,000	0,818	0,741	0,359-1,853
Del	22	23,404	14	20,000	1,222	0,741	0,540-2,786
Total de Alelos	94		70				
InIn	26	55,319	23	65,714	0,646	0,470	0,236-1,752
InDel	20	42,553	10	28,571	1,852	0,286	0,662-5,249
DelDel	1	2,128	2	5,714	0,359	0,794	0,012-5,380
Total de Indivíduos	47		35				

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); Freq: frequência; n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. Os valores significativos estão anotados com *.

APÊNDICE F

Frequências alélicas e genotípicas em conjunto com proteína C-reativa (CRP), cálculos de associação (OR) entre a presença do polimorfismo e a positividade do CRP, valores de intervalo de confiança (95%) e p para OR.

Polimorfismo	CRP+	Freq	CRP-	Freq	OR	p	IC
14pb (rs1704)							
In	34	36,170	46	47,917	0,616	0,135	0,330-1,147
Del	60	63,830	50	52,083	1,624	0,135	0,872-3,028
Total de Alelos	94		96				
InIn	4	8,511	8	16,667	0,465	0,375	0,107-1,892
InDel	26	55,319	30	62,500	0,743	0,615	0,301-1,826
DelDel	17	36,170	10	20,833	2,153	0,153	0,788-5,964
Total de Indivíduos	47		48				
+3001 (rs567747016)							
C	93	98,936	94	97,917	1,979	1,000	0,138-55,381
T	1	1,064	2	2,083	0,505	1,000	0,018-7,260
Total de Alelos	94		96				
CC	46	97,872	46	95,833	2,000	1,000	0,135-57,159
CT	1	2,128	2	4,167	0,500	1,000	0,017-7,401
TT	0	0,000	0	0,000	1,021	1,000	0,001-1066,956
Total de Indivíduos	47		48				

Polimorfismo	CRP+	Freq	CRP-	Freq	OR	<i>p</i>	IC
+3003 (rs1707)							
C	4	4,255	11	11,458	0,343	0,116	0,088-1,228
T	90	95,745	85	88,542	2,912	0,116	0,814-11,333
Total de Alelos	94		96				
CC	0	0,000	2	4,167	0,196	0,569	0,000-3,974
CT	4	8,511	7	14,583	0,545	0,545	0,123-2,294
TT	43	91,489	39	81,250	2,481	0,249	0,626-10,525
Total de Indivíduos	47		48				
+3010 (rs1710)							
G	43	46,739	40	41,667	1,229	0,580	0,633-2,279
C	49	53,261	56	58,333	0,814	0,580	0,439-1,509
Total de Alelos	92		96				
GG	10	21,739	6	12,500	1,944	0,360	0,574-6,763
GC	23	50,000	28	58,333	0,714	0,546	0,291-1,746
CC	13	28,261	14	29,167	0,957	1,000	0,356-2,564
Total de Indivíduos	46		48				
+3027 (rs17179101)							
A	4	4,255	3	3,125	1,378	0,978	0,251-8,008
C	90	95,745	93	96,875	0,726	0,978	0,125-3,978
Total de Alelos	94		96				
AA	0	0,000	0	0,000	1,021	1,000	0,001-1066,488
AC	4	8,511	3	6,250	1,395	0,977	0,244-8,450
CC	43	91,489	45	93,750	0,717	0,977	0,118-4,099
Total de Indivíduos	47		48				

Polimorfismo	CRP+	Freq	CRP-	Freq	OR	p	IC
+3035 (rs17179108)							
C	80	86,957	82	85,417	1,138	0,925	0,461-2,819
T	12	13,043	14	14,583	0,879	0,925	0,355-2,168
Total de Alelos	92		96				
CC	34	73,913	34	70,833	1,167	0,918	0,430-3,177
CT	12	26,087	14	29,167	0,857	0,918	0,315-2,327
TT	0	0,000	0	0,000	1,043	1,000	0,001-1089,673
Total de Indivíduos	46		48				
+3142 (rs1063320)							
G	48	51,064	54	60,000	0,696	0,285	0,372-1,301
C	46	48,936	36	40,000	1,438	0,285	0,769-2,691
Total de Alelos	94		90				
GG	11	23,404	13	28,889	0,752	0,718	0,267-2,108
GC	26	55,319	28	62,222	0,752	0,645	0,300-1,877
CC	10	21,277	4	8,889	2,770	0,173	0,712-11,585
Total de Indivíduos	47		45				
+3187 (rs9380142)							
A	61	69,318	64	71,111	0,918	0,923	0,459-1,834
G	27	30,682	26	28,889	1,090	0,923	0,545-2,178
Total de Alelos	88		90				
AA	21	47,727	22	48,889	0,955	1,000	0,382-2,384
AG	19	43,182	20	44,444	0,950	1,000	0,337-2,390
GG	4	9,091	3	6,667	1,400	0,976	0,243-8,522
Total de Indivíduos	44		45				

Polimorfismo	CRP+	Freq	CRP-	Freq	OR	<i>p</i>	IC
+3196 (rs1610696)							
G	20	22,222	29	32,222	0,601	0,181	0,293-1,229
C	70	77,778	61	67,778	1,664	0,181	0,813-3,416
Total de Alelos	90		90				
GG	3	6,667	1	2,222	3,143	0,609	0,273-80,439
GC	14	31,111	27	60,000	0,301	0,011*	0,115-0,781
CC	28	62,222	17	37,778	2,713	0,035*	1,065-6,986
Total de Indivíduos	45		45				
+3227 (rs1233331).							
A	5	5,952	3	3,409	1,793	0,667	0,358-9,843
G	79	94,048	85	96,591	0,588	0,667	0,102-2,793
Total de Alelos	84		88				
AA	0	0,000	0	0,000	1,047	1,000	0,001-1096,022
AG	5	11,905	3	6,818	1,847	0,659	0,359-10,623
GG	37	88,095	41	93,182	0,541	0,659	0,094-2,863
Total de Indivíduos	42		44				
AluYHG (AF055066)							
In	64	74,419	67	81,707	1,535	0,341	0,690-3,437
Del	22	25,581	15	18,293	0,651	0,341	0,291-1,450
Total de Alelos	86		82				
InIn	23	53,488	27	65,854	1,951	1,000	0,131-56,077
InDel	18	41,860	13	31,707	1,551	0,461	0,578-4,183
DelDel	2	4,651	1	2,439	0,596	0,352	0,224-1,574
Total de Indivíduos	43		41				

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade; SI: sem informação. Os valores significativos estão anotados com *.

APÊNDICE G

Frequências alélicas e genotípicas em conjunto com velocidade de hemossedimentação (VHS), cálculos de associação (OR) entre a presença do polimorfismo e a positividade da VHS, valores de e e p para OR e intervalo de confiança (95%).

Polimorfismo	VHS+	Freq	VHS-	Freq	OR	p	IC
14pb (rs1704)							
In	51	39,231	30	35,714	0,732	0,390	0,382-1,399
Del	79	60,769	34	40,476	1,367	0,390	0,715-2,615
Total de Alelos	130		64				
InIn	8	15,686	4	9,524	0,982	1,000	0,239-4,290
InDel	35	68,627	22	52,381	0,530	0,237	0,197-1,409
DelDel	22	43,137	6	14,286	2,217	0,192	0,724-7,059
Total de Indivíduos	65		32				
+3001 (rs567747016)							
C	127	97,692	66	100,000	0,274	0,706	0,000-4,627
T	3	2,308	0	0,000	3,651	0,706	0,216-2160,306
Total de Alelos	130		66				
CC	62	95,385	33	100,000	0,267	0,698	0,000-4,683
CT	3	4,615	0	0,000	3,752	0,698	0,214-2245,545
TT	0	0,000	0	0,000	0,511	1,000	0,000-535,084
Total de Indivíduos	65		33				

Polimorfismo	VHS+	Freq	VHS-	Freq	OR	<i>p</i>	IC
+3003 (rs1707)							
C	6	4,615	9	13,636	0,296	0,042*	0,088-0,966
T	124	95,385	57	86,364	3,382	0,042*	1,035- 11,342
Total de Alelos	130		66				
CC	0	0,000	2	6,061	0,096	0,226	0,000-1,966
CT	6	9,231	5	15,152	0,569	0,589	0,137-2,390
TT	59	90,769	26	78,788	2,647	0,181	0,707- 10,059
Total de Indivíduos	65		33				
+3010 (rs1710)							
G	56	43,750	30	45,455	0,933	0,942	0,492-1,772
C	72	56,250	36	54,545	1,071	0,942	0,564-2,033
Total de Alelos	128		66				
GG	12	18,750	5	15,152	1,292	0,873	0,370-4,727
GC	32	50,000	20	60,606	0,650	0,437	0,253-1,657
CC	20	31,250	8	24,242	1,420	0,627	0,498-4,128
Total de Indivíduos	64		33				
+3027 (rs17179101)							
A	4	3,077	3	4,545	0,667	0,908	0,121-3,889
C	126	96,923	63	95,455	1,500	0,908	0,257-8,253
Total de Alelos	130		66				
AA	0	0,000	0	0,000	0,511	1,000	0,000- 535,084
AC	4	6,154	3	9,091	0,656	0,906	0,113-3,991
CC	61	93,846	30	90,909	1,525	0,840	0,298-7,812
Total de Indivíduos	65		33				

Polimorfismo	VHS+	Freq	VHS-	Freq	OR	<i>p</i>	IC
+3196 (rs1610696)							
G	32	25,806	18	29,032	0,850	0,770	0,409-1,776
C	92	74,194	44	70,968	1,176	0,770	0,563-2,447
Total de Alelos	124		62				
GG	3	4,839	1	3,226	1,525	1,000	0,132-39,166
GC	26	41,935	16	51,613	0,677	0,507	0,260-1,757
CC	33	53,226	14	45,161	1,382	0,607	0,533-3,595
Total de Indivíduos	62		31				
+3227 (rs1233331).							
A	9	7,377	0	0,000	0,948	0,129	0,700-5164,672
G	113	92,623	56	100,000	0,106	0,129	0,000-1,429
Total de Alelos	122		56				
AA	0	0,000	0	0,000	0,463	1,000	0,000-486,320
AG	9	14,754	0	0,000	10,314	0,115	0,728-5709,912
GG	52	85,246	28	100,000	0,097	0,115	0,000-1,374
Total de Indivíduos	61		28				
AluyHG (AF055066)							
In	89	75,424	45	83,333	1,629	0,336	0,667-4,070
Del	29	24,576	9	16,667	0,614	0,336	0,246-1,500
Total de Alelos	118		54				
InIn	33	55,932	18	66,667	3,407	0,764	0,191-2047,393
InDel	23	38,983	9	33,333	1,278	0,793	0,445-3,711
DelDel	3	5,085	0	0,000	0,635	0,481	0,220-1,808
Total de Indivíduos	59		27				

Frequências e associações (GENEPOP e HDS Epimax); n: número amostral; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade; SI: sem informação. Os valores significativos estão anotados com *.

APÊNDICE H

Haplótipos inferidos para 3'UTR do *HLA-G*, suas frequências para as populações de casos e controles, análises de associação (OR) entre haplótipos e o desenvolvimento da AR, valores de *p* e intervalo de confiança (IC).

UTR	Haplótipos	Casos (n=106)		Controles (n=104)		OR	<i>p</i>	IC
		Frequência	Frequência	Frequência	Frequência			
UTR1	DelTGCCCG	54	50,943	69	66,346	0,727	0,169	0,466-1,133
UTR2	InsTCCCGA	61	57,547	55	52,885	1,185	0,505	0,755-1,859
UTR3	DelTCCCGA	29	27,358	26	25,000	1,159	0,715	0,633-2,123
UTR4	DelCGCCCA	17	16,038	19	18,269	0,904	0,909	0,433-1,884
UTR5	InsTCCTGA	24	22,642	12	11,538	2,174	0,048*	1,006-4,761
UTR6	DelTGCCCA	17	16,038	16	15,385	1,090	0,995	0,507-2,346
UTR7	InsTCATGA	6	5,660	14	13,462	0,420	0,118	0,141-1,198
UTR8	InsTGCCGA	0	0,000	1	0,962	0,338	1,000	0,000-9,802

n: número amostral; freq.: frequência; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. Os valores significativos estão anotados com *.

APÊNDICE I

Haplótipos inferidos para 3'UTR do *HLA-G* e *AluYG*, suas frequências para as populações de casos e controles, análises de associação (OR) entre haplótipos e o desenvolvimento da AR, valores de *p* e intervalo de confiança (IC).

UTR	Haplótipos + <i>AluYG</i>	Casos (n=104)		Controles (n=102)		OR	<i>p</i>	IC
		Frequência		Frequência				
UTR1	DelTGCCCG + <i>AluYG*Ins</i>	47	45,192	63	61,765	0,653	0,073	0,411-1,039
UTR1	DelTGCCCG + <i>AluYG*Del</i>	7	6,731	5	4,902	1,386	0,796	0,387-5,120
UTR2	InsTCCCGA + <i>AluYG*Del</i>	60	57,692	50	49,020	1,249	0,377	0,787-1,981
UTR3	DelTCCCGA + <i>AluYG*Del</i>	30	28,846	26	25,490	1,154	0,724	0,633-2,107
UTR4	DelCGCCCA + <i>AluYG*Del</i>	17	16,346	19	18,627	0,867	0,814	0,415-1,807
UTR5	InsTCCTGA + <i>AluYG*Del</i>	24	23,077	12	11,765	2,087	0,063	0,965-4,574
UTR6	DelTGCCCA + <i>AluYG*Del</i>	17	16,346	15	14,706	1,121	0,899	0,515-2,447
UTR7	InsTCATGA + <i>AluYG*Del</i>	6	5,769	13	12,745	0,436	0,146	0,145-1,262
UTR8	InsTGCCGA + <i>AluYG*Del</i>	0	0,000	1	0,980	0,325	0,989	0,000-9,434

n: número amostral; freq.: frequência; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; p: probabilidade

APÊNDICE J

Combinações haplotípicas inferidas para 3'UTR do *HLA-G*, suas frequências para as populações de casos e controles, análises de associação (OR) entre haplótipos e o desenvolvimento da AR, valores de *p* e intervalo de confiança (IC).

Combinação Haplotópica	Casos (n=106)		Controles (n=104)		OR	<i>p</i>	IC
	Frequência		Frequência				
UTR1 + UTR1	6	5,660	7	6,731	0,866	1,000	0,247-2,998
UTR1 + UTR2	19	17,925	24	23,077	0,764	0,539	0,369-1,577
UTR1 + UTR3	5	4,717	12	11,538	0,396	0,140	0,116-1,271
UTR1 + UTR4	2	1,887	6	5,769	0,327	0,292	0,045-1,847
UTR1 + UTR5	10	9,434	2	1,923	5,532	0,034*	1,098-37,579
UTR1 + UTR6	4	3,774	6	5,769	0,667	0,769	0,152-2,773
UTR1 + UTR7	2	1,887	5	4,808	0,396	0,457	0,052-2,372
UTR2 + UTR2	6	5,660	7	6,731	0,866	1,000	0,247-2,998
UTR2 + UTR3	12	11,321	7	6,731	1,85	0,315	0,640-5,452
UTR2 + UTR4	4	3,774	2	1,923	0,48	0,661	0,060-3,137
UTR2 + UTR5	5	4,717	2	1,923	2,63	0,427	0,438-19,992
UTR2 + UTR6	6	5,660	4	3,846	1,56	0,722	0,375-6,818
UTR2 + UTR7	2	1,887	1	0,962	2,06	0,987	0,144-57,510
UTR2 + UTR8	0	0,000	1	0,962	0,324	0,989	0,000-9,509

Combinação Haplotópica	Casos (n=106)		Controles (n=104)		OR	p	IC
	Frequência		Frequência				
UTR3 + UTR3	2	1,887	0	0,000	5,2	0,550	0,265-3221,479
UTR3 + UTR4	4	3,774	3	2,885	1,373	0,980	0,252-7,961
UTR3 + UTR5	2	1,887	1	0,962	2,059	0,987	0,144-57,510
UTR3 + UTR6	3	2,830	0	0,000	7,345	0,304	0,437-4338,186
UTR3 + UTR7	0	0,000	3	2,885	0,141	0,322	0,000-2,379
UTR4 + UTR4	1	0,943	2	1,923	0,505	1,000	0,018-7,288
UTR4 + UTR5	3	2,830	1	0,962	3,119	0,600	0,283-77,800
UTR4 + UTR6	1	0,943	2	1,923	0,505	1,000	0,018-7,228
UTR4 + UTR7	1	0,943	1	0,962	1,019	1,000	0,028-37,619
UTR5 + UTR5	1	0,943	1	0,962	1,019	1,000	0,028-37,619
UTR5 + UTR6	2	1,887	2	1,923	1,020	1,000	0,101-10,321
UTR5 + UTR7	0	0,000	2	1,923	0,200	0,572	0,000-3,924
UTR6 + UTR6	0	0,000	0	0,000	1,019	1,000	0,001-1052,490
UTR6 + UTR7	1	0,943	2	1,923	0,505	1,000	0,018-7,228

n: número amostral; freq.: frequência; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; p: probabilidade. Os valores significativos estão anotados com *.

APÊNDICE K

Combinações haplotípicas inferidas para 3'UTR do *HLA-G* e *AluYHG*, suas frequências para as populações de casos e controles, análises de associação (OR) entre haplótipos e o desenvolvimento da AR, valores de *p* e intervalo de confiança (IC).

Combinação Haplotópica + <i>AluYHG</i>	Casos (n=104)	Frequência	Controles (n=102)	Frequência	OR	<i>p</i>	IC
<i>UTR1 *Ins</i>	2	1,923	3	2,941	0,647	0,983	0,074-4,882
<i>UTR1 *Del</i>	1	0,962	0	0,000	2,971	1,000	0,101-2046,961
<i>UTR1 *Del UTR3 *Del</i>	1	0,962	1	0,980	0,981	1,000	0,027-36,198
<i>UTR1 *Del UTR5 *Del</i>	1	0,962	0	0,000	2,971	1,000	0,101-2046,961
<i>UTR1 *Del UTR6 *Del</i>	1	0,962	0	0,000	2,971	1,000	0,101-2046,961
<i>UTR1 *Del UTR7 *Del</i>	0	0,000	1	0,980	0,324	0,989	0,000-9,508
<i>UTR1 *Ins</i>	3	2,885	4	3,922	0,728	0,979	0,125-3,970
<i>UTR2 *Del</i>	19	18,269	24	23,529	0,726	0,449	0,350-1,503
<i>UTR3 *Del</i>	4	3,846	11	10,784	0,331	0,099	0,085-1,178
<i>UTR1 *Ins UTR4 *Del</i>	2	1,923	6	5,882	0,314	0,267	0,043-1,776
<i>UTR5 *Del</i>	9	8,654	2	1,961	4,737	0,067	0,921-32,697
<i>UTR6 *Del</i>	3	2,885	5	4,902	0,576	0,697	0,106-2,863
<i>UTR7 *Del</i>	2	1,923	4	3,922	0,480	0,661	0,060-3,138

Combinação Haplotópica + <i>AluyHG</i>	Casos (n=104)	Frequência	Controles (n=102)	Frequência	OR	<i>p</i>	IC
<i>UTR2 *Del</i>	6	5,769	5	4,902	1,188	1,000	0,308-4,668
<i>UTR3 *Del</i>	12	11,538	7	6,863	1,770	0,359	0,613-5,236
<i>UTR4 *Del</i>	4	3,846	2	1,961	2,000	0,696	0,306-16,079
<i>UTR2 *Del UTR5 *Del</i>	5	4,808	2	1,961	2,525	0,457	0,421-19,235
<i>UTR6 *Del</i>	6	5,769	4	3,922	1,500	0,770	0,360-6,557
<i>UTR7 *Del</i>	2	1,923	0	0,000	5,000	0,572	0,255-3101,049
<i>UTR8 *Del</i>	0	0,000	1	0,980	0,324	0,989	0,000-9,508
<i>UTR3 *Del</i>	2	1,923	0	0,000	5,000	0,572	0,255-3101,049
<i>UTR4 *Del</i>	4	3,846	3	2,941	1,320	1,000	0,242-7,658
<i>UTR3 *Del UTR5 *Del</i>	2	1,923	1	0,980	1,980	1,000	0,138-55,339
<i>UTR6 *Del</i>	3	2,885	0	0,000	7,069	0,322	0,420-4176,009
<i>UTR7 *Del</i>	0	0,000	3	2,941	0,136	0,304	0,000-2,289
<i>UTR4 *Del</i>	1	0,962	2	1,961	0,485	0,987	0,017-6,955
<i>UTR4 *Del UTR5 *Del</i>	3	2,885	1	0,980	3,000	0,627	0,272-74,863
<i>UTR6 *Del</i>	1	0,962	2	1,961	0,485	0,987	0,017-6,955
<i>UTR7 *Del</i>	1	0,962	1	0,980	0,981	1,000	0,027-36,198

Combinação Haplotópica + <i>Alu</i>YHG	Casos (n=104)	Frequência	Controles (n=102)	Frequência	OR	<i>p</i>	IC
<i>UTR5 *Del</i>	1	0,962	1	0,980	0,981	1,000	0,027-36,198
<i>UTR5 *Del UTR6 *Del</i>	2	1,923	2	1,961	0,98	1,000	0,097-9,930
<i>UTR7 *Del</i>	0	0,000	2	1,961	0,192	0,549	0,000-3,777
<i>UTR6 *Del UTR7 *Del</i>	1	0,962	2	1,961	0,485	0,987	0,017-6,955

n: número amostral; freq.: frequência; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; p: probabilidade.

APÊNDICE L

Haplótipos inferidos para 3'UTR do *HLA-G* e análise para o modelo de herança genética de adição e o desenvolvimento da AR.

UTR	Modelo de Herança		Análise		
			OR	<i>p</i>	IC(95%)
<i>UTR1</i>	Aditivo	11+1U x UU	0,615	0,096	0,349 - 1,083
<i>UTR2</i>	Aditivo	22+2U x UU	1,265	0,457	0,723 - 2,218
<i>UTR3</i>	Aditivo	33+3U x UU	1,215	0,640	0,630 - 2,343
<i>UTR4</i>	Aditivo	44+4U x UU	0,905	0,929	0,416 - 1,964
<i>UTR5</i>	Aditivo	55+5U x UU	2,346	0,038*	1,043 - 5,341
<i>UTR6</i>	Aditivo	66+6U x UU	1,099	0,953	0,491 - 2,461
<i>UTR7</i>	Aditivo	77+7U x UU	0,402	0,109	0,131 - 1,182
<i>UTR8</i>	Aditivo	88+8U x UU	0,337	1,000	0,000 - 9,878

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade; U: outra UTR qualquer que não a destacada. Os valores significativos estão anotados com *.

APÊNDICE M

Haplótipos inferidos para 3'UTR do *HLA-G* e inserção *Alu*_{YHG} e análise para o modelo de herança genética de adição e o desenvolvimento da AR.

UTR+ <i>Alu</i> _{YHG}	Modelo de Herança	Análise		
		OR	<i>p</i>	IC(95%)
UTR1 + *Ins	1Ins1Ins+1InsUA x UUA	0,556	0,047*	0,311 - 0,993
UTR1 + *Del	1Del1Del+1DelUA x UUA	1,386	0,806	0,378 - 5,235
UTR2 + *Del	2Del2Del+2DelUA x UUA	1,368	0,310	0,774 - 2,418
UTR3 + *Del	3Del3Del+3DelUA x UUA	1,154	0,764	0,567 - 2,231
UTR4 + *Del	4Del4Del+4DeUA x UUA	0,864	0,830	0,397 - 1,879
UTR5 + *Del	5Del5Del+5DelUA x UUA	2,247	0,050*	0,998 - 5,123
UTR6 + *Del	6Del6Del+6DelUA x UUA	1,133	0,895	0,500 - 2,573
UTR7 + *Del	7Del7Del+7DelUA x UUA	0,419	0,136	0,135 - 1,249
UTR8 + *Del	8Del8Del+8DelUA x UUA	0,989	0,324	0,000 - 9,508

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade; UA: outro conjunto de UTR e *Alu*_{YHG} qualquer que não o destacado. Os valores significativos estão anotados com *.

ANEXO A

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Genética da Autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide em pacientes de Santa Catarina

Pesquisador: ILIADA RAINHA DE SOUZA

Área Temática: Genética Humana;

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

Versão: 2

CAAE: 19430913.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E INOVAÇÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 423.535

Data da Relatoria: 23/09/2013

ANEXO B

Questionário para indivíduos pacientes.



Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB
Departamento de Clínica Médica/CCS
Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Artrite
Reumatóide

NOME: _____

PRONTUÁRIO/HU: _____

IDADE: _____ anos **SEXO:** ()F ()M **COR da Pele:**

Procedência: _____ **Natural de:**

Estado Civil: ()S ()C ()D ()V **Ocupação:**

Telefone: _____ **Data de**

nascimento: __/__/____

DATA: __/__/____ **AR:** _____

Médico: _____

Entrevistador: _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____

CIDADE onde nasceu: _____

Profissão: _____

DESCENDÊNCIA: Materna _____

Paterna _____

NOME da mãe: _____

CIDADE onde nasceu: _____

Profissão: _____

DESCEndência: Materna _____
 Paterna _____

Tempo de doença diagnosticada:

Histórico Familiar: AR: ()S ()N Parentesco:

Outras D. Reumat.: ()S ()N Parentesco:

Manifestações Iniciais:

- () Febre
 () Rigidez Matinal
 () Derrame Articular
 () Dor Articular

Articulações Acometidas:

- () Ombro () Cotovelo
 () Punho () MCF
 () IFPM () Quadril
 () Joelho () Tornozelo
 () MTF () IFPP

Total: _____ articulações

Manifestações Extra-articulares:

- () Pleurite
 () Pericardite
 () Vasculite Reumatóide
 () Nódulos Reumatóides
 () Acometimento Ocular
 () Acometimento Pulmonar
 () Acometimento Renal
 () Amiloidose
 () Sjögren Secundário
 () Outras

Quais? _____

Evolução: Internações: ()S ()N Quantas? _____ Motivos?

Hist. Familiar de Doença Cardiovascular: () S () N

Parentesco: _____

DAS 28 =

Fator Reumatóide =

Health Assesment Questionnaire (HAQ)

Nível de Dificuldade

Você é capaz de:	Nível de Dificuldade			
	Sem qualquer	Com alguma	Com muita	Incapaz de fazer
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões do sapato e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2. Lavar sua cabeça e seus	0	1	2	3
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braço?	0	1	2	3
4. Deitar-se e levantar-se da	0	1	2	3
5. Cortar um pedaço de carne?	0	1	2	3
6. Levar à boca um copo ou uma xícara cheia de café ou água?	0	1	2	3
7. Abrir um saco de leite	0	1	2	3
8. Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9. Subir 5 degraus?	0	1	2	3
10. Lavar e secar seu corpo após o banho?	0	1	2	3
11. Tomar banho de chuveiro?	0	1	2	3
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 kg que está posicionado pouco acima de sua cabeça?	0	1	2	3
14. Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15. Segurar-se em pé no ônibus ou no metrô?	0	1	2	3

16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido abertos previamente?	0	1	2	3
17. Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18. Fazer compras nas redondezas onde mora?	0	1	2	3
19. Entrar e sair de um ônibus?	0	1	2	3
20. Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	0	1	2	3

Escore dos Componentes:

Componente 1, perguntas 1 e 2: _____

Maior escore: _____

Componente 2, perguntas 3 e 4: _____

Maior escore: _____

Componente 3, perguntas 5, 6 e 7: _____

Maior escore: _____

Componente 4, perguntas 8 e 9: _____

Maior escore: _____

Componente 5, perguntas 10, 11 e 12: _____

Maior escore: _____

Componente 6, perguntas 13 e 14: _____

Maior escore: _____

Componente 7, perguntas 15 e 16: _____

Maior escore: _____

Componente 8, perguntas 18, 19 e 20: _____

Maior escore: _____

Média Aritmética dos Escore dos Componentes = _____
--

Escore do HAQ: _____

Tratamento Atual:**CORTICosteróides:** ()S ()N

Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

METOTrexato: ()S ()N

Dose? _____ Freqüência? _____

SULFASSALazina: ()S ()N

Dose? _____ Freqüência? _____

ANTIMALárico: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

CICLOFosfamida: ()S ()N

Dose? _____ Freqüência? _____

INFLIXImab: ()S ()N

Ampolas? _____ Freqüência? _____

ETANERcept: ()S ()N

Ampolas? _____ Freqüência? _____

AINE: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

ANALGésicos: ()S ()N

Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

Outros: ()S ()N

Quais? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

.....
Idade da MENARCA: _____ anos

MENOPAUSA: ()S ()N Idade: _____ anos

GESTA: _____ **PARA:** _____

FASE do Ciclo Reprodutivo: ()Menacme ()Climatério

Tratamento HORMONAL Antes do Diagnóstico: ()S ()N

Qual? ()AC ()Outro

Duração: _____ Parou há quanto tempo? _____

Tratamento MEDICAMENTOSO Antes do Diagnóstico: ()S ()N

Quais? _____

História de Uso de DROGAS:

Álcool: ()S ()N Tipo? _____

Qtde? _____ Freqüência? _____

Cigarro: ()S ()N Cigarros/dia: _____

Se fumava, qual a duração? _____

Quando parou? _____

Algum familiar ou amigo próximo é fumante? _____

Drogas Ilícitas: ()S ()N Qual? _____

Por quanto tempo? _____

ANEXO C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos pacientes.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM APOIO DO CENTRO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E
GENÉTICA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO

Informações aos participantes,

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos da saúde e genéticos de pacientes que desenvolveram artrite reumatoide e controles saudáveis. Para isto pedimos a colaboração para doar 10 ml de sangue periférico (com anticoagulante EDTA) e para responder um questionário que dura aproximadamente quinze minutos. O questionário e a coleta de material serão feitas por pessoas que fazem parte desta pesquisa e que são devidamente treinados para este fim.

Deixamos claro que a participação dos pacientes nesta pesquisa é voluntária e as informações aqui coletadas, bem como dos resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. Caso o paciente não queira mais participar da pesquisa, poderá reaver sua amostra de DNA.

Toda a equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Caso não queira mais fazer parte da pesquisa, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3721-9804.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu declaro que concordo em participar da pesquisa “**Genética da Auto-imunidade**” na condição de voluntário de acordo com os critérios expostos no termo de consentimento livre e esclarecido:

Florianópolis, ___/___/_____

Assinatura: _____

RG: _____

ANEXO D

Questionário para indivíduos controles.



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e
Genética – BEG



Laboratório de Polimorfismos Genéticos
QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE
IDENTIFICAÇÃO



Data: ___/___/___ **Coleta:** () sangue

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

Idade: ___ Sexo: () M () F Data de nascimento: ___/___/___

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não

Escolaridade: () analfabeto () 1º grau incompleto

() 1º grau completo () 2º grau incompleto

() 2º grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência:

Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente

() Asiático descendente () Indígena descendente

Cor da pele: () negra () mulata () amarela () branca

Observação:

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência do pai:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Possui filhos: () Sim () Não Quantos: _____

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? () Sim () Não

Frequência:

() Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? () Sim () Não

Tipo: _____

Quantidade: () menos de 30 min () 30 min () 1h () mais de 1 h

Frequência: () 1x semana () 2-3x semana () 4-6x semana

() Todos os dias () Menos de 1x semana

Você **FUMA**? () Sim () Não Você já **FUMOU**? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Entrevistador: _____ Data da entrevista: ___/___/_____

Nome: _____

Identificação: _____**HISTÓRICO HORMONAL E REPRODUTIVO**

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª estação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total (meses): _____

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? () Sim () Não

Já utilizou AC? () Sim () Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: _____

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

Faz TRH? () Sim () Não Já fez TRH? () Sim () Não

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações: _____

HISTÓRICO MÉDICOCaso de **CÂNCER** pessoal? () Sim () Não

Tipo: _____

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: () filha () irmã () mãe () avó

() tia materna 1º grau () tia paterna 1º grau

() prima materna 1º grau () prima paterna 1º grau

() Outros _____

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Caso de **TUMOR BENIGNO** pessoal? () Sim () Não

Local: _____

Caso de **DOENÇA AUTOIMUNE** pessoal? () Sim () Não

Qual? _____

Tempo de diagnóstico: _____

Casos de **DOENÇA AUTOIMUNE** na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco e tipo: _____

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**? () Sim () Não

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: () Sim () Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: () Sim () Não

OSTEOPOROSE: () Sim () Não

DOENÇA REUMÁTICA: () Sim () Não

DIABETES: () Sim () Não

ASMA: () Sim () Não

HIV: () Sim () Não () Nunca fez exame

HEPATITE: () Sim () Não () Nunca fez exame

DENGUE: () Sim () Não

TUBERCULOSE: () Sim () Não

DISTÚRPIO RENAL: () Sim () Não

DISTÚRPIO PULMONAR: () Sim () Não

DISTÚRPIO HEPÁTICO: () Sim () Não

Casos de **DOENÇA DE ALZHEIMER** na família: () Sim () Não

Grau de parentesco: _____

Casos de **DOENÇA DE PARKINSON** na família: () Sim () Não

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim ()
Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:

ANEXO E

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos controles.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR,
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS
GENÉTICOS**



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETOS DE PESQUISA:

“CÂNCER DE MAMA: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
INFORMATIVOS PARA DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO NA
POPULAÇÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA”

e

“GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATOIDE
EM PACIENTES DE SANTA CATARINA.”

INFORMAÇÕES:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba

novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas.

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário irá conter dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

Riscos:

A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças

autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas: _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____