



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Janaína Raquel de Simas

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA PRÓ-
INFLAMATÓRIA *TNF* E ARTRITE REUMATOIDE**

Florianópolis

2022

Janaína Raquel de Simas

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA PRÓ-
INFLAMATÓRIA *TNF* E ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e do Desenvolvimento
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Dal-Ri Lindenau

Florianópolis

2022

Simas, Janaína Raquel de

Relação entre polimorfismos no gene da citocina pró inflamatória TNF e artrite reumatoide / Janaína Raquel de Simas ; orientadora, Juliana Dal-Ri Lindenau, 2022.

59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Artrite reumatoide. 3. TNF- α . 4. Polimorfismos. I. Lindenau, Juliana Dal-Ri . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Janaína Raquel de Simas

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE DA CITOCINA PRÓ-
INFLAMATÓRIA *TNF* E ARTRITE REUMATOIDE**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Juliana Dal-Ri Lindenau
PPGBCD/UFSC

Prof.(a) Dr.(a) Júlia Pasqualini Genro
UFSCPA

Prof.(a) Dr.(a) Geison de Souza Izídio
PPGBCD/UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Prof.^a Dr.^a Evelise Maria Nazari

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Prof.^a Dr.^a Juliana Dal-Ri Lindenau
Orientadora

Florianópolis, 08 de dezembro de 2022.

Decido este trabalho aos pacientes que permitiram a utilização de suas informações para o desenvolvimento da ciência no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à prof. Juliana Dal-Ri Lindenau que aceitou me orientar e, até o final, lutou para que eu conseguisse passar por essa fase nada fácil. Obrigada mesmo, mesmo, mesmo por ter aceitado dividir seu conhecimento comigo e, mais que isso, ter me dado a chance de me tornar mestre nessa área que tanto amo.

Agradeço à minha família: Marjorie, minha primeira agência de fomento, minha noiva que eu tanto amo, que trocou seu conforto pelo meu sonho; Tânia, minha segunda agência de fomento, minha mãe, que é o maior exemplo de força que eu tenho; Juliana e Jussara, minhas irmãs e melhores amigas, por terem me estimulado a continuar, por terem me feito sentir a pessoa mais inteligente do mundo (quanta ilusão! rs); ao meu pai, o biólogo não-biólogo mais biólogo que existe; Johnny, meu cunhado (pra mim, um irmão), que sempre demonstra interesse nos meus assuntos científicos. Só Deus sabe o quão difícil foi ficar longe, mas dar orgulho para quem dedicou tanto tempo e dinheiro para me ajudar a realizar esse sonho era necessário. Vocês foram incríveis e indispensáveis, vocês acreditaram muito mais em mim que eu mesma, isso não tem preço.

Agradeço à Dra. Patrícia e a psicóloga Simone, por terem me dado a força necessária para conseguir entrar no mestrado e por me acompanharem em períodos difíceis. À prof. Paula e ao prof. Ricardo que me viciaram em Genética e me fizeram querer entrar no mestrado. À minha querida cliente Cíntia, que me deu a ideia de usar cronogramas (como eu nunca pensei nisso?) e me estimulou a terminar logo a dissertação. Vocês fazem a diferença no mundo.

Agradeço à Júlia Puñal, minha ídola na pesquisa, a pessoa que trata seus experimentos com tanto amor que contagia quem está por perto. Obrigada por me fazer acreditar em amizade na área acadêmica.

Aos meus amigos, Anderson, Bianca Olívia, Carolina, Gabriela, Helena, Isabela, Isabelle, Kathleen, Maria Júlia, Priscila, Tiago, Rafaela, que se alegravam junto comigo a cada nova conquista.

Agradeço aos professores que encontrei no PPGBCD que serão inesquecíveis, em especial a prof. Yara que, mesmo não sendo muito fã de abraços, me abraçou e acolheu em momentos que eu precisava tanto, e me lembrou que se eu tinha entrado é porque alguma chance de finalizar eu tinha, e olha eu aqui agora.

E, por fim, sendo as estrelas do trabalho, agradeço aos pacientes que autorizaram a utilização de suas informações mais íntimas (e moleculares) para elaboração deste trabalho. Obrigada por acreditarem na ciência brasileira e por permitirem sua evolução.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) está entre as doenças autoimunes sistêmicas e inflamatórias crônicas mais prevalentes no mundo, sendo que aqui no Brasil sua prevalência é de 0,5% a 1% na população, principalmente em mulheres. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória amplamente relacionada a doenças inflamatórias como a artrite reumatoide, inclusive fármacos bloqueadores de TNF vem sendo utilizados e demonstrando excelentes resultados. O objetivo deste trabalho foi correlacionar os polimorfismos presentes no gene do TNF- α com o quadro clínico apresentado pelos pacientes afetados pela artrite reumatoide do Hospital Universitário da UFSC, em Florianópolis, Santa Catarina. As amostras já estavam disponíveis no Laboratório de Polimorfismos Genéticos – LAPOGE da UFSC, todos os indivíduos assinaram TCLE e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (CEPSH/UFSC). Os polimorfismos foram determinados por PCR em tempo real. Para análises estatísticas foram utilizados teste de Qui-quadrado, Equilíbrio de Hardy-Weinberg, aplicou-se abordagem de análise de componentes principais para agrupar os sintomas em 3 grandes grupos. Os grupos foram denominados PCA1 (composta por vasculite, PCR, VHS e cardiopatias), PCA2 (trombocitopenia, plaquetas, leucopenia e anemia) e PCA3 (sinovite, anti CCP e fator reumatoide). Encontramos correlação entre a presença do alelo G de rs361525 e os agrupamentos de sintomas PCA1 e PCA3; presença do alelo C de rs1800629 e menores escores de DAS28; presença do alelo C de rs1800630 e PCA2; presença do alelo C de rs1799964 e diagnóstico tardio e menor atividade da doença; presença do alelo C de rs1799724 e maiores escores de DAS28. Não foi encontrada correlação entre rs1800629, rs1799964 e rs1799724 e os agrupamentos de sintomas. Sugere-se a utilização do TNF- α em possíveis painéis de marcadores de artrite reumatoide.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide. TNF- α . Polimorfismos.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is among the most prevalent systemic and chronic inflammatory autoimmune diseases in the world, and here in Brazil its prevalence is 0.5% to 1% in the population, mainly in women. TNF- α is a pro-inflammatory cytokine widely related to inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, therefore TNF-blocking drugs have been used and showing excellent results. The objective of this study was to correlate the polymorphisms present in the TNF- α gene with the clinical conditions presented by patients affected by rheumatoid arthritis at the University Hospital of UFSC, in Florianópolis, Santa Catarina. The samples were already available at the Laboratory of Genetic Polymorphisms – LAPOGE at UFSC, all individuals signed the informed consent and the research was approved by the Ethics Committee for Research on Human Beings at UFSC (CEPSH/UFSC). Polymorphisms were determined by real-time PCR. For statistical analysis, the Chi-square test, Hardy-Weinberg Equilibrium test were used, and the principal components analysis approach was applied to group the symptoms into 3 groups. The groups were named PCA1 (composed of vasculitis, c-reactive protein, ESR and heart disease), PCA2 (thrombocytopenia, platelets, leukopenia and anemia) and PCA3 (synovitis, anti-CCP and rheumatoid factor). We found a correlation between the presence of the G allele of rs361525 and the clusters of symptoms PCA1 and PCA3; presence of the C allele of rs1800629 and lower DAS28 scores; presence of the C allele of rs1800630 and PCA2; presence of the C allele of rs1799964 and late diagnosis and lower disease activity; presence of the C allele of rs1799724 and higher DAS28 scores. No correlation was found between rs1800629, rs1799964 and rs1799724 and symptom clusters. We suggest the use of TNF- α in possible panels of markers of rheumatoid arthritis.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. TNF- α . Polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imunidade inata e imunidade adaptativa com seus principais mecanismos de ação.

Figura 2 – Receptores de reconhecimento de padrões que recebem destaque pelo papel na resposta inflamatória.

Figura 3 – Células relacionadas ao sistema imunológico – células de imunidade inata e adaptativa.

Figura 4 – Esquema do curso da patogênese da artrite reumatoide.

Figura 5 – Esquema de desenvolvimento das células, onde uma célula multipotente dá origem às demais células.

Figura 6 – Seleção realizada nos timócitos para que apenas as células capazes de realizar uma identificação adequada sejam selecionadas positivamente para sobrevida e maturação, a fim de evitar autorreatividade.

Figura 7 – Diferenciação de linfócitos T auxiliares regulada por citocinas.

Figura 8 – Diferenciação de linfócito Th em Th1 ou Th2 por citocinas.

Figura 9 – Circuito de efeitos da citocina TNF- α .

Figura 10 – Fluxograma de recomendações terapêuticas para tratamento de artrite reumatoide.

Figura 11 – Esquema do gene do tumor de necrose tumoral alfa (TNF- α) apresentando os principais polimorfismos encontrados no gene.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Interpretação do resultado do score de DAS28

Tabela 2 – Variáveis clínicas associadas ao rs361525

Tabela 3 – Variáveis clínicas associadas ao rs1800629

Tabela 4 – Variáveis clínicas associadas ao rs1800630

Tabela 5 – Variáveis clínicas associadas ao rs1799964

Tabela 6 – Variáveis clínicas associadas ao rs1799724

Tabela 7 – Correlação entre as variáveis contínuas e os escores obtidos através dos polimorfismos avaliados

Tabela 8 – Correlação dos agrupamentos de sintomas com rs361525

Tabela 9 – Correlação dos agrupamentos de sintomas com rs1800630

Tabela 10 – Correlação dos agrupamentos de sintomas com rs1800629

Tabela 11 – Correlação dos agrupamentos de sintomas com rs1799964

Tabela 12 – Correlação dos agrupamentos de sintomas com rs1799724

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ARTRITE REUMATOIDE	13
1.2	SISTEMA IMUNOLÓGICO E A AUTOIMUNIDADE	15
1.3	RESPOSTA TH E CITOCINAS.....	19
1.4	TNF-ALFA	23
1.5	GENE DO TNF-ALFA E OS POLIMORFISMOS	25
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	AMOSTRA.....	30
4.2	MÉTODOS LABORATORIAIS	30
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5	RESULTADOS.....	32
5.1	AGRUPAMENTO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS	32
5.2	VARIÁVEIS E OS POLIMORFISMOS.....	32
5.2.1	VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs361525	32
5.2.2	VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs1800629	33
5.2.3	VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs1800630	34
5.2.4	VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs1799964	35
5.2.5	VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs1799724	36
5.3	eSCORE DE EXPRESSÃO DO TNf.....	37
1.	rs361525	38
2.	rs1800630	38
3.	rs1800629	39
4.	rs1799964	39
5.	rs1799724	39

6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÃO	45
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A	53
	ANEXO B	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARTRITE REUMATOIDE

Artrite reumatoide é uma doença autoimune sistêmica, altamente debilitante, e que não possui cura, apenas tratamentos para diminuição de sintomas e controle do desenvolvimento das complicações (GOELDNER et al., 2011; QIU et al., 2017). A doença tem maior predominância em indivíduos do sexo feminino, principalmente da quarta até a quinta década de vida, podendo ter variação nos sintomas de acordo com o período menstrual da mulher, e sua prevalência vai de 0,5% a 1% da população brasileira (MOTA et al., 2012; TAN et al., 2015; TEDESCHI et al., 2013).

O surgimento da doença está relacionado a uma soma de fatores ambientais, fatores genéticos e o desenvolvimento da autoimunidade. O início dos sintomas ocorre com detecção da sinovite, que é uma inflamação nos tecidos articulares sinoviais. Essa lesão articular gera um aumento da vascularização local, gerando maior acesso de células do sistema imunológico e fô para autoanticorpos. A presença destes autoanticorpos, por sua vez, estimularia a vasodilatação, levando ao recrutamento de mais leucócitos. As células recrutadas para as articulações iniciam um aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, levam ao agravamento da inflamação com a formação do *pannus*, um tecido invasivo povoado por células que alimentam a produção destas citocinas (ALIVERNINI et al., 2018; KURKÓ et al., 2013). Essa inflamação local, que se torna crônica, principalmente nas regiões periféricas do corpo, como mãos e pés, pode evoluir e levar ao aniquilamento das cartilagens e ossos, e, por conseguinte, a deformação dos membros do portador da doença (OKU et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2015; ZHU et al., 2014).

As manifestações clínicas não se limitam apenas às articulações, elas podem comprometer diversos outros órgãos e tecidos quando se manifestam em sua forma mais grave, o que corresponde à cerca de 40% dos casos, e podem afetar homens e mulheres de maneira igual (COJOCARU et al., 2010).

O fato de a artrite reumatoide ser uma doença com várias possibilidades de manifestações clínicas gera dificuldades para seu diagnóstico. Portanto, um conjunto de variáveis deve ser analisado para a geração de um índice clínico. Este índice é utilizado para o diagnóstico baseado em uma escala predeterminada, a DAS28 (DAS, do inglês, *disease activity score*; 28 pois são 28 articulações analisadas), e a dosagem de proteína C reativa, que é utilizada como marcador inflamatório (AGUIAR et al., 2013).

Para realização do cálculo do índice DAS28 existe uma fórmula bastante complexa (mostrada abaixo) que pode ser realizada por aplicativos ou on-line, onde são inseridos dados como saúde global (SG, escala de 0 a 10 atribuída pelo próprio paciente), velocidade de hemossedimentação (VHS), contagem das articulações inchadas (SJC) e sensíveis (TJC), sendo que as articulações avaliadas são as articulações dos joelhos, dos ombros, dos cotovelos, dos punhos, das metacarpofalanges e interfalanges (ALETAKHA et al., 2005; PINHEIRO, 2007; SAAG et al., 2008).

$$\text{DAS28} = (0.56 * \text{sqr}(\text{TJC})) + (0.28 * \text{sqr}(\text{SJC})) + (0.7 * \ln(\text{VHS})) + (0.014 * \text{SG})$$

Fórmula matemática utilizada para chegar à pontuação final de DAS28. Fonte: MSD Manuals.

Ao final, é determinado um score, e com base no valor deste score é indicado em qual fase da doença o paciente está (Tabela 1): remissão, atividade baixa, atividade moderada ou atividade alta da doença (ALETAHA et al., 2005; SAAG et al., 2008).

Score	Estágio da AR
DAS-28 < 2.6:	Remissão
DAS-28 >= 2.6 e <= 3.2:	Atividade da doença - baixa
DAS-28 > 3.2 e <= 5.1:	Atividade da doença - moderada
DAS-28 > 5.1:	Atividade da doença - alta

Tabela 1. Interpretação do resultado do score de DAS28. Fonte: ALETAHA et al., 2005.

Além da proteína C reativa, que é um marcador inespecífico de fase aguda da inflamação, também são utilizadas outras dosagens de marcadores. Conforme orientação da Liga Europeia de Artrite e Reumatismo (EULAR – European League of Arthritis and Rheumatism), as dosagens de fator reumatoide (FR) e anticorpos contra peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) também são relevantes para identificação da doença (AGUIAR et al., 2013; CONRAD et al., 2010). Os achados clínicos associados a dados sorológicos e exames radiológicos possibilitam o diagnóstico e a proposta de tratamento ideal para cada caso (CONRAD et al., 2010).

Além dos problemas médicos e individuais causados, a artrite reumatoide também causa graves danos à economia, de forma indireta, pois há uma perda de produtividade pessoal e aposentadorias precoces, e, de maneira direta, com tratamentos medicamentosos e hospitalares (MOTA et al., 2012). O prognóstico da doença depende do período em que se detectam os sintomas e o seu diagnóstico definitivo. Alguns pacientes podem apresentar remissão completa e espontânea da doença (CONRAD et al., 2010). Se não tratada de forma eficaz, em 10 anos a artrite reumatoide impossibilita cerca de metade dos indivíduos acometidos de trabalharem, inclusive podendo diminuir o tempo de vida dos portadores da doença, que geralmente são afetados também pelos sintomas extra-articulares, principalmente no tecido cardiovascular (GOELDNER et al., 2011; SCHINNERLING et al., 2019).

O tratamento da artrite reumatoide firma-se sobre a utilização de MMCDs (medicamentos modificadores do curso da doença), reconhecidos pela capacidade de mitigar ou reverter o quadro clínico. Desde a década de 80, eles são utilizados como medicação de primeira linha no tratamento (SMOLEN et al., 2014). Entretanto, não são todos os pacientes afetados pela doença que respondem ao tratamento com este

tipo de medicação. A utilização de medicamentos anti-TNF (bloqueadores do fator de necrose tumoral - TNF) marcou uma nova era do tratamento contra artrite reumatoide, pois pacientes que anteriormente eram não responsivos aos medicamentos convencionais, mostraram uma boa resposta a estes fármacos, com melhora do quadro geral de sintomas e menores deformidades articulares e progressão radiográfica mais lenta (CANET et al, 2018; YONEKURA et al., 2017).

1.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO E A AUTOIMUNIDADE

Os seres humanos, assim como os demais vertebrados, possuem um sistema imunológico bastante complexo capaz de identificar, neutralizar e, quando necessário, empregar respostas imunológicas, que podem ser do tipo inatas ou adaptativas, a elementos estranhos, patogênicos ou não, assegurando que não ocorrerá autodestruição (figura 1) (ALBERTS et al., 2017; MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

Ao nascer, o indivíduo já possui ativo o sistema imune inato, que é constituído por barreiras físicas, químicas e biológicas, e tem como padrão uma resposta rápida e inespecífica. Ela permanece constante no decorrer da vida do indivíduo, independente de contato com patógenos ou partículas que gerem sua ativação. Os macrófagos, as células dendríticas, os neutrófilos e as células NK (*natural killer*) são os tipos celulares cruciais na resposta imune inata (ALBERTS et al., 2017; CRUVINEL et al., 2010; DORIA et al., 2012).

Figura 1. Imunidade inata e imunidade adaptativa com seus principais mecanismos de ação.

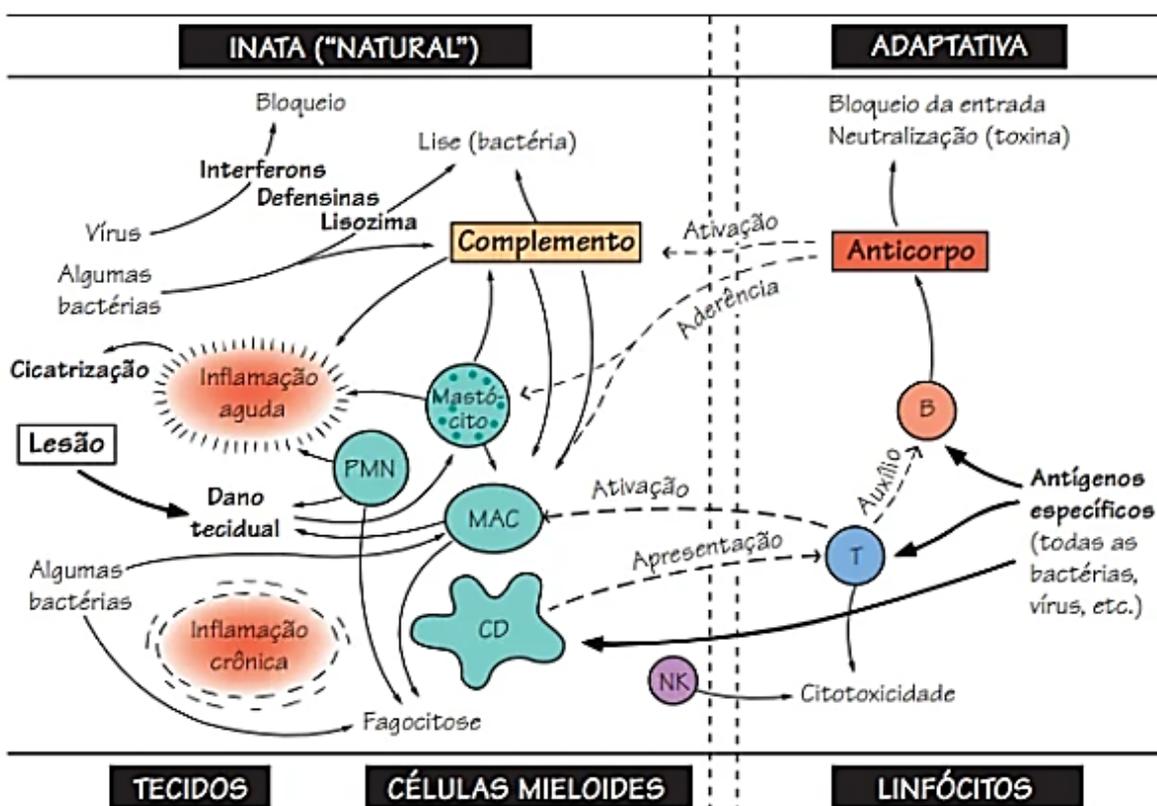


Figura 1. Elementos da imunidade inata e adaptativas, como as células e mecanismos de ação utilizados em cada momento da resposta imune. Fonte: PLAYFAIR, 2013.

Diversos mecanismos estão associados à resposta imunológica, são liberados mediadores inflamatórios, as proteínas do sistema complemento são ativadas, as células realizam fagocitose dos possíveis patógenos, são sintetizadas proteínas de fase aguda e são liberadas citocinas e quimiocinas (CRUVINEL et al., 2010). Estas respostas demonstram padrão estável por serem estimuladas por moléculas predominantes em micro-organismos (por ex. lipopolissacarídeos), que compõem os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) que são como assinaturas moleculares destes organismos, e são reconhecidas pelos RRP's (receptores de reconhecimento de padrões). Os PAMPs e os RRP's têm bastante especificidade entre si (Figura 2), o que garante que a resposta imune inata seja deveras satisfatória no bloqueio de patógenos e demais gatilhos que prejudicariam o organismo do hospedeiro (CRUVINEL et al., 2010; DORIA et al., 2012; MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

Figura 2. Receptores de reconhecimento de padrões que recebem destaque pelo papel na resposta inflamatória.

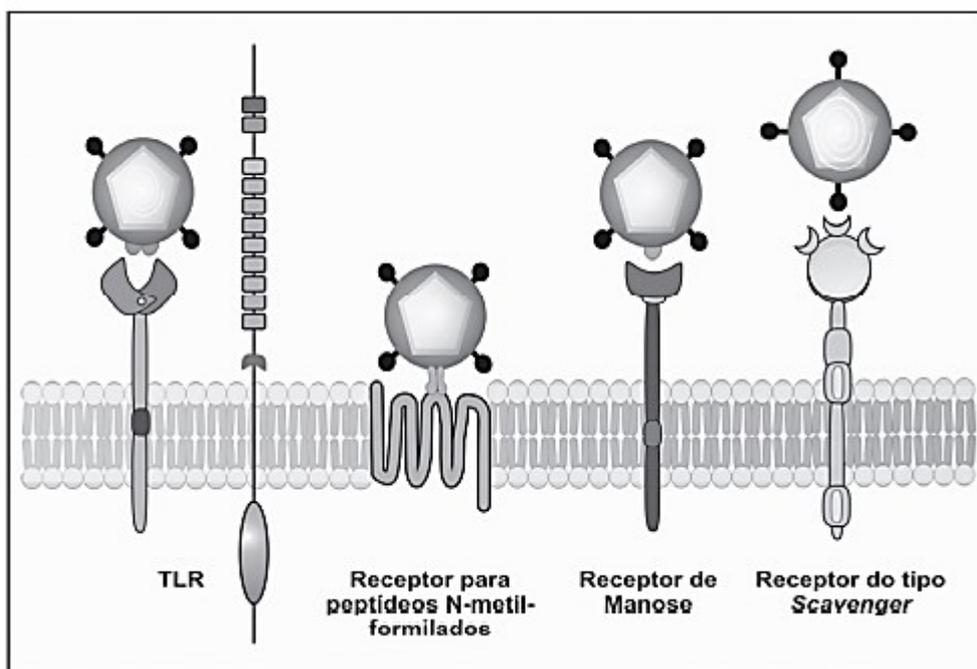


Figura 2. Esquema de receptores de reconhecimento de padrões e seus ligantes. Fonte: CRUVINEL et al., 2010.

Alternativamente, as respostas imunes adaptativas fazem parte de uma versão mais rebuscada e específica do sistema imune. Neste caso, o sistema imune utiliza linfócitos B (LB) e linfócitos T (LT), células fagocitárias, células dendríticas e células NK (ALBERTS, 2017).

As células NK têm grânulos no seu citoplasma contendo proteínas citotóxicas. Uma delas é a perforina, uma proteína que é liberada na membrana da célula identificada como possivelmente nociva ao organismo, gera poros nela e, por conseguinte, ativa a cascata apoptótica (MURPHY et al., 2010). Uma das funções das células NK também é a secreção de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento das células fagocitárias.

As células dendríticas formam uma conexão entre a resposta imune inata e a adaptativa (Figura 3). Na mesma linha que os macrófagos e os neutrófilos, que são células fagocitárias, as células dendríticas também internalizam possíveis antígenos, mas após este contato inicial, elas maturam e apresentam o antígeno ao LT, atuando como apresentadoras de antígenos (APC), e ativando o LT (MURPHY et al., 2010).

Figura 3. Células relacionadas ao sistema imunológico.

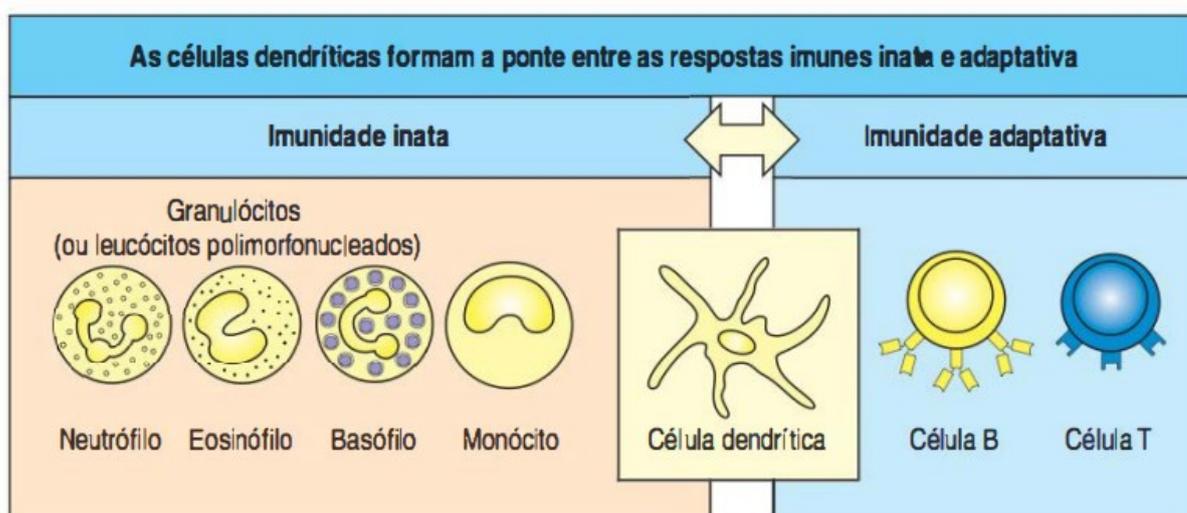


Figura 3. Esquema representando as células presentes na imunidade inata e adaptativa, bem como demonstrando que as células dendríticas atuam em ambas. Fonte: JANEWAY, 1997.

Os linfócitos B reconhecem antígenos e secretam anticorpos. Os linfócitos B têm anticorpos diversos em sua superfície, sendo estes capazes de reconhecer padrões específicos de antígenos, moléculas diversas ou organismos potencialmente patogênicos ao hospedeiro, e marcá-los para destruição (ANDRADE, 2019; ALBERTS, 2017; MURPHY et al., 2010).

Os linfócitos T diferenciam-se em três tipos básicos. Os LT citotóxicos, que têm como função reconhecer antígenos intracelulares e induzir as células contaminadas à apoptose. Os LT auxiliares que reconhecem os antígenos apresentados pelas APCs e produzem citocinas que induzem vias imunológicas e inflamatórias. E os LT regulatórios, que têm como função suprimir e modular as respostas imunológicas, através da síntese de proteínas supressoras de outras células do sistema imune. Todos eles se comunicam através de citocinas, ativam e desativam vias imunológicas, principalmente as inflamatórias, a fim de promover ou regular as respostas do sistema imune (ALBERTS, 2017).

Na resposta imune adaptativa primária o LB, inicialmente, se liga ao antígeno através de seu receptor de superfície, processa o antígeno e expressa em sua membrana os peptídeos gerados após esse processamento. Os peptídeos são apresentados através do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC de classe II) para o LT auxiliar. Após este estímulo, os LTs auxiliares iniciam um aumento clonal do número de células e o aumento na produção de citocinas. As citocinas, por sua vez, estimulam a produção e diferenciação de mais LB. Os LB diferenciados, agora denominados plasmócitos, são responsáveis pela produção e liberação de anticorpos que neutralizam e/ou destroem o antígeno. Nesta fase primária há uma grande produção de anticorpos, seguida de um platô e decaimento dos níveis séricos de anticorpos (MESQUITA et al., 2010).

Dependendo do tempo em que o organismo levar para entrar em contato com o mesmo antígeno novamente, a resposta secundária será bastante diferente, pois a quantidade de antígeno necessária para geração de resposta será menor, e a resposta será mais rápida devido a memória do sistema imune adaptativo (MESQUITA et al., 2010).

Há anos procura-se a resposta do que pode ser o gatilho para o desenvolvimento de uma doença autoimune (DA), sendo considerados fatores intrínsecos e extrínsecos. Contribuições genéticas (confirmadas através de estudos de agregação familiar e de concordância maior entre gêmeos monozigóticos), distúrbios no sistema imunológico, e até mesmo o envolvimento de fatores ambientais (exposição a agentes biológicos, químicos e físicos) demonstram que se trata de uma reação em cadeia, onde diversos fatores chegam a um resultado comum. (ALIVERNINI et al., 2018; ALBERTS, 2017; SOUZA et al., 2010).

As doenças autoimunes ocorrem quando o sistema imunológico do indivíduo perde a capacidade de assimilar o que é próprio (*self*) e não-próprio (*non-self*), ou seja, a capacidade de auto tolerância. Através de mecanismos do sistema imune inato, o sistema imune adaptativo é ativado, ocorre o aumento de ativação de linfócitos T reativos aos antígenos próprios do organismo, e ocorre o início do processo inflamatório. Este processo inflamatório se torna exacerbado, acarretando a autoimunidade (DORIA et al., 2012; MESQUITA et al., 2010; SOUZA et al., 2010).

Diversas doenças autoimunes vêm se mostrando associadas a diversos genes, e parte delas são ligadas aos muitos polimorfismos encontrados no HLA enquanto outras doenças tem curso direcionado pelos linfócitos T, tais como a artrite reumatoide (figura 4) (ABBAS, 2009).

Figura 4. Curso de patogênese da artrite reumatoide.

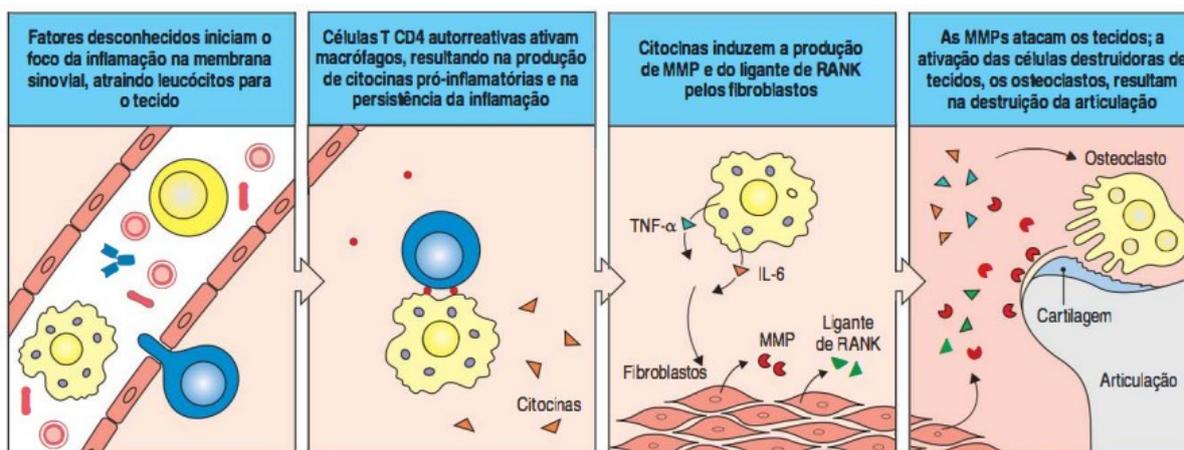


Figura 4. Inicialmente, a inflamação local ocorre por fatores não bem esclarecidos, mas o processo inflamatório segue seu curso de ativação e recrutamento de macrófagos, que induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias como o $\text{TNF-}\alpha$. As citocinas recrutam fibroblastos que ativam metaloproteinasas de matriz para destruição das articulações, bem como a RANK (citocina da família do TNF) ativa os osteoclastos que também destroem o tecido sinovial. Fonte: JANEWAY, 1997.

1.3 RESPOSTA TH E CITOCINAS

As células que dão origem aos linfócitos são as células linfoides, produzidas na medula óssea. Para que esses progenitores linfoides se diferenciem em linfócitos T, é necessário que elas deixem a medula e migrem para o timo, onde poderão ser selecionadas para maturarem e, posteriormente, caírem na circulação (Figura 5) (MESQUITA et al., 2010).

Para que ocorra a maturação dos linfócitos T é necessária a expressão de receptores funcionais (TCR), que serão expressos na sua membrana acoplados a um complexo chamado CD3, que é formado por imunoglobulinas. O TCR terá a importante função de reconhecimento do complexo peptídeo-molécula de MHC e o CD3 pela sinalização celular que vem depois. A maturação ainda depende de correceptores (CD4 e/ou CD8). Os linfócitos têm a capacidade de reconhecer antígenos, porém estes antígenos devem ser apresentados pelas células apresentadoras de antígenos.

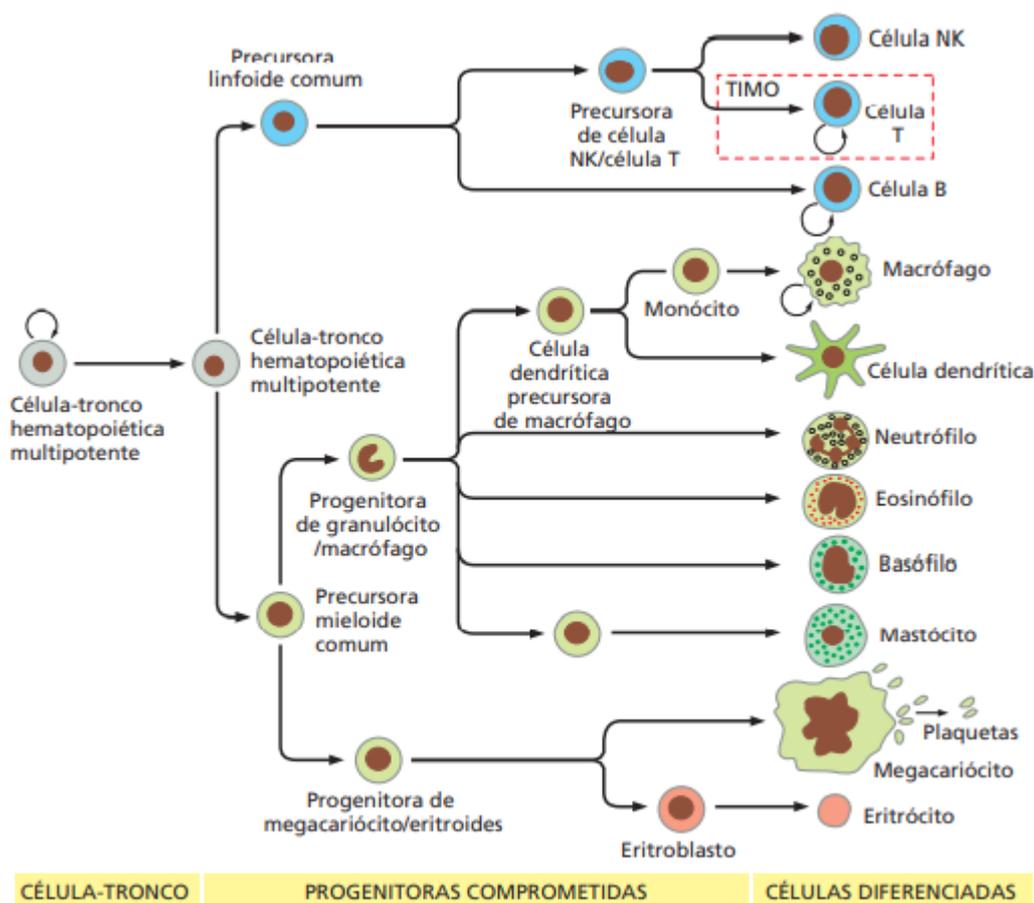


Figura 5. Esquema de desenvolvimento das células, onde uma célula multipotente dá origem às demais células. Fonte: ALBERTS et al., 2017.

Inicialmente, há um trabalho de seleção que ocorre com base nas respostas geradas a partir da apresentação de antígenos próprios pelas células no timo, e somente os timócitos, linfócitos imaturos, que se ligam de forma adequada ao complexo MHC-Ag são selecionados negativamente, enquanto os timócitos que não apresentam ligação com MHC próprio são selecionados positivamente, e sofrem apoptose (Figura 6). Para se diferenciarem em CD8 ou CD4, os timócitos dependem da interação com as moléculas de MHC de classe I (CD8) ou II (CD4). Após estes rígidos processos, em que apenas 5% das células seguirão em frente, os timócitos tornam-se linfócitos T maduros e podem deixar o timo. Uma pequena parte das células T imaturas que são capazes de reconhecer antígenos próprios no timo se desenvolvem em linfócitos T reguladores, que são responsáveis por controlar respostas aos antígenos próprios nos tecidos periféricos. A rigidez do processo se dá pela necessidade de garantir que os linfócitos T terão capacidade de reconhecer antígenos estranhos e serão tolerantes aos antígenos próprios. Ainda assim, em certo nível, são encontrados linfócitos autorreativos na circulação (BARARDI et al., 2010).

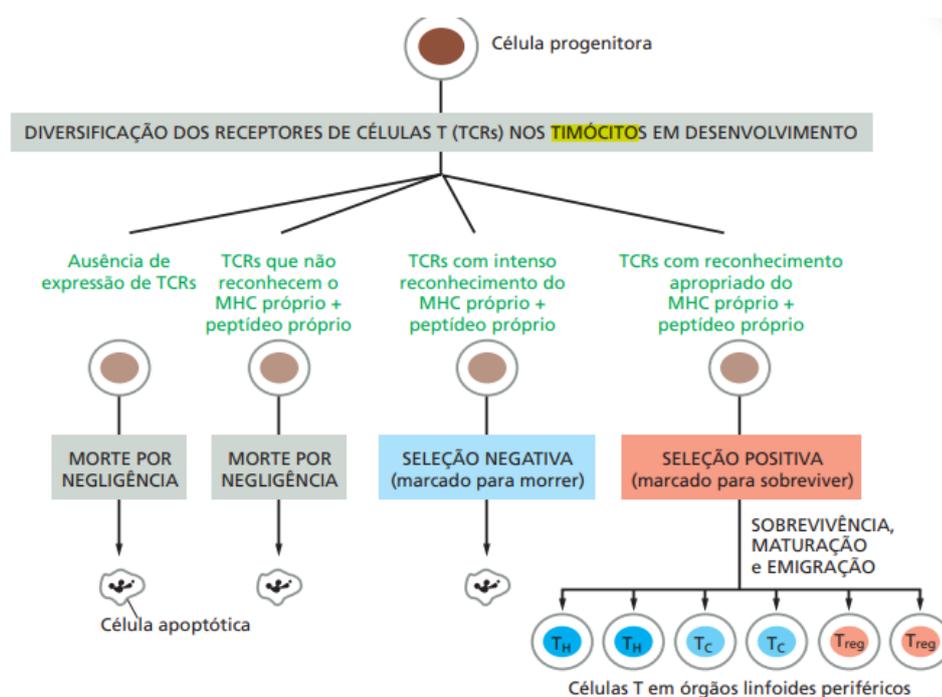


Figura 6. Seleção realizada nos timócitos para que apenas células capazes de realizar uma identificação adequada sejam selecionadas positivamente para sobreviver e maturação, a fim de evitar autorreatividade. Fonte: ALBERTHS et al., 2017.

Os linfócitos produzidos dividem-se primariamente em reguladores, que controlarão e impedirão o desenvolvimento de autoimunidade, e os efetores, que se dividem em auxiliares (Th) e citotóxicos. Para nosso trabalho, focaremos nos linfócitos Th.

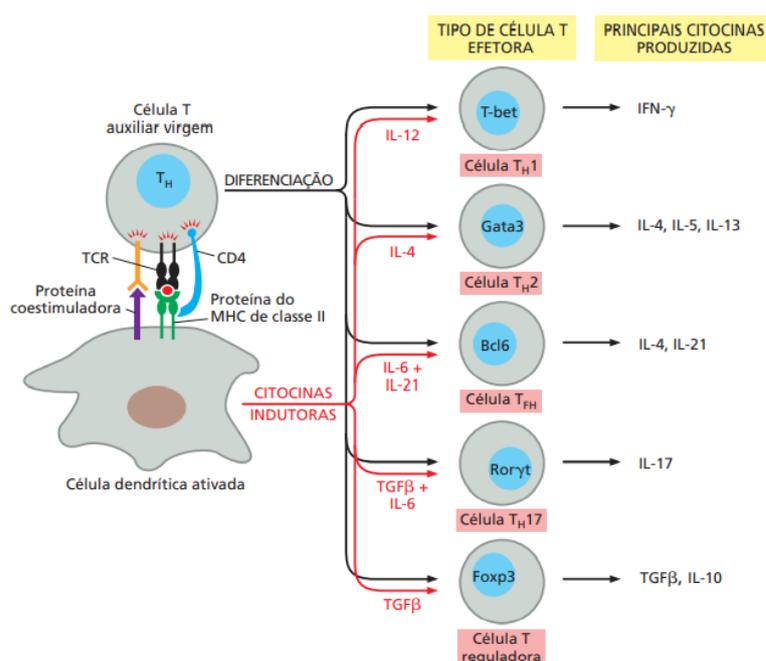


Figura 7. Diferenciação de linfócitos T auxiliares regulada por citocinas. Fonte: ALBERTS et al., 2017.

Os linfócitos Th CD4 (*helper* ou auxiliares) recebem esse nome por ajudarem na produção de anticorpos pelos linfócitos B, eles atuam nas respostas imunológicas para destruição de patógenos, ativam macrófagos e até mesmo LT CD8, que atuarão em respostas antivirais e antitumorais. Os linfócitos Th0, ainda não diferenciados, receberão o estímulo de uma célula apresentadora de patógenos, e se diferenciarão em Th1, Th2, Th17, dependendo de qual citocina está ativa no momento, e essas citocinas determinarão o padrão de atividade do linfócito, isto é, quais citocinas ele produzirá, e em qual tipo de resposta ele atuará (Figura 7) (ALBERTS et al., 2017; JANEWAY, 1997).

Linfócitos Th1

Neste tipo de LTh, há produção de interleucina 2, citocina que induz a proliferação de linfócitos T CD4. Há também a grande produção de interferon γ , importante para respostas contra patógenos intracelulares. Ambas as citocinas incrementam a citotoxicidade dos linfócitos T CD8.

A principal função das células Th1 é a defesa mediada por fagócitos, especialmente contra microrganismos intracelulares, através da expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas que promovem a migração da célula e sua retenção nos locais da infecção. Essas células então ativam os macrófagos através de sinais mediados por contato, liberados pelas interações CD40L-CD40 e pela citocina IFN- γ . Esses macrófagos ativados acabam por destruir os microrganismos fagocitados utilizando os mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio microbidas, óxido nítrico e enzimas lisossômicas. A ativação destes macrófagos também estimula a inflamação aguda por meio da secreção de TNF- α e IL, quimiocinas e mediadores lipídicos de vida curta (como o fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas e leucotrienos). A função final destes macrófagos ativados é remover os tecidos mortos para facilitar o reparo depois que a infecção for controlada (ABBAS, 2019).

Linfócitos Th2

Esta outra subpopulação de células está mais relacionada com alergias e patogenicidade de helmintos através de respostas mediadas por eosinófilos e mastócitos e contribui para produção de diversas interleucinas, sendo elas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, o que contribui para produção de anticorpos. Os anticorpos estimulados pelas citocinas Th2 não promovem fagocitose de forma eficiente, mas são capazes de neutralizar micróbios e toxinas.

As citocinas produzidas por estes linfócitos estimulam a produção de anticorpos IgE, que são responsáveis por opsonizar os helmintos. Esse processo se dá através da ativação dos mastócitos pelos helmintos revestidos por IgE, o que resulta em degranulação. O conteúdo dos grânulos inclui aminas vasoativas, citocinas como TNF- α e mediadores lipídicos, que induzem inflamação local.

Essas respostas desencadeadas pelas células Th2 são relacionadas com reações alérgicas e podem interferir na ativação das respostas desencadeadas pelas células Th1, uma vez que alteram o padrão de expressão de citocinas e acabam impactando na diferenciação das células T virgens (ABBAS, 2019).

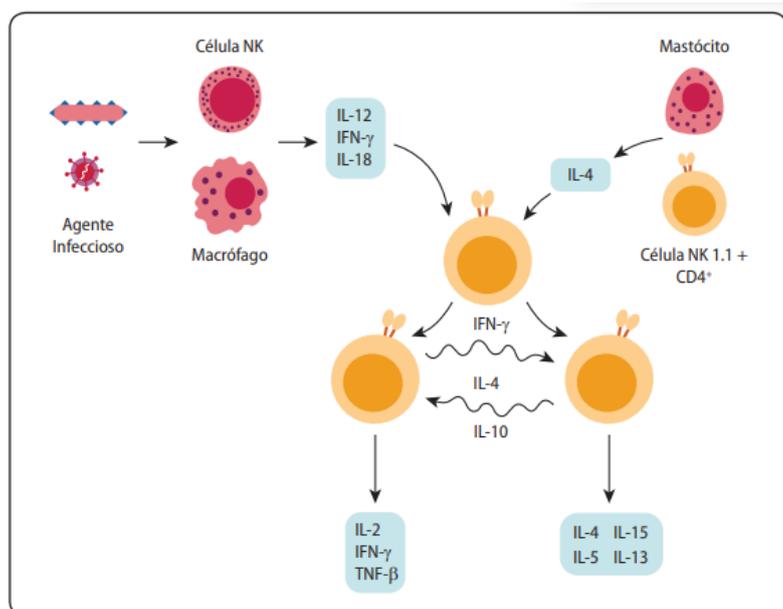


Figura 8. Diferenciação de linfócito Th em Th1 ou Th2 induzido por citocinas. Fonte: BARARDI et al., 2010.

1.4 TNF-ALFA

O TNF- α (fator de necrose tumoral) é uma citocina bastante potente, pró-inflamatória e imunomoduladora. É produzida por células NK, mastócitos e linfócitos T, mas a principal célula fonte de TNF são os fagócitos mononucleares ativados. Esta citocina induz várias respostas celulares através da sua interação com proteínas transmembranas TNFR1 (receptor de TNF tipo 1) e TNFR2 (receptor de TNF tipo 2) (HUANG, 1999; MOTA et al., 2012). Na sua principal fonte, o fagócito mononuclear ativado, o TNF é sintetizado como uma proteína de membrana, onde há uma porção intracelular e uma extracelular. Parte dessa proteína é clivada por uma metaloproteinase de membrana e se torna o TNF circulante (ABBAS, 2019).

A molécula de TNF atua no recrutamento e estimulação de neutrófilos e monócitos para área de infecção por microrganismos. Nestas regiões de infecção, o TNF atua estimulando a expressão de moléculas de adesão que auxiliarão na diapedese de células de defesa. Como sequência do processo inflamatório, o TNF também estimula a produção de quimiocinas pelos macrófagos e pelas células endoteliais, para haja uma quimiotaxia para mais leucócitos, e produção de IL-1, que atua em mimetismo com ela.

Durante a resposta inflamatória aguda, ela pode atuar por meio da ligação aos receptores transmembrana TNFR1 e 2 em algumas células do sistema imunológico, transmitindo sinais para inibição de apoptose e vias de inflamação. O TNF- α inicia várias vias de sinalização por meio da ativação do fator nuclear (NF), que induz a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando uma cascata inflamatória (Figura 9) (HUANG, 1999; MOREIRA et al., 2020). Ela é a principal citocina associada às respostas inflamatórias contra bactérias gram-negativas, já que a presença do lipopolissacarídeo (LPS) de membrana

dessas bactérias é o principal fator associado com a produção dela. O que ocorre é que o IFN- γ produzido pelas células que entram em contato com LPS dessas bactérias induz a produção de mais TNF- α . O TNF- α também se relaciona com respostas contra micro-organismos patogênicos e com problemas graves sistêmicos.

Figura 9. Circuito de efeitos da citocina TNF- α .

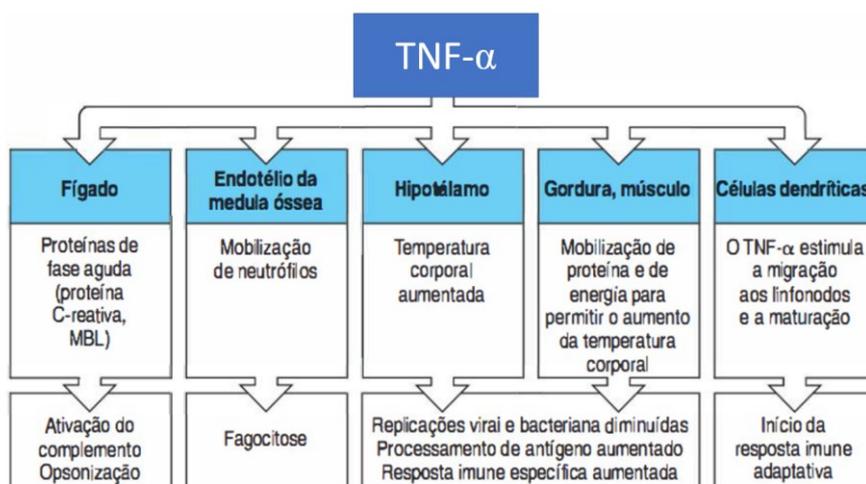


Figura 9. O TNF- α atua em diversos órgãos intensificando a resposta imunológica, e de forma bastante intensa estimula o aumento da temperatura em que a replicação bacteriana fica prejudicada e a resposta imune adaptativa pode ocorrer de forma melhor. Fonte: JANEWAY, 1997.

O TNF- α é encontrado no líquido sinovial de pacientes acometidos pela artrite reumatoide em grandes quantidades, por isso, atualmente, fármacos com intuito de bloquearem a atividade do TNF- α vem sendo utilizados para tratamento contra artrite reumatoide (Figura 10) (GOH et al., 2013).

Por ser uma molécula tão relevante nas respostas imunológicas, o TNF precisa de um fino ajuste, visto que quando em quantidade menor que a necessária ocorre dificuldade em controlar infecções, e quando em quantidades maiores pode ser um problema para o indivíduo, desencadeando excesso de inflamação, como em doenças autoimunes.

Há também a questão temporal associada aos riscos, já que a produção deve durar apenas o necessário para conter as infecções. A produção prolongada de TNF pode levar a caquexia, diminuição da pressão sanguínea acentuada (podendo evoluir para choque), trombose intravascular e distúrbios metabólicos graves por uma grande utilização de glicose, gerando níveis glicêmicos tão baixos que se tornam incompatíveis com o funcionamento do organismo, levando ao óbito.

Figura 10. Fluxograma de recomendação terapêutica para tratamento de artrite reumatoide.

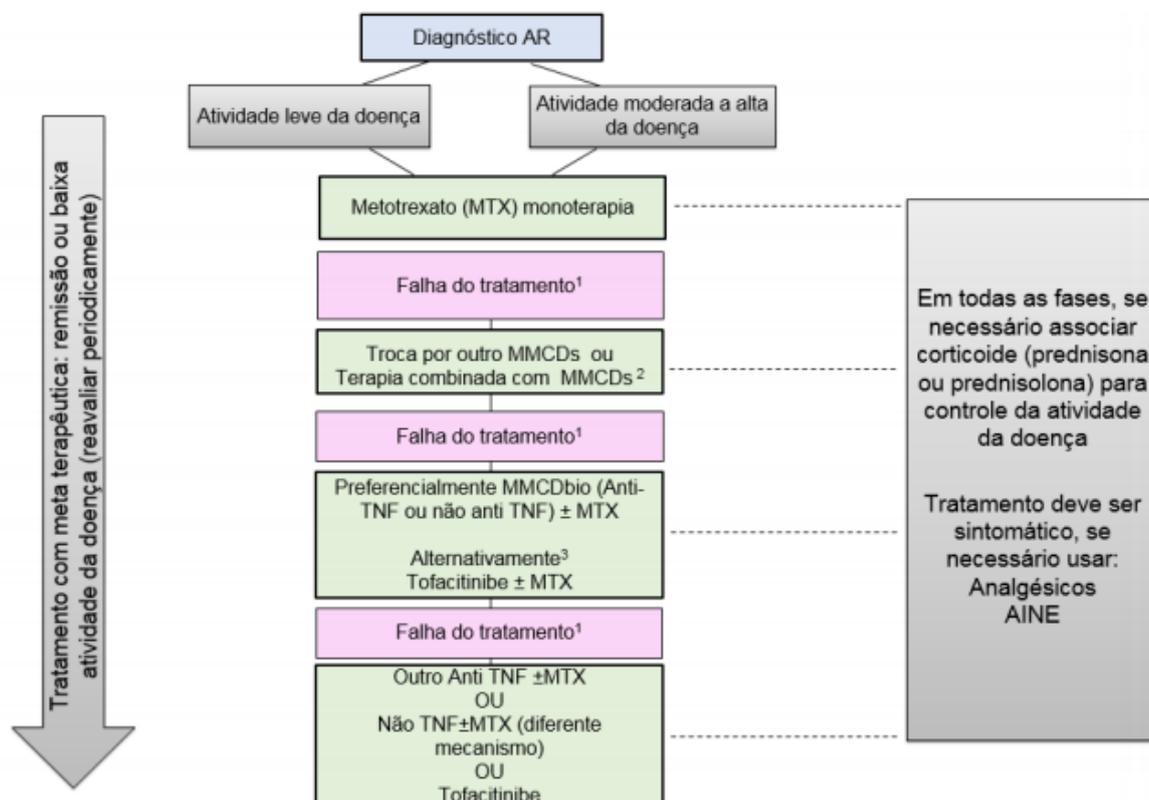
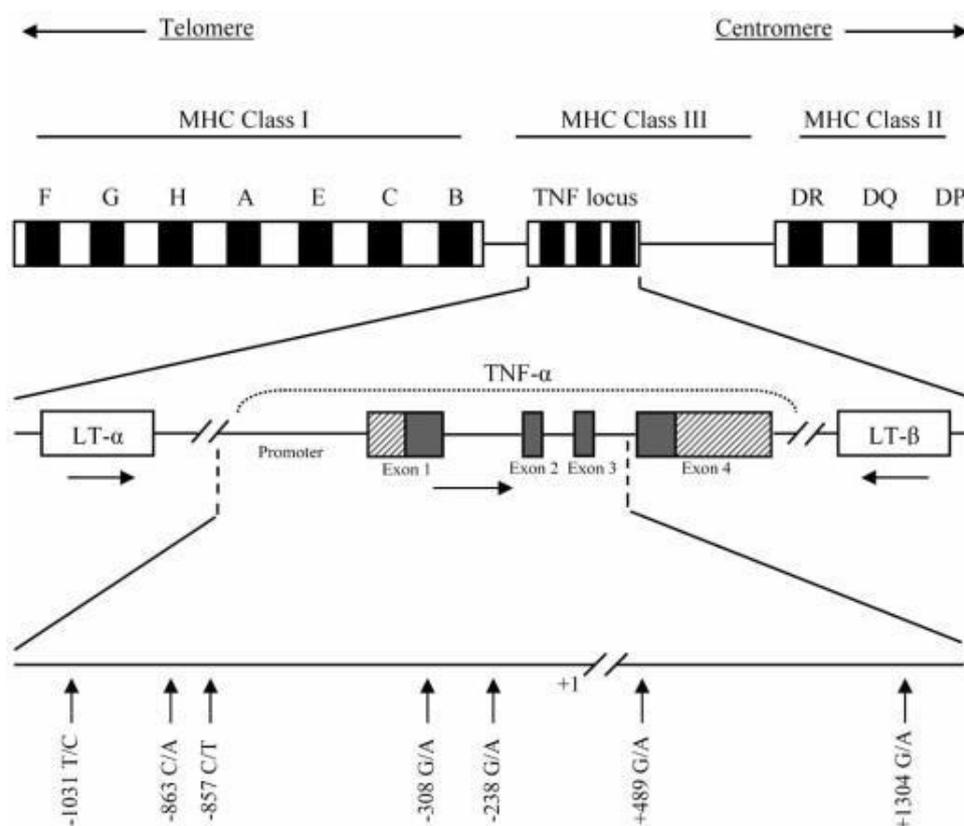


Figura 10. Fluxograma com informações sobre as formas de tratamento de acordo com diagnóstico e estágio da doença. Medicamentos com ação anti-TNF aparecem na última linha de tratamento, após três tentativas com falha. Fonte: Portaria Conjunta n. 16 de novembro de 2019 – Ministério da Saúde.

1.5 GENE DO TNF-ALFA E OS POLIMORFISMOS

O TNF é uma molécula codificada pelo gene *TNF- α* , está situado no cromossomo 6p21.3, com aproximadamente 3 kb. Este gene apresenta polimorfismos em sua região promotora. Estes polimorfismos vêm sendo associados ao desenvolvimento de doenças autoimunes mediadas por anticorpos, e estão associados a alterações nos níveis de citocina produzidos e, à vista disso, a intensidade dos sintomas (Figura 11) (CHEN et al., 2019; ASTERMARK, 2006;).

Figura 11. Esquema do gene do tumor de necrose tumoral alfa (TNF- α) apresentando os principais polimorfismos encontrados no gene.



Fonte: Adaptado de REGO-PÉREZ et al., 2008.

Em condições normais de saúde, um indivíduo tem grandes variações na produção de TNF, porém estas alterações são estáveis. Diferentes fenótipos são encontrados na população, o que indica a cooperação da genética na regulação da taxa de expressão gênica dessa citocina (HIGUCHI et al., 1998; CHEN et al., 2019; PAVLOVA et al., 2009).

Quanto às variantes na região promotora do gene *TNF-α*, o alelo A do polimorfismo rs1800630 (C/A, posição -863) mostrou-se associado com o desenvolvimento da artrite reumatoide em populações europeias (SADAF et al., 2018; UDALOVA et al., 2002). O alelo A do polimorfismo rs1800629 (G/A, posição -308), quando avaliado também em populações da Europa, têm demonstrado associação com maior risco de desenvolvimento de doença cardiovascular em indivíduos afetados pela AR (ZEGKOS et al., 2016; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2011). O polimorfismo rs1799964 (T/C, posição -1031) não apresentou relação com maior probabilidade de desenvolvimento de doença cardiovascular, porém o alelo T foi relacionado a um lipidograma alterado que se relaciona com maior suscetibilidade ao desenvolvimento de ateromas em artérias em populações caucasianas (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

A relação entre o polimorfismo rs1799724 (C/T, posição -857) e AR não está bem estabelecida, porém há indícios de que o alelo T contribua no desenvolvimento sistêmico da doença, levando à incapacidade de realização de tarefas pelo indivíduo afetado, e para desenvolvimento de artrite psoriática (GIARDINA et al., 2011; SADAF et al., 2016). O alelo A do polimorfismo rs361525 (G/A, posição -238) já demonstrou conexão

com o desenvolvimento de doenças periodontais e dano radiológico em pacientes afetados pela artrite reumatoide em pacientes Norte Americanos (SCARDAPANE et al, 2012. SCHULZ et al., 2019).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando o fato de que a artrite reumatoide é uma doença crônica incurável, estabelecer uma terapêutica eficaz (com início rápido de ação, pronta redução de sintomas e baixos índices de efeitos colaterais), bem como entender quais as expectativas e preferências do indivíduo (via preferencial de administração e periodicidade da medicação) é de extrema importância, evitando com isso a não aderência ou o abandono do tratamento antes da redução ou remissão dos sintomas.

A questão econômica, pela cronicidade da doença, também deve ser levada em consideração. Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) determina que a terapêutica de pacientes diagnosticados com artrite reumatoide deve ser realizada de forma multidisciplinar (sendo o acompanhamento feito pelos setores de fisioterapia, terapia ocupacional, psicologia e nutrição), acompanhamento específico de médico reumatologista, e, havendo a necessidade e disponibilidade, utilização de medicamentos.

Por tratar-se de uma doença relacionada ao sistema imune, diversas moléculas estão associadas ao seu desenvolvimento e, por consequência, diversos genes por trás destas moléculas. Compreender a base genética auxilia no entendimento dos processos que geraram o desbalanço do organismo e pode auxiliar no estabelecimento de biomarcadores específicos para determinadas populações que auxiliem no entendimento do prognóstico da doença.

Quando avaliamos os inúmeros polimorfismos associados ao TNF, conseguimos entender o motivo para as doenças se desenvolverem de formas tão diferenciadas e haver uma dificuldade tão grande em desenvolver uma terapêutica efetiva para todos. O estudo dos polimorfismos do TNF vem justamente para auxiliar na compreensão do desenvolvimento clínico da doença, bem como traz a oportunidade de que seja realizada uma pesquisa genética antes do início do tratamento, no momento que o paciente não desenvolveu a forma grave da artrite e ainda está completamente envolvido no tratamento, já que muitos pacientes acabam desistindo dos tratamentos por não verem resultado, o que gera um problema ainda maior.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar polimorfismos encontrados na região promotora do TNF com o quadro clínico apresentado pelos pacientes afetados pela artrite reumatoide.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos genéticos rs1800629; rs1800630; rs1799724; rs361525; rs1799964 do gene *TNF* em pacientes com AR do Estado de Santa Catarina.
- Dentro deste grupo de indivíduos, determinar as frequências alélicas e genótípicas destes polimorfismos nas principais manifestações clínicas.
- Calcular o desequilíbrio de ligação entre essas variantes e derivar os haplótipos se necessário.
- Relacionar as variantes e possíveis haplótipos com a patogênese da doença.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

Para a elaboração da pesquisa foram utilizadas 147 amostras de sangue periférico de pacientes já previamente coletadas. O DNA das amostras foi extraído e armazenado no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE – UFSC). Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH/UFSC) parecer 423.535.

Os pacientes com AR que foram utilizados neste trabalho foram diagnosticados pela equipe de reumatologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – Universidade Federal de Santa Catarina (HU – UFSC), de acordo com os critérios da Comunidade Americana de Reumatologia (American College of Rheumatology – ACR), com coleta de informações clínicas, epidemiológicas e familiares. O questionário utilizado para coletar as informações pode ser visto no Anexo A.

4.2 MÉTODOS LABORATORIAIS

Os polimorfismos escolhidos foram genotipados por discriminação alélica através da técnica de PCR em tempo real. Os ensaios foram realizados por conjuntos de genotipagem TaqMan® SNP da Applied Biosystem. Posteriormente foram discriminadas as variantes e as sondas utilizadas: (I) rs1800629 (-308C>T), sonda C__7514879_10; (II) rs1800630 (-863A>C), sonda C__1747362_10; (III) rs1799724 (-857C>T), sonda C__11918223_10; (IV) rs361525 (-238A>G), sonda C__2215707_10; (V) rs1799964 (-1031C>T), sonda C__7514871_10. Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo B).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência alélica foi calculada por contagem direta. As frequências genotípicas foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado e os desvios das frequências observadas em relação às esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram analisados a 5% de significância.

Foi verificado se os polimorfismos se encontram em desequilíbrio de ligação, e quais as combinações haplotípicas mais prováveis, utilizando o programa MLocus (LONG, 1999).

Aplicou-se a abordagem de análise de componentes principais para agrupar os sintomas clínicos de AR em 3 grandes grupos. Os grupos formados foram denominados de PCA1 (composta por vasculite, PCR, VHS e cardiopatias), PCA2 (trombocitopenia, plaquetas, leucopenia e anemia) e PCA3 (sinovite, anti CCP e fator reumatoide).

As análises visando relacionar a presença dos alelos (ou haplótipos), assim como os componentes principais formados, e a manifestação clínica da doença foram realizadas através da técnica de Regressão de Poisson. Todas as análises foram realizadas no software SPSS versão 20 e o nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 AGRUPAMENTO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS

Criamos três agrupamentos baseados nas variáveis clínicas, sendo denominadas de PCA1 o grupo que estão as variáveis: presença de vasculite, alterações nas dosagens de PCR e VHS, e cardiopatias; PCA2 o grupo com as variáveis presença de trombocitopenia, alterações de plaquetas, presença de leucopenia ou anemia; e, por último, PCA3 o grupo com as variáveis como presença de sinovite, alterações nas dosagens de anti CCP e fator reumatoide.

5.2 VARIÁVEIS E OS POLIMORFISMOS

Avaliamos a presença das variáveis citadas e a sua relação com os polimorfismos encontrados nos pacientes.

5.2.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs361525

Com relação ao rs361525, observamos diferença significativa nas variáveis vasculite reumatoide e anti-CCP, e uma tendência de diferença na variável fator reumatoide. Isso significa que parece haver uma tendência de observação de que indivíduos portadores do alelo G tenham uma prevalência duas vezes maior de alterações nas dosagens de fator reumatoide do que indivíduos homozigotos para o alelo A. A presença de desregulações nas dosagens de anti-CCP é 113% maior em indivíduos portadores do alelo G do que em homozigotos AA. Pacientes portadores do alelo G tem uma prevalência duas vezes maior de vasculite reumatoide do que indivíduos homozigotos para o alelo A (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis clínicas associadas ao rs361525.

		AA	*G_	PR (95% IC)	p-valor
Idade de diagnóstico		43,2 (12,9)	42,0 (14,1)	0,994 [0,969; 1,021]	0,668
Avaliação do paciente		4,4 (1,6)	4,3 (1,4)	0,973 [0,788; 1,202]	0,801
DAS 28		3,7 (1,0)	3,5 (0,7)	0,846 [0,603; 1,187]	0,334
Status da Doença	Ativa	72 (79,1)	22 (95,7)	4,681 [0,669; 32,737]	0,120
	Inativa	19 (20,9)	1 (4,3)	1	
Sinovite	Presença	78 (73,6)	20 (71,4)	0,918 [0,445; 1,897]	0,818
	Ausência	28 (26,4)	8 (28,6)	1	
Nódulos Reumatoides	Presença	18 (17)	6 (21,4)	1,250 [0,569; 2,747]	0,579
	Ausência	88 (83)	22 (78,6)	1	
Vasculite Reumatoide	Presença	3 (2,8)	4 (14,3)	3,024 [1,449; 6,311]	0,003
	Ausência	103 (97,2)	24 (85,7)	1	
Cardiopatía	Presença	25 (23,6)	10 (35,7)	1,571 [0,804; 3,071]	0,186
	Ausência	81 (76,4)	18 (64,3)	1	

Anemia	Presença	21 (19,8)	5 (17,9)	0,903 [0,379; 2,149]	0,818
	Ausência	85 (80,2)	23 (82,1)	1	
Trombocitopenia	Presença	5 (4,7)	1 (3,6)	0,790 [0,128; 4,878]	0,800
	Ausência	101 (95,3)	27 (96,4)	1	
Plaquetas	Presença	7 (6,6)	1 (3,6)	0,583 [0,090; 3,761]	0,571
	Ausência	99 (93,4)	27 (96,4)	1	
VHS	Presença	75 (70,8)	23 (82,1)	1,690 [0,695; 4,109]	0,247
	Ausência	31 (29,2)	5 (17,9)	1	
Fator Reumatoide	Presença	74 (69,8)	26 (89,7)	3,033 [0,978; 9,403]	0,055
	Ausência	32 (30,2)	3 (10,3)	1	
Anti-CCP	Presença	49 (46,2)	20 (69)	2,126 [1,044; 4,326]	0,038
	Ausência	57 (53,8)	9 (31)	1	
Proteína C reativa	Presença	48 (45,3)	17 (58,6)	1,526 [0,791; 2,944]	0,208
	Ausência	58 (54,7)	12 (41,4)	1	
TGO(AST)	Presença	5 (4,7)	1 (3,4)	0,768 [0,125; 4,734]	0,776
	Ausência	101 (95,3)	28 (96,6)	1	
TGP(ALT)	Presença	20 (18,9)	2 (6,9)	0,380 [0,097; 1,485]	0,164
	Ausência	86 (81,1)	27 (93,1)	1	
Pressão Alta	Presença	73 (72,3)	19 (76)	1,170 [0,511; 2,682]	0,710
	Ausência	28 (27,7)	6 (24)	1	

5.2.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs1800629

Quanto ao rs1800629, observamos que indivíduos portadores do alelo C tem escores mais baixos de DAS28 do que homocigotos TT. Com relação às demais variáveis, não foram observadas discrepâncias significativas (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis clínicas associadas ao rs1800629.

		TT	*C	PR (95% IC)	p-valor
Idade de diagnóstico		43,7 (13,3)	42,8 (12,4)	0,996 [0,977; 1,015]	0,685
Avaliação do paciente		4,3 (1,6)	4,3 (1,5)	1,024 [0,859; 1,222]	0,789
DAS 28		3,7 (1,0)	3,4 (0,6)	0,730 [0,542; 0,984]	0,039
Status da Doença	Ativa	61 (81,3)	26 (78,8)	0,897 [0,452; 1,779]	0,755
	Inativa	14 (18,7)	7 (21,2)	1	
Sinovite	Presença	65 (73,9)	28 (70)	0,878 [0,505; 1,527]	0,645
	Ausência	23 (26,1)	12 (30)	1	
Nódulos Reumatoides	Presença	17 (19,3)	6 (15)	0,806 [0,384; 1,691]	0,568
	Ausência	71 (80,7)	34 (85)	1	
Vasculite Reumatoide	Presença	4 (4,5)	2 (5)	1,070 [0,335; 3,420]	0,909
	Ausência	84 (95,5)	38 (95)	1	
Cardiopatia	Presença	22 (25)	8 (20)	0,817 [0,423; 1,577]	0,546
	Ausência	66 (75)	32 (80)	1	
Anemia	Presença	15 (17)	9 (22,5)	1,258 [0,694; 2,280]	0,449
	Ausência	73 (83)	31 (77,5)	1	
Leucopenia	Presença	3 (3,4)	1 (2,5)	0,795 [0,143; 4,426]	0,793
	Ausência	85 (96,6)	39 (97,5)	1	

Leucocitose	Presença	5 (5,7)	1 (2,5)	0,521 [0,086; 3,179]	0,480
	Ausência	83 (94,3)	39 (97,5)	1	
Trombocitopenia	Presença	4 (4,5)	2 (5)	1,070 [0,335; 3,420]	0,909
	Ausência	84 (95,5)	38 (95)	1	
Plaquetas	Presença	5 (5,7)	3 (7,5)	1,216 [0,478; 3,094]	0,681
	Ausência	83 (94,3)	37 (92,5)	1	
VHS	Presença	66 (75)	27 (67,5)	0,782 [0,458; 1,335]	0,367
	Ausência	22 (25)	13 (32,5)	1	
Fator Reumatoide	Presença	64 (73,6)	34 (79,1)	1,234 [0,666; 2,286]	0,505
	Ausência	23 (26,4)	9 (20,9)	1	
Anti-CCP	Presença	47 (54)	18 (41,9)	0,720 [0,437; 1,186]	0,197
	Ausência	40 (46)	25 (58,1)	1	
Proteína C reativa	Presença	39 (44,8)	22 (51,2)	1,185 [0,727; 1,932]	0,496
	Ausência	48 (55,2)	21 (48,8)	1	
TGO(AST)	Presença	3 (3,4)	2 (4,7)	1,220 [0,405; 3,673]	0,724
	Ausência	84 (96,6)	41 (95,3)	1	
TGP(ALT)	Presença	16 (18,4)	6 (14)	0,796 [0,383; 1,653]	0,541
	Ausência	71 (81,6)	37 (86)	1	
Pressão Alta	Presença	56 (70)	29 (72,5)	1,086 [0,613; 1,923]	0,778
	Ausência	24 (30)	11 (27,5)	1	

5.2.3 VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs1800630

Avaliando rs1800630, observamos que indivíduos portadores do alelo C tem uma prevalência 60% maior de leucocitose e trombocitopenia do que indivíduos homozigotos para o alelo T. Notamos também uma tendência de observação de que indivíduos portadores do alelo C tenham uma prevalência cerca de 40% maior de sinovite do que indivíduos homozigotos para o alelo T (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis clínicas associadas ao rs1800630.

		TT	*C_	PR (95% IC)	p-valor
Idade de diagnóstico		42,0 (12,0)	42,2 (14,0)	1,001 [0,991; 1,010]	0,909
Avaliação do paciente		4,0 (1,4)	4,4 (1,6)	1,061 [0,970; 1,159]	0,194
DAS 28		3,5 (0,9)	3,6 (0,8)	1,041 [0,884; 1,225]	0,632
Status da Doença	Ativa	31 (86,1)	54 (78,3)	0,847 [0,628; 1,143]	0,278
	Inativa	5 (13,9)	15 (21,7)	1	
Sinovite	Presença	27 (60)	63 (78,8)	1,441 [0,999; 2,080]	0,051
	Ausência	18 (40)	17 (21,3)	1	
Nódulos Reumatoides	Presença	8 (17,8)	12 (15)	0,926 [0,631; 1,361]	0,697
	Ausência	37 (82,2)	68 (85)	1	
Vasculite Reumatoide	Presença	1 (2,2)	5 (6,3)	1,322 [0,901; 1,940]	0,153
	Ausência	44 (97,8)	75 (93,8)	1	
Cardiopatia	Presença	11 (24,4)	19 (23,8)	0,986 [0,723; 1,346]	0,931
	Ausência	34 (75,6)	61 (76,3)	1	
Anemia	Presença	8 (17,8)	14 (17,5)	0,993 [0,702; 1,406]	0,969
	Ausência	37 (82,2)	66 (82,5)	1	
Leucopenia	Presença	1 (2,2)	3 (3,8)	1,179 [0,659; 2,108]	0,580
	Ausência	44 (97,8)	77 (96,3)	1	

Leucocitose	Presença	0 (0)	5 (6,3)	1,600 [1,393; 1,838]	< 0,001
	Ausência	45 (100)	75 (93,8)	1	
Trombocitopenia	Presença	0 (0)	6 (7,5)	1,608 [1,398; 1,850]	< 0,001
	Ausência	45 (100)	74 (92,5)	1	
Plaquetas	Presença	2 (4,4)	6 (7,5)	1,186 [0,777; 1,811]	0,430
	Ausência	43 (95,6)	74 (92,5)	1	
VHS	Presença	32 (71,1)	60 (75)	1,076 [0,787; 1,471]	0,646
	Ausência	13 (28,9)	20 (25)	1	
Fator Reumatoide	Presença	36 (78,3)	53 (68,8)	0,844 [0,640; 1,112]	0,228
	Ausência	10 (21,7)	24 (31,2)	1	
Anti-CCP	Presença	22 (47,8)	38 (49,4)	1,023 [0,779; 1,344]	0,870
	Ausência	24 (52,2)	39 (50,6)	1	
Proteína C reativa	Presença	27 (58,7)	33 (42,9)	0,788 [0,595; 1,043]	0,095
	Ausência	19 (41,3)	44 (57,1)	1	
TGO(AST)	Presença	3 (6,5)	2 (2,6)	0,629 [0,213; 1,857]	0,402
	Ausência	43 (93,5)	75 (97,4)	1	
TGP(ALT)	Presença	9 (19,6)	11 (14,3)	0,858 [0,563; 1,309]	0,478
	Ausência	37 (80,4)	66 (85,7)	1	
Pressão Alta	Presença	36 (81,8)	49 (69)	0,786 [0,593; 1,043]	0,095
	Ausência	8 (18,2)	22 (31)	1	

5.2.4 VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs1799964

Quanto ao rs1799964, observou-se que portadores do alelo C tem maior idade quando recebem o diagnóstico que homocigotos TT, o que indica uma progressão mais demorada da doença. Aqui também observamos que portadores do alelo C tem uma prevalência 40% menor de doença ativa do que indivíduos homocigotos para o alelo T. Há uma tendência de que indivíduos portadores do alelo C tenham uma prevalência cerca de 33% menor de pressão alta do que indivíduos homocigotos para o alelo T (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis clínicas associadas ao rs1799964.

		TT	*C_	PR (95% IC)	p-valor
Idade de diagnóstico		40,2 (12,6)	45,4 (13,2)	1,018 [1,003; 1,033]	0,019
Avaliação do paciente		4,3 (1,4)	4,5 (1,7)	1,050 [0,906; 1,218]	0,515
DAS 28		3,7 (0,9)	3,5 (0,8)	0,827 [0,642; 1,063]	0,139
Status da Doença	Ativa	58 (87,9)	36 (73,5)	0,619 [0,406; 0,944]	0,026
	Inativa	8 (12,1)	13 (26,5)	1	
Sinovite	Presença	58 (76,3)	40 (67,8)	0,795 [0,536; 1,179]	0,253
	Ausência	18 (23,7)	19 (32,2)	1	
Nódulos Reumatoides	Presença	13 (17,1)	10 (16,9)	0,994 [0,596; 1,657]	0,981
	Ausência	63 (82,9)	49 (83,1)	1	
Vasculite Reumatoide	Presença	3 (3,9)	4 (6,8)	1,330 [0,679; 2,604]	0,406
	Ausência	73 (96,1)	55 (93,2)	1	
Cardiopatia	Presença	23 (30,3)	11 (18,6)	0,681 [0,402; 1,154]	0,153
	Ausência	53 (69,7)	48 (81,4)	1	
Anemia	Presença	13 (17,1)	13 (22)	1,185 [0,761; 1,845]	0,453

Leucopenia	Ausência	63 (82,9)	46 (78)	1	0,785
	Presença	2 (2,6)	2 (3,4)	1,149 [0,423; 3,121]	
Leucocitose	Ausência	74 (97,4)	57 (96,6)	1	0,963
	Presença	4 (5,3)	3 (5,1)	0,980 [0,407; 2,356]	
Trombocitopenia	Ausência	72 (94,7)	56 (94,9)	1	0,144
	Presença	2 (2,6)	4 (6,8)	1,564 [0,858; 2,850]	
Plaquetas	Ausência	74 (97,4)	55 (93,2)	1	0,696
	Presença	4 (5,3)	4 (6,8)	1,155 [0,561; 2,374]	
VHS	Ausência	72 (94,7)	55 (93,2)	1	0,243
	Presença	52 (68,4)	46 (78)	1,336 [0,822; 2,172]	
Fator Reumatoide	Ausência	24 (31,6)	13 (22)	1	0,749
	Presença	59 (74,7)	39 (72,2)	0,929 [0,590; 1,461]	
Anti-CCP	Ausência	20 (25,3)	15 (27,8)	1	0,085
	Presença	36 (45,6)	33 (61,1)	1,458 [0,950; 2,237]	
Proteína C reativa	Ausência	43 (54,4)	21 (38,9)	1	0,527
	Presença	41 (51,9)	25 (46,3)	0,875 [0,579; 1,323]	
TGO(AST)	Ausência	38 (48,1)	29 (53,7)	1	0,283
	Presença	2 (2,5)	3 (5,6)	1,506 [0,714; 3,177]	
TGP(ALT)	Ausência	77 (97,5)	51 (94,4)	1	0,206
	Presença	16 (20,3)	6 (11,1)	0,631 [0,309; 1,289]	
Pressão Alta	Ausência	63 (79,7)	48 (88,9)	1	0,059
	Presença	57 (77)	31 (62)	0,667 [0,439; 1,015]	

5.2.5 VARIÁVEIS CLÍNICAS E rs1799724

Avaliando o rs1799724, inferimos que indivíduos portadores do alelo C tem maiores valores de DAS28 do que homozigotos TT, e indivíduos portadores do alelo C tem uma prevalência quase 2 vezes maior de leucopenia do que indivíduos homozigotos para o alelo T (Tabela 6).

Tabela 6. Variáveis clínicas associadas ao rs1799724.

		TT	*C_	PR (95% IC)	p-valor
Idade de diagnóstico		43,3 (13,2)	42,4 (12,8)	0,996 [0,970; 1,022]	0,756
Avaliação do paciente		4,3 (1,5)	4,5 (1,7)	1,092 [0,831; 1,436]	0,527
DAS 28		3,5 (0,8)	4,2 (0,9)	1,732 [1,324; 2,265]	< 0,001
Status da Doença	Ativa	82 (79,6)	18 (100)	-	-
	Inativa	21 (20,4)	0 (0)	-	-
Sinovite	Presença	85 (72)	21 (80,8)	1,506 [0,611; 3,711]	0,374
	Ausência	33 (28)	5 (19,2)	1	
Nódulos Reumatóides	Presença	22 (18,6)	3 (11,5)	0,621 [0,202; 1,909]	0,406
	Ausência	96 (81,4)	23 (88,5)	1	
Vasculite Reumatóide	Presença	6 (5,1)	1 (3,8)	0,783 [0,123; 4,973]	0,795
	Ausência	112 (94,9)	25 (96,2)	1	
Cardiopatia	Presença	31 (26,3)	7 (26,9)	1,028 [0,470; 2,249]	0,945
	Ausência	87 (73,7)	19 (73,1)	1	
Anemia	Presença	26 (22)	3 (11,5)	0,517 [0,167; 1,605]	0,254

Leucopenia	Ausência	92 (78)	23 (88,5)	1	
	Presença	2 (1,7)	2 (7,7)	2,917 [1,025; 8,297]	0,045
Leucocitose	Ausência	116 (98,3)	24 (92,3)	1	
	Presença	5 (4,2)	3 (11,5)	2,217 [0,841; 5,844]	0,107
Trombocitopenia	Ausência	113 (95,8)	23 (88,5)	1	
	Presença	5 (4,2)	1 (3,8)	0,920 [0,148; 5,701]	0,929
Plaquetas	Ausência	113 (95,8)	25 (96,2)	1	
	Presença	7 (5,9)	1 (3,8)	0,680 [0,105; 4,400]	0,686
VHS	Ausência	111 (94,1)	25 (96,2)	1	
	Presença	83 (70,3)	22 (84,6)	2,043 [0,752; 5,553]	0,161
Fator Reumatoide	Ausência	35 (29,7)	4 (15,4)	1	
	Presença	89 (76,7)	17 (60,7)	0,554 [0,286; 1,074]	0,080
Anti-CCP	Ausência	27 (23,3)	11 (39,3)	1	
	Presença	58 (50)	15 (53,6)	1,122 [0,576; 2,187]	0,735
Proteína C reativa	Ausência	58 (50)	13 (46,4)	1	
	Presença	56 (48,3)	12 (42,9)	0,838 [0,428; 1,643]	0,607
TGO(AST)	Ausência	60 (51,7)	16 (57,1)	1	
	Presença	4 (3,4)	1 (3,6)	1,030 [0,173; 6,139]	0,974
TGP(ALT)	Ausência	112 (96,6)	27 (96,4)	1	
	Presença	19 (16,4)	5 (17,9)	1,087 [0,459; 2,574]	0,850
Pressão Alta	Ausência	97 (83,6)	23 (82,1)	1	
	Presença	81 (75)	17 (63)	0,642 [0,324; 1,271]	0,204
	Ausência	27 (25)	10 (37)	1	

5.3 ESCORE DE EXPRESSÃO DO TNF

Os polimorfismos não estavam em desequilíbrio de ligação, então não foi possível realizar análise por haplótipos. Foi criado um escore baseado na presença de alelos que aumentam a expressão desta citocina com base em dados de funcionalidade obtidos da literatura. Neste caso os alelos de maior expressão são: C no rs1799964 / A no rs1800630 / T no rs1799724 / A no rs1800629 e A no rs361525. Quanto mais alelos desses estavam presentes nos indivíduos, mais alto o valor do escore e, conseqüentemente, maior a expressão de TNF.

Correlacionamos esse escore com os três agrupamentos que criamos na análise de componentes principais e não observamos nenhuma correlação significativa. Quando correlacionamos esse escore com idade de diagnóstico, percebemos uma correlação baixa, mas significativa. Isso significa que quanto mais alelos de alta expressão o indivíduo tem, maior a idade de diagnóstico dele. Não observamos correlação com avaliação do paciente e DAS28. Portanto, esse escore parece influenciar no tempo de diagnóstico da doença, mas não no desencadeamento dos sintomas clínicos dela (Tabela 7).

Tabela 7. Correlação entre as variáveis contínuas e os escores obtidos através dos polimorfismos avaliados.

	ESCORE		
	r ²	p-valor	N
PCA 1	-0,036	(0,725)	[97]
PCA 2	-0,061	(0,528)	[108]
PCA 3	0,107	(0,295)	[97]
Idade de diagnóstico	0,205	(0,033)	[108]
Avaliação do paciente	-0,033	(0,776)	[76]
DAS28	0,099	(0,343)	[93]

1. *rs361525*

Portadores do alelo G tem maior prevalência das patologias de PCA1 e PCA3 do que homozigotos TT. Em relação à PCA1, foi observada uma PR de 1,393 [1,154; 1,681], com p-valor de 0,001. Isso significa que a presença do alelo C aumenta em 39,3% a chance de desenvolver as condições que compõem esse agrupamento. Em relação à PCA 2, não foram observadas diferenças, PR de 0,860 [0,530; 1,397], com p-valor de 0,543. Em relação à PCA3, foi observada uma PR de 1,519 [1,053; 2,192], com p-valor de 0,025, o que significa que a presença do alelo C aumenta em 51,9% a chance de desenvolver as condições que compõem esse agrupamento (Tabela 8).

Tabela 8. Correlação dos agrupamentos de sintomas com o rs361525.

rs361525			
	PR	Intervalo de confiança	p
PCA1	1,393	[1,154; 1,681]	0,001
PCA2	0,86	[0,530; 1,397]	0,543
PCA3	1,519	[1,053; 2,192]	0,025

2. *rs1800630*

Portadores do alelo C tem maior prevalência das variáveis agrupadas em PCA2 do que homozigotos TT. Quanto à PCA 1, não foram observadas diferenças, PR de 1,010 [0,888; 1,149], com p-valor de 0,882. Em relação à PCA2, foi observada uma PR de 1,067 [1,017; 1,120], com p-valor de 0,008. Isso significa que a presença do alelo C aumenta em 6,7% a chance de desenvolver as condições que compõem esse agrupamento. Em relação à PCA 3, não foram observadas diferenças, PR de 0,917 [0,806; 1,044], com p-valor de 0,189 (Tabela 9).

Tabela 9. Correlação dos agrupamentos de sintomas com o rs1800630.

rs1800630			
	PR	Intervalo de confiança	p
PCA1	1,01	[0,888; 1,149]	0,882

PCA2	1,067	[1,017; 1,120]	0,008
PCA3	0,917	[0,806; 1,044]	0,189

3. *rs1800629*

Em relação à PCA 1, obtivemos um PR de 0,952 [0,736; 1,231], com p-valor de 0,706. Em relação à PCA2, o PR de 1,027 [0,824; 1,281], com p-valor de 0,810. Em relação à PCA 3, PR de 0,952 [0,740; 1,225], com p-valor de 0,704 (Tabela 10).

Tabela 10. Correlação dos agrupamentos de sintomas com o rs1800629.

rs1800629			
	PR	Intervalo de confiança	p
PCA1	0,952	[0,736; 1,231]	0,706
PCA2	1,027	[0,824; 1,281]	0,81
PCA3	0,952	[0,740; 1,225]	0,704

4. *rs1799964*

Em relação à PCA 1, não foram observadas diferenças, PR de 1,032 [0,857; 1,243], com p-valor de 0,740. Em relação à PCA2, não foram observadas diferenças, PR de 1,069 [0,931; 1,226], com p-valor de 0,345. Em relação à PCA 3, não foram observadas diferenças, PR de 1,108 [0,891; 1,377], com p-valor de 0,357 (Tabela 11).

Tabela 11. Correlação dos agrupamentos de sintomas com o rs1799964.

rs1799964			
	PR	Intervalo de confiança	p
PCA1	1,032	[0,857; 1,243]	0,74
PCA2	1,069	[0,931; 1,226]	0,345
PCA3	1,108	[0,891; 1,377]	0,357

5. *rs1799724*

Em relação à PCA 1, não foram observadas diferenças, PR de 1,053 [0,794; 1,397], com p-valor de 0,719. Em relação à PCA2, não foram observadas diferenças, PR de 1,014 [0,758; 1,357], com p-valor de 0,923. Em relação à PCA 3, não foram observadas diferenças, PR de 0,878 [0,616; 1,249], com p-valor de 0,469 (Tabela 12).

Tabela 12. Correlação dos agrupamentos de sintomas com o rs1799724.

rs1799724			
	PR	Intervalo de confiança	p
PCA1	1,053	[0,794; 1,397]	0,719

PCA2	1,014	[0,758; 1,357]	0,923
PCA3	0,878	[0,616; 1,249]	0,469

6 DISCUSSÃO

Observamos um efeito do alelo G da variante rs361525 sobre a presença de anti-CCP (peptídeo citrulinado anticíclico) em nossa amostra, onde indivíduos portadores deste alelo tem uma maior prevalência de desregulações nesta dosagem em relação à homozigotos para o alelo A. O anti-CCP detecta os anticorpos proteicos anti-citrulinados (ACPA) que são geralmente detectados anos antes do aparecimento de sintomas clínicos (RANTAPÄÄ-DAHLQVIST et al, 2003). Além disso, pacientes com artrite reumatoide que são anti-CCP positivos tem um pior prognóstico do que pacientes que são negativos (MIL et al, 2005). Alguns marcadores genéticos já foram relacionados com anti-CCP positivo em populações de ancestralidade europeia, como alguns subtipos de HLA-DRB1*04 e de HLA-DRB1*01 (DING et al, 2009), a variante R620W no gene *PTPN22* (KALLBERG et al, 2007) e polimorfismos no *PADI4* (MASSARENTI et al, 2021). Citocinas inflamatórias, como o $TNF-\alpha$, foram relatadas como indutoras da formação de armadilhas extracelulares para neutrófilos (NET), o que acaba por expor autoantígenos no contexto de moléculas imunoestimulatórias (KHANDPUR et al, 2013). Nossos resultados demonstram que o gene do $TNF-\alpha$ pode ser um marcador a ser incluído neste painel de marcadores que se relacionam com anti-CCP positivo em indivíduos com artrite reumatoide de ancestralidade predominantemente europeia, auxiliando na identificação de indivíduos em risco de desenvolver sintomas clínicos de artrite e possibilitando condutas clínicas mais eficientes e precoces. Seria importante caracterizar a população para essas outras variantes destacadas na literatura de maneira que fosse possível avaliar interações gene-gene e o impacto destes conjuntos de marcadores genéticos para o desfecho em questão, de maneira a estabelecer o real painel de marcadores relacionados com anti-CCP positivo na população brasileira.

Outro resultado observado para o polimorfismo rs361525 foi a associação da presença do alelo G com maior prevalência de vasculite reumatoide. Uma meta-análise de estudos envolvendo vasculite sugeriu que há uma contribuição de polimorfismos no gene da molécula de adesão intercelular I (*ICAM-1*) para a suscetibilidade a este quadro clínico (LEE & BAE, 2016). *ICAM-1* atua em processos inflamatórios e na resposta imune mediada por células T, funcionando como uma molécula coestimuladora em células apresentadoras de antígenos para ativar células T restritas à MHC de classe II e em outras células ativando células T citotóxicas a partir de MHC de classe I. Sabe-se que esta molécula é expressa por uma gama de tipos celulares e é controlada por uma série de citocinas, dentre elas o $TNF-\alpha$ (STOLPE & SAAG, 1996). Considerando esse papel regulador do $TNF-\alpha$ sobre uma importante molécula relacionada ao quadro de vasculite, hipotetizamos que a interação entre estes genes deve ser relevante para o desencadeamento deste quadro clínico, portanto, mais estudos avaliando esta rota deveriam ser conduzidos para melhor compreensão dos fatores relacionados ao desencadeamento de vasculite reumatoide.

Ainda relacionado ao polimorfismo rs361525, este demonstrou correlação positiva com os agrupamentos PCA1 e PCA3, em que são agrupados vasculite, cardiopatias, sinovite e alterações nos resultados das dosagens de PCR, VHS, anti CCP e fator reumatoide. Conforme descrito acima, a presença do

alelo G parece estar associado ao descontrole na regulação do anti CCP e a presença de vasculite, o que corrobora com o achado da correlação positiva com estes sintomas. A presença deste polimorfismo também vem sendo associada a uma maior patogênese de doenças relacionadas a inflamações, pois este polimorfismo gera um aumento de transcrição do gene e, portanto, há, possivelmente, maiores níveis desta citocina circulantes no organismo, bem como aumento dela em regiões sinoviais, causando inflamação local, a sinovite. Estudos vem associando a presença do alelo G deste polimorfismo ao aumento de risco cardiovascular (ALLEN, 2001; CUI, 2012; CHO, 2013; HUSSAIN, 2015). Quando há altos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como a TNF- α , ocorre uma estimulação da produção da proteína C reativa, que está relacionada a processos agudos e com as doenças cardiovasculares (PEARSON et al, 2003; SCHWEDLER et al, 2006).

Quando avaliamos o desenvolvimento clínico dos pacientes portadores do alelo C do polimorfismo rs1800630, os resultados obtidos demonstraram níveis aumentados de leucocitose e uma tendência de maiores índices de sinovite. Durante o curso da AR, o líquido sinovial dos pacientes é invadido por citocinas inflamatórias, e o TNF- α demonstra um papel crucial na sequência inflamatória que ocorre nestes locais, bem como a destruição do tecido dali através do recrutamento de células que retroalimentam a produção de citocinas pró-inflamatórias. Sinergicamente a atuação de TNF- α , está a interleucina 17, que tem sua atividade aumentada pelo TNF- α , e está ligada ao desenvolvimento da sinovite por mediação de metaloproteinases que destroem as articulações. A destruição local mediada pela IL-17 ocorre pela ativação do receptor ativador de fator nuclear, que agem na osteoclastogênese, que por consequência leva ao crescimento do tecido *pannus*, o que explica os níveis aumentados de sinovite nestes pacientes. Outro achado comum a esses pacientes é o aumento de expressão de interleucina 10, uma citocina anti-inflamatória, que parece estar associada a uma tentativa de abrandamento da inflamação local em contrapartida a atuação do TNF- α e IL-17 (COSTA et al, 2021; KIM et al, 2017; MORALES et al, 2019).

Foi observado também uma prevalência aumentada de trombocitopenia. Alguns estudos vêm relacionando a presença de trombocitopenia imune aos polimorfismos encontrados em citocinas pró-inflamatórias, como os polimorfismos de TNF- α deste estudo. Indivíduos acometidos com a artrite reumatoide produzem autoanticorpos, e foi demonstrado que a presença destes anticorpos precede a formação de trombocitopenia imune, e a presença deste polimorfismo foi associada a uma significativa chance de aumento dela (PEHLIVAN et al, 2011; SWINKELS et al, 2018).

O polimorfismo rs1800630 demonstrou associação positiva com o agrupamento PCA2. As citocinas pró-inflamatórias atuam nas células progenitoras eritropoiéticas estimulando apoptose, ou seja, na presença de aumento de TNF- α há um estímulo para destruição destas células, gerando alterações hematológicas, como a anemia, leucopenia, trombocitopenia e a diminuição de plaquetas conforme visto no agrupamento PCA 2. Há também o fato de que pacientes com artrite reumatoide produzem autoanticorpos associados a formação de trombocitopenia imune. O TNF- α ainda atua na inibição de síntese de eritropoetina, bem como interrompem a proliferação e diferenciação celular de progenitores de eritrócitos, o que agrava casos de anemia

e gera ainda mais alterações hematológicas (ABENSUR, 2010; OLIVEIRA JUNIOR et al, 2015; MEANS & KRANTZ, 1992).

Quando avaliamos o polimorfismo rs1799724, observamos a presença de leucopenia. Um estudo realizado com uma população Taiwanesa encontrou relação entre a presença de leucopenia e polimorfismo de nucleotídeo único associados ao gene FCRL3, que codifica os receptores Fc de imunoglobulinas. Esses receptores estão associados a formação de imunocomplexos em pacientes com doenças autoimunes e, em pacientes com artrite reumatoide, o fator reumatoide, que é um autoanticorpo de imunoglobulinas do tipo M, se liga às imunoglobulinas do tipo G na sua porção Fc. A porção Fc das imunoglobulinas está intimamente relacionada às respostas imunes corporais, atuando como ativadoras e inibidoras e, com isso, tendo papel fundamental no curso da autoimunidade ou na parada de uma resposta exagerada das citocinas, como o TNF- α (CHEN et al, 2011).

Ainda relacionado ao polimorfismo rs1799724, mas também associado ao polimorfismo rs1800629, identificamos variações nos valores do score DAS28, em que o valor de DAS28 relacionado ao polimorfismo rs1799724 foi maior, e quando relacionado ao polimorfismo rs1800629 foi menor. Estudos pesquisaram a associação entre o score e a utilização de fármacos anti-TNF, e nele foi encontrado uma associação entre o gene LINC02549 e as diferentes respostas aos fármacos. Este gene é expresso em células T e, ainda que sua função não seja completamente conhecida, ele parece estar associado aos subconjuntos de células T encontrados no líquido sinovial de pacientes com artrite crônica. A presença de polimorfismos neste gene pode estar associada ao melhor curso da doença, diminuindo assim o valor de DAS28, ou ao pior curso da doença, aumentando o DAS28. Sugere-se, neste caso, que sejam realizados rastreamento de polimorfismos de LINC02549 em conjunto com polimorfismos do TNF- α para possível correlação destes polimorfismos com o desenvolvimento clínico da artrite reumatoide (SÁNCHEZ-MALDONADO et al, 2021).

Os achados no polimorfismo rs1799964 parecem indicar uma forma abrandada de desenvolvimento da doença. A presença do alelo T deste SNP parece gerar uma diminuição na expressão do TNF- α e, com níveis mais baixos desta citocina, o curso de doenças relacionadas a ela se diferenciam, então a artrite reumatoide em pacientes com esse alelo se encaminharia de forma mais lenta, com menor atividade, e o diagnóstico seria feito mais tardiamente (NOURIAN et al, 2017; SANTOS et al, 2019). Quanto à pressão arterial que demonstrou níveis mais baixos neste grupo, parece haver uma associação entre a menor produção de TNF- α , que por ser uma citocina pró-inflamatória mantém o corpo em estado de inflamação, e a diminuição na pressão arterial. Os níveis de TNF- α aumentados, bem como associados a outras citocinas pró-inflamatórias, estimula a produção de proteína C reativa, que é uma proteína de fase aguda associada a doenças cardiovasculares e, portanto, em níveis mais baixos de TNF- α parece haver uma contra regulação, em que os níveis de pressão arterial se tornam mais baixos por falta de TNF- α circulante na corrente sanguínea (PEARSON et al, 2003; SCHWEDLER et al, 2006).

Estudos relacionando ao gene de TNF- α vem sendo realizados há bastante tempo, pois sabe-se que esta citocina pró-inflamatória tem uma atuação bastante interessante. O TNF- α consegue iniciar e alimentar

todo um processo de inflamação através do recrutamento de outras citocinas pró-inflamatórias e, inclusive, estimulando a secreção de mais TNF- α por outras células e, por isso, vem sendo associada fortemente ao curso de doenças autoimunes graves. A grande quantidade de polimorfismos associados ao gene, bem como a atuação diferenciada de cada polimorfismo, demonstra ainda melhor como essa citocina é importante, visto que polimorfismos associados a uma maior transcrição e, conseqüentemente, maiores níveis de citocina circulante cursam com piores prognósticos e piores sintomatologias, enquanto a presença de polimorfismos associados a uma diminuição na transcrição do gene se encaminham para melhores prognósticos e um desenvolvimento mais lento da doença para o paciente acometido. No entanto, deve-se avaliar com cuidado os estudos, pois pouco se compreende de como essas variações estão estratificadas nas populações. Outra área de pesquisa com esta citocina também busca avaliar a relação entre os polimorfismos aqui presentes e a resposta terapêutica, pois parece haver uma diferenciação de resposta ao tratamento de acordo com os alelos presentes, em que alguns pacientes respondem melhor que outros aos medicamentos bloqueadores de TNF (ANTONATOS et al, 2021; CHEN et al, 2019).

Fica, portanto, clara a necessidade de melhor compreensão da relação entre os polimorfismos de TNF- α com o curso sintomatológico de artrite reumatoide, principalmente em populações miscigenadas como a população brasileira, a fim de compreender quais melhores abordagens terapêuticas. A utilização dos marcadores corretos se mostra imprescindível para aumentar as chances de melhora terapêutica para, com isso, aumentar a aderência terapêutica e melhorar o prognóstico, pois quanto antes o paciente descobre a doença, antes ele pode ser tratado e, com isso, visualizar bons resultados, aderir ao tratamento e melhorar suas condições de vida após o diagnóstico.

7 CONCLUSÃO

- Portadores do alelo G do polimorfismo rs361525 têm duas vezes mais alterações nas dosagens de fator reumatoide e vasculite, e 113% mais desregulação nas dosagens de anti-CCP,
- Portadores do alelo G do polimorfismo rs361525 também estão mais suscetíveis aos agrupamentos de sintomas PCA1 e PCA3,
- Portadores do alelo C do polimorfismo rs1800629 tem menores escores de DAS28,
- Portadores do alelo C do polimorfismo rs1800630 tem 60% mais alterações hematológicas (leucocitose e trombocitopenia) e 40% maior risco de sinovite,
- Portadores do alelo C do polimorfismo rs1800630 estão mais suscetíveis aos danos encontrados no agrupamento PCA2,
- Portadores do alelo C do polimorfismo rs1799964 recebem o diagnóstico em idade mais tardia e tem uma prevalência 40% menor de atividade da doença, bem como 33% deles tem menores índices de pressão alta,
- Portadores do alelo C do polimorfismo rs1799724 tem escores maiores de DAS28 e quase duas vezes mais leucopenia,
- Os polimorfismos rs1800629, rs1799964 e rs1799724 não parecem estar ligados a uma maior suscetibilidade de desenvolvimento dos agrupamentos de sintomas feitos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme visto no decorrer desta pesquisa, muitos estudos vêm sendo realizados para melhorar a terapêutica e, com isso, estimular os pacientes à adesão do tratamento para uma vida longa e tranquila, ainda que com a doença. Sugere-se, portanto, a continuidade de pesquisas na área de polimorfismos associados ao TNF- α e o desenvolvimento da artrite reumatoide para que possa ser desenvolvido um painel de marcadores desta doença.

Os medicamentos utilizados para esta doença trazem inúmeros efeitos colaterais e, por isso, geram desistência do tratamento, por isso conhecer melhor as vias envolvidas na patogenicidade da doença podem ajudar a evitar os efeitos colaterais.

Esta doença debilita e incapacita, dia após dia, milhares de pessoas no Brasil, e isso gera custos financeiros para o Sistema Único de Saúde, custos financeiros e emocionais para os pacientes e, por isso, precisa de mais atenção além do tratamento, visando melhorias no tempo de diagnóstico e início do tratamento,

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 3 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2009.
- ABENSUR, Hugo et al. Deficiência de ferro na doença renal crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 32, p. 95-98, jun. 2010.
- AGUIAR, Francisco J. B. *et al.* Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 1, n. 59, p. 85-92, set. 2012.
- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da célula**. 6 ed. Rio de Janeiro, Artmed, 2017.
- ALLEN, R. A. et al. Polymorphisms in the TNF- α and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. **European Journal Of Clinical Investigation**, Liverpool, v. 1, n. 31, p. 843-851, set. 2001.
- ALETAHA, Daniel; SMOLEN, Josef S. Remission in rheumatoid arthritis: missing objectives by using inadequate das28 targets. **Nature Reviews Rheumatology**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 633-634, 19 ago. 2019.
- ALETAHA, Daniel *et al.* Remission and Active Disease in Rheumatoid Arthritis: defining criteria for disease activity states. **Arthritis & Rheumatism**, Vienna, v. 52, n. 9, p. 2625-2636, 09 set. 2005.
- ANDRADE, Thaisa Ferreira *et al.* Etiologia da artrite reumatoide: revisão bibliográfica. **Brazilian Journal Of Health Review**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 3698-3718, ago. 2019.
- ALIVERNINI, S *et al.* Driving chronicity in rheumatoid arthritis: perpetuating role of myeloid cells. **Clinical And Experimental Immunology**, [S.L.], v. 193, n. 1, p. 13-23, 2 fev. 2018.
- ANTONATOS, Charalabos et al. Exploring pharmacogenetic variants for predicting response to anti-TNF therapy in autoimmune diseases: a meta-analysis. **Pharmacogenomics**, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 435-445, maio 2021.
- ASTERMARK, Jan *et al.* Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. **Hemostasis, Thrombosis, And Vascular Biology**, Malmö, v. 108, n. 12, p. 3739-3745, 01 dez. 2006.
- BARARDI, Célia Regina Monte *et al.* **Imunologia**. Florianópolis: Biblioteca Universitária da UFSC, 2010.
- CANET, Luz M. et al. Polymorphisms at phase I-metabolizing enzyme and hormone receptor loci influence the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis patients. **The Pharmacogenomics Journal**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 83-96, 5 out. 2018.
- CHEN, Ji-Yih *et al.* Disease Phenotypes and Gender Association of FCRL3 Single-Nucleotide Polymorphism -169T/C in Taiwanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. **The Journal Of Rheumatology**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 264-270, 15 nov. 2010.
- CHEN, Lin *et al.* Association between tumor necrosis factor polymorphisms and rheumatoid arthritis as well as systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 1-9, ago. 2019.
- CHO, Ho-Chan *et al.* TNF- α polymorphisms and coronary artery disease: association study in the korean population. **Cytokine**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 104-109, abr. 2013.
- COJOCARU, M. *et al.* Extra-articular manifestations in Rheumatoid Arthritis. **Journal Of Clinical Medicine**, Bucharest, v. 5, n. 4, p. 286-291, abr. 2010

CONRAD, Karsten *et al.* Profiling of rheumatoid arthritis associated autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 431-435, abr. 2010.

COSTA, Ana Carolina de Figueiredo *et al.* Anti-inflammatory and Hepatoprotective Effects of Quercetin in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. **Inflammation**, [S.L.], v. 44, n. 5, p. 2033-2043, 2 jun. 2021.

CRUVINEL, Wilson de Melo *et al.* Sistema Imunitário – Parte I: fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 4, n. 50, p. 434-461, jan. 2010.

CUI, Guanglin *et al.* Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke. **Journal Of Neuroinflammation**, Wuhan, v. 235, n. 9, p. 1-11, jan. 2012.

DING, Bo *et al.* Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. **Arthritis & Rheumatism**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 30-38, jan. 2009.

DORIA, A.; ZEN, M.; BETTIO, S.; GATTO, M.; BASSI, N.; NALOTTO, L.; GHIRARDELLO, A.; IACCARINO, L.; PUNZI, L.. Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 22-30, nov. 2012.

GIARDINA, Emiliano *et al.* Tumor Necrosis Factor Promoter Polymorphism TNF*-857 Is a Risk Allele for Psoriatic Arthritis Independent of the PSORS1 Locus. **Arthritis & Rheumatism**, Rome, v. 63, n. 12, p. 3801-3806, 02 ago. 2011.

GOELDNER, Isabela *et al.* Artrite reumatoide: uma visão atual. **Bras Patol Med Lab**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 495-503, out. 2011.

GOH, Leslie *et al.* Análise sistemática da influência do antifator de necrose tumoral [anti-TNF] sobre as taxas de infecção em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.L.], v. 53, n. 6, p. 501-515, nov. 2013.

HIGUCHI, T. *et al.* Polymorphism of the Sflanking region of the human tumor necrosis factor (TNF- α) gene in Japanese. **Tissue Antigens**, Tokyo, v. 1, n. 51, p. 605-612, mar. 1998.

HUANG, Deren *et al.* Tumour necrosis factor- α polymorphism and secretion in myasthenia gravis. **Journal Of Neuroimmunology**, Estocolmo, v. 1, n. 94, p. 165-171, nov. 1998.

HUSSAIN, Sabir *et al.* TNF-alpha-308G>A polymorphism and the risk of familial CAD in a Pakistani population. **Human Immunology**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 13-18, jan. 2015.

JANEWAY, Charles A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunology Today**, [S.I.], v. 13, 1992.

KÄLLBERG, Henrik *et al.* Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Involving HLA-DRB1, PTPN22, and Smoking in Two Subsets of Rheumatoid Arthritis. **The American Journal Of Human Genetics**, [S.L.], v. 80, n. 5, p. 867-875, maio 2007.

KHANDPUR, Ritika *et al.* NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. **Science Translational Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 178, 27 mar. 2013.

KIM, Eun Kyung *et al.* IL-17-mediated mitochondrial dysfunction impairs apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through activation of autophagy. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 2565-2565, 19 jan. 2017.

KURKÓ, Júlia *et al.* Genetics of Rheumatoid Arthritis — A Comprehensive Review. **Clinical Reviews In Allergy & Immunology**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 170-179, 5 jan. 2013.

LEE, Y H; BAE, S-C. Intercellular adhesion molecule-1 polymorphisms, K469E and G261R and susceptibility to vasculitis and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Cell Mol Biol**, Seoul, v. 12, n. 62, p. 84-90, 31 out. 2016.

LONG, JC. Multiple Locus Haplotype Analysis. Software and documentation distributed by the author. Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, Bethesda, 1999.

MASSARENTI, Laura *et al.* PADI4 Polymorphisms Confer Risk of Anti-CCP-Positive Rheumatoid Arthritis in Synergy With HLA-DRB1*04 and Smoking. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], 18 out. 2021.

MEANS, Rt Jr *et al.* Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. **Blood**, [S.L.], American Society of Hematology, v. 80, n. 7, p. 1639-1647, 1 out. 1992.

MEDZHITOV, Ruslan *et al.* Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current Opinion In Immunology**, New Heaven, v. 4, n. 9, p. 4-9, jan. 1997.

MESQUITA JUNIOR, Danilo *et al.* Sistema Imunitário – Parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos t e b. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 5, n. 50, p. 552-580, set. 2010.

MIL, Annette Hm van Der Helm-Van *et al.* Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [S.L.], v. 7, n. 5, 14 jun. 2005.

MORALES, José María G. Ruiz de *et al.* Critical role of interleukin (IL)-17 in inflammatory and immune disorders: an updated review of the evidence focusing in controversies. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 19, n. 1, jan. 2020.

MOREIRA, Lorrane Brunelle *et al.* Fatores associados a capacidade funcional de idosos adscritos à Estratégia de Saúde da Família. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 2041-2050, jun. 2020.

MOTA, Licia Maria Henrique da *et al.* Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 2, n. 52, p. 135-174, dez. 2011.

MURPHY, K. *et al.* *Imunobiologia de Janeway*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NOURIAN, Mahyar *et al.* Evaluation of tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA expression level and the rs1799964 polymorphism of the TNF- α gene in peripheral mononuclear cells of patients with inflammatory bowel diseases. **Biomedical Reports**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 698-702, 9 maio 2017.

OLIVEIRA JÚNIOR, Wander Valadares de; SABINO, Adriano de Paula; FIGUEIREDO, Roberta Carvalho; RIOS, Danyelle Romana Alves. Inflammation and poor response to treatment with erythropoietin in chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 255-263, fev. 2015.

OKU, Elaine Cristina *et al.* INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA MÃO EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE. **Fisioter Mov**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 221-228, abr. 2009.

PAVLOVA, A.; DELEV, D.; LACROIX-DESMAZES, S.; SCHWAAB, R.; MENDE, M.; FIMMERS, R.; ASTERMARK, J.; OLDENBURG, J. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor- α and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. **Journal Of Thrombosis And Haemostasis**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 2006-2015, dez. 2009.

PEARSON, Thomas A. *et al.* Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Circulation**, [S.L.], v. 107, n. 3, p. 499-511, 28 jan. 2003.

PEHLIVAN, M. *et al.* Investigation of TNF-alpha, TGF-beta 1, IL-10, IL-6, IFN-gamma, MBL, GPIIb/IIIa, and IL1A gene polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. **Platelets**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 588-595, 19 maio 2011.

PLAYFAIR, J. H. L; CHAIN, B. M Co-autor. *Imunologia básica: guia ilustrado de conceitos fundamentais*. 9. São Paulo: Manole, 2013. E-book. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788520450154>. Acesso em: 19 maio 2022.

PINHEIRO, Geraldo da Rocha Castelar. Instrumentos de Medida da Atividade da Artrite Reumatóide – Por que e como empregá-los. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 362-365, out. 2007.

QIU, Qi *et al.* Polymorphisms and Pharmacogenomics for the Clinical Efficacy of Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-24, 7 mar. 2017.

RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, Solbritt *et al.* Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [S.L.], v. 48, n. 10, p. 2741-2749, out. 2003.

REGO-PÉREZ, Ignacio *et al.* Gene Polymorphisms and Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis. **Current Genomics**, Coruña, v. 1, n. 9, p. 381-393, fev. 2008.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Luis *et al.* TNFA -308 (rs1800629) polymorphism is associated with a higher risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, [S.L.], v. 216, n. 1, p. 125-130, maio 2011.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Luis *et al.* Genetic Markers of Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2012, p. 1-14, 2012.

SAAG, Kenneth G. *et al.* American College of Rheumatology 2008 Recommendations for the Use of Nonbiologic and Biologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [S.L.], v. 59, n. 6, p. 762-784, jun. 2015.

SADAF, Tayyaba. Lack of tumor necrosis factor alpha gene polymorphism -857c/t (rs1799724) association in Pakistani rheumatoid arthritis patients. **International Journal Of Rheumatic Diseases**, Rawalpindi, jan. 2016.

SADAF, Tayyaba *et al.* Lack of association of -863C/A (rs1800630) polymorphism of tumor necrosis factor- α gene with rheumatoid arthritis. **Archives Of Medical Science**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 531-536, 2019.

SÁNCHEZ-MALDONADO, Jose Manuel *et al.* Validation of GWAS-Identified Variants for Anti-TNF Drug Response in Rheumatoid Arthritis: a meta-analysis of two large cohorts. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, 27 out. 2021.

SANTOS, Camilla N O *et al.* Association Between Zika Virus Microcephaly in Newborns With the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- α Gene. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 220, n. 11, p. 1797-1801, 28 jul. 2019.

SCARDAPANE, A. *et al.* TNF- α Polymorphisms in Juvenile Idiopathic Arthritis: which potential clinical implications. **International Journal Of Rheumatology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-16, 2012.

SCHINNERLING, Katina *et al.* Humanized Mouse Models of Rheumatoid Arthritis for Studies on Immunopathogenesis and Preclinical Testing of Cell-Based Therapies. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-24, 19 fev. 2019.

SCHULZ, Susanne *et al.* Are There Any Common Genetic Risk Markers for Rheumatoid Arthritis and Periodontal Diseases? A Case-Control Study. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2019, p. 1-11, 12 fev. 2019.

SCHWEDLER, Susanne B. *et al.* C-Reactive Protein: a family of proteins to regulate cardiovascular function. **American Journal Of Kidney Diseases**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 212-222, fev. 2006.

SMOLEN, Josef s *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, [S.L.], v. 73, n. 3, p. 492-509, 25 out. 2013.

SOUZA, Alexandre Wagner Silva e *et al.* Sistema Imunitário – Parte III: o delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 6, n. 50, p. 665-694, nov. 2010.

STOLPE, A. van de; SAAG, P. T. van Der. Intercellular adhesion molecule-1. **Journal Of Molecular Medicine**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 13-33, jan. 1996.

SWINKELS, Maurice *et al.* Emerging Concepts in Immune Thrombocytopenia. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 1-15, 30 abr. 2018.

TAN, Irene J. *et al.* Hormonal modulation of the immune system — A spotlight on the role of progestogens. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 536-542, jun. 2015.

TEDESCHI, Sara K. *et al.* Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. **Clinical Immunology**, [S.L.], v. 149, n. 2, p. 211-218, nov. 2013.

UDALOVA, I. A. *et al.* Association of accelerated erosive rheumatoid arthritis with a polymorphism that alters NF- κ B binding to the TNF promoter region. **Rheumatology**, Oxford, p. 830-831, fev. 2002.

YAMAMOTO, Kazuhiko *et al.* Genetic studies of rheumatoid arthritis. **Proceedings Of The Japan Academy, Series B**, [S.L.], v. 91, n. 8, p. 410-422, 2015.

YONEKURA, Claudia Leiko *et al.* Incidência de tuberculose em pacientes com artrite reumatoide em uso de bloqueadores do TNF no Brasil: dados do registro brasileiro de monitoração de terapias biológicas biobadabrasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.L.], v. 57, p. 477-483, 2017.

ZEGKOS, Thomas *et al.* Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: assessment, management and next steps. **Therapeutic Advances In Musculoskeletal Disease**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 86-101, 30 abr. 2016.

ZHU, Hong *et al.* Pharmacogenetics and pharmacogenomics for rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate treatment: the 2013 update. **Pharmacogenomics**, Jianguo, v. 4, n. 15, p. 551-566, jan. 2014.

ANEXO A

QUESTIONÁRIO DOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE



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

Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Artrite Reumatoide

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 () Derrame Articular

() Rigidez Matinal () Dor Articular

Articulações Acometidas:

() Ombro () Quadril

() Cotovelo () Joelho

() Punho () Tornozelo

() MCF () MTF

() IFPM () IFPP

Total: _____ articulações

- Manifestações Extra-articulares:**
- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Pleurite | <input type="checkbox"/> Acometimento Pulmonar |
| <input type="checkbox"/> Pericardite | <input type="checkbox"/> Acometimento Renal |
| <input type="checkbox"/> Vasculite Reumatóide | <input type="checkbox"/> Amiloidose |
| <input type="checkbox"/> Nódulos Reumatóides | <input type="checkbox"/> Sjögren Secundário |
| <input type="checkbox"/> Acometimento Ocular | <input type="checkbox"/> Outras. Quais? _____ |

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

Observações: Osteoporose? Diabetes? Depressão? _____

- Sintomatologia Recente:**
- (Nos últimos 10 dias)**
- | | |
|--------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Febre | <input type="checkbox"/> Rigidez Matinal |
| | <input type="checkbox"/> Derrame Articular |
| | <input type="checkbox"/> Dor Articular |

- | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| <u>Articulações</u> | <input type="checkbox"/> Punho | <input type="checkbox"/> Joelho |
| <u>Acometidas:</u> | <input type="checkbox"/> MCF | <input type="checkbox"/> Tornozelo |
| <input type="checkbox"/> Ombro | <input type="checkbox"/> IFPM | <input type="checkbox"/> MTF |
| <input type="checkbox"/> Cotovelo | <input type="checkbox"/> Quadril | <input type="checkbox"/> IFPP |

Total: _____ articulações

- Manifestações Extra-articulares:**
- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Pleurite | <input type="checkbox"/> Acometimento Renal |
| <input type="checkbox"/> Pericardite | <input type="checkbox"/> Amiloidose |
| <input type="checkbox"/> Vasculite Reumatóide | <input type="checkbox"/> Sjögren Secundário |
| <input type="checkbox"/> Nódulos Reumatóides | <input type="checkbox"/> Outras. Quais? _____ |
| <input type="checkbox"/> Acometimento Ocular | _____ |
| <input type="checkbox"/> Acometimento Pulmonar | _____ |

Envolvimento Cardiovascular:

- HAS
- Doença Coronariana
- Angina
- IAM Prévio
- Revascularização do Miocárdio
- Cateterismo Prévio

Envolvimento Neurológico: () AVC () AIT () Ateroma em Carótidas

Dislipidemia: () Hipercolesterolemia () Hipertrigliceridemia

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

DAS 28 =

Fator Reumatoide =

Health Assesment Questionnaire (HAQ)

Nível de Dificuldade

Você é capaz de	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	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 cama	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	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	0	1	2	3

pouco acima de sua cabeça?				
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 carro	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 Escores 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

GESTAÇÃO: _____ **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 B

PCR em Tempo Real (q-PCR)

As reações de genotipagem para determinação dessas amostras foram realizadas por ensaios TaqMan predefinidos que usam sondas que se ligam no sulco menor do DNA, cada uma das sondas foi designada para um alelo específico e por isso, elas foram marcadas diferentemente com um repórter fluorescente (FAM® e VIC®) na extremidade 5' para detectar os alelos polimórficos ou selvagens.

Quando uma sonda específica se hibridiza com a região do DNA de interesse, a DNA Polimerase, durante o processo de extensão da fita complementar, cliva o repórter da sonda. Desta forma, o corante se separa do seu inibidor e a fluorescência é emitida. Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Reagentes e Soluções

- Água ultrapura;
- TaqMan® Genotyping Master Mix;
- Sonda TaqMan® SNP Genotyping Assays.

Procedimento

Inicialmente foi preparado um mix para cada SNP, onde foi utilizado por amostra 2,375 µL de água; 2,5 µL de Master Mix e 0,125 µL de sonda específica para cada SNP, o mix total foi calculado multiplicando esses valores pela quantidade de amostras utilizadas em cada reação. Em seguida, o mix foi distribuído em uma placa MicroAmp™ Optical de 96/384 poços, foi colocado 5 µL de mix e 1 µL de DNA em cada poço, sendo uma amostra diferente por poço. Para cada reação foi utilizado água ultrapura, como controle negativo o último poço foi utilizado apenas a água.

Condições de q-PCR

Após um passo inicial de pré-PCR de 30seg a 60°C e 10min a 95°C, as amostras foram amplificadas por 50 ciclos em condições de desnaturação, pareamento e extensão de 15seg a 92°C e 1min e 30seg a 60°C, respectivamente, seguidos de um passo final de pós-PCR de 30seg a 60°C. A reação de amplificação foi realizada pelo equipamento 7900HT PCR quantitativa em tempo real (Thermo Fisher Scientific®).