

Ticiana Della Justina Farias

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E DE ASSOCIAÇÃO DOS
GENES *KIR* COM ARTRITE REUMATOIDE**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilíada Rainha de Souza

Coorientadora: Dr^a Andrea Rita Marrero

Florianópolis
2012

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

Farias, Ticiania Della Justina
ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES KIR COM
ARTRITE REUMATOIDE [dissertação] / Ticiania Della Justina
Farias ; orientadora, Iliada Rainha de Souza ; co-
orientadora, Andrea Rita MARRERO. - Florianópolis, SC, 2012.
148 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Artrite
Reumatoide. 3. Imunogenética. 4. Genes KIR. 5. Células
Natural Killer. I. Souza, Iliada Rainha de. II. MARRERO,
Andrea Rita. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

“Análise epidemiológica e de associação dos genes *KIR* com artrite reumatoide”

por

Ticiania Della Justina Farias

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 08/PPGBCD/2012) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



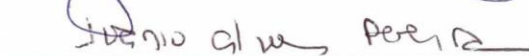
Prof(a). Dr(a). Iliada Rainha de Souza (Presidente/Orientadora)



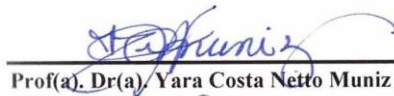
Prof(a). Dr(a). Andrea Rita Marrero (Coorientadora)



Prof(a). Dr(a). José Artur Bogo Chies (GENÉTICA/UFGRS)



Prof(a). Dr(a). Ivânio Alves Pereira (HU/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Yara Costa Netto Muniz (PPGBCD/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Danilo Gardenal Augusto (NATIONAL HEALTHY INSTITUTE/EUA)



Prof(a). Dr(a). Angelica Francesca Maris (Suplente/BEG/CCB/UFSC)



Profa. Dra. Yara Maria Rauh Muller

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

Florianópolis, 25 de outubro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiramente agradecer ao meu principal suporte: a minha família.

Aos meus pais que são exemplos de dedicação, amor, caráter e quem sempre nos motivaram à superação. Não há como mensurar o tamanho da minha admiração por vocês. Grata pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Thaís e Thiago, que são meus eternos companheiros, amigos e por estarem sempre presentes, mesmo que em pensamento. Amo muito vocês!

Também gostaria de agradecer aos meus cunhados, Wanks e Fran, por acrescentar alegria à nossa família.

E, claro, ao meu amado afilhado Benjamin que ilumina nossas vidas e vem me inspirando desde o seu nascimento.

Ao meu namorado e companheiro Lucas. A sua presença em minha vida trouxe-me tranquilidade e muitas alegrias. O seu apoio, incentivo, amor e compreensão foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Em segundo, agradeço às pessoas que estiveram diretamente relacionadas ao desenvolvimento de minha vida acadêmica, e que tornaram possível a realização e finalização desta etapa de minha formação.

À minha querida orientadora professora Ilíada que me ensinou muitas coisas além da genética. Eu sou grata por todo carinho, conselhos, apoio e amizade neste período de sete anos de convívio, proporcionando aprendizados que levarei para a minha vida.

À minha coorientadora Andrea que me acompanhou na descoberta do “mundo dos *KIRs*”, sempre me incentivando a sonhar mais alto. Além de trazer seu alto astral e (muitas) risadas ao laboratório, principalmente em companhia da Yara, cujo auxílio nas otimizações e leitura dos experimentos foi muito importante.

Aos amigos e colegas do laboratório. Os trabalhos realizados são possíveis pela equipe que temos, auxiliando nas coletas, extrações de DNA, preparação de géis e eletroforeses,... e pelas risadas e conversas, tornando o *lab* um ambiente muito agradável. Agradeço, também, a

todos os lapogeanos que passaram no LAPOGE nestes anos, que auxiliaram em meu aprendizado e proporcionaram o crescimento de amizades eternas.

Agradeço especialmente à Luisa, uma das minhas principais aliadas e amiga, que mesmo morando em Washington acompanhou o meu mestrado e auxiliou na revisão da dissertação. À Elis que esteve sempre por perto quando precisei, obrigada pela atenção de me ouvir (e muito), pelo companheirismo e pela amizade. Eu amo vocês!

Aos meus amigos que convivem comigo desde a faculdade e àqueles que eu conheci mais nestes últimos anos, compartilhando tanto momentos críticos (geralmente envolvendo o tópico “mestrado”), como alegrias, conquistas, festas e conversas nos corredores do MIP e ao redor da UFSC. Cada um contribuiu na conclusão deste mestrado.

Aos médicos da divisão de reumatologia do Hospital Universitário (HU), Dr. Ivânio Pereira, Dr^a Adriana Zimmermann e Dr^a Sônia Fialho, por apoiarem o projeto de genética e autoimunidade, colaborando com a coleta de dados de pacientes e nas discussões de dados e trabalhos.

Aos pacientes com artrite reumatoide que compartilharam um pouco de suas experiências de vida, incentivando-nos a estudar esta doença tão agressiva. Aos indivíduos do grupo controle pela sua ação voluntária de contribuir à pesquisa.

À prof^a Maria Luiza Petzl-Erler e aos membros do laboratório de Genética Molecular Humana, especialmente ao Danillo, por me receberem prontamente e auxiliarem com os procedimentos de tipagem e cederem amostras de *primers* dos *KIR*. Esta ajuda foi essencial para a execução deste trabalho.

Aos membros da banca, doutores José Artur Bogo Chies, Ivânio Alves Pereira, Danillo Gardenal Augusto, Yara Costa Netto Muniz e Angélica Francesca Maris por aceitarem participar da avaliação deste trabalho. As suas contribuições foram bem vindas e preciosas para aprimoramento desta dissertação.

Aos órgãos de fomento, CAPES e FAPESC, pelo financiamento de minha bolsa de estudo de mestrado e pelos financiamentos dos

projetos de pesquisa desenvolvidos no LAPOGE, um dos quais resultou nesta dissertação.

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”

(Los Hermanos)

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por inflamação crônica que causa erosões e deformidades nas articulações e manifestações inflamatórias sistêmicas como acometimentos pulmonar e cardíaco. As células *natural killer* (NK) são células efetoras que participam tanto da resposta imune inata quanto adaptativa através de produção de citocinas e ação citolítica. As NK são encontradas com frequência nas articulações afetadas pela AR. Dentre os receptores das células NK, destaca-se o receptor das células *killer* semelhante à imunoglobulina (KIR) que possui ação ativadora e/ou inibidora das NK. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença/ausência dos genes *KIR* na população de Santa Catarina e a associação da presença dos genes *KIR* ativadores com pacientes de AR e com dados clínicos. Neste estudo foram avaliados 147 pacientes com AR (casos) e 164 indivíduos sem histórico de doença autoimune (controle) para a presença/ausência de 16 genes *KIR*, através da técnica de PCR por *primer* de sequência específica (PCR-SSP). No entanto, apenas os genes *KIR* ativadores (*KIR2DS1*, *KIR2SD2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*) foram investigados para o estudo de associação caso-controle. As frequências gênicas foram estimadas e o *odds ratio* (OR) foi calculado para avaliar associação dos genes *KIR* ativadores com AR ($p < 0,05$ foi considerado significativo). As amostras de pacientes e controles tiveram predominância de mulheres (87%) com média de 53(\pm 12) anos e com ascendência europeia (86%). As frequências de presença/ausência dos 16 genes *KIR* em pacientes com AR assemelharam-se aos estudos com AR e outras doenças autoimunes no Brasil, bem como as frequências destes genes no grupo controle aproximaram-se aos demais estudos brasileiros para populações eurodescendentes. Não foi encontrada associação do polimorfismo de ausência e presença dos genes ativadores com AR. No entanto, a presença do gene *KIR2DS2* foi mais frequente em pacientes com AR que apresentaram manifestação articular (MA) em relação ao grupo controle (OR=2,312; $p=0,010$). Além do mais, não houve associação do tabagismo com a AR, apenas com fator reumatoide (FR) em pacientes com AR (OR=2,947; $p=0,02$). Os genes *KIR* não foram associados ao desenvolvimento de AR neste estudo. Entretanto, o gene *KIR2DS2* foi mais frequente em pacientes com a presença de MA, enquanto que o hábito tabagista foi relacionado com FR.

Palavras-chave: Artrite reumatoide; genes *KIR*; células *Natural Killer*; NK.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammation that causes joint erosions and deformities, and systemic manifestations such as lung and heart commitment. The natural killer cells (NK) play a role in both adaptive and innate immune responses through cytokines production which can lead to cell lysis. NK cells are usually found in RA joints. The killer immunoglobulin-like receptor (KIR) controls the trigger to activate and/or inhibit the NK cells. The aim of this study was to investigate the presence/absence of *KIR* genes in the population of Santa Catarina, as well the association of the *KIR* activating genes to RA development and clinical data. In this study, the presence/absence of 16 *KIR* genes polymorphisms of 147 RA patients (case) and 164 individuals without autoimmune disease history (control) were analyzed through sequence specific primer PCR (SSP-PCR) method. Among them, the *KIR* activating genes (*KIR2DS1*, *KIR2SD2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, and *KIR3DS1*) were investigated for the association study (case-control). The gene frequencies were estimated and the odds ratio (OR) of *KIR* activating genes was calculated, $p < 0.05$ was considered significant. Both patients and controls have a prevalence of women (87%), mean age of 53(\pm 12 years), and European ancestry (86%). The frequencies of the 16 *KIR* genes in controls were similar to other Brazilian studies with European ancestry. The *KIR* frequencies in RA patients were similar to other studies about RA and autoimmune diseases. No association of the activating *KIR* genes with RA was found. However, the presence of *KIR2DS2* gene was higher in RA patients with limited to joint manifestations than in controls (OR= 2.312; $p=0.010$). Furthermore, smoking was not associated with RA, but with the high levels of rheumatoid factor (RF) in RA patients (OR=2.947; $p=0.02$). *KIR* genes were not associated with RA development in this study. However, *KIR2DS2* gene was more frequent in RA patients with joint manifestation, whereas the smoking habit was related with RF.

Keywords: Rheumatoid Arthritis; *KIR* genes; Natural Killer cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Receptores das células <i>natural killer</i> (NK).....	37
Figura 2: A regulação da função efetora da célula <i>natural killer</i> (NK)..	39
Figura 3: Estrutura e nomenclatura de moléculas KIR..	41
Figura 4: Exemplo de haplótipos que pertencem aos haplogrupos A e B de <i>KIR</i>	42
Figura 5: Foto de uma eletroforese de gel de agarose 3% da PCR-SSP multiplex..	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes <i>KIR</i> e dos genes controles utilizados na detecção do polimorfismo de presença/ausência dos genes por PCR-SSP.....	52
Tabela 2: O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada mix na técnica de PCR-SSP multiplex dos genes <i>KIR</i>	54
Tabela 3: O protocolo dos reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR-SSP) na amplificação dos genes <i>KIR</i>	54
Tabela 4: Programa para amplificação dos genes <i>KIR</i>	55
Tabela 5: Distribuição de dados epidemiológicos em pacientes com artrite reumatoide (AR) e controle.	59
Tabela 6: A frequência dos sintomas clínicos em pacientes com artrite reumatoide.....	60
Tabela 7: Associação do hábito tabagista entre pacientes com artrite reumatoide (AR) e controle e entre a presença de fator reumatoide (FR) em pacientes com AR.....	61
Tabela 8: Presença dos genes <i>KIR</i> , frequência da presença do gene (<i>f</i>); frequência gênica estimada (<i>F</i>) em pacientes com artrite reumatoide (AR) e controle.....	62
Tabela 9: Análise de suscetibilidade da presença dos genes <i>KIR</i> ativadores com artrite reumatoide (AR) e controles.....	63
Tabela 10: Associação da presença dos genes <i>KIR</i> ativadores com dados clínicos em pacientes com artrite reumatoide e controles.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACPA	Anticorpos anti-proteína citrulinada, do inglês <i>Anti-Citrullinated Protein Antibodies</i>
ACR	Colégio Americano de Reumatologia, do inglês <i>American College of Rheumatology</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno, do inglês <i>Antigen-presenting Cell</i>
AR	Artrite reumatoide
BCR	Receptor de célula B, do inglês <i>B-cell receptor</i>
CD	Célula dendrítica
CD(16,3,40)	Grupo de diferenciação das células do sistema imune, do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CD56	Receptor das células <i>natural killer</i>
CD94/NKG2A	Receptor heterodímero das células <i>natural killer</i>
CIT	Cauda intracitoplasmática do receptor KIR
CRP	Proteína C-reativa, do inglês <i>C-reactive protein</i>
<i>CTLA-4</i>	Gene <i>CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)</i>
D0, D1 e D2	Domínios dos receptores KIR
DAS 28	Índice de atividade da doença (artrite reumatoide), do inglês <i>Disease Activity Score in 28 Joints</i>
DC	Doença de Crohn
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado, do inglês <i>Deoxynucleoside Triphosphates</i>
DT1	Diabetes tipo 1
Fc	Receptor Fc
FR	Fator reumatoide
<i>GALC</i>	Gene <i>GALC (Galactosylceramidase)</i>
GWAS	Estudo de associação por varredura do genoma, do inglês <i>Genome Wide Association Studies</i>
H ₂ O	Estrutura molecular da água
HLA	Antígenos leucocitários humanos, do inglês <i>Human Leukocyte Antigens</i>
<i>HLA-DRB1</i>	Gene <i>HLA-D</i> região β hipervariável 1
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon- γ
ITAM	Do inglês <i>Immunotyrosine-based activatory motif</i>
ITIM	Do inglês <i>Immunotyrosine-based inhibitory motif</i>
KIR	Receptor de células <i>killer</i> semelhante à imunoglobulina, do inglês <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor</i>

LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LRC	Complexo de receptores leucocitários, do inglês <i>Leukocyte Receptor Complex</i>
MA	Manifestação articular
MEA	Manifestação extra-articular
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NCR	Receptores naturais de citotoxicidade, do inglês <i>Natural Cytotoxicity Receptor</i>
NDN	Gene <i>NDN (Necdin)</i>
NK	(Células) <i>natural killer</i>
NKG2D	Receptor das células <i>natural killer</i> e B
OR	<i>Odds ratio</i>
PADI	Gene <i>PADI (Peptidyl arginine deiminase)</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-SSP	Reação em cadeia da polimerase com <i>primers</i> de sequências específicas
PTPN22	Gene <i>PTPN22 (Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 22)</i>
SE	Epítopo compartilhado, do inglês <i>Shared Epitope</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STAT4	Gene <i>STAT4 (Signal transducer and activator of transcription 4)</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de célula T, do inglês <i>T-Cell Receptor</i>
Th	Célula T auxiliar, do inglês <i>T Helper cells</i>
TM	Porção transmembranar do receptor KIR
TNFAIP3	Gene <i>TNFAIP3 (Tumor Necrosis Factor, alpha-induced protein 3)</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α , do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TRAF1-C5	Loco <i>TRAF1-C5 (TNF-receptor-associated factor 1, complement component factor 5)</i>
Treg	Células T reguladoras, do inglês <i>T Regulatory cells</i>
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	O SISTEMA IMUNE E AUTOIMUNIDADE.....	25
2.2	ARTRITE REUMATOIDE	27
2.3	ASPECTOS CLÍNICOS DA ARTRITE REUMATOIDE	29
2.4	ASPECTOS GENÉTICOS DA ARTRITE REUMATOIDE	31
2.5	IMUNOPATOGÊNESE DA ARTRITE REUMATOIDE.....	33
2.6	CÉLULAS NATURAL KILLER	35
2.7	RECEPTORES KIR	40
2.7.1	<i>Imunogenética dos KIRs.....</i>	<i>41</i>
3	JUSTIFICATIVA.....	45
4	OBJETIVOS	47
4.1	OBJETIVO GERAL.....	47
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
5	MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	49
5.2	DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	49
5.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	49
5.4	DETECÇÃO DO POLIMORFISMO <i>KIR</i>	50
5.5	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS	55
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5.6.1	<i>Teste de homogeneidade.....</i>	<i>56</i>
5.6.2	<i>Estimativa de frequências genotípicas</i>	<i>56</i>
5.6.3	<i>Estudo de associação.....</i>	<i>57</i>
6	RESULTADOS.....	59
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	59
6.2	DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DE ARTRITE REUMATOIDE.....	60
6.3	GENES <i>KIR</i> E ARTRITE REUMATOIDE	61
6.4	GENES <i>KIR</i> E SUA INFLUÊNCIA NOS FATORES CLÍNICOS DA ARTRITE REUMATOIDE	63
7	DISCUSSÃO.....	67
7.1	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS	67
7.2	OS GENES <i>KIR</i>	70
7.2.1	<i>Análise de frequência dos KIR em populações brasileiras</i>	<i>70</i>

7.2.2	<i>Análise de frequências dos KIR em artrite reumatoide e doenças autoimunes</i>	72
7.3	ASSOCIAÇÃO DOS GENES <i>KIR</i> E A ARTRITE REUMATOIDE.....	74
7.4	ASSOCIAÇÃO DOS <i>KIR</i> E OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES.....	75
7.5	ASSOCIAÇÃO DE <i>KIR</i> E DADOS CLÍNICOS DA ARTRITE REUMATOIDE.....	78
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	APÊNDICE A – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO HÁBITO TABAGISTA COM A PRESENÇA DO FATOR REUMATOIDE EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE	107
	APÊNDICE B – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES <i>KIR</i> ATIVADORES NA SUSCETIBILIDADE À ARTRITE REUMATOIDE	109
	APÊNDICE C – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES <i>KIR</i> ATIVADORES NA SUSCETIBILIDADE DA PRESENÇA DE DADOS CLÍNICOS NA ARTRITE REUMATOIDE E CONTROLE	111
	APÊNDICE D – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES <i>KIR</i> ATIVADORES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE	114
	APÊNDICE E – COMPILAÇÃO DAS FREQUENCIAS DOS GENES <i>KIR</i> EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS	117
	APÊNDICE F – COMPILAÇÃO DAS FREQUENCIAS DOS GENES <i>KIR</i> EM ESTUDOS COM ARTRITE REUMATOIDE NO MUNDO E OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES NO BRASIL	119
	APÊNDICE G – COMPILAÇÃO DOS ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES <i>KIR</i> EM DOENÇAS AUTOIMUNES	123
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E APLICADO NOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE	127
	ANEXO B - QUESTIONÁRIO APLICADO NOS PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE	131
	ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO APLICADO NO GRUPO CONTROLE	139
	ANEXO D – QUESTIONÁRIO APLICADO NO GRUPO CONTROLE	143

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, de etiologia complexa e com quadro crônico inflamatório que acomete as articulações, comprometendo, também, pulmões e coração. Esta doença causa elevada mortalidade por complicações cardiovasculares e comorbidade – pelas erosões e deformidades articulares. A origem da AR é incerta, embora o tabagismo, alguns genes e aspectos imunológicos tenham sido associados à patologia.

As células *natural killer* (NK) participam tanto da resposta imune inata quanto adaptativa, interagindo com outras células através de citocinas e quimiocinas, além de possuir poder citolítico. A resposta destas células depende de seus receptores que podem tanto enviar sinais de ativação como inibição, destacando os receptores das células *killer* semelhantes à imunoglobulina (KIR). Os receptores KIR são codificados por uma família de 16 genes cujo polimorfismo pode ser representado por presença/ausência gênica, diversidade alélica e formação de haplótipos. Desta forma, os genes *KIR* são altamente polimórficos e suas frequências variam entre populações. Estes genes estão envolvidos na suscetibilidade a doenças, especialmente doenças autoimunes, infecciosas e câncer.

Este trabalho buscou analisar os dados epidemiológicos das amostras e dados clínicos dos pacientes. Além disso, observaram-se as frequências de presença e ausência dos genes *KIR*, sendo que somente os genes *KIR* ativadores foram analisados no estudo caso-controle. Por fim, a presença dos genes *KIR* ativadores foram avaliados com dados clínicos de pacientes de AR, tais como fator reumatoide (FR), manifestação articular (MA) e manifestação extra-articular (MEA).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O SISTEMA IMUNE E AUTOIMUNIDADE

O sistema imune é responsável pela defesa do organismo contra diversos patógenos, incluindo bactérias, vírus e outros parasitas. O poder destrutivo e a complexidade do sistema imunológico em humanos necessitam de um sofisticado mecanismo que regule a atividade das células imunológicas. Mecanismos estes que existem em diversos níveis que envolvem muitas vias celulares e bioquímicas (Jäger e Kuchroo, 2010; Gergersen e Behrens, 2006).

A falha do reconhecimento correto de antígenos próprios pelo sistema imune pode levar a ataques diretos e indiretos contra o próprio organismo, processo conhecido como autoimunidade. A resposta autoimune é naturalmente controlada pelo sistema imune em busca da homeostase do organismo, contudo a sua persistência resulta em inflamação e dano tecidual, levando ao quadro patogênico autoimune (Amur, Parekh, Mummaneni, 2012; Lettre e Rioux, 2008; Ni Choileain e Redmond, 2006).

A imunidade adaptativa é a principal responsável no desenvolvimento e manutenção de doenças autoimunes, sendo que as principais células envolvidas são os linfócitos B e T. Além disso, imunidade adaptativa é caracterizada pela produção de anticorpos e pelo reconhecimento celular por receptores específicos, como receptores das células B e T (BCR e TCR, do inglês *B-cell receptor* e *T-cell receptor*) (revisado em Doria *et al.*, 2012).

A expansão e maturação das células B autorreativas pode levar a produção de um elevado número de autoanticorpos que contribuem na inflamação e dano tecidual na resposta autoimune (Jäger e Kuchroo, 2010). O excesso de autoanticorpos pode estar presente por meses ou anos no organismo antes do início dos sintomas e diagnóstico. Embora os autoanticorpos nem sempre participem da patogênese, eles são importantes marcadores na suscetibilidade a doença, a manifestações clínicas específicas e progressão (Revisado por Tobón *et al.*, 2012; Schleinitz *et al.*, 2010; Ni Choileain e Redmond, 2006).

Em doenças autoimunes, o alvo é um tipo celular, órgão ou tecido do organismo que é reconhecido por uma população de células T autorreativas que foram ativadas por células dendríticas (CD) ou outras células que também apresentam autoantígenos. Para evitar tal fato, o sistema imune possui diversos e complexos mecanismos imunorreguladores que envolvem as células T reguladoras (Treg)

(Benson *et al.*, 2010; Schleinitz *et al.*, 2010; Ni Choileain e Redmond, 2006).

Apesar da falta de regulação das Treg, a patogênese autoimune também envolve as células T auxiliares (Th, do inglês *T helper cell*) que produzem citocinas pró-inflamatórias, auxiliam a células B autorreativas e contribuem na ativação, expansão e diferenciação de subgrupos de células T (revisado por Jäger e Kuchroo, 2010). As células Th possuem diferentes propriedades que dependem de estímulos de citocinas, diferenciando, portanto, subgrupos de células efectoras Th1 e Th2, bem como as células Th17 e Th9 (Selmi, 2011; Jäger e Kuchroo, 2010; Hemdan *et al.*, 2010).

A resposta imune adaptativa e o processo inflamatório são ativados por células do sistema imune inato que representa a primeira defesa imune do organismo. As células efectoras do sistema imune inato como *natural killer* (NK), macrófagos, CD e outras células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês *Antigen-presenting cell*) reconhecem moléculas nocivas por receptores de reconhecimento de padrões (Revisado em Doria *et al.*, 2012).

Após a sua ativação, as células efectoras do sistema imune inato enviam sinais intracelulares que induzem a produção de citocinas como interferon-alfa (INF- α), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL)-1. Estas citocinas influenciam também na imunologia adaptativa, pois INF- α , além de estimular a maturação de CD, estimula a apresentação de autoantígenos, recrutamento de células T e B e produção de autoanticorpos (revisado em Doria *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da doença autoimune envolve processos em diversas etapas, sendo influenciados por fatores genéticos, ambientais e eventos estocásticos e é sob estes fatores que o sistema imunológico age (Amur, Parekh, Mummaneni, 2012; Pollard, 2012; Tobón *et al.*, 2012).

Os fatores genéticos estão relacionados com o desenvolvimento de doenças autoimunes, uma vez que os níveis de concordância destas doenças são maiores em gêmeos monozigóticos que em dizigóticos. Por exemplo, em lúpus eritematoso sistêmico o nível de concordância dessa patologia está entre 24 e 57% em gêmeos monozigóticos, enquanto que a concordância em gêmeos dizigóticos está entre apenas 2 e 5% (Amur, Parekh, Mummaneni, 2012). A partir disso diversos genes que foram associados às doenças autoimunes, sobretudo os genes que estão envolvidos em funções imunológicas, como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC – do inglês *Major Histocompatibility Complex*) que está envolvido na apresentação de antígeno. Todavia, o mecanismo preciso da influência dos genes no desenvolvimento de

doenças autoimunes ainda é incerto (Amur, Parekh, Mummaneni, 2012; Tobón *et al.*, 2012; Selmi, 2011; Lettre e Rioux, 2008; Pearce e Merriman, 2006).

Quanto às questões epidemiológicas, a taxa de prevalência das doenças é diferente entre áreas geográficas e etnias. Um exemplo é lúpus eritematoso sistêmico, pois possui maior prevalência em indivíduos hispânico, asiático e afro-descendentes do que indivíduos de outras etnias nos E.U.A. (Pons-Estel *et al.*, 2010). Os dados epidemiológicos também incluem infecções, exposição a agentes químicos e físicos e tratamento medicamentoso (Amur, Parekh, Mummaneni, 2012; Pollard, 2012; Selmi, 2011).

Entre as doenças autoimunes, é comum o acometimento múltiplo de órgãos, sendo que o dano no primeiro órgão-alvo usualmente leva às manifestações clínicas que caracterizam a doença (Amur, Parekh, Mummaneni, 2012; Doria *et al.*, 2012; Schleinitz *et al.*, 2010; Lettre e Rioux, 2008). Portanto, as doenças autoimunes podem ser divididas em duas categorias: tecido-específicas, como a diabetes tipo I (DT1) e esclerose múltipla; e, doença sistêmica, como lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatoide (AR) (Schleinitz *et al.*, 2010; Gregersen e Behrens, 2006).

2.2 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica e de etiologia multifatorial desconhecida. A AR acomete principalmente articulações embora a inflamação apresente caráter sistêmico, atingindo outras regiões do organismo, causando morbidade e elevada mortalidade (Mota *et al.*, 2012; Klareskog, Catrina, Paget, 2009; Firestein, 2003).

A idade média dos pacientes acometidos por AR está entre 30-50 anos de idade, sendo mais frequente em mulheres, na proporção de 2 a 3 mulheres para cada homem acometido pela doença. A prevalência do gênero feminino e o fato de mulheres apresentarem pior prognóstico de AR podem indicar que o fator hormonal seria importante no desenvolvimento da patogênese da doença (Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Carmona *et al.*, 2010; Alamanos, Voulgari, Drosos, 2006; Alamanos e Drosos, 2005; Symmons, 2002).

A etiologia da AR envolve uma complexa combinação de genes, aspectos ambientais (como o tabagismo) e pessoais (epidemiológicos). No entanto, a relação entre os fatores de risco e a sua real contribuição na patogênese da AR, ainda é incerta (Klareskog, Catrina, Paget, 2009; Alamanos e Drosos, 2005). A inclusão de fatores epidemiológicos pode

auxiliar no entendimento da patogênese em diferentes populações, indicando possíveis elementos envolvidos no curso da doença e fornecendo informações pertinentes para ações de prevenção, procedimentos clínicos e futuras pesquisas (Ferraz, 1995; Kelsey *et al.*, 1986).

Entre os fatores ambientais, tabagismo é o mais fortemente associado à AR, conferindo risco na ocorrência, persistência e severidade da AR. O efeito do tabagismo no desenvolvimento da AR está relacionado aos componentes químicos do cigarro. Este efeito também pode ser provocado por outros componentes químicos tais como pó de sílica, óleos minerais, ou exposição a outras partículas suspensas no ar (revisado em McInnes e Schett, 2011; Klareskog *et al.*, 2011; Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Klareskog, Catrina, Paget, 2009). A elevada suscetibilidade do tabagismo no desenvolvimento da AR permanece por anos, mesmo após a interrupção desse hábito (Vittecoq *et al.*, 2008; Costenbader *et al.*, 2006; Stolt *et al.*, 2003).

A diferença na ocorrência e expressão clínica da AR entre diferentes populações tem sido reportada, pois alguns grupos étnicos possuem maior risco de desenvolver AR que outros, devido a distintas interações entre fatores genéticos e ambientais (revisado em Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Alamanos e Drosos, 2005). Por exemplo, a prevalência do epítipo compartilhado (SE – do inglês *shared epitope*), uma região do gene *HLA-DR* comum nos acometidos pela AR, é variável em distintos grupos étnicos e sua presença confere o desenvolvimento de uma doença mais erosiva (Alamanos e Drosos, 2005).

A incidência da AR no Brasil é estimada em 0,50% enquanto que em outros países em desenvolvimento ela é de 0,35 casos a cada 100 pessoas, considerada inferior que nos países da América do norte e norte europeu (0,5–1%). Provavelmente, esta diferença entre as populações deve-se à metodologia empregada nos estudos epidemiológicos, bem como aos critérios de diagnóstico da patologia e acesso ao diagnóstico médico preciso (Tobón, Youinou, Saraux, 2010, Alamanos, Voulgari, Drosos, 2006, Alamanos e Drosos, 2005, Senna, 2004).

Em um estudo comparativo entre pacientes com AR do Brasil e da Espanha realizado por Ide *et al.* (2011), detectou diferenças entre os países tanto em relação aos aspectos clínicos – pacientes brasileiros sentem mais dor e apresentam maior comprometimento da capacidade funcional – quanto epidemiológico (pacientes no Brasil são mais jovens). Além do mais, a qualidade do atendimento e o tratamento da doença na Espanha são mais eficientes, influenciando os resultados

relacionados a aspectos epidemiológicos e clínicos entre as populações (Ide *et al.*, 2011).

Além de a incidência e manifestações clínicas da AR mostrem-se variáveis em distintas regiões geográficas, na América Latina (especialmente no Brasil) estas informações são escassas (Coenen e Gregersen, 2009; Harney e Wordsworth, 2002). Desta forma, elucidar a patogênese da AR em uma população heterogênea como a brasileira pode ajudar a descobrir marcadores específicos que facilitem o diagnóstico e a escolha do tratamento de cada paciente.

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide é caracterizada pelo acometimento das pequenas e grandes articulações bilateralmente, com maior frequência de envolvimento das mãos e pés. Além da destruição articular, o quadro inflamatório extra-articular pode levar a manifestações em outras regiões do organismo como o desenvolvimento de nódulos reumatoides, síndrome de Sjögren, envolvimento pulmonar. Uma vez que o envolvimento cardíaco é a comorbidade responsável pela elevada mortalidade dos pacientes com AR (Mota *et al.*, 2012; Gabriel e Crowson, 2012; Louzada-Júnior *et al.*, 2007).

Considerando que a AR possui uma etiologia complexa, em indivíduos geneticamente suscetíveis alguns fatores ambientais específicos podem potencialmente ativar reações imunológicas patogênicas, como a produção de autoanticorpos e resposta autorreativa (Souza *et al.*, 2010; Klareskog, Catrina, Paget, 2009; Alamanos e Drosos, 2005; Firestein, 2003). O início da AR pode ser indicado pela produção elevada de anticorpos anti-proteína citrulinada (ACPA – do inglês *anti-citrullinated protein antibodies*) e fator reumatoide (FR), os quais estão relacionados a perda da auto-tolerância. Recentemente, dois subgrupos clínicos de AR foram propostos de acordo com a presença ou ausência de ACPA (Klareskog, Catrina, Paget, 2009; McInnes e Schett, 2007).

O FR é um marcador clássico na AR e consiste em anticorpos das classes IgM e IgA como marcadores patogênicos diretos contra a porção Fc de IgG. ACPA são anticorpos que reconhecem as proteínas citrulinadas, cujo processo de citrulinação é um evento fisiológico que ocorre em distintas condições, incluindo a inflamação. Diferente do FR, os ACPA parecem ser mais específicos para o diagnóstico de AR (Bax *et al.*, 2011). A maioria dos pacientes ACPA positivos também é positiva para o FR, e estes diferem dos pacientes soronegativos para

ambos os anticorpos quanto à atividade da doença, severidade e resposta a diversos medicamentos (Ruysse-Witrand *et al.*, 2012; Farragher *et al.*, 2010; van der Helm-van Mil *et al.*, 2005).

O ACPA também é um importante marcador de prognóstico de doença mais agressiva, envolvendo destruição articular progressiva, desenvolvimento de mais manifestações extra-articulares (Ruysse-Witrand *et al.*, 2012; Scott, Wolfe, Huizinga, 2010; van der Linden, *et al.*, 2009; Klareskog, Catrina, Paget, 2009; Silva *et al.*, 2006b). ACPA positivo pode predizer um futuro desenvolvimento de AR em indivíduos assintomáticos e em pacientes com artrite indiferenciada (van Venrooij, Zendman, Pruijn, 2006) e, ainda, ser utilizado em casos de difícil diagnóstico concomitantemente com o FR (Silva *et al.*, 2006b).

Além de autoanticorpos, em pacientes com AR, outros marcadores de condições inflamatórias estão presentes na fase aguda, como em elevado nível proteína C-reativa (CRP), alta velocidade de hemossedimentação (VHS), entre outros. Assim, estes marcadores normalmente auxiliam no monitoramento da atividade da doença e resposta ao tratamento o qual o paciente é submetido (Farrag e Friedrich, 2011; Mota *et al.*, 2010; Deighton *et al.*, 2009). Além disso, estes marcadores inflamatórios possuem correlação direta com a presença dos anticorpos ACPA e FR (Silva 2006a). Esta condição crônica inflamatória aumenta os níveis e expressão de CRP, TNF- α e citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas IL-1, IL-6 e IL-18 que são fatores de risco relevantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) comuns em pacientes com AR (Gabriel e Crowson, 2012; Bartoloni *et al.*, 2011).

A principal causa de mortalidade em pacientes com AR é o acometimento cardiovascular. Uma vez que o risco de DCV em pacientes com AR é 50% maior quando comparado com a população geral, acredita-se que outros fatores de risco a DVC estão presentes na patogênese da AR (Gabriel e Crowson, 2012; Aviña-Zubieta *et al.*, 2008). Por conseguinte, o desenvolvimento acelerado do dano cardiovascular é consequência de fatores de risco tradicionais em combinação com a inflamação e mecanismos relacionados à AR e autoimunidade (Boyer *et al.*, 2011; Bartoloni *et al.*, 2011). A inflamação possui um papel importante na lesão aterosclerótica e os pacientes com AR possuem uma predisposição elevada de desenvolver aterosclerose (Gonzalez-Juanatey *et al.*, 2003). Em doenças mediadas pela resposta imunológica, como a AR, o dano vascular acelerado e precoce da aterosclerose pode ser explicado parcialmente pela resposta autoimune

humoral e celular aos antígenos expressos no endotélio (Gabriel e Crowson, 2012; Pereira e Borba, 2008).

A condição inflamatória da AR pode ser iniciada ou multiplicada quando o indivíduo possui o hábito tabagista que está associado com o desenvolvimento de vasculite reumatoide e manifestação extra-articular, especialmente nódulos e acometimento pulmonar (Carmona *et al.*, 2010; Alamandos e Drosos, 2005).

A influência do tabagismo na AR pode estar relacionada com a presença do FR ou ACPA, uma vez que em pacientes do subgrupo anticorpo-negativo, encontra-se um efeito mínimo do tabagismo na AR (revisado em Klareskog, Catrina e Paget, 2009). Aliás, o tabagismo aumenta a predisposição à AR em populações que possuem alelos do gene *HLA-DRB1*, estes amplamente associados à AR (revisado em McInnes e Schett, 2011; Klareskog *et al.*, 2011; Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Klareskog, Catrina e Paget, 2009).

2.4 ASPECTOS GENÉTICOS DA ARTRITE REUMATOIDE

A AR é uma doença multifatorial clássica com mecanismo de herança complexo, sendo que diversos estudos buscam elucidar o envolvimento de fatores hereditários no desenvolvimento da patologia. Em estudos realizados em famílias com indivíduos acometidos pela AR, observou-se fenótipos heterogêneos dentro da mesma família, indicando que múltiplos fatores genéticos e ambientais deveriam estar envolvidos na patogênese da AR. Enquanto que estudos realizados entre irmãos e gêmeos monozigóticos e dizigóticos indicaram que os fatores genéticos contribuem entre 50% e 60% no desenvolvimento da patologia (Worthington, 2005; MacGregor *et al.*, 2000). Além disso, percebeu-se que a presença do FR era quatro vezes mais frequente em famílias portadoras da patologia que em famílias sem a manifestação da doença. Em estudos com gêmeos, o índice de concordância para soropositivos do FR em AR foi de 30% em gêmeos monozigóticos e apenas 5% em gêmeos dizigóticos (Raychaudhuri, 2010; Worthington, 2005; Symmons, 2002).

A partir destes estudos familiares e com gêmeos, foram iniciadas pesquisas por marcadores genéticos em diversas regiões do genoma, resultando no descobrimento da associação do FR com a região do MHC, no cromossomo 6 (Worthington, 2005).

Os alelos dos genes da região do MHC estão amplamente associados com a autoimunidade e, nesta região, destaca-se o loco *HLA-DR* como principal marcador de predisposição genética da AR. Os genes

dos antígenos leucocitários humanos (HLA – do inglês *Human Leukocyte Antigens*) codificam moléculas essenciais para o funcionamento do sistema imunológico e participam da apresentação do antígeno às células T (Gergersen e Behrens, 2006; Pearce e Merriman, 2006; Firestein, 2003; Feldman *et al.*, 1996).

A forte associação genética entre HLA e AR localiza-se, no peptídeo, na terceira região hipervariável da cadeia DR β 1, nas posições 70-74. A presença da sequência de aminoácidos QKRAA, QRRAA ou RRRRAA nesta região é comum nos pacientes com AR, conhecida como "epítipo compartilhado" (SE) (Bax *et al.*, 2011; Gregersen; Silver; Winchester, 1987).

O efeito da presença do SE na AR é incerto, porém acredita-se que o polimorfismo da molécula HLA-DR altere sua habilidade de ligar-se e apresentar peptídeos específicos, apresentando peptídeos-próprios artritogênicos (induzem artrite), mimetismo molecular de antígenos de patógenos, ou seleção do repertório de células T. Assim, a presença do SE pode influenciar no quadro erosivo e nas manifestações extra-articulares da AR. Os alelos *HLA* associados à suscetibilidade da AR são *HLA-DR4*, *HLA-DR14* e *HLA-DR1* (Ruyssen-Witrand *et al.*, 2012; Mitsunaga *et al.*, 2012; McInnes e Schett, 2011; Firestein, 2003; Feldman *et al.*, 1996).

Diversos estudos de associação genética de AR mostram que há, também, genes não-*HLA*, como *PTPN22*, *STAT4*, *PADI*, *CD40* e no loco *TRAF1-C5* que participam de alguma forma na patogênese da AR (Bax *et al.*, 2011; Coenen e Gregersen, 2009; Barton e Worthington 2009; Klareskog, Catrina e Paget 2009). O *PTPN22* destaca-se por estar amplamente associado ao desenvolvimento da AR e a outras doenças autoimunes (Stahl *et al.*, 2010; Gergensen, 2010; WTCCC, 2007). Acredita-se que a associação dos genes *HLA-DRB1* e *PTPN22* elucidada cerca de 50% da agregação familiar da AR (Vries, 2011; WTCCC, 2007).

A busca de outros marcadores genéticos associados à patogênese de doenças complexas, dentre elas a AR, tem recebida a contribuição de metodologias inovadoras de estudos de associação caso-contrôle, destacando o estudo de associação por varredura do genoma (GWAS – do inglês *Genome Wide Association Studies*) e meta-análises. Na AR, foram confirmados a associação de suscetibilidade de locos previamente conhecidos, tais como alelos do gene *HLA*, genes *PTPN22*, *CTLA-4*, *TNFAIP3* e *CD40*. Outros locos que foram associados com AR já haviam sido validados como alelos de risco em outras doenças autoimunes, relatando, então, a sobreposição genética em doenças

autoimunes como doença de Crohn (DC) e diabetes do tipo I (DT1) (Stahl *et al.*, 2010; Lettre e Rioux, 2008; WTCCC, 2007).

2.5 IMUNOPATOGÊNESE DA ARTRITE REUMATOIDE

AR é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação sinovial e hiperplasia, produção de autoanticorpos (FR e ACPA), destruição da cartilagem e ossos (causando deformidade) e complicações sistêmicas, tais como acometimento cardiovascular, pulmonar e do sistema nervoso central. Embora a patogênese precisa da AR seja indefinida, o mecanismo central da inflamação articular e a progressão da doença é formado pelas células T, B, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos sinoviais. Aliás, acredita-se que tanto a resposta imunológica celular quanto a resposta imunológica humoral podem contribuir para o desenvolvimento de sinovite (McInnes e Schett, 2011; Andersson, Li e Brennan, 2008; Smolen e Steiner, 2003; Firestein, 2003).

O mecanismo de resposta inflamatória que ocorre nas articulações é mal compreendido, no entanto é provável que envolva vias de microvascularização, neurológicas, bioquímicas ou outros eventos tecido-específicos. A sinovite é iniciada e perpetuada por retroalimentação positiva (*feedback* positivo) de citocinas produzidas e interações celulares que, conseqüentemente, promovem desordens sistêmicas que completam a síndrome da AR (revisado em McInnes e Schett, 2011; Klareskog, Catrina e Paget, 2009).

O acúmulo de leucócitos no compartimento sinovial é a principal característica da sinovite, que se deve inicialmente, sobretudo, à infiltração e à proliferação das células no local. A migração celular é possível pelo aumento da expressão de moléculas de adesão (integrinas, selectinas) e quimiocinas no endotélio de microvasos sinoviais, o que é causado pelas condições de hipóxia e citocinas presentes no local (McInnes e Schett, 2011, Firestein, 2003, Feldman *et al.*, 1996).

Devido a estudos genéticos e a produção de autoanticorpos na AR, acredita-se que a imunidade adaptativa esteja relacionada com o início da patogênese. As células T são abundantes no líquido sinovial na AR e a consolidada associação dos alelos *HLA-DR* com AR destaca sua importância no mecanismo de sinovite (Firestein, 2003). Além da infiltração de células T nas articulações na AR, é abundante a presença de células mielóides e dendríticas que expressam citocinas IL-2, IL-18, IL-23, de moléculas de HLA de classe II e de outras moléculas coestimulatórias que são necessárias na ativação das células T e

apresentação de antígeno (revisado em McInnes e Schett, 2011; Andersson, Li, Brennan, 2008; Firestein, 2003).

A AR é uma doença mediada pelas células Th do tipo 1, envolvidas em respostas pró-inflamatórias e de citotoxicidade. No entanto, atualmente, estudos com o tipo Th17 tem demonstrado o seu papel na patogênese da AR, produzindo IL-17, IL-21, IL-23 e TNF- α (Eggleton *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011). A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos em diversas células, destacando o seu sinergismo com TNF- α que ativa fibroblastos e condrócitos. Além disso, o desequilíbrio entre IL-17 e células Treg pode refletir na produção de TNF- α local e bloquear a atividade das Treg, conferindo uma persistente inflamação nas articulações (McInnes e Schett, 2011; Andersson, Li, Brennan, 2008; Kolls e Lindén, 2004; Jovanovic *et al.*, 1998).

A contribuição das células B na AR é altamente relevante, visto que são elas as responsáveis pela produção dos autoanticorpos, que, por consequência, influenciam no reconhecimento de autoantígenos. As células B também podem produzir citocinas e estimular a produção dessas moléculas por outras células do sistema imune. Através da terapia de depleção de células B com o fármaco rituximab (anti-B) evidenciou-se a importância dessas células na manutenção da inflamação da AR, reduzida após tratamento (revisado em McInnes e Schett, 2011; Andersson, Li, Brennan, 2008; Smolen e Steiner, 2003).

As células localizadas na articulação inflamada da AR são responsáveis pela liberação de diversas citocinas no local, tais como IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, IL-17, IL-23, TNF- α e INF- γ . Acredita-se que as citocinas, especialmente IL-17 e TNF- α , ativem células sinoviais residentes, estimulando a produção de enzimas proteolíticas, como a colagenase, que promovem a destruição da cartilagem, dos ligamentos e dos tendões nas articulações (McInnes e Schett, 2011; McInnes e Schett, 2007; Firestein, 2003; Feldmann *et al.*, 1996).

Diversas células do sistema imune inato também são encontradas em excesso na membrana sinovial na AR, tais como macrófagos, neutrófilos, mastócitos e células *natural killer* (NK) (Schleinitz *et al.*, 2010; Perricone *et al.*, 2008; Firestein, 2003; Smolen e Steiner, 2003). Os macrófagos são células efetoras centrais da sinovite, pois produzem citocinas, espécies reativas de oxigênio, enzimas de degradação de matriz e apresentam de antígenos. Os macrófagos também são ativados através de citocinas, interações com células T, imunocomplexos, entre outros eventos. Os neutrófilos contribuem com a sinovite pela produção de prostaglandinas, proteases, enquanto que os mastócitos produzem

citocinas, quimiocinas e apresentam receptor que reconhece Fc γ e Fc ϵ . (revisado em McInnes e Schett, 2011, Klareskog, Catrina, Paget 2009; Firestein, 2003).

Quanto às células NK, uma quantidade significativa foi detectada nas articulações (líquido sinovial) em pacientes com AR (Dalbeth e Callan, 2002; Pridgeon *et al.*, 2003), demais detalhes serão discorridos neste trabalho.

2.6 CÉLULAS NATURAL KILLER

As células NK representam um subgrupo de linfócitos granulares que representam 10–15% dos linfócitos presentes no sangue e 5% das células mononucleares em linfonodos periféricos, estas células possuem capacidade de migrar ao tecido periférico e órgãos-alvo na autoimunidade (Perricone *et al.*, 2008; Jobim e Jobim, 2008; Farag e Caligiuri, 2006).

NK são efetores do sistema imune inato que interagem com outros tipos celulares direta ou indiretamente através da produção de citocinas e quimiocinas, destacando sua ação citolítica. As NK são essenciais no controle de infecções por vírus e parasitas intracelulares (Perricone *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007), vigilância imunológica de tumores (Langers *et al.*, 2012; Purdy e Campbell, 2009; Smyth *et al.*, 2002), na gravidez em humanos (Parham *et al.*, 2012) e, por fim, na patogênese de diversas doenças autoimunes (Vivier, 2011; Schleinitz *et al.*, 2010; Farag e Caligiuri, 2006).

Após o reconhecimento da célula-alvo, as NK podem provocar a lise celular e/ou produzir citocinas e quimiocinas que ativem outras células, eventos que dependem da natureza do estímulo entre a célula NK e alvo. Para promover um ataque direto às células-alvo, as NK não necessitam de uma ativação prévia, o que salienta a participação desta célula tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (revisado por Vivier, 2011; Perricone *et al.*, 2008).

Dentre os mediadores celulares, as NK produzem INF- α e INF- β que favorecem efeitos citotóxicos enquanto que a secreção de INF- γ ocorre em diversas situações, sendo este considerado um mediador de dano tecidual que favorece a ação promotora da condição autoimune. As NK são ativadas por IL-12, estimulando sua produção de citocinas como INF- γ , e IL-10, citocinas presentes em condições inflamatórias crônicas ou sistêmicas (revisado por Vivier, 2011; Schleinitz *et al.*, 2010; Perricone *et al.*, 2008; Jobim e Jobim, 2008).

As células NK interagem com diversos tipos celulares e por diversas vias, inclusive com células dendríticas (CD). As NK promovem a morte de CD imaturas e, também, a sua maturação pela produção de INF- γ e TNF- α , resultando em uma apresentação de antígenos à célula T mais eficiente. Portanto, as NKs participam da resposta imune subsequente, podendo aumentar ou diminuir respostas de macrófagos e células T através da secreção de INF- γ ou IL-10, respectivamente (revisado por Vivier, 2011). A supressão de função através da lise de CD e células T ativadas atribui às células NK funções patogênicas de ativação inapropriada em condições clínicas e experimentais de doenças autoimunes (Perricone *et al.*, 2008).

Alterações celulares nas NK podem contribuir com o aumento da autoimunidade e com a variação no número de células NK circulantes. A frequência dessas células na corrente sanguínea é menor em uma variedade de doenças autoimunes e inflamatórias, tais como Esclerose Sistêmica, Diabetes tipo I e AR (Schleinitz *et al.*, 2010; Perricone *et al.*, 2008). Em pacientes com AR, a presença de NK no líquido sinovial é maior que no sangue periférico. Aliás, em diferentes tecidos há variações quantitativas e qualitativas dessas células e de seus produtos na AR (Ahern e Brennan, 2010; Farag e Caligiuri, 2006; Pridgeon *et al.*, 2003; Dalbeth e Callan, 2002).

O fenótipo das células NK maduras é definido pela expressão de CD56 (CD56⁺) na superfície celular e pela não expressão de CD3 (CD3⁻). O nível de expressão de CD56 na superfície celular das NK define dois subgrupos CD56^{bright} e CD56^{dim}. As células NK do tipo CD56^{bright} – *bright*, indica maior expressão de CD56 – localizam-se predominante em linfonodos e locais de inflamação e a sua função reguladora ocorre através da produção de citocinas, como IL-12 e IL-18, e quimiocinas. Enquanto que as células NK do tipo CD56^{dim} – *dim*, indica baixa expressão de CD56 – circulam na corrente sanguínea. Estas células possuem grande potencial citotóxico, pois produzem perforinas e apresentam receptores de células *killer* semelhantes à imunoglobulina (KIR, do inglês *Killer-cell immunoglobulin-like receptor*) (Schleinitz *et al.*, 2010; Ahern e Brennan, 2010; Flodström-Tullberg *et al.*, 2009; Farag e Caligiuri, 2006).

O reconhecimento das células-alvo pelas NK é realizado pelos seus receptores celulares, que, por sua vez, não sofrem rearranjos genéticos como ocorre com os receptores das células T (TCR). Os receptores destas células NK reconhecem a célula-alvo baseando-se na presença do ligante a seus receptores inibidores e ativadores; os quais possuem grande variabilidade, além de ser expressos simultaneamente

(Orr e Lanier, 2010; Jobim e Jobim, 2008; Perricone *et al.*, 2008; Moretta *et al.*, 1996).

As células NK possuem um amplo repertório de receptores que podem tanto estimular a atividade das células NK, por receptores ativadores, quanto impedir a ativação destas células pelos receptores inibidores (Bryceson *et al.*, 2006; Vivier *et al.*, 2004). Os receptores ativadores incluem os receptores que interagem com ligantes solúveis como as citocinas e quimiocinas, e receptores inibidores interagem com moléculas de superfície celular (Figura 1). A ativação das células NK depende do balanço de sinais entre os diversos receptores localizados em sua superfície (Vivier *et al.*, 2011; Vivier *et al.*, 2004; Lanier, 1998).

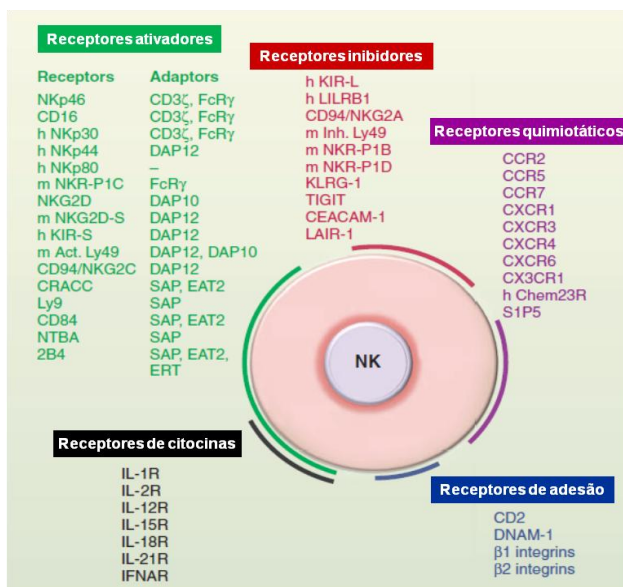


Figura 1: Receptores das células *natural killer* (NK). As células NK expressam diversos receptores de superfície que podem ser agrupados em receptores ativadores (verde), inibidores (vermelho), de adesão (azul), de citocinas (preto) e quimiotáticos (roxo). Estas moléculas de superfície celular estão envolvidas na regulação da função da célula NK em camundongos (m, *mouse*) e humanos (h, *human*). Os receptores sem a indicação (m, h) são conservados em ambas as espécies. Adaptado de Vivier *et al.*, 2011.

Para alguns receptores das NK, as células-alvo são reconhecidas pela presença de MHC de classe I, especialmente as moléculas HLA ou proteínas de estruturas homólogas. A característica de reconhecimento de HLA pelos receptores inibidores da NK é baseada na hipótese da falta do próprio (do inglês *missing-self*). Então, o receptor inibidor não interage com o seu ligante HLA, pois este está ausente na célula-alvo, impedindo o envio deste sinal. A falta do sinal inibidor permite a ativação das células NK pelo predomínio de sinalizações dos receptores ativadores (Jobim e Jobim, 2008; Raulet, 2006; Parham, 2006; Vilches e Parham, 2002).

A resposta das células NK é um resultado do equilíbrio de sinais entre os receptores ativadores e inibidores expressos na superfície celular (Figura 2). Quando o sinal de interação entre o receptor ativador/ligante é superado pelo sinal de interação entre o receptor inibidor e moléculas de HLA de classe I da superfície da célula-alvo, a lise celular é inibida (Figura 2A). No entanto, a ativação das células NK, que promove a lise celular, ocorre quando o receptor ativador reconhece o seu ligante na célula-alvo na ausência da interação receptor inibidor/ligante (Figura 2B). A ativação da NK e lise celular pode ser resultado, também, da interação receptor ativador/ligante predomina sobre a interação receptor inibidor/ligante, pois há poucos receptores inibidores ou ligantes na célula-alvo (Figura 2C). Contudo, a predominância da interação receptor inibidor/ligante, resulta em um sinal negativo que impede a lise celular pela NK. Além do mais, cabe salientar que os genes MHC de classe I possuem alta variabilidade alélica, o que é muito importante para a interação entre receptor/ligante (Vivier, 2011; Raulet, 2006; Farag e Caligiuri, 2006; Farag *et al.*, 2002).

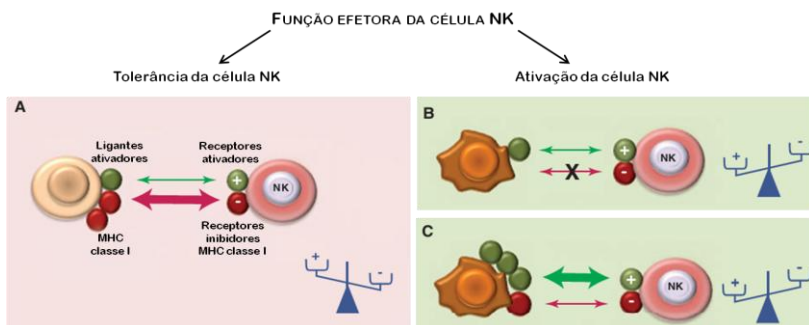


Figura 2: A regulação da função efetora da célula natural killer (NK). As células NK percebem a densidade das diversas moléculas de superfície expressas nas células de interação (células-alvo). A interação destes distintos sinais estabelecem a qualidade e intensidade da resposta das células NK. NK interagem com células que expressam moléculas próprias de MHC de classe I e com baixa expressão de ligantes ativadores, impedindo a ativação das NK (A). Quando as NK reconhecem células-alvo que possuem uma baixa expressão de moléculas de MHC de classe I (B) ou alta expressão de moléculas próprias induzidas por estresse celular (C), ativando a célula. + receptores ativadores; – receptores inibidores (adaptado de Vivier, 2011).

As células NK podem ser ativadas e tornar-se citotóxicas pela expressão exagerada de ligantes ou de moléculas estranhas pela célula-alvo, que interagem com os receptores ativadores. A condição de maior ativação pode ser interessante no combate a infecções, porém pode contribuir para a predisposição à autoimunidade (Vivier, 2011; Orr e Lanier, 2010; Perricone *et al.*, 2008; Jobim e Jobim, 2008).

Curiosamente, têm se observado que algumas células NK não expressam receptores KIR inibidores, demonstrando que a sua ausência não ativa isoladamente as células NK. A ativação de NK requer uma interação específica entre os diversos receptores e seus ligantes, porém alguns dos ligantes de NK também são expressos em células como células T e B, e células da medula óssea (Vivier, 2011; Orr e Lanier, 2010; Raulat, 2006; Backström, Kristensson, Ljunggren, 2004; Snyder, Weyand, Goronzy, 2004).

A citotoxicidade das NK é ativada pelos receptores naturais de citotoxicidade (NCR – do inglês *Natural Cytotoxicity Receptor*) e pelo receptor ativador NKG2D. Cabe salientar que alguns ligantes dos

receptores ativadores são expressos em condições inflamatórias e autoimunes (Orr e Lanier, 2010; Schneinitz *et al.*, 2010).

Um dos receptores das células NK mais estudado e polimórfico é o receptor das células *killer* semelhante à imunoglobulina (KIR – do inglês *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*) que se liga às moléculas de MHC classe I, particularmente HLA-A e HLA-C. Outro receptor inibidor é CD94/NKG2A que interage com moléculas MHC de classe I não-clássicas, como a molécula HLA-E. A maioria dos estudos genéticos com *KIR* se baseia na hipótese “*missing self*” e tem-se investigado os genótipos de *KIR* juntamente com os alelos do gene *HLA* de classe I (Vivier, 2011; Orr e Lanier, 2010; Schneinitz *et al.*, 2010; Jobim e Jobim, 2008; Perricone *et al.*, 2008; Raulet, 2006; Parham, 2006; Moretta *et al.*, 1996).

2.7 RECEPTORES KIR

A nomenclatura dos receptores KIRs das células NKs está baseada na sua estrutura proteica extracelular e intracelular (Figura 3). Essas moléculas apresentam uma homologia estrutural com as imunoglobulinas, apresentando dois ou três domínios extracelulares (2D e 3D) que interagem com as moléculas HLA-A, B e C. Também possuem uma porção transmembranar (TM) e uma cauda intracitoplasmática (CIT) que pode ser curta e ativadora (S, *short*) ou longa e inibidora (L, *long*) (Jobim e Jobim, 2008; Carrington e Norman, 2003; Biassoni *et al.*, 1996; Moretta *et al.*, 1995).

As moléculas com cadeia citoplasmática longa apresentam domínios com características imunoinibidoras, denominados motivos inibidores baseados em tirosina (ITIM, do inglês *immunotyrosine-based inhibitory motif*). Em contraste, os receptores com cadeia citoplasmática curta (S) não possuem ITIM, mas sim um aminoácido positivamente carregado na porção TM que permite associação com uma molécula acessória (como DAP-12), liberando um sinal ativador por intermédio de imunorreceptores ativadores denominados motivos ativadores baseados em tirosina (ITAM, do inglês *immunotyrosine-based activatory motif*) (Jobim e Jobim, 2008; Brown e Scalzo, 2008; Carrington e Norman, 2003; Biassoni *et al.*, 1996; Moretta *et al.*, 1995). Desta forma, o receptor KIR2DL4 possui tanto ITIM como ITAM associados à cauda intracitoplasmática longa (Kikuchi-Maki *et al.*, 2003).

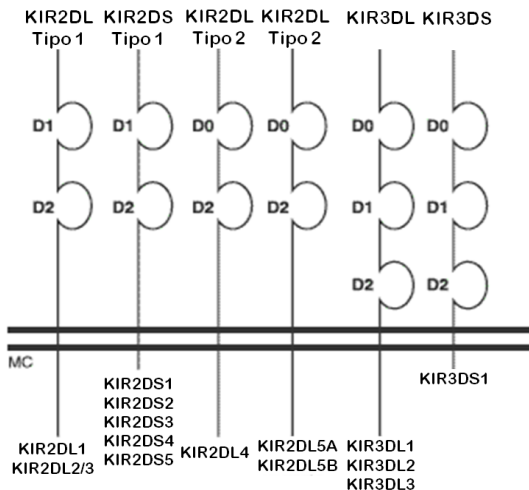


Figura 3: Estrutura e nomenclatura de moléculas KIR. Os domínios extracelulares estão representados acima da membrana celular (MC) e as caudas citoplasmáticas, abaixo da MC. Caudas longas (L) e curtas (S) e o número de domínios extracelulares definem o nome do gene. Domínio extracelular tipo 1 apresenta os domínios D1 e D2 e o tipo 2 apresenta os domínios D0 e D2 (adaptado de Jobim e Jobim, 2008).

2.7.1 Imunogenética dos KIRs

Os receptores KIR são codificados por uma família de genes polimórficos e homólogos localizada na região cromossômica 19q13.4, dentro do complexo de receptores leucocitários (LRC, do inglês *Leucocyte Receptor Complex*), e é composta por 14 genes e 2 pseudogenes (Carrington e Norman, 2003). Os haplótipos dos genes *KIR* foram divididos em dois grupos A e B, considerados também como haplogrupos (Figura 4), os quais diferem no número e na variedade de genes presentes no haplótipo observado. No entanto, quatro genes (*KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL4* e *KIR3DL2*) conhecidos como genes moldura (em inglês *framework*), estão presentes em ambos os grupos (Hsu *et al.*, 2002). O haplogrupo A é o grupo formado por haplótipos que contêm genes que codificam os receptores inibidores *KIR2DL1*, *KIR2DL3* e *KIR3DL1* e um único receptor ativador de cauda curta, *KIR2DS4*. O haplogrupo B é formado por haplótipos que possuem maior quantidade de receptores ativadores que o haplogrupo A (Singh *et al.*, 2012; Kulkarni, Martin, Carrington, 2008; Carrington e Norman, 2003).

Haplogrupo A não possui grandes variações na composição gênica quando comparado com o haplogrupo B, entretanto ambos possuem grande variabilidade alélica. Além disso, acredita-se que os receptores inibidores são relativamente mais polimórficos, enquanto os receptores ativadores são mais conservados (Sanchez-Mazaz *et al.*, 2011; Pyo *et al.*, 2010).



Figura 4: Exemplo de haplótipos que pertencem aos haplogrupos A e B de *KIR*. Haplogrupo A apresenta apenas um gene que codifica um receptor ativador de cauda curta (*KIR2DS4*). Haplogrupo B contém combinações de genes ativadores e inibidores. Os genes *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e o pseudogene *KIR3DP1* estão presentes em ambos os haplogrupos (adaptado de Carrington e Norman 2003).

Até o momento foram catalogados 614 alelos para os 16 genes *KIR*, dentre eles 107 alelos do gene *KIR3DL3*, 84 alelos do gene *KIR3DL2*, 73 alelos do gene *KIR3DL1*, 46 alelos do gene *KIR2DL4* (Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>. Acesso em 19 de novembro de 2012, 00h03).

A diversidade alélica dos genes *KIR* pode estar relacionada com os níveis de expressão dos receptores na superfície celular e a sua interação com os ligantes HLA de classe I. Portanto, as células NK podem modular seu limiar de ativação, permitindo que a detecção de níveis baixos da interação receptor/ligante ativem estas células (Campbell e Purdy, 2010; Uhrberg, 2005). A interação HLA-C-KIR é sensível a uma substituição de aminoácidos, em especial na posição 80 na alfa-hélice do HLA-C e na posição 44 do domínio D1 em *KIR2DL1*, *KIR2DL2* e *KIR2DL3*. O polimorfismo nestas regiões altera a especificidade ligante-receptor, porém permite interações inespecíficas com intensidades distintas, sendo que a interação preferencial é mais forte em relação às outras interações possíveis (Kulkarni, Martin, Carrington, 2008; Parham, 2005).

A diversidade dos genes *KIR* é tão ampla que mesmo os haplótipos que possuem igual conteúdo gênico, podem se diferenciar em termos de alelos. Desta forma, a diversidade genotípica dos *KIRs* depende da constituição gênica do haplótipo, do polimorfismo alélico e a combinação dos haplótipos maternos e paternos (Parham, 2005).

O elevado polimorfismo de genes que codificam moléculas envolvidas na resposta imune deve ter apresentado uma grande vantagem no combate a diversos agentes infecciosos, levando a crer que a evolução molecular destes polimorfismos deve ter sido influenciada pela seleção natural. A distribuição das frequências genotípicas dos *KIR* é distinta entre as populações, este padrão de variação genética mundial mostra sinais de expansão humana geográfica, história demográfica e diversificação cultural (Sanchez-Mazas *et al.*, 2011; Parham, 2005). Portanto, a heterogeneidade da distribuição das frequências genotípicas de *KIR* entre as populações deve ser considerada ao realizar estudos em populações miscigenadas, pois pode comprometer a precisão das inferências realizadas em estudos de associação (Singh *et al.*, 2012; Parham, 2005).

A partir da importância imunológica e diversidade genética, estudos de associação com *KIR* vêm sendo realizados, a fim de entender sua participação no desenvolvimento de doenças como autoimunes, câncer e infecções (Kulkarni, Martin, Carrington, 2008; Parham, 2005). Dados da literatura indicam que em doenças autoimunes e inflamatórias há associação de suscetibilidade dos genes *KIR* ativadores e dos haplótipos do haplogrupo B (Schleinitz *et al.*, 2010; Vivier *et al.*, 2008; Kulkarni, Martin, Carrington, 2008; Parham, 2005).

Enquanto que em pacientes com AR, estudos encontraram que a presença do gene *KIR2DL1* e *KIR2DS1* foi menor que no grupo controle (Kogure *et al.*, 2001). Aliás, foi detectada a presença de anticorpos para o receptor *KIR2DL1-3* em pacientes com AR (Matsui *et al.*, 2001). Esses dados levantam a hipótese de que pode haver expressão anormal ou alterada dos genes *KIR* envolvida no progresso dessa patologia (Carrington e Martin 2006).

3 JUSTIFICATIVA

A artrite reumatoide, por ser uma doença de etiologia complexa e incerta, apresenta dificuldade de diagnóstico e prognóstico. Embora existam marcadores que auxiliam o diagnóstico e que permitem o acompanhamento da evolução da doença, a AR apresenta heterogeneidade de fatores clínicos e epidemiológicos entre os pacientes.

As células NK são importantes na regulação do sistema imune inato e adaptativo através da ativação de células efectoras como linfócitos T, B e macrófagos que desencadeiam cascatas de reações inflamatórias, fundamental condição da AR.

As moléculas KIR podem tanto ativar quanto inibir a resposta imune dessas células, o que poderia explicar a possível relação entre a presença ou ausência de certos genes *KIR* no desenvolvimento da AR. Uma vez que, pacientes acometidos por doenças autoimunes têm menor número de células NK circulantes e possuem sua função reduzida (Carrington e Martin, 2006). Desta forma, é importante averiguar o potencial efeito dos genes *KIR* na AR.

Nesta dissertação serão considerados os estudos de associação dos genes *KIR* ativadores, por sua relevância imunopatológica em doenças autoimunes, pois a presença destes genes pode conferir risco ao desenvolvimento de AR ou condições clínicas desenvolvidas pela doença.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da presença e/ou ausência dos genes *KIR* ativadores no desenvolvimento da Artrite Reumatoide, bem como verificar a relevância deste polimorfismo nas questões epidemiológicas e clínicas em casos e controles, no Estado de Santa Catarina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar a presença e ausência dos 16 genes *KIR* nas amostras de pacientes e controle.
- ✓ Estimar as frequências de presença/ausência de cada gene analisado.
- ✓ Realizar um estudo de associação caso-controle para avaliar os polimorfismos dos genes *KIR* ativadores na suscetibilidade à AR, bem como analisar estes polimorfismos com dados clínicos e epidemiológicos.
- ✓ Comparar as frequências gênicas observadas neste estudo com outras doenças autoimunes encontradas na literatura.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho faz parte de um projeto em vigência: “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), nº 172/06, de 26/06/2006 e renovado até março de 2013.

5.2 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 311 indivíduos, sendo 147 pacientes com diagnóstico de Artrite Reumatoide de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia de 1987 (ACR, do inglês *American College of Rheumatology*). Os pacientes foram atendidos no ambulatório de Reumatologia no Hospital Universitário (HU) vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de março de 2007 a junho de 2012. Os outros 164 indivíduos foram voluntários sem histórico pessoal nem familiar de doença autoimune que compuseram o grupo controle. Os indivíduos do grupo controle foram selecionados de acordo com a composição do grupo de pacientes com AR quanto à idade, gênero e a classificação étnica, esta última realizada pela equipe de pesquisa através de informações sobre cor da pele e ascendência dos pais.

Todos os participantes desta pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexos A e C) e responderam um questionário sobre dados familiares e epidemiológicos (Anexo B e D). Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir dos prontuários médicos, cujas informações clínicas datavam do dia da coleta e consulta.

5.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Amostras de 10 mL de sangue periférico foram coletadas com anticoagulante EDTA para a extração do material genético e análise dos polimorfismos no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) – UFSC.

As amostras biológicas foram centrifugadas, separando-se os constituintes do sangue e a partir da camada de leucócitos (*buffy coat*)

foi obtido o DNA genômico. A extração de DNA foi realizada pelo método *salting-out* adaptado de Miller *et al.* (1988). Posteriormente o DNA foi quantificado (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 2001) e diluído em alíquotas de uso na concentração de 20µg/mL, armazenadas a -20°C.

5.4 DETECÇÃO DO POLIMORFISMO *KIR*

O polimorfismo de presença/ausência de 16 genes *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DP1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DP1*, *KIR3DS1*) foi verificado através da reação em cadeia da polimerase por oligonucleotídeos iniciadores de sequências específicas (PCR-SSP). De acordo com a variabilidade genética destes genes, a genotipagem dos genes *KIR* foi realizada por PCR de dois pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene (Tabela 1) (Kulkarni, Martin, Carrington, 2010). Contudo, somente os 6 genes *KIR* ativadores (*KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1*) foram genotipados para todos os indivíduos e realizado estudo de associação.

É importante destacar que o par de oligonucleotídeos iniciadores 26 que amplifica o gene *KIR2DS4* (Tabela 1) também permite a detecção de uma deleção de 22 pares de bases (pb) deste gene, a qual codifica uma proteína não-funcional. Entretanto, a distinção dos fragmentos de 219 pb e 197 pb gerados por esta PCR não foi possível pela técnica de eletroforese em gel de agarose realizada neste estudo.

Uma vez que os tamanhos dos fragmentos a serem amplificados eram diferentes, foi possível realizar PCR multiplex (Figura 5), na qual mais de um gene foi amplificado em cada reação, sendo que a composição do “mix” dependia dos conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores pré-definidos (Tabela 2). Em caso de divergência dos resultados de genotipagem entre os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção do mesmo gene, foram realizadas amplificações isoladas de cada gene com os oligonucleotídeos iniciadores correspondentes em uma mesma placa de PCR.

Como o polimorfismo observado era a presença ou ausência destes genes, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores como controles internos da reação, sendo esses controles genes *KIR* comuns a todos os indivíduos, genes moldura, ou outros genes como *HLA-DRB1* (Kulkarni, Martin, Carrington, 2010), *NDN* e *GALC* (Alves *et al.*, 2008) (Tabela 1).

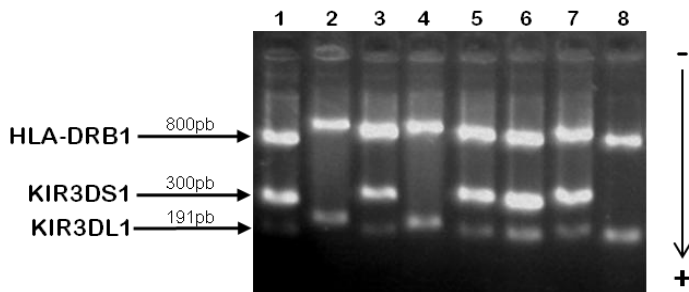


Figura 5: Foto de uma eletroforese de gel de agarose 3% da PCR-SSP multiplex. Esta reação foi composta pelo “Mix 03” (Tabela 2) que permite a detecção de presença/ausência dos genes *KIR3DL1* (191pb), *KIR3DS1* (300pb) e como controle interno a amplificação do gene *HLA-DRB1* (800pb), indicados pelas setas. As amostras 1, 3, 5, 6 e 7 foram tipadas como positivas para os três genes (3DL1+/3DS1+/DRB1+), enquanto que as amostras 2, 4 e 8 foram tipadas como 3DL1+/3DS1-/DRB1+.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo, bem como os protocolos de amplificação e leitura dos resultados, foram gentilmente cedidos pela pesquisadora Dr^a Maria Luiza Petzl-Erler da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo foram publicados em Kulkarni *et al.* (2010) e alguns oligonucleotídeos iniciadores dos genes *KIR* foram adaptados pelo grupo da pesquisadora Dr^a Maria Luiza Petzl-Erler (dado não publicado) (Tabela 1).

A técnica de PCR-SSP foi realizada de acordo com Kulkarni *et al.* (2010) e descrita nas Tabelas 3 e 4.

Após a amplificação por PCR, em uma pequena porção dos produtos foi adicionado o corante fluorescente GelRedTM e esses foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%. O gel foi registrado pelo fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro[®] e a tipagem realizada pela análise do tamanho dos fragmentos citados na Tabela 1 (Kulkarni, Martin, Carrington, 2010).

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes *KIR* e dos genes controles utilizados na detecção do polimorfismo de presença/ausência dos genes por PCR-SSP. A sequência dos iniciadores R (*reverse*), F (*forward*), tamanho do fragmento amplificado (pb – pares de bases), número do iniciador (n°) e referência bibliográfica (Ref) foram indicados.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência(5'→3')	Tamanho (bp)	n°	Ref
KIR2DL1 F1 KIR2DL1 R1	CCATCAGTCGCATGACG TCACTGGGAGCTGACAC	94	17B	b
KIR2DL1 F2 KIR2DL1 R2	TGGACCAAGAGTCTGCAGGA TGTTGTCTCCCTAGAAGACG	146	16	b
KIR2DL2 F1 KIR2DL2 R1	GAGGGGGAGGCCCATGAAT TCGAGTTTGACCACTCGTAT	151	07	a
KIR2DL2 F2 KIR2DL2 R2	CTGGCCACCCAGGT GGACCGATGGAGAAGTTGGCT	173	06	b
KIR2DL3 F1 KIR2DL3 R1	CTTCATCGCTGGTGCTG AGGCTCTTGGTCCATTACAA	~550	08	a
KIR2DL3 F2 KIR2DL3 R2	TCCTTCATCGCTGGTGCTG GGCAGGAGACAACCTTTGGATCA	~800	09	a
KIR2DL4 F1 KIR2DL4 R1	CAGGACAAGCCCTTCTGC CTGGGTGCCGACCACT	254	18	a
KIR2DL4 F2 KIR2DL4 R2	ACCTTCGCTTACAGCCCG CCTCACCTGTGACAGAAACAG	288	19	a
KIR2DL5 F1 KIR2DL5 R1	GCGCTGTGGTGCCTCG GACCACTCAATGGGGGAGC	214	10	a
KIR2DL5 F2 KIR2DL5 R2	TGCAGCTCCAGGAGCTCA GGGTCTGACCACTCATAGGGT	191	11	a
KIR3DL1 F1 KIR3DL1 R1	CGCTGTGGTGCCTCGA GGTGTGAACCCCGACATG	191	20	a
KIR3DL1 F2 KIR3DL1 R2	CCCTGGTGAATCAGGAGAGAG TGTAGGTCCCTGCAAGGGCAA	186	21	a
KIR3DL2 F1 KIR3DL2 R1	CAAACCCTTCTGTCTGCCC GTGCCGACCACCCAGTGA	242	27	a
KIR3DL2 F2 KIR3DL2 R2	CCCATGAACGTAGGCTCCG CACACGCAGGGCAGGG	130	28	a
KIR3DL3 F1 KIR3DL3 R1	GTCAGGACAAGCCCTTCCTC GAGTGTGGGTGTGAACTGCA	232	1B	a
KIR3DL3 F2 KIR3DL3 R2	TTCTGCACAGAGGGGATCA GAGCCGACAACCTCATAGGGTA	165	1C	a
KIR2DP1 F1 KIR2DP1 R1	GTCTGCCTGGCCAGCT GTGTGAACCCCGACATCTGTAC	205	14	a

KIR2DP1 F2	CCATCGGTCCCATGATGG	89	15	a
KIR2DP1 R2	CACTGGGAGCTGACAACTGATG			
KIR2DS1 F1	CTTCTCCATCAGTCGCATGAA	102	24	a
KIR2DS1 F2	CTTCTCCATCAGTCGCATGAG			
KIR2DS1 R1	AGAGGGTCACTGGGAGCTGAC			
KIR2DS2 F1	TTCTGCACAGAGAGGGGAAGTA	175	3/3B	a
KIR2DS2 R1	GGTCACTGGGAGCTGACAA			
KIR2DS2 F2	CGGGCCCCACGGTTT	240	04	a
KIR2DS2 R2	GGTCACTCGAGTTTGACCACTCA			
KIR2DS3 F1	TGGCCACCCAGGTCG	242	12	a
KIR2DS3 R1	TGAAAACCTGATAGGGGGAGTGAGG			
KIR2DS3 F2	CTATGACATGTACCATCTATCCAC	190	13	a
KIR2DS3 R2	AAGCAGTGGGTCACCTGAC			
KIR2DS4 F1	CTGGCCCTCCCAGGTCA	204	25	a
KIR2DS4 R1	TCTGTAGGTTCCCTGAAAGGACAG			
KIR2DS4 F2	G TTCAGGCAGGAGAGAAT	197/219	26	a
KIR2DS4 R2	GTTTGACCACTCGTAGGGGAC			
KIR2DS5 F1	TGATGGGGTCTCCAAGGG	126	5A	a
KIR2DS5 R1	TCCAGAGGGTCACTGGGC			
KIR2DS5 F2	ACAGAGAGGGGACGTTTAACC	178	5C	a
KIR2DS5 R2	ATGTCCAGAGGGTCACTGGG			
KIR3DP1 F	AGAGTATTCCGAAACACCG	104	30	b
KIR3DP1 R	TGACCACCCAGTGAGGA			
KIR3DS1 F1	AGCCTGCAGGGAACAGAAG	300	22	a
KIR3DS1 R1	GCCTGACTGTGGTGCTCG			
KIR3DS1 F2	CCTGGTGAAATCAGGAGAGAG	180	23	a
KIR3DS1 R2	GTCCCTGCAAGGGCAC 4			
DRB1 F1	TGCCAAGTGGAGCACCCAA	796	CI	a
DRB1 R1	GCATCTTGCTCTGTGCAGAT			
NDN F	GGCTGCACCTGAGGCTAA	335		c
NDN R	GCCCCAAAAGAAGTCTGATTC			
GALC F	TTACCCAGAGCCCTATCGTTCT	352		c
GALC R	GTCTGCCCATCACCACCTATT			

a: seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores publicados em Kulkarni *et al.*, 2010.

b: seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados pelo laboratório da pesquisadora Maria Luiza Petzl-Erlar (dado não publicado).

c: seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores controles publicados em Alves *et al.*, 2008.

Tabela 2: O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada mix na técnica de PCR-SSP multiplex dos genes *KIR*. Os iniciadores foram numerados cujos respectivos genes indicados entre parênteses, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados são correspondentes aos respectivos genes.

MIX	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanhos dos fragmentos
Mix01	06(2DL2), 10(2DL5), 09(2DL3)	173, 214, 800pb
Mix02	13 (2DS3), 15(2DP1)	190, 89pb
Mix03	20(3DL1), 22(3DS1), CI(DRB1)	191, 300, 800pb
Mix04	24(2DS1), 07(2DL2), 11(2DL5),	102, 151, 191pb
Mix05	16(2DL1), 18(2DL4)	146, 254pb
Mix06	08(2DL3), 12(2DS3), 23(3DS1)	550, 242, 180pb
Mix07	25(2DS4), 21(3DL1), 17B(2DL1)	204, 186, 94pb
Mix08	26(2DS4), 5A(2DS5)	197/219, 126pb
Mix09	01B(3DL3), 5C(2DS5), 28(3DL2)	232, 178, 130pb
Mix10	14(2DP1), 3/3B(2DS2), 24(2DS1)	205, 175, 102pb
Mix11	04(2DS2), 30(3DP1)	240, 104pb
Mix12	19(2DL4), 27(3DL2), 01C(3DL3)	288, 242, 165pb

Tabela 3: O protocolo dos reagentes utilizados em cada mix para a reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR-SSP) na amplificação dos genes *KIR*.

Mix p/ 1 amostra	1/3	2/5/8/11*	4/10	6/7/9/12
H ₂ O miliQ	6,02 uL	6,42 uL	5,67 uL	5,92 uL
Tampão 10X	1,00 uL	1,00 uL	1,00 uL	1,00 uL
MgCl ₂ (50mM)	0,30 uL	0,30 uL	0,30 uL	0,30 uL
dNTP (0,2mM)	0,20 uL	0,20 uL	0,20 uL	0,20 uL
P1 (20mM)	0,25 uL	0,25 uL	0,25 uL	0,25 uL
P1 (20mM)	0,25 uL	0,25 uL	0,25 uL	0,25 uL
P2 (20mM)	0,25 uL	0,25* uL	0,25 uL	0,25 uL
P2 (20mM)	0,25 uL	0,25* uL	0,25 uL	0,25 uL
P3 (20mM)	0,20 uL	-	0,25 uL	0,25 uL
P3 (20mM)	0,20 uL	-	0,25 uL	0,25 uL
P3 (20mM)	-	-	0,25 uL	-
Taq Platinum® 5U/uL	0,08 uL	0,08 uL	0,08 uL	0,08 uL
Volume Total	9,0 uL	9,0 uL	9,0 uL	9,0 uL
DNA (20ng/uL)	1,0 uL	1,0 uL	1,0 uL	1,0 uL

* No mix 11: para o oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) 30 (P2) foi acrescentado 0,30uL de cada iniciador (R e F) ao invés de 0,25uL.

Tabela 4: Programa para amplificação dos genes *KIR* (Kulkarni, Martin, Carrington, 2010).

Duração	Temperatura	Fases
3 minutos	94°C	Desnaturação inicial
15 segundos	94°C	5 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão
15 segundos	65°C	
30 segundos	72°C	
15 segundos	94°C	21 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão
15 segundos	60°C	
30 segundos	72°C	
15 segundos	94°C	5 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão
1 minuto	55°C	
2 minutos	72°C	
7 minutos	72°C	Extensão final

5.5 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

O fator epidemiológico considerado neste estudo foi o hábito tabagista, considerando o indivíduo como: (a) **tabagista**, se consome 10 ou mais cigarros por dia no momento da entrevista ou se parou de fumar há menos de 30 anos (período ainda exposto ao risco), (b) **ex-tabagista**, se interrompeu o hábito tabagista há mais de 30 anos antes do período da entrevista, e (c) **não-tabagista**, se o indivíduo nunca possuiu o hábito ou fumava menos de 10 cigarros por dia.

O hábito tabagista foi considerado pelo consumo de 10 cigarros por dia, valor baseado em dados da literatura (Vittecoq *et al.*, 2008; Costenbader *et al.*, 2006; Stold *et al.*, 2003). Além disso, o tabagismo contribui com o desenvolvimento da AR mesmo após 20 anos de interrupção do hábito (Vittecoq *et al.*, 2008; Costenbader *et al.*, 2006; Stold *et al.*, 2003), portanto, neste estudo foi extrapolado para 30 anos o período de interrupção desse hábito (ex-tabagista) em busca de garantir a ausência deste fator de risco.

Os dados laboratoriais de pacientes com AR foram considerados: FR positivo (valores superiores a 20IU/mL), VHS superior a 19mm/h, elevados níveis de CRP (acima de 5mg/L) e valor de DAS 28 maior ou igual a 3,2. Além disso, verificou-se a presença de FR sua relação com hábito tabagista.

Os fatores clínicos verificados em pacientes foram divididos em manifestação articular (MA), presença de sinovite e doença erosiva, e

manifestação extra-articular (MEA), incluindo a presença de fatores relacionados à comorbidade em AR. Os sintomas caracterizados como MEA foram: hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia, osteoporose, depressão, diabetes, hipotireoidismo, síndrome metabólica, síndrome de Sjögren, fibromialgia, anemia, LES, nódulos reumatóides, acometimento cardíaco e pulmonar.

Além do estudo de associação caso-controle, a presença dos genes *KIR* ativadores foram relacionados com a presença de manifestações clínicas em pacientes com AR, tais como a presença de FR, MA e MEA.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.6.1 Teste de homogeneidade

O parâmetro de idade (subdividida em classes de 10 anos), gênero e etnia foram submetidos a testes de homogeneidade, através do χ^2 e $p=0,05$ foi considerado o limite de significância. Este teste foi realizado para conferir se as amostras de pacientes e controle eram semelhantes entre si nesses aspectos epidemiológicos.

5.6.2 Estimativa de frequências genótípicas

As frequências de presença de cada gene foram calculadas por contagem direta. Através do procedimento de genotipagem dos genes *KIR*, não foi possível diferenciar os indivíduos heterozigotos dos homozigotos, pois apresentam o mesmo padrão de bandas. Desta forma, para verificar as frequências genótípicas, considera-se que a ausência do gene *KIR* é recessiva. As frequências gênicas (F) foram estimadas através da fórmula de Bernstein, sendo f a frequência observada da presença do gene na população. Esta fórmula considera as amostras distribuídas de acordo com equilíbrio de Hardy-Weinberg (Single *et al.*, 2008).

Fórmula de Bernstein:

$$F = 1 - \sqrt{(1 - f)}$$

F : frequência gênica estimada

f : frequência da presença do gene encontrada na população

5.6.3 Estudo de associação

A associação de determinados genótipos e dados clínicos e epidemiológicos com a susceptibilidade à AR foi verificada através de tabelas de contingência 2x2 de acordo com o índice de *odds ratio* (OR). Testes de associação foram realizados através de cálculos de OR, segundo a fórmula:

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

A condição “a” representa os indivíduos de pacientes com a condição de risco e “d” indivíduos controle com ausência da condição de risco analisado, enquanto que “b” quantidade de pacientes com ausência do risco e “c” controle com presença do risco em questão (Woolf, 1955).

Desta forma, quando o valor de OR for maior que 1,0 significa que a característica avaliada pode estar associada à patogênese, enquanto que OR menor que 1,0 indica que a característica analisada protege ao desenvolvimento da doença, uma vez que esta condição é mais frequente no grupo controle. Logo, valores de OR iguais ou próximos a 1,0 significam que o fator avaliado não deve estar associado à doença em questão. Os valores de OR foram considerados ao adotar intervalo de confiança (IC) de 95% e considerando $p < 0,05$ como valor de significância.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras apresentaram prevalência de mulheres com idade média de 53(\pm 12) anos e com ascendência europeia (Tabela 5). As distribuições dos dados epidemiológicos, como gênero, idade, etnia e hábito tabagista, foram semelhantes entre pacientes com AR e controle ($p>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Distribuição de dados epidemiológicos, tais como gênero, idade, ascendência étnica e tabagismo em pacientes com artrite reumatoide (AR) e controle e o valor do χ^2 do teste de homogeneidade verificado entre as duas amostras.

	AR % (n=147)	Controle % (n=164)	Teste de homogeneidade
Gênero			
Masculino	11,56 (17)	12,20 (20)	$\chi^2_{(1)}= 7,9 \times 10^{-05}$, $p>0,05$
Feminino	88,44 (130)	87,80 (144)	
Idade (anos)			
20 a 30	2,72 (4)	3,66 (6)	$\chi^2_{(6)}= 4,896$, $p>0,05$
31 a 40	8,84 (13)	10,37 (17)	
41 a 50	22,45 (33)	25,00 (41)	
51 a 60	34,69 (51)	25,00 (55)	
61 a 70	20,41 (30)	22,56 (37)	
71 a 80	10,20 (15)	4,88 (8)	
81 a 90	0,68 (1)	0,00 (0)	
Média (\pm DP)	54,95 (\pm 12,22)	52,89 (\pm 12,07)	
Etnia			
Euro-descendente	87,76 (129)	86,59 (142)	$\chi^2_{(2)}= 0,228$, $p>0,05$
Afro-descendente	8,84 (13)	10,37 (17)	
Ameríndio descendente	3,40 (5)	3,04 (5)	
Hábito Tabagista			
É tabagista	12,24 (18)	12,80 (21)	$\chi^2_{(2)}= 0,240$, $p>0,05$
Ex-tabagista	23,13 (34)	20,73 (34)	
Nunca foi tabagista	60,54 (89)	66,46 (109)	

DP: desvio padrão; $\chi^2_{(n)}$: qui-quadrado, com indicação de graus de liberdade; $p=0,05$ foi considerado significativo.

6.2 DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES DE ARTRITE REUMATOIDE

Elevados níveis de fator reumatoide (FR) estão presentes na maioria dos pacientes (64,70%), bem como altos valores do DAS28 (68,18%), VHS (67,48%) e CRP (59,68%). O acometimento articular foi a principal forma de manifestação da doença (83,33%), contudo a manifestação extra-articular e de comorbidade acometeu 56,91% dos pacientes com AR (Tabela 6).

Das 139 manifestações extra-articulares e de comorbidade observadas, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) estava presente em 32% dos pacientes com AR, seguida por dislipidemia (26%), osteoporose (12%), depressão (5%), diabetes e acometimento cardíaco (4%), hipotireoidismo, síndrome metabólica e acometimento pulmonar (3%), síndrome de Sjögren e fibromialgia (2%) e outros fatores (anemia, LES e nódulos reumatoides) acometeram 5% dos pacientes com AR.

Tabela 6: A frequência dos sintomas clínicos em pacientes com artrite reumatoide. Os fatores analisados foram a presença de elevados níveis de fator reumatoide (FR), índice de atividade da doença (DAS28), velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C-reativa (CRP). Além de observar a forma de manifestação da AR pela manifestação restrita à articulação (MA) ou com manifestação extra-articular e comorbidades (MEA).

	n total*	Frequência % (n)
FR	117	61,54 (72)
DAS28	66	68,18 (45)
VHS	123	67,48 (83)
CRP	124	45,97 (57)
Manifestação articular (MA)	102	83,33 (85)
Manifestação extra-articular (MEA)	123	56,91 (70)

n: número amostral; *n total é variável pela disponibilidade dos dados analisados.

Entre os dados epidemiológicos verificou-se que há prevalência de indivíduos “não tabagistas” tanto em pacientes com AR quanto em controle (Tabela 5). Ao realizar o estudo de associação deste hábito entre pacientes com AR e controle, observou-se que a presença deste hábito não conferiu risco ao desenvolvimento de AR ($p>0,05$) (Tabela 7). No entanto, os pacientes tabagistas e ex-tabagistas conferiram um risco elevado de apresentarem altos níveis de FR (OR=2,947, $p=0,024$) em comparação aos não tabagistas (Tabela 7). Enquanto que os pacientes com AR ex-tabagistas possuíam maior frequência de FR positivo que pacientes não tabagistas, porém este valor foi próximo a significância ($p=0,072$) (Tabela 7). As frequências observadas nesta análise estão presentes no apêndice A).

Tabela 7: Associação do hábito tabagista entre pacientes com artrite reumatoide (AR) e controle e entre a presença de fator reumatoide (FR) em pacientes com AR. O hábito tabagista e/ou ex-tabagista foi considerado um fator de risco no desenvolvimento de AR e FR positivo.

	AR e controle			FR positivo		
	OR	IC (95%)	<i>p</i>	OR	IC (95%)	<i>p</i>
Tabagista <i>versus</i> não tabagista	1,050	0,499-2,205	1,000	3,158	0,715-15,873	0,159
Tabagista e ex-tabagista <i>versus</i> não tabagista	1,158	0,703-1,907	0,624	2,947	1,134-7,823	0,024
Ex-tabagista <i>versus</i> não tabagista	1,225	0,680-2,206	0,562	2,842	0,924-9,096	0,072

OR: *odds ratio*; $p<0,05$ foi considerado significativo; IC: intervalo de confiança de 95%.

6.3 GENES *KIR* E ARTRITE REUMATOIDE

As frequências gênicas obtidas (*f*) e frequências gênicas estimadas (*F*) dos genes *KIR* em pacientes com AR e controles estão na Tabela 8. O número total de amostras (*n*) consideradas varia entre os genes estudados devido a não amplificação do controle interno da PCR em parte das amostras.

Tabela 8: Presença dos genes *KIR*, frequência da presença do gene (*f*); frequência gênica estimada (*F*) em pacientes com artrite reumatoide (AR) e controle.

	Pacientes com AR			Controle		
	n total	f % (n)	F	n total	f % (n)	F
<i>KIR2DL1</i>	28	100,00 (28)	1,000	38	100,00 (38)	1,000
<i>KIR2DL2</i>	69	76,81 (53)	0,518	75	70,67 (53)	0,458
<i>KIR2DL3</i>	71	94,37 (67)	0,763	92	91,30 (84)	0,705
<i>KIR2DL4</i>	106	100,00 (106)	1,000	87	100,00 (87)	1,000
<i>KIR2DL5</i>	59	71,19 (42)	0,463	76	75,00 (57)	0,500
<i>KIR2DP1</i>	107	100,00 (107)	1,000	94	98,94 (93)	0,897
<i>KIR2DS1</i>	144	40,28 (58)	0,227	161	42,86 (69)	0,244
<i>KIR2DS2</i>	142	61,27 (87)	0,378	161	50,93 (82)	0,300
<i>KIR2DS3</i>	142	28,87 (41)	0,157	148	35,81 (53)	0,199
<i>KIR2DS4</i>	146	93,84 (137)	0,752	158	95,57 (151)	0,790
<i>KIR2DS5</i>	144	34,03 (49)	0,188	160	29,38 (47)	0,160
<i>KIR3DL1</i>	62	100,00 (62)	1,000	65	100,00 (65)	1,000
<i>KIR3DL2</i>	70	100,00 (70)	1,000	70	100,00 (70)	1,000
<i>KIR3DL3</i>	107	100,00 (107)	1,000	124	100,00 (124)	1,000
<i>KIR3DP1</i>	89	96,63 (86)	0,816	71	100,00 (71)	1,000
<i>KIR3DS1</i>	146	34,25 (50)	0,189	151	35,76 (54)	0,199

n: tamanho da amostra é variável pela não amplificação do gene controle positivo da reação em cadeia da polimerase.

Verificou-se a presença dos genes moldura *KIR3DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL2* em todos os indivíduos (de pacientes com AR e controle). Além destes, a presença do pseudogene *KIR3DP1* foi muito frequente em pacientes com AR (96,63%) e presente em todos os indivíduos do grupo controle, e o pseudogene *KIR2DP1* presente em todos pacientes com AR e não amplificou para apenas um indivíduo controle (Tabela 8).

A presença dos demais genes inibidores foi frequente tanto em pacientes com AR quanto em controle, sendo que os genes *KIR2DL1* e *KIR3DL1* foram presentes em 100% dos indivíduos e o gene *KIR2DL3* em mais de 90% de pacientes e controle. Enquanto os genes *KIR2DL2* e *KIR2DL5* foram presentes em mais de 70% dos pacientes de AR e controle (Tabela 8).

Os genes *KIR2DS3* e *KIR2DS5* foram os menos frequentes em pacientes com AR e controle entre os genes ativadores, esses presentes em aproximadamente 30% dos indivíduos. Por outro lado, o gene *KIR2DS4* foi o mais frequente dos genes ativadores (mais que 90%) em ambos os grupos. A frequência do gene *KIR2DS2* foi a mais diferenciada entre pacientes (61%) e controle (51%) (Tabela 8).

Apenas os genes *KIR* ativadores foram analisados no estudo de associação entre AR e controle (Tabela 9). A presença dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DS5* foram mais frequentes em pacientes com AR, porém esta diferença não foi significativa ($p>0,05$). Por outro lado, os demais genes *KIR* ativadores foram mais frequentes em controle (hipótese de proteção à doença) e o valor de $p>0,05$, logo estas diferenças não foram significativas (Tabela 9) (Apêndice B).

Tabela 9: Análise de suscetibilidade da presença dos genes *KIR* ativadores com artrite reumatoide (AR) e controles.

	OR	IC (95%)	<i>p</i>
<i>KIR2DS1</i>	0,899	0,555-1,456	0,734
<i>KIR2DS2</i>	1,524	0,940-2,473	0,090
<i>KIR2DS3</i>	0,728	0,430-1,229	0,256
<i>KIR2DS4</i>	0,706	0,230-2,137	0,675
<i>KIR2DS5</i>	1,240	0,742-2,072	0,455
<i>KIR3DS1</i>	0,936	0,564-1,550	0,880

OR: *odds ratio*; IC: Intervalo de confiança de 95%; $p<0,05$ foi considerado significativo.

6.4 GENES *KIR* E SUA INFLUÊNCIA NOS FATORES CLÍNICOS DA ARTRITE REUMATOIDE

A presença dos genes *KIR* ativadores foi avaliada na suscetibilidade de fatores clínicos dos pacientes com AR e em controle (Tabela 10) (Apêndice C e D).

Ao analisar a presença dos genes *KIR* com fatores clínicos nos pacientes com AR em comparação aos controles, observou-se que os genes *KIR2DS2* e *KIR2DS5* foram mais frequentes em pacientes com AR que apresentaram FR positivo, MA positivo, MEA positivo e presença de MA e MEA concomitantemente. A presença do gene *KIR2DS2* aumentou 2,3 vezes a chance de um indivíduo apresentar AR

com MEA quando comparado ao controle, IC 95% 1,211-4,441 e $p=0,010$. A presença deste gene também foi mais frequente em pacientes de AR que possuem MA e MEA (OR=2,064, IC 0,968-4,446), embora p não fora significativa ($p=0,062$). Por outro lado, a frequência do gene *KIR2DS4* foi maior em controles que pacientes de AR que apresentaram MA (OR=0,305, IC 95% 0,090-1,029), com o valor de p próximo à significância ($p=0,057$).

Na análise dos genes *KIR* e sua influência na presença dos fatores clínicos em pacientes com AR, verificou-se que os genes *KIR* ativadores foram menos frequentes em pacientes com FR positivo do que FR negativo. Destacando o gene *KIR3DS1*, cujo valor de OR= 0,448 embora $p=0,073$, com diferença não significativa. Quanto a presença da MA, os testes estatísticos mostram que os genes *KIR* ativadores não influenciam neste fator clínico.

Os pacientes com AR que apresentaram MEA possuem maior frequência da presença dos genes *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2SD4* e *KIR3DS1* que os pacientes sem esta condição, porém não foi significativo ($p>0,05$). Enquanto que todos os genes *KIR* ativadores foram mais frequentes (OR > 1,3) em pacientes com AR que possuem MA e MEA concomitantemente do que os pacientes sem esta condição, no entanto $p>0,05$ (Tabela 10).

Tabela 10: Associação da presença dos genes *KIR* ativadores com dados clínicos em pacientes com artrite reumatoide e controles. Presença (positivo ou **+**) de elevados níveis de fator reumatoide (FR**+/-**), manifestação articular (MA**+/-**) e/ou manifestação extra-articular (MEA**+/-**) foram considerados fatores de risco entre pacientes e entre paciente e controle (C).

	<i>KIR2DS1</i>	<i>KIR2DS2</i>	<i>KIR2DS3</i>	<i>KIR2DS4</i>	<i>KIR2DS5</i>	<i>KIR3DS1</i>
	OR (IC 95%) <i>p</i>	OR (IC 95%) <i>p</i>	OR (IC 95%) <i>p</i>	OR (IC 95%) <i>p</i>	OR (IC 95%) <i>p</i>	OR (IC 95%) <i>p</i>
FR+ versus C	0,722 (0,392-1,326) 0,329	1,429 (0,783-2,610) 0,271	0,676 (0,349-1,304) 0,272	0,502 (0,144-1,766) 0,365	1,037 (0,542-1,979) 1,000	0,665 (0,344-1,278) 0,247
FR + versus FR-	0,692 (0,295-1,623) 0,468	0,855 (0,359-2,028) 0,852	0,784 (0,313-1,970) 0,723	0,774 (0,144-3,755) 1,000	0,832 (0,341-2,039) 0,817	0,448 (0,187-1,069) 0,073
MA+ versus C	0,880 (0,495-1,562) 0,743	1,489 (0,842-2,638) 0,186	0,687 (0,366-1,284) 0,267	0,305 (0,090-1,029) 0,057	1,361 (0,746-2,480) 0,353	0,998 (0,550-1,807) 1,000
MA+ versus MA-	0,743 (0,232-2,386) 0,774	1,159 (0,320-4,136) 1,000	0,639 (0,184-2,258) 0,625	0,469 (0,020-4,474) 0,810	0,943 (0,278-3,281) 1,000	1,019 (0,306-3,478) 1,000
MEA+ versus C	0,775 (0,361-1,227) 0,212	2,312 (1,211-4,441) 0,010	0,916 (0,478-1,749) 0,896	0,664 (0,146-3,401) 0,849	1,002 (0,512-1,951) 1,000	0,998 (0,529-1,878) 1,000
MEA+ versus MEA-	0,886 (0,396-1,982) 0,895	2,133 (0,935-4,892) 0,074	1,619 (0,662-3,994) 0,342	2,966 (0,589-16,509) 0,251	0,724 (0,313-1,674) 0,529	1,250 (0,544-2,887) 0,705
MA e MEA+ versus C	0,790 (0,373-1,664) 0,621	2,064 (0,968-4,446) 0,062	0,836 (0,383-1,811) 0,758	0,997 (0,180-7,207) 1,000	1,161 (0,529-2,529) 0,829	0,991 (0,466-2,094) 1,000
MA/MEA+ versus MA/MEA-	1,481 (0,212-12,593) 0,987	8,571 (0,764-218,319) 0,103	2,333 (0,221-56,953) 0,776	1,338 (0,002-33,967) 1,000	2,414 (0,228-58,983) 0,750	8,390 (0,533-4801,183) 0,211

OR: odds ratio; IC: Intervalo de confiança de 95%; $p < 0,05$ foi considerado significante

7 DISCUSSÃO

7.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

Dentre as amostras analisadas verificou-se prevalência do gênero feminino (Tabela 5), semelhante a outros estudos com a AR que corroboraram que esta doença acomete mais mulheres que homens (Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Mota *et al.*, 2010; Louzada-Júnior *et al.*, 2007; Alamanos e Drosos, 2005). A proporção de gênero encontrada neste estudo foi de 7,6 mulheres para 1 homem acometido pela doença, valor superior àquela encontrada na literatura onde a razão varia entre 2:1 e 3:1 (Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Alamanos e Drosos, 2005; Symmons, 2002). Por outro lado, estudos com pacientes brasileiros com AR têm demonstrado prevalência de mulheres maior que a razão mundial, obtendo uma proporção superior a 5 mulheres para 1 homem acometido pela doença (Corbacho e Dapuetto, 2010; Ide *et al.*, 2011; Louzada-Júnior *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Senna *et al.*, 2004). Desta forma, a composição de gênero nos pacientes com AR no Brasil parece se comportar diferentemente de outras populações, tal fato pode ser verificado no estudo comparativo de pacientes com AR no Brasil e na Espanha (Ide *et al.*, 2011).

O motivo da prevalência de mulheres na AR ainda é incerto, embora acredita-se que o fator hormonal teria uma importante influência no desenvolvimento da patogênese. A diferença entre os gêneros estaria associada às diferenças na atividade da doença do que na patogênese em si, possibilitando a pesquisa de outros fatores epidemiológicos relacionados ao surgimento da AR (Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Carmona *et al.*, 2010; Alamanos, Voulgari, Drosos 2006; Alamanos e Drosos, 2005; Symmons, 2002).

Os pacientes acometidos pela AR possuem média de idade próxima a 50 anos com variação de ± 12 anos neste estudo (Tabela 5), semelhante a diversos estudos encontrados na literatura (Ide *et al.*, 2011; Mota *et al.*, 2010; Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Corbacho e Dapuetto, 2010; Louzada-Júnior *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Senna *et al.*, 2004).

Neste estudo houve a predominância de pacientes euro-descendentes (87,76%), bem como ocorreu no estudo brasileiro realizado no Estado de São Paulo por Louzada-Júnior *et al.* (2007). Interessantemente, outros estudos brasileiros realizados com pacientes nordestinos (Maceió, Alagoas) e mineiros (Montes Claros, Minas Gerais) relataram que a maioria dos pacientes com AR foram

classificados como “não-brancos” (Teixeira et al., 2007; Senna et al., 2004). A partir disso, é importante ressaltar que a amostra deste estudo é proveniente do Estado de Santa Catarina o qual possui um histórico de migração prevalente de euro-descendente que se diferencia de várias regiões do País (Pena et al., 2011; Santos et al., 2010; Salzano e Freire-Maia, 1970).

Esta diferença da composição étnica dos pacientes com AR poderia estar relacionada às diferentes formas de classificação étnica, que ora são restritas a cor de pele, ora são formadas a partir de informações sobre ascendência do pacientes. Enquanto que no presente estudo foram consideradas ambas as informações para a classificação étnica das amostras. Infelizmente não há como padronizar tais procedimentos de classificações fenotípicas, entretanto vêm crescendo a utilização de ferramentas moleculares que auxiliam no conhecimento da estruturação étnica das populações miscigenadas mediante os marcadores informativos de ancestralidade (AIMs – do inglês, *Ancestry Informative Markers*) (Galanter et al., 2012).

A classificação étnica das amostras é importante, pois se acredita que alguns grupos étnicos tenham maior risco de desenvolver a AR que outros, justamente pela interação genética e ambiental que cada população está suscetível. A análise entre populações com *background* genético semelhante permite que fatores ambientais (ou estilo de vida) possam ser investigados como fatores não genéticos, os quais podem influenciar na patogênese de uma doença complexa como a AR (Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Alamanos e Drosos, 2005).

Além dos dados epidemiológicos, foram analisados alguns fatores clínicos como índice de atividade da doença (DAS28), condição inflamatória (CRP, VHS, FR) e forma de MA e MEA que foram observados de forma heterogênea entre os pacientes com AR. Ao analisar o grau de atividade da doença, verificou-se que em 68,18% dos pacientes com AR possuíam o valor de DAS28 >3,2 (atividade moderada e/ou alta), uma frequência inferior a outros estudos que encontraram este índice em 73,5% (Corbacho e Dapuetto, 2010) ou em todos os pacientes com AR (DAS ≥5,2) (Teixeira et al., 2007).

Os testes de fase aguda (como VHS e CRP) são marcadores de inflamação utilizados no monitoramento da atividade da doença e resposta a tratamento (Farng e Friedrich, 2011). Observou-se que elevados valores de VHS e CRP são mais frequentes em pacientes com AR do que em indivíduos não afetados pela doença (controle), sendo $p < 0,001$ (Teixeira et al., 2007). Neste estudo os elevados valores de VHS e CRP estão presentes em 67,48% e 45,97% dos pacientes com

AR respectivamente, no entanto estas frequências são inferiores a outro estudo no qual VHS e CRP estão presentes em mais de 70% dos pacientes com AR (Mota *et al.*, 2010).

O FR positivo é considerado um marcador para AR, sendo que sua positividade foi mais frequente em pacientes com AR que indivíduos controle, $p < 0,001$ (Teixeira *et al.*, 2007). Além do que, a frequência do FR positivo foi maior em pacientes com AR com menos de 50 anos, em comparação com pacientes com mais de 50 anos (Silva *et al.*, 2006a). No presente estudo 61,54% dos pacientes com AR tinham FR positivo, frequência superior a encontrada por Mota *et al.* (2010) de 49,23% e inferior que 70% encontrado por Louzada-Júnior *et al.* (2007) e 100% de presença do FR em pacientes com AR (Teixeira *et al.*, 2007).

Neste estudo os pacientes com AR apresentaram MA (83,33%) e MEA (56,91%), sendo que outro estudo demonstrou que apenas 23,3% dos pacientes com AR tinham alguma MEA (Louzada-Júnior *et al.*, 2007). Esta maior frequência de MAE em pacientes com AR no presente estudo pode estar relacionada com o fato de inclusão de características de comorbidade neste grupo. Uma vez que as principais MEA encontradas neste estudo foram HAS (32%), dislipidemia (26%), osteoporose (12%), acometimento cardíaco (4%), acometimento pulmonar (3%), síndrome de Sjögren (2%). Enquanto que outros estudos brasileiros encontraram como MEA mais comuns os nódulos reumatoides em cerca de 30% dos pacientes, seguido pela síndrome de Sjogren (28% e 11,3 %) e envolvimento pulmonar (15% e 7,5%) (Louzada-Júnior *et al.*, 2007; Corbacho e Dapuzeto, 2010). No entanto, a anemia foi considerada uma importante MEA encontrada em 18,46% dos pacientes com AR (Mota *et al.*, 2010).

Entre os fatores ambientais o tabagismo é o mais associado com a AR, sendo que pode influenciar tanto no risco de desenvolvimento da AR quanto no curso da doença (Tobón, Youinou, Saraux, 2010; Alamanos e Drosos, 2005; Albano, Santana-Sahagun, Weisman, 2001). No presente estudo não houve associação do tabagismo com o desenvolvimento da AR, porém os indivíduos que são tabagistas e ex-tabagistas possuem um risco elevado de desenvolver FR, $OR=2,947$ e $p=0,024$ (Tabela 7). Interessantemente, os indivíduos que foram tabagistas, ou seja, pararam com o hábito há mais de 30 anos que apresentaram o FR positivo foram mais frequentes que os indivíduos não tabagistas ($OR=2,842$), no entanto esta diferença não foi significativa ($p=0,072$). A presença do FR em elevados níveis foi associada ao tabagismo (Stolt *et al.*, 2003; Albano, Santana-Sahagun, Weisman, 2001). Além disso, acredita-se que o hábito tabagista esteja

relacionado ao desenvolvimento do FR independentemente da AR (Silman e Pearson, 2002).

O hábito tabagista é considerado um importante fator de risco da incidência e severidade da AR. Desta forma, o tabagismo foi relacionado com fatores clínicos tais como MEA a vasculite, acometimentos pulmonares e cardíacos (Stolt *et al.*, 2003; Albano, Santana-Sahagun, Weisman, 2001). Esta associação do tabagismo com fatores clínicos da AR deve estar relacionada com a condição inflamatória presente na AR, como o desenvolvimento de marcadores inflamatórios da AR, elevados valores de VHS e CRP (Silva *et al.*, 2006a) e presença de autoanticorpos ACPA, além do FR (Klareskog, Catrina, Paget, 2009).

7.2 OS GENES *KIR*

7.2.1 Análise de frequência dos *KIR* em populações brasileiras

As frequências dos genes *KIR* da amostra controle foram comparadas com outros estudos populacionais realizados no Brasil, tais como nos Estados do Paraná (Curitiba e Maringá), Rio Grande do Sul (Porto Alegre), São Paulo (São Paulo), Minas Gerais (Belo Horizonte), Rio de Janeiro (Rio de Janeiro) e Amazônia (tribos indígenas). É importante lembrar que esta amostra de controles não representa a população de Santa Catarina por ter sido pareado de acordo com o perfil dos pacientes com AR (Apêndice E).

Os genes inibidores *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, o pseudogene *KIR2DP1* e gene ativador *KIR2DS2* apresentaram frequências semelhantes a outros estudos brasileiros (Augusto *et al.*, 2011; Hollenbach *et al.*, 2010; Jobim *et al.*, 2010a; Rudnick *et al.*, 2008; Ewerton *et al.*, 2007; Morgun *et al.*, 2004). O pseudogene *KIR3DP1* estava presente em todos os indivíduos neste trabalho, bem como no único trabalho brasileiro populacional que analisou este gene realizado em Maringá (PR) (Rudnick *et al.*, 2008).

As frequências dos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL3* encontradas foram respectivamente 70,6% e 90% e foram maiores que aquelas encontradas por outros estudos brasileiros (Augusto *et al.*, 2011; Hollenbach *et al.*, 2010; Jobim *et al.*, 2010a; Rudnick *et al.*, 2008; Ewerton *et al.*, 2007; Morgun *et al.*, 2004). No entanto, o gene *KIR2DL3* possui uma frequência semelhante no estudo de Belo Horizonte (MG) cuja frequência foi 94,4% (Hollenbach *et al.*, 2010). O gene *KIR2DL5* teve uma frequência de 75% e foi maior que a maioria

dos estudos brasileiros, exceto na população ameríndia (Amazônia) na qual este gene esteve presente em 85% dos indivíduos (Ewerton *et al.*, 2007).

Os genes *KIR2DS1*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* foram frequentes em 40%, 30% e 35% dos indivíduos respectivamente, semelhantes a outras populações brasileiras (Augusto *et al.*, 2011; Hollenbach *et al.*, 2010; Jobim *et al.*, 2010a; Rudnick *et al.*, 2008; Ewerton *et al.*, 2007; Morgun *et al.*, 2004). Entretanto, as frequências dos genes *KIR2DS1* (88%), *KIR2DS5* (90%) e *KIR3DS1* (70%) foram maiores na população ameríndia (Ewerton *et al.*, 2007). Por outro lado, o gene *KIR2DS3* foi menos frequente em ameríndios (10%) que nos demais estudos brasileiros (Ewerton *et al.*, 2007), incluindo o estudo presente no qual este gene foi presente em 35,8% dos indivíduos.

Os genes *KIR2DS4* e *KIR3DL1* foram muito frequentes nas amostras controle deste estudo, representando respectivos 95,6% e 100% dos indivíduos, de forma semelhante aos outros estudos brasileiros (Augusto *et al.*, 2011; Hollenbach *et al.*, 2010; Jobim *et al.*, 2010a; Rudnick *et al.*, 2008; Ewerton *et al.*, 2007; Morgun *et al.*, 2004). Porém, em São Paulo (SP) e Amazônia (AM) as frequências dos genes *KIR2DS4* (38,2% e 78%) e *KIR3DL1* (87,3% e 65%) foram inferiores às encontradas no presente estudo (Morgun *et al.*, 2004; Ewerton *et al.*, 2007).

Interessantemente, os genes inibidores *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1* e os ativadores *KIR2DS1*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* foram distribuídos diferentemente na amostra da Amazônia, esta composta por indivíduos de tribos indígenas da região, ao se comparar com as demais populações brasileiras estudadas. De fato, isso corrobora a importância de compreender a composição étnica e genética das populações em estudos caso-controle e epidemiológicos, principalmente tratando-se de marcadores genéticos com importância imunológica como os *KIR* e em uma população miscigenada como a brasileira (Pena *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2009). Como as frequências destes genes são distintas entre populações de composição étnica diferente, os resultados obtidos nos estudos de associação genética podem ser espúrios, pois a associação encontrada pode estar relacionada com o *background* genético da amostra e não com a doença avaliada em si.

Quanto às frequências de outros genes *KIR* encontradas neste estudo que foram distintas dos estudos realizados em populações miscigenadas (SP e MG), percebeu-se que a amostragem populacional destes estudos foi pequena (55 e 90 indivíduos respectivamente)

(Morgun *et al.*, 2004; Hollenbach *et al.*, 2010); fato que poderia mascarar a detecção das frequências destes genes (Middleton, Meenagh, Wright, 2007). Além disso, é importante destacar que no presente trabalho os genes *KIR* inibidores e pseudogenes possuem o tamanho amostral (n) reduzido pela não amplificação dos indivíduos pela técnica de PCR, o que também poderia alterar as frequências reais destes genes na população amostrada do Estado de Santa Catarina.

7.2.2 Análise de frequências dos *KIR* em artrite reumatoide e doenças autoimunes

As frequências dos genes *KIR* das amostras de AR deste estudo foram comparadas com outros estudos com AR publicados em diversas regiões do mundo (Middleton, Meenagh, Wright, 2007; Majorczyk *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2001) e com outras doenças autoimunes analisadas em populações brasileiras, tais como Diabetes Tipo 1 (DT1) (Jobim *et al.*, 2010b), Esclerose Sistêmica (ES) (Salim *et al.*, 2010), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (Coelho, 2011; Pedroza *et al.*, 2011) e Pênfigo Foliáceo (PF) (Augusto *et al.*, 2012a). Os estudos com doenças autoimunes foram realizados na região sul do País, exceto estudo com LES no Pará (Pedroza *et al.*, 2011) (Apêndice F).

Os genes inibidores *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* e *KIR3DL3*, pseudogene *KIR2DP1* e o ativador *KIR2DS3* apresentaram frequências semelhantes aos estudos com AR (Middleton, Meenagh, Wright, 2007; Majorczyk *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2001) e com outras doenças autoimunes (Augusto *et al.*, 2012a; Coelho, 2011; Pedroza *et al.*, 2011; Jobim *et al.*, 2010b; Salim *et al.*, 2010). O pseudogene *KIR3DP1* foi encontrado em todos os indivíduos, bem como no único estudo que analisou este marcador (Augusto *et al.*, 2012a).

As frequências dos genes *KIR2DL1* (100%) e *KIR2DL3* (94,4%) encontradas neste estudo foram semelhantes àquelas de outros estudos de AR e outras doenças autoimunes (Middleton, Meenagh, Wright, 2007; Majorczyk *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2001; Augusto *et al.*, 2012a; Coelho, 2011; Pedroza *et al.*, 2011; Jobim *et al.*, 2010b; Salim *et al.*, 2010). No entanto, no estudo com AR em Taiwan estes genes foram bem menos frequentes, com apenas 12,5% e 57% respectivamente (Yen *et al.*, 2006).

As frequências dos genes *KIR2DL2* (76,8%) e *KIR2DL5* (71,2%) foram semelhantes com estudos realizados com LES (Coelho, 2011; Pedroza *et al.*, 2011), contudo estes genes foram mais frequentes que outros estudos com AR e doenças como DT1, ES, PF (Jobim *et al.*,

2010b; Salim *et al.*, 2010; Augusto *et al.*, 2012a). Por outro lado, as frequências dos genes *KIR2DS5* e *KIR3DS1* foram maiores em estudos com LES (Coêlho, 2011; Pedroza *et al.*, 2011) do que as frequências destes genes no presente estudo (34% e 34,3%) e de outros estudos com AR e outras doenças autoimunes.

O gene *KIR2DS1* esteve presente em 40% dos indivíduos com AR semelhantemente com estudo com AR no Reino Unido (Middleton, Meenagh, Wright, 2007) e com DT1 (Jobim *et al.*, 2010b), ES (Salim *et al.*, 2010) e PF (Augusto *et al.*, 2012a). Todavia, este gene foi mais frequente (maior que 50%) em estudo norte-americano com AR (Yin *et al.*, 2001) e nos estudos com LES (Coêlho, 2011; Pedroza *et al.*, 2011). Enquanto em Taiwan este gene estava presente em apenas 9,7% dos pacientes com AR (Yen *et al.*, 2006).

O gene *KIR2DS2* foi ligeiramente mais frequente neste estudo (61,3%) do que nos outros (Middleton, Meenagh, Wright, 2007; Majorczyk *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2001; Augusto *et al.*, 2012a; Coêlho, 2011; Pedroza *et al.*, 2011; Jobim *et al.*, 2010b; Salim *et al.*, 2010), sendo que a menor frequência deste gene foi observada em pacientes com AR de Taiwan, presente em apenas 25% dos pacientes com AR (Yen *et al.*, 2006).

O gene *KIR2DS4* estava presente em 93,8% dos indivíduos com AR de forma semelhante aos outros estudos com AR (Middleton, Meenagh, Wright, 2007), DT1 (Jobim *et al.*, 2010b), ES (Salim *et al.*, 2010), LES (Coêlho, 2011; Pedroza *et al.*, 2011) e PF (Augusto *et al.*, 2012a). No entanto, este gene foi menos frequente nos estudos com AR realizado na Polônia (30,5%) e Taiwan (20,8%) (Majorczyk *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2006).

As análises comparativas das frequências dos genes *KIR* em AR do presente estudo com outros estudos com AR, permitiu-se observar que as frequências destes genes em indivíduos com AR de etnia oriental (Taiwan) diferenciaram-se das frequências dos demais estudos (Yen *et al.*, 2006). De fato, outros estudos que avaliaram os genes *KIR* e AR foram realizados em populações caucasianas ou descendentes de europeus (Middleton, Meenagh, Wright, 2007; Majorczyk *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2001), cuja composição étnica é semelhante a população do presente estudo, miscigenada com predominância de euro-descendentes.

A frequência do gene *KIR2DS4* encontrada no presente e nos demais estudos se diferenciou do estudo realizado em poloneses com AR. É importante salientar que este trabalho da Polônia detectou tanto a presença/ausência deste gene quanto a deleção de 22 pares de bases do *KIR2DS4*, que, por sua vez, leva a tradução de um receptor não

funcional (Maxwell *et al.*, 2002). Como o presente e os demais estudos consideraram apenas a presença e ausência deste gene, a frequência do mesmo em poloneses não foi considerada nesta análise.

A partir das comparações das frequências gênicas deste presente estudo com outras doenças autoimunes avaliadas no Brasil, a maioria dos genes tiveram frequências muito semelhantes, permitindo a observação de sobreposição genética e, talvez, imunopatológica entre estas doenças. Aliás, as populações avaliadas possuíam a composição étnica semelhante, maioria do sul do País. No entanto, em ES os genes *KIR2DL2* e *KIR2DS1* foram menos frequentes e em LES os genes *KIR2DS2* e *KIR3DS1* foram mais frequentes em comparação aos outros estudos. Desta forma, estes genes com frequências diferenciadas nestas doenças poderiam estar relacionados com o desenvolvimento destas patologias especificamente.

Alguns genes *KIR* no presente estudo, *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1* e *KIR2DS2*, foram mais frequentes que em outras doenças, como DT1, ES, PF e LES. Provavelmente, estes genes possam estar mais envolvidos com o desenvolvimento da AR do que em outras doenças autoimunes. Entretanto, vale destacar, novamente, que o tamanho amostral (n) pequeno de alguns genes *KIR* poderia influenciar na determinação das frequências gênicas dos genes *KIR* em pacientes com AR em Santa Catarina.

7.3 ASSOCIAÇÃO DOS GENES *KIR* E A ARTRITE REUMATOIDE

As frequências dos genes *KIR* foram semelhantes entre pacientes e controles. Ao analisar a suscetibilidade dos genes *KIR* ativadores com AR, o gene *KIR2DS2* foi mais frequente em pacientes ($OR=1,52$, $p=0,090$), porém esta diferença não foi significativa, bem como os demais genes *KIR* ativadores não foram associados ao desenvolvimento da patogênese ($p>0,05$).

A não associação do polimorfismo de ausência e presença dos genes *KIR* analisados nesse estudo foi semelhante aos resultados de estudos com AR no Reino Unido (Middleton, Meenagh, Wright, 2007), na Polônia (Majorczyk *et al.*, 2007) e nos E.U.A (Yen *et al.*, 2001) os quais não encontraram associação com genes *KIR* ativadores nem com os inibidores. Contudo, tanto a presença do gene ativador *KIR2DS4* quanto do gene inibidor *KIR2DL1* foi associada com o desenvolvimento de AR em um estudo caso-controle em Taiwan ($OR>1,9$, $p<0,02$) (Yen *et al.*, 2006).

A associação encontrada somente em pacientes com AR de origem oriental (Taiwan) (Yen *et al.*, 2006) difere dos resultados encontrados em estudos de países europeus e dos E.U.A, os quais possuem a ascendência ou são predominantemente europeias (Middleton, Meenagh, Wright, 2007; Majorczyk *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2001). Portanto, este fato destaca que a composição étnica dos estudos deve ser considerada nestes estudos de suscetibilidade. Por isso, também, o presente estudo foi realizado para avaliar se haveria associação desses genes com AR em uma população miscigenada com a brasileira, uma vez que este é o primeiro trabalho que avalia esses genes com AR no Brasil.

7.4 ASSOCIAÇÃO DOS *KIR* E OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES

As doenças autoimunes possuem características imunopatológicas semelhantes entre si, ocorrendo sobreposição de associações genéticas, por isso é possível comparar as características no desenvolvimento e manutenção das patologias autoimunes (Tobón *et al.*, 2012; Schleinitz *et al.*, 2010; Baranzini, 2009; Lettre e Rioux 2008). Nesta seção foram avaliados os estudos de suscetibilidade dos genes *KIR* ativadores com outras doenças autoimunes encontrados na literatura (Apêndice G).

A presença de mais de três genes *KIR* ativadores conferiu proteção ao pênfigo foliáceo (PF), bem como a porção de genes ativadores e inibidores foi maior em controle (Augusto *et al.*, 2012b). No entanto, em pacientes com diabetes tipo 1 (DT1) houve um aumento no número de genes ativadores em comparação com controle ($p=0,049$) (Van der Slik *et al.*, 2003). Esta análise quantitativa do número de genes *KIR* ativadores presentes não foi realizada neste estudo, pois não foram avaliados os genes inibidores no estudo de associação.

O gene ativador *KIR2DS1* foi mais frequente em pacientes com psoríase, presente em 85% pacientes na Polônia ($p<0,001$) (Łuszczek *et al.*, 2004), em 45% pacientes do Japão ($p<0,05$) (Suzuki *et al.*, 2004), e em pacientes da Suécia o risco (OR) foi de 1,47 no desenvolvimento da patologia ($p=0,01$) (Holm *et al.*, 2005). Por outro lado, a presença deste gene conferiu proteção ao desenvolvimento de LES, OR=0,434 e $p<0,001$ (Coêlho, 2011). Todavia, outro estudo com lúpus eritematoso sistêmico (LES) observou que a presença do par de genes *KIR2DS1* e *KIR2DL2* conferiu um risco ao desenvolvimento da patogênese (Hou *et*

al., 2011). O gene *KIR2DS1* não foi associado ao desenvolvimento da AR, no presente estudo (OR=0,899 e $p>0,05$)

A combinação da presença do gene ativador *KIR2DS2* com seu respectivo ligante HLA foi mais frequente em pacientes com diabetes tipo 1 (DT1) (49%) que em controle (41%), $p=0,030$ (van der Slik *et al.*, 2003). Por outro lado, a ausência de *KIR2DS2* e a presença de seu ligante *HLA-C1* conferiu o risco de 1,97 ao desenvolvimento de DT1 ($p=0,004$), enquanto que na ausência de *KIR2DS2* e de seu ligante *HLA-C1* houve proteção ao desenvolvimento desta patologia (OR=0,55, $p=0,02$) (Zhi *et al.*, 2011). Além do mais, a presença do par *KIR2SD2* e ligante *HLA* combinado com a ausência do par gene inibidor *KIR* e ligante aumentou o risco de desenvolver DT1 (49%, $p=0,035$) (van der Slik *et al.*, 2003). Neste presente estudo, o gene *KIR2DS2* foi mais frequente em pacientes com AR (OR=1,524), porém este resultado foi próximo à significância $p=0,090$.

A presença do gene ativador *KIR2DS2* combinada com a ausência do gene inibidor *KIR2DL2* foi associada à esclerose sistêmica (OR=19,3, $p<0,001$) e foi frequente em 15,71% dos pacientes com síndrome de Sjögren ($p=0,01$) e em 27% dos pacientes com artrite psoriática ($p<0,001$) (Salim *et al.*, 2010; Lowe *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2002).

A presença de ambos os genes ativadores *KIR2DS1* e *KIR2DS2* esteve presente em 80% dos pacientes com escleroderma ($p=0,02$), bem como a combinação do gene *KIR2DS2* com a ausência do gene inibidor *KIR2DL2* foi frequente em 11,8% dos pacientes, $p=0,005$ (Pellet *et al.*, 2007; Momot *et al.*, 2004). Além disso, a presença de *KIR2DS1* e ausência de *KIR2DS2* concomitantemente foi frequente em 23% dos pacientes com escleroderma ($p=0,01$) e 19% dos pacientes com LES ($p=0,04$) (Pellet *et al.*, 2007), além de conferir um risco de desenvolver LES ($r=0,258$, $p<0,001$) (Pedroza *et al.*, 2011).

As presenças do par de genes ativadores *KIR2DS1* e *KIR2DS3* e o par *KIR2DS1* e *KIR2DS5* foram mais frequentes em controle que em pacientes com psoríase, OR=0,2 e $p<0,005$ (Płoski *et al.*, 2006). Enquanto que a combinação dos genes *KIR2DS2*, *KIR2DS5* e *KIR3DS1* foram presentes em 33,33% dos pacientes com LES em relação ao controle (19,6%), $p=0,01$ (Pedroza *et al.*, 2011). Contudo, a presença somente do gene ativador *KIR2DS5* conferiu risco de 4,3 vezes de desenvolver LES, $p<0,001$ (Coêlho, 2011). Este gene foi mais frequente em pacientes com AR que em controles no presente estudo, porém este valor não foi significativo (OR=1,24 e $p=0,455$).

Quanto à presença do gene ativador *KIR3DS1* sozinho, ou em combinação com inibidor *KIR3DL1* e presença do alelo *KIR3DS1*013* conferiram um risco (OR) maior que 3,0 ao desenvolvimento de espondilite anquilosante ($p < 0,03$). Enquanto que a presença do alelo *KIR3DL1*004* e a ausência de ambos *KIR3DL1* e *KIR3DS1* foram maiores nos controles que no grupo de pacientes, $OR = 0,44$ e $p = 0,045$; $OR = 0,11$ e $p = 0,032$ respectivamente (Wang *et al.*, 2012; Díaz-Peña *et al.*, 2010). Interessantemente, a presença do gene *KIR3DS1* conferiu proteção ao LES ($OR = 0,562$ e $p = 0,009$) (Coêlho, 2011) e ao pênfigo foliáceo na presença de seu ligante *HLA-Bw4* ($OR = 0,34$ e $p < 10^{-3}$) (Augusto *et al.*, 2012b), porém não foi associado ao desenvolvimento da AR no presente estudo, $OR = 0,936$ e $p > 0,05$.

O fato de não ter sido encontrada associação dos genes *KIR* ativadores com AR pode ter relação ao baixo número amostral deste estudo, o que pode ter mascarado a variabilidade dos genes *KIR* na população estudada. É importante destacar que o polimorfismo avaliado destes genes foi a sua presença ou ausência. Desta forma, outras variabilidades genéticas destes genes poderiam estar relacionadas com a patogênese, tais como diversidade alélica de cada gene *KIR*, análise de perfil genético dos *KIR*, interação com os seus ligantes HLA e outros genes relacionados com mecanismo de regulação das células NK.

Também, é interessante destacar que outros estudos que avaliaram a associação entre os genes *KIR* e a AR não encontraram resultados significativos, exceto o estudo realizado com pacientes de Taiwan. Isso evidencia a importância de compreender a composição étnica da população estudada, pois em orientais a distribuição genética dos *KIR* parece se diferenciar das demais populações composta por indivíduos euro-descendentes. Além de poucos estudos realizados na verificação da variabilidade genética dos receptores *KIR* e suscetibilidade à AR, há poucas informações na literatura sobre a função destes polimorfismos e sua relação com os ligantes HLA na imunopatologia da AR.

Ao considerar que a AR é uma doença complexa que envolve uma grande rede imunológica, não está clara a real função das células NK nesta patologia. No entanto, sabe-se que as células NK agem por diversas vias de interações celulares através de outros receptores além dos KIRs e em diversos aspectos da patologia da AR. Uma vez que as células NK apresentam fenótipo distinto e são mais frequentes no líquido sinovial que no sangue de pacientes com AR, esta característica diferenciada tem sido investigada ao avaliar associações dos

polimorfismos de *KIR* com manifestações clínicas presentes em pacientes com AR (Ahern e Brennan, 2010; Schleinitz *et al.*, 2010).

7.5 ASSOCIAÇÃO DE *KIR* E DADOS CLÍNICOS DA ARTRITE REUMATOIDE

As células NK agem de formas diferentes no tecido e órgãos-alvo. Fatores específicos de órgãos, incluindo microambiente de citocinas, receptores ou moléculas de superfície celular e estruturas restritas ao órgão-alvo podem auxiliar no início da função efetora diferencial das células NK (revisado em Tian, Gershwin, Zhang, 2012).

A expressão dos receptores *KIR* em linfócitos periféricos não foi associada com os fatores clássicos de inflamação, como CRP e VHS, bem como com a presença e FR (Kogure *et al.*, 2007). De fato, o estudo presente também não encontrou associação dos genes *KIR* ativadores com a presença do FR em pacientes com AR, embora o gene *KIR3DS1* foi mais frequente em indivíduos que apresentaram altos níveis de FR (OR= 0,448), mas não foi significativo ($p=0,073$). A presença dos receptores *KIR* na superfície celular pode contribuir com o início da patogênese da AR, mas não com as condições inflamatórias crônicas que induzem o dano articular nem com a atividade da doença (Kogure *et al.*, 2007).

Interessantemente, foi detectada a presença de anticorpos para o receptor KIR2DL em pacientes com AR (Matsui *et al.*, 2001), o que pode estar relacionado à quebra da autotolerância e aumento da severidade de doenças autoimunes. A presença dos anticorpos anti-KIR2DL também foi relacionada com altos níveis de Ig e VHS em AR e LES (Matsui *et al.*, 2001). A partir disso, a formação de um auto-anticorpo específico contra receptor KIR pode indicar uma participação deste receptor na patogênese além do que a sua produção em altos níveis poderá se tornar mais um marcador de diagnóstico e prognóstico de doenças autoimunes, como a AR.

Ao analisar os genes *KIR* e fatores clínicos, os genes *KIR2DS2* e *KIR2DS5* foram mais frequentes em pacientes com AR que tinham FR positivo, MA positivo, MEA positivo e presença de MA e MEA concomitantemente quando comparados com o controle.

Desta forma, a presença do gene *KIR2DS2* foi associada com pacientes de AR que apresentaram MEA quando comparado ao controle (OR= 2,312 e $p=0,010$). A presença deste gene também foi mais frequente em pacientes de AR que possuem MA e MEA (OR=2,064), porém não foi significativo ($p=0,062$). Este gene foi associado em

pacientes com AR que manifestavam vasculite como MEA em poloneses (OR=9,4 e $p=0,01$) (Majorczyk *et al.*, 2007), bem como nos EUA na presença do ligante *HLA-Cw03* (OR=5,56 e $p=0,001$) (Yen *et al.*, 2001).

A associação do gene *KIR2DS2* com vasculite reumatoide pode refletir a atividade funcional destas células no dano vascular, uma vez que algumas subpopulações de células T que expressam KIR em suas superfícies e apresentam risco de desenvolver MEA como nódulos reumatoides e vasculite. Estas células T também foram associadas com condições inflamatórias como síndromes coronárias, característica da AR, e que pode desenvolver acometimento cardiovascular como a arteriosclerose, cuja doença é a principal responsável pela mortalidade na AR (Middleton, Meenagh, Wright, 2007; Yen *et al.*, 2001).

Por outro lado, um estudo encontrou que os genes *KIR2DS1* e *KIR3DS1* foram mais frequentes no grupo controle do que em pacientes com AR sem doença erosiva. Entretanto, a presença destes genes conferiu risco 3,8 vezes maior de desenvolver uma doença erosiva do que AR não-erosiva, $p<0,01$ (Majorczyk *et al.*, 2007). No presente estudo foi observado que a presença do gene *KIR2DS4* foi mais frequente em controles que em pacientes de AR com MA (OR=0,305), $p=0,057$ próximo à significância.

Enquanto que a manifestação extra-articular (MEA) em pacientes com AR foi mais frequente na presença dos genes *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2SD4* e *KIR3DS1*, porém as diferenças não foram significativas. Contudo, a frequência dos genes *KIR2DS2* e *KIR2DL2* foram maiores em pacientes poloneses com AR que apresentaram MAE quando comparados com o grupo controle (OR>2,5 e $p<0,002$), bem como quando comparados com pacientes com MA (OR>4,0 e $p<0,0001$). Além do que, a presença destes genes foi fortemente associada ao desenvolvimento de vasculite em pacientes com AR em relação ao controle (OR>9,0, com $p<0,0002$). Do mesmo modo, esse estudo encontrou associação do gene *KIR2DS2* com pacientes de AR que apresentavam outras formas de MEA (excluindo vasculite) quando comparado com controles (OR=2,8 e $p=0,04$) (Majorczyk *et al.*, 2007).

Os genes *KIR2DS2* e *KIR2DL2* conferiram proteção aos pacientes de AR com MA em relação aos controles (OR=0,6 e $p<0,04$). Por outro lado, estes genes foram mais frequentes em pacientes com AR e outras MAE (excetuando vasculite) em relação com pacientes que manifestaram MA (OR>2,5, $p<0,02$). (Majorczyk *et al.*, 2007).

De acordo com o estudo polonês, a presença do gene inibidor *KIR2DL2* influencia na associação do gene ativador *KIR2DS2* com

MEA e MA, o que poderia impedir a ativação desta célula e desenvolver MA. Esta relação a qual não pode ser verificada neste presente estudo pela escolha de realizar análises apenas com os genes *KIR* ativadores. Além disso, a presença dos genes *KIR* ativadores (OR > 1,3) foi maior em pacientes com AR que apresentaram ambas MA e MAE, todavia não foi significativo ($p > 0,05$).

Os estudos dos genes *KIR* com fatores clínicos não se restringe às manifestações clínicas da AR consideradas neste trabalho. Logo, foi avaliada a relação dos genes *KIR* e *HLA* com a resposta de pacientes de AR a terapia anti-TNF- α – uma droga modificadora do curso da doença (DMCD) biológica que envolve anticorpo contra a citocina mais relevante na AR, TNF- α (Mota *et al.*, 2012). Os pacientes que responderam à terapia possuíam uma frequência maior dos genes *KIR2DS2/KIR2DL2* (67,7% *versus* 33,3%, $p = 0,012$). Por outro lado, os pacientes que não responderam ao tratamento foram associados com o genótipo heterozigoto da ausência de *KIR2DS2* e grupo *HLA-C* 1 e 2, conferindo um caráter inibidor. Desta forma, acredita-se que o perfil ativador possa criar uma vantagem de resposta à terapia anti-TNF- α (McGeough *et al.*, 2012).

Interessantemente, esta terapia com DMCD biológica é realizada em indivíduos que possuem a combinação de pior prognóstico, envolvendo elevado número de articulações acometidas, erosões articulares na fase inicial da doença, FR e/ou ACPA presentes em altos títulos (Mota *et al.*, 2012). A presença destas manifestações clínicas que condicionam uma doença mais agressiva poderia estar relacionada com ação de células NK e/ou receptores KIR.

A associação de suscetibilidade e/ou proteção dos genes *KIR* com manifestações clínicas da AR pode estar relacionada com a característica de suscetibilidade e proteção das células NK à patogênese da AR. Uma vez que as NK possuem características de promoção e manutenção da doença, acredita-se que as NK circulantes no sangue possam controlar a resposta autoimune na AR, mesmo em baixo em número e com função reduzida quando comparado às células do líquido sinovial. Por isso, a função dessas células na autoimunidade é contraditória e ainda incerta (Revisado em Shegarfi, Naddafi, Mirshafiey, 2012; Ahern e Brennan, 2010; Schleinitz *et al.*, 2010).

O fenótipo das células NK encontradas no líquido sinovial é consideravelmente diferente das células circulantes no organismo. Pois, as células das articulações apresentaram o aumento da expressão de receptores CD94 e CD56 e grande redução na proporção de células que expressavam CD158a/b (*KIR2DL1-3* e *S1-2*) (Pridgeon *et al.*, 2003).

Além disso, estas células também tiveram redução do RNAm codificante para CD158 a/b e baixos níveis de perforina ao se comparar células NK do sangue periférico de pacientes com AR e de controle (Pridgeon *et al.*, 2003). Portanto, as células encontradas nas articulações de pacientes com AR possuem alterações dos receptores, KIR e CD56, afetando a sensibilização e resposta destas células cuja alteração pode condicionar a condição patológica em relação aos indivíduos saudáveis.

Embora a atividade das células NK da periferia esteja diminuída em pacientes com AR em relação aos controles, as titulações no soro sanguíneo de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-18 e TNF- α encontram-se maiores nos pacientes com AR do que nos controles (Aramaki *et al.*, 2009). De toda forma, as células NK podem responder a interleucinas IL-12 e IL-15 secretadas pela linhagem de células de monócitos/macrófagos, e a partir dessa interação com outros tipos celulares, as células NK participam da produção de citocinas pró-inflamatória, e amplificação da condição inflamatória e erosiva característica da AR (Revisado em Shegarfi, Naddafi, Mirshafiey, 2012; Tian, Gershwin, Zhang, 2012; Dalbeth e Callan, 2002). Esta condição inflamatória que ocorre, portanto, pode ativar a expressão de receptores e células como as NK presentes na articulação ou que migraram da periferia (Dalbeth e Callan, 2002).

É importante lembrar que a expressão de receptores KIR ocorre em uma subpopulação de células T, sendo estas que possuem uma importante função na AR, além de preferencialmente apresentarem receptores KIR ativadores e a ausência dos receptores KIR inibidores. Desta forma, a grande expressão de receptores ativadores e a ausência dos receptores inibidores e HLA apropriado devem levar a proliferação clonal de células T auto reativas, comum na AR (Yen *et al.*, 2001; Kogure *et al.*, 2001; Middleton, Meenagh, Wright, 2007; Namekawa *et al.*, 2000).

Além disso, a expressão dos receptores KIR nas células NK pode ocorrer em diferentes combinações através de estímulos celular/molecular, resultando em um repertório de clones de NK com uma variedade de especificidades de ligantes. Por mais que não haja combinação genética dos receptores, este nível de probabilidade de variação dos receptores KIR pode estar relacionado com certos estímulos, tecidos específicos ou uma maior ou menor resposta a patógenos ou resposta autoimune (Sanchez-Mazas *et al.*, 2011; Raulet, Vance, McMahon, 2001).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste estudo de associação dos genes *KIR* em Artrite Reumatoide, e de análises epidemiológicas e clínicas, foi possível observar que:

- Os dados clínicos e epidemiológicos foram consultados através das informações dos prontuários dos pacientes com AR e catalogados em planilhas, o que permitiu a identificação destes aspectos e análise dos mesmos neste estudo.
- A amostra de pacientes e controles teve a predominância de mulheres (87%) com média de 53(\pm 12) anos e com ascendência europeia (86%). Este perfil foi semelhante em outros estudos.
- Ao observar dados clínicos e epidemiológicos, verificou-se que o tabagismo não foi associado ao desenvolvimento de AR. Contudo, em pacientes com AR com o hábito tabagista e ex-tabagista foi associado com elevados níveis de fator reumatoide (FR) (OR=2,95 e $p=0,024$), o qual é um importante marcador de diagnóstico e prognóstico da AR.
- A técnica de PCR-SSP multiplex empregada no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) associada ao uso de dois pares de *primers* para a tipagem de cada gene *KIR* forneceu confiabilidade aos resultados.
- As amostras de 147 pacientes com AR e 165 indivíduos controle foram tipadas para a presença e ausência dos genes *KIR* para a verificação da frequência dos mesmos e posteriormente comparados às frequências obtidas por estudos similares da literatura. Desta forma, foi possível observar que as frequências encontradas neste trabalho para o grupo controle aproximaram-se aos demais estudos populacionais brasileiros, porém diversos genes tiveram frequências distintas quando comparados com a população de tribos ameríndias (Amazônia). Quanto às análises de pacientes com AR, as frequências foram semelhantes aos outros estudos com AR e doenças autoimunes, excetuando estudo com AR em população de Taiwan, que foi díspar em alguns genes.

- A análise caso-controle foi realizada somente com os genes *KIR* ativadores, bem como a associação genética com dados epidemiológicos e clínicos.
- O estudo caso-controle foi realizado a partir da hipótese que a presença do gene *KIR* ativador estaria relacionado com o desenvolvimento da AR em relação ao controle, porém não foi encontrada associação significativa; embora a presença do gene ativador *KIR2DS2* tenha sido mais frequente em pacientes que em controle ($p=0,09$). Outros estudos caso-controle de genes *KIR* com AR da literatura não apresentaram associação entre tais genes com a patologia, exceto um estudo realizado em uma amostra de Taiwan. Oportunamente, foi possível verificar a associação dos genes *KIR* com outras doenças autoimunes.
- O polimorfismo dos genes *KIR* ativadores também foi analisado na presença de fatores da doença, tais como FR, manifestação articular (MA), manifestação extra-articular (MAE) e concomitantemente MA e MEA. O gene *KIR2DS2* foi associado com pacientes de AR com MA quando comparado ao controle ($OR=2,312$ e $p=0,010$). Os demais genes *KIR* ativadores também foram investigados quanto à associação a estes fatores, em relação à suscetibilidade ou proteção a manifestações clínicas na AR, porém estes resultados não se mostraram significativos.

Perspectivas

Realizar as tipagens dos outros genes *KIR* e realizar um estudo de associação e de interação destes na suscetibilidade à artrite reumatoide.

Utilizar ferramentas estatísticas mais robustas que permitam análises multivariadas, relacionando dados epidemiológicos, genéticos e clínicos, possibilitando uma melhor compreensão de fatores relacionados com a suscetibilidade à doença, diagnóstico e prognóstico.

De forma geral, este estudo permitiu investigar a possibilidade de associação dos genes *KIR* ativadores em relação à Artrite Reumatoide, relacionando-os tanto com questões epidemiológicas como clínicas na população brasileira. Além disso, este tipo de estudo tem sido muito importante na procura de um melhor entendimento da patologia e de suas condições clínicas heterogêneas, buscando identificar possíveis marcadores genéticos relacionados às doenças autoimunes, o que

auxiliaria na identificação mais precisa das diversas doenças, apontando para um tratamento mais eficiente aos pacientes. Estudos funcionais devem ser realizados para melhor compreender como os polimorfismos genéticos podem agir na patogênese da AR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahern DJ, Brennan FM. **The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Major contributors or essential homeostatic modulators?** Immunol Lett. 136(2):115-21, 2010

Alamanos Y, Drosos AA. **Epidemiology of adult rheumatoid arthritis.** Autoimmun Rev. 4(3):130-6, 2005

Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. **Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review.** Semin Arthritis Rheum. 36(3):182-8, 2006.

Albano SA, Santana-Sahagun E, Weisman MH. **Cigarette smoking and rheumatoid arthritis.** Semin Arthritis Rheum. 31(3):146-59, 2001

Alves LG, Rajalingam R, Canavez F. **A novel real-time PCR method for KIR genotyping.** Tissue Antigens. 73(2):188-91, 2008

Amur S, Parekh A, Mummaneni P. **Sex differences and genomics in autoimmune diseases.** J Autoimmun. 38(2-3):J254-65, 2012.

Andersson AK, Li C, Brennan FM. **Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis.** Arthritis Res Ther. 10(2):204, 2008.

Aramaki T, Ida H, Izumi Y, Fujikawa K, Huang M, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Nakamura H, Kawakami A, Origuchi T, Matsuoka N, Eguchi K. **A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis.** Mod Rheumatol. 19(3):245-52, 2009

Augusto DG, Zehnder-Alves L, Pincerati MR, Martin MP, Carrington M, Petzl-Erler ML. **Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population.** Immunogenetics. 64(2):143-52, 2012a

Augusto DG, Lobo-Alves SC, Melo MF, Pereira NF, Petzl-Erler ML. **Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased**

susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. PLoS One. 7(7):e39991, 2012b

Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. **Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies.** Arthritis Rheum. 59(12):1690-7, 2008.

Backström E, Kristensson K, Ljunggren HG. **Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed.** Scand J Immunol. 60(1-2):14-22, 2004

Baranzini SE. **The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective.** Curr Opin Immunol. 21(6):596-605, 2009

Bartoloni E, Alunno A, Bistoni O, Gerli R. **Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis and Systemic Autoimmune Rheumatic Disorders: a Suggested Model of Preventive Strategy.** Clin Rev Allergy Immunol. doi 10.1007/s12016-010-8251-x, 2011

Barton A, Worthington J. **Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture.** Arthritis Rheum. 61(10):1441-6, 2009

Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE. **Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned?** Immunogenetics. 63(8):459-66. doi: 10.1007/s00251-011-0528-6, 2011.

Benson RA, Patakas A, Conigliaro P, Rush CM, Garside P, McInnes IB, Brewer JM. **Identifying the cells breaching self-tolerance in autoimmunity.** J Immunol. 184(11):6378-85, 2010

Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A, Moretta L. **The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions.** J Exp Med. 183(2):645-50, 1996

Boyer JF, Gourraud PA, Cantagrel A, Davignon JL, Constantin A. **Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis.** *Joint Bone Spine.* 78(2):179-83, 2011

Brown MG, Scalzo AA. **NK gene complex dynamics and selection for NK cell receptors.** *Semin Immunol.* 20(6):361-8, 2008

Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. **Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells.** *Immunol Rev.* 214:73-91, 2006

Campbell KS, Purdy AK. **Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations.** *Immunology.* 132(3):315-25, 2011

Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. **Rheumatoid arthritis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 24(6):733-45, 2010

Carrington M, Martin MP. **The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 298:225-57, 2006

Carrington M, Norman P. **The KIR Gene Cluster.** Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10135/> 2003. Acesso em outubro de 2012.

Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL. **Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy.** *Arthritis Res Ther.* 13(4):R126, 2011

Coêlho, CC **Associação de genes KIR ao lúpus eritematoso sistêmico em Santa Catarina** [dissertação] / Cíntia Callegari Coelho; orientadora, Ilíada Rainha de Souza. – Florianópolis, SC. 126p.: Il., tabs. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, 2011

Coenen MJ, Gregersen PK. **Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape.** *Genes Immun.* 10(2):101-11, 2009

Corbacho MI, Dapuetto JJ. **Avaliação da capacidade funcional e da qualidade de vida de pacientes com artrite reumatoide.** Rev Bras Reumatol. 50(1):31-43, 2010

Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW. **Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women.** Am J Med. 119(6):503.e1-9, 2006

Dalbeth N, Callan MF. **A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints.** Arthritis Rheum. 46(7):1763-72, 2002

Deighton C, O'Mahony R, Tosh J, Turner C, Rudolf M; Guideline Development Group. **Management of rheumatoid arthritis: summary of NICE guidance.** BMJ. 338:b702. doi: 10.1136/bmj.b702. 2009

Díaz-Peña R, Vidal-Castiñeira JR, Alonso-Arias R, Suarez-Alvarez B, Vicario JL, Solana R, Collantes E, López-Vázquez A, Martínez-Borra J, López-Larrea C. **Association of the KIR3DS1*013 and KIR3DL1*004 alleles with susceptibility to ankylosing spondylitis.** Arthritis Rheum. 62(4):1000-6, 2010

Doria A, Zen M, Bettio S, Gatto M, Bassi N, Nalotto L, Ghirardello A, Iaccarino L, Punzi L. **Autoinflammation and autoimmunity: Bridging the divide.** Autoimmun Rev. 12(1):22-30, 2012

Eggleton P, Bremer E, Tarr JM, de Bruyn M, Helfrich W, Kendall A, Haigh RC, Viner NJ, Winyard PG. **Frequency of Th17 CD20+ cells in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients is higher compared to healthy subjects.** Arthritis Res Ther. 13(6):R208, 2011

Ewerton PD, Leite M de M, Magalhães M, Sena L, Melo dos Santos EJ. **Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles.** Immunogenetics. 59(8):625-30, 2007

Farag SS, Caligiuri MA. **Human natural killer cell development and biology.** Blood Rev. 20(3):123-37, 2006

Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. **Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect.** *Blood.* 100(6):1935-47, 2002

Farng E, Friedrich JB. **Laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis.** *J Hand Surg Am.* 36(5):926-7; quiz 928, 2011

Farragher TM, Lunt M, Plant D, Bunn DK, Barton A, Symmons DP. **Benefit of early treatment in inflammatory polyarthritis patients with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies versus those without antibodies.** *Arthritis Care Res (Hoboken).* 62(5):664-75, 2010

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. **Rheumatoid arthritis.** *Cell.* 85(3):307-10, 1996

Ferraz MB. **Tropical rheumatology. Epidemiology and community studies: Latin America.** *Baillieres Clin Rheumatol.* 9(1):1-9, 1995

Firestein GS. **Evolving concepts of rheumatoid arthritis.** *Nature.* 423(6937):356-61, 2003

Flodström-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Höglund P, Ljunggren HG. **Natural killer cells in human autoimmunity.** *Curr Opin Immunol.* 21(6):634-40, 2009

Gabriel SE, Crowson CS. **Risk factors for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol.* 24(2):171-6, 2012

Galanter JM, Fernandez-Lopez JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernandez-Rozadilla C, Via M, Hidalgo-Miranda A, Contreras AV, Figueroa LU, Raska P, Jimenez-Sanchez G, Zolezzi IS, Torres M, Ponte CR, Ruiz Y, Salas A, Nguyen E, Eng C, Borjas L, Zabala W, Barreto G, González FR, Ibarra A, Taboada P, Porras L, Moreno F, Bigham A, Gutierrez G, Brutsaert T, León-Velarde F, Moore LG, Vargas E, Cruz M, Escobedo J, Rodriguez-Santana J, Rodriguez-Cintrón W, Chapela R, Ford JG, Bustamante C, Seminara D, Shriver M, Ziv E, Burchard EG, Haile R, Parra E, Carracedo A; LACE Consortium. **Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas.** *PLoS Genet.* 8(3):e1002554, 2012

Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J, Garcia-Porrua C, Gonzalez-Gay MA. **Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease.** *Medicine (Baltimore)*. 82(6):407-13, 2003

Goris A, Dobosi R, Boonen S, Nagels G, Dubois B. **KIR2DL4 (CD158d) polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis.** *J Neuroimmunol*. 210(1-2):113-5, 2009

Gregersen PK, Behrens TW. **Genetics of autoimmune diseases-disorders of immune homeostasis.** *Nat Rev Genet*. 7(12):917-28, 2006

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. **The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*. 30(11):1205-13, 1987

Gregersen PK. **Susceptibility genes for rheumatoid arthritis - a rapidly expanding harvest.** *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 68(3):179-82, 2010

Harney S, Wordsworth BP. **Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis.** *Tissue Antigens*. 60(6):465-73, 2002

HDS EpiMax Table Calculator. Disponível em:
<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm> Acesso em agosto 2012.

Hemdan NY, Birkenmeier G, Wichmann G, Abu El-Saad AM, Krieger T, Conrad K, Sack U. **Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity.** *Autoimmun Rev*. 9(11):785-92, 2010

Hollenbach JA, Meenagh A, Sleator C, Alaez C, Bengoche M, Canossi A, Contreras G, Creary L, Evseeva I, Gorodezky C, Hardie RA, Karlsen TH, Lie B, Luo M, Martinetti M, Navarette C, de Oliveira DC, Ozzella G, Pasi A, Pavlova E, Pinto S, Porto LC, Santos P, Slavcev A, Srinak D, Tavoularis S, Tonks S, Trachtenberg E, Vejbaesya S, Middleton D. **Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci**

and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA. *Tissue Antigens.* 76(1):9-17, 2010

Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Ståhle M, Sánchez FO. **Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis.** *J Invest Dermatol.* 125(4):721-30, 2005

Hou L, Jiang B, Chen M, Ng J, Hurley CK. **The characteristics of allelic polymorphism in killer-immunoglobulin-like receptor framework genes in African Americans.** *Immunogenetics.* 63(9):549-59, 2011

Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. **The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism.** *Immunol Rev.* 190:40-52, 2002

Ide MR, Gonzalez-Gay MA, Yano KC, Imai MJ, de Andrade MC Jr, Llorca J. **Functional capacity in rheumatoid arthritis patients: comparison between Spanish and Brazilian sample.** *Rheumatol Int.* 31(2):221-6, 2011

IPD-KIR Database. Disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/> Acesso em 19 de novembro de 2012.

Jäger A, Kuchroo VK. **Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation.** *Scand J Immunol.* 72(3):173-84, 2010

Jiao YL, Zhang BC, You L, Li JF, Zhang J, Ma CY, Cui B, Wang LC, Chen ZJ, Zhao YR. **Polymorphisms of KIR gene and HLA-C alleles: possible association with susceptibility to HLA-B27-positive patients with ankylosing spondylitis.** *J Clin Immunol.* 30(6):840-4, 2010

Jobim M, Salim PH, Portela P, Wilson TJ, Fraportti J, Baronio D, Gil B, Penna LS, Roesler R, Jobim LF, Schwartzmann G. **Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Caucasian population of southern Brazil.** *Int J Immunogenet.* 37(2):83-9, 2010a

Jobim M, Chagastelles P, Salim PH, Portela P, Wilson TJ, Curti AG, Jobim MR, João DA, Nardi NB, Tschiedel B, Jobim LF, Roesler R, Schwartzmann G. **Association of killer cell immunoglobulin-like**

receptors and human leukocyte antigen-C genotypes in South Brazilian with type 1 diabetes. *Hum Immunol.* 71(8):799-803, 2010b

Jobim M, Jobim LF. **Natural killer cells and immune surveillance.** *J Pediatr (Rio J).* 84(4 Suppl):S58-67, 2008

Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. **IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages.** *J Immunol.* 160(7):3513-21, 1998

Kelsey JL, Thompson WD, Evans AS. **Methods in Observational Epidemiology**, pp 1-76. New York: Oxford University Press, 1986

Kikuchi-Maki A, Yusa S, Catina TL, Campbell KS. **KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production.** *J Immunol.* 171(7):3415-25, 2003

Klareskog L, Catrina AI, Paget S. **Rheumatoid arthritis.** *Lancet.* 373(9664):659-72, 2009

Klareskog L, Malmström V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. **Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Semin Immunol.* 23(2):92-8, 2011

Kogure T, Niizawa A, Hai LX, Fujinaga H, Shimada Y, Ochiai H, Terasawa K. **Effect of interleukin 2 on killer cell inhibitory receptors in patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis.* 60(2):166-9, 2001

Kogure T, Tatsumi T, Niizawa A, Fujinaga H, Ito T, Shimada Y, Terasawa K. **No correlation exists between disease activity and the expression of killer-cell immunoglobulin-like receptors in patients with rheumatoid arthritis.** *Mediators Inflamm.* 2007:65179, 2007

Kolls JK, Lindén A. **Interleukin-17 family members and inflammation.** *Immunity.* 21(4):467-76, 2004

Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. **The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease.** *Semin Immunol.* 20(6):343-52, 2008

Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. **KIR genotyping by multiplex PCR-SSP.** *Methods Mol Biol.* 612:365-75, 2010

Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. **Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis.** *Biologics.* 6:73-82, 2012

Lanier LL. **NK cell receptors.** *Annu Rev Immunol.* 16:359-93, 1998

Lee SH, Miyagi T, Biron CA. **Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare.** *Trends Immunol.* 28(6):252-9, 2007

Lettre G, Rioux JD. **Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies.** *Hum Mol Genet.* 17(R2):R116-21, 2008

Louzada-Junior P, Souza BDB, Toledo RA, Ciconelli RM. **Análise Descritiva das Características Demográficas e Clínicas de Pacientes com Artrite Reumatóide no Estado de São Paulo, Brasil.** *Rev Bras Reumatol.* 47(2):84-90, 2007

Lowe DP, Cook MA, Bowman SJ, Briggs DC; UK Sjögren's Interest Group. **Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with primary Sjogren's syndrome.** *Rheumatology (Oxford).* 48(4):359-62, 2009

Łuszczek W, Mańczak M, Cisko M, Nockowski P, Wiśniewski A, Jasek M, Kuśnierzcyk P. **Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris.** *Hum Immunol.* 65(7):758-66, 2004

MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. **Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.** *Arthritis Rheum.* 43(1):30-7, 2000

Majorczyk E, Pawlik A, Łuszczek W, Nowak I, Wiśniewski A, Jasek M, Kuśnierzcyk P. **Associations of killer cell immunoglobulin-like**

receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 8(8):678-83, 2007

Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, Wade J, Wilson MJ, Trowsdale J, Gladman D, Carrington M. **Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles.** *J Immunol.* 169(6):2818-22, 2002

Matsui T, Otsuka M, Maenaka K, Furukawa H, Yabe T, Yamamoto K, Nishioka K, Kato T. **Detection of autoantibodies to killer immunoglobulin-like receptors using recombinant fusion proteins for two killer immunoglobulin-like receptors in patients with systemic autoimmune diseases.** *Arthritis Rheum.* 44(2):384-8, 2001

Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD. **A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey.** *Tissue Antigens.* 60(3):254-8, 2002

McGeough CM, Berrar D, Wright G, Mathews C, Gilmore P, Cunningham RT, Bjourson AJ. **Killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen-C genotypes in rheumatoid arthritis primary responders and non-responders to anti-TNF- α therapy.** *Rheumatol Int.* 32(6):1647-53, 2012

McInnes IB, Schett G. **Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Immunol.* 7(6):429-42, 2007

McInnes IB, Schett G. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med.* 365(23):2205-19, 2011

Middleton D, Meenagh A, Wright GD. **No association in frequency of KIR receptors in patients with rheumatoid arthritis from Northern Ireland.** *Tissue Antigens.* 69(6):577-82, 2007

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Res.* 16(3):1215, 1988

Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Inoue I, Kulski JK, Inoko H. **Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis.** *Tissue Antigens.* 80(1):16-25, 2012

Momot T, Koch S, Hunzelmann N, Krieg T, Ulbricht K, Schmidt RE, Witte T. **Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma.** *Arthritis Rheum.* 50(5):1561-5, 2004

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. **Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells.** *Annu Rev Immunol.* 14:619-48, 1996

Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L. **Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells.** *J Exp Med.* 182(3):875-84, 1995

Morgun A, Godcalves-Primo A, Shulzhenko N, Rampim GF, Mine KL, Gerbase-DeLima M. **HLA-DQB1 and -DRB1 alleles, cytokine polymorphisms and KIR gene frequencies in a population (caucasian) from South East Brazil.** *Human Immunology* 65, 879–82, 2004

Mota LM, dos Santos Neto LL, Burlingame R, Ménard HA, Laurindo IM. **Laboratory characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis.** *Rev Bras Reumatol.* 50(4):375-88, 2010

Mota LMH, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, de Freitas MVC, da Silva NA, Louzada-Júnior P, Giorgi RDN, Lima RAC, Pinheiro GRC. **Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide.** *Rev Bras Reumatol.* 52(2):135-174, 2012

Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, Goronzy JJ. **Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis.** *J Immunol.* 165(2):1138-45, 2000

Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. **Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis.** *J Immunol.* 173(7):4273-6, 2004

Ni Choileain N, Redmond HP. **Regulatory T-cells and autoimmunity.** *J Surg Res.* 130(1):124-35, 2006

Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tanii H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. **Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population.** *Nat Genet.* 44(5):511-6, 2012

Orr MT, Lanier LL. **Natural killer cell education and tolerance.** *Cell.* 142(6):847-56, 2010

Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Hilton HG, Guethlein LA. **Review: Immunogenetics of human placentation.** *Placenta.* 33 Suppl:S71-80, 2012

Parham P. **Influence of KIR diversity on human immunity.** *Adv Exp Med Biol.* 560:47-50, 2005

Parham P. **Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development.** *Immunol Rev.* 214:155-60, 2006

Pearce SH, Merriman TR. **Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity.** *Trends Mol Med.* 12(2):90-8, 2006

Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP, Oliveira LF, Henderson BL, Castro AP, Maia MH, Barbosa FB, Santos SE, Guerreiro JF, Sena L, Santos EJ. **Systemic lupus erythematosus:**

association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus*. 20(3):265-73, 2011

Pellett F, Siannis F, Vukin I, Lee P, Urowitz MB, Gladman DD. **KIRs and autoimmune disease: studies in systemic lupus erythematosus and scleroderma.** *Tissue Antigens*. 69 Suppl 1:106-8, 2007

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. **The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected.** *PLoS One*. 6(2):e17063, 2011

Pereira IA, Borba EF. **The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis.** *Swiss Med Wkly*. 138(37-38):534-9, 2008

Perricone R, Perricone C, De Carolis C, Shoenfeld Y. **NK cells in autoimmunity: a two-edg'd weapon of the immune system.** *Autoimmun Rev*. 7(5):384-90, 2008

Płoski R, Luszczek W, Kuśnierczyk P, Nockowski P, Cisło M, Krajewski P, Malejczyk J. **A role for KIR gene variants other than KIR2DS1 in conferring susceptibility to psoriasis.** *Hum Immunol*. 67(7):521-6, 2006

Pollard KM. **Gender differences in autoimmunity associated with exposure to environmental factors.** *J Autoimmun*. 38(2-3):J177-86, 2012

Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. **Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus.** *Semin Arthritis Rheum* 39:257-68, 2010

Pridgeon C, Lennon GP, Pazmany L, Thompson RN, Christmas SE, Moots RJ. **Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid**

arthritis patients exhibit a CD56 bright,CD94 bright,CD158 negative phenotype. *Rheumatology (Oxford)*. 42(7):870-8, 2003

Purdy AK, Campbell KS. **Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR).** *Cancer Biol Ther*. 8(23):2211-20, 2009

Pyo CW, Guethlein LA, Vu Q, Wang R, Abi-Rached L, Norman PJ, Marsh SG, Miller JS, Parham P, Geraghty DE. **Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus.** *PLoS One*. 5(12):e15115, 2010

Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. **Regulation of the natural killer cell receptor repertoire.** *Annu Rev Immunol*. 19:291-330, 2001

Raulet DH. **Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells.** *Semin Immunol*. 18(3):145-50, 2006

Raychaudhuri S. **Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol*. 22(2):109-18, 2010

Rudnick CC, Franceschi DS, Marangon AV, Guelsin GA, Sell AM, Visentainer JE. **Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná.** *Hum Immunol*. 69(12):872-6, 2008

Ruyssen-Witrand A, Constantin A, Cambon-Thomsen A, Thomsen M. **New insights into the genetics of immune responses in rheumatoid arthritis.** *Tissue Antigens*. 80(2):105-18, 2012

Salim PH, Jobim M, Bredemeier M, Chies JA, Schlottfeldt J, Brenol JC, Jobim LF, Xavier RM. **Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes in systemic sclerosis.** *Clin Exp Immunol*. 160(3):325-30, 2010

Salzano FM, Freire-Maia SM. **Problems in Human Biology. A Study of Brazilian Populations.** Detroit: Wayne State University Press; 1970.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2001

Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, Rajalingam R, Dugoujon JM, Mack SJ, Thorsby E. **Immunogenetics as a tool in anthropological studies**. *Immunology*. 133(2):143-64, 2011

Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. **Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel**. *Hum Mutat*. 31(2):184-90, 2010

Schleinitz N, Vély F, Harlé JR, Vivier E. **Natural killer cells in human autoimmune diseases**. *Immunology*. 131(4):451-8, 2010

Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. **Rheumatoid arthritis**. *Lancet*. 376(9746):1094-108, 2010

Selmi C. **Autoimmunity in 2010**. *Autoimmun Rev*. 10(12):725-32, 2011

Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, Ferraz MB. **Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach**. *J Rheumatol*. 31(3):594-7, 2004

Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. **Natural killer cells and their role in rheumatoid arthritis: friend or foe?** *Scientific World Journal*. 2012:491974. doi: 10.1100/2012/491974, 2012

Silman AJ, Pearson JE. **Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis**. *Arthritis Res*. 4 Suppl 3:S265-72, 2002

Silva AF, Matos AN, Lima AMS, Lima EF, Correa MICC, Carvalho EM. **Associação do Anticorpo Anticitrulina e Gravidade da Artrite Reumatoide**. *Rev Bras Reumatol*. 46(3):165-173, 2006a

Silva AF, Matos AN, Lima AMS, Lima EF, Gaspar AP, Braga JAF, Carvalho EM. **Valor Diagnóstico do Anticorpo Antipeptídeo Citrulinado Cíclico na Artrite Reumatoide**. *Rev Bras Reumatol*. 46(3):174-180, 2006b

Singh KM, Phung YT, Kohla MS, Lan BY, Chan S, Suen DL, Murad S, Rheault S, Davidson P, Evans J, Singh M, Dohil S, Osorio RW, Wakil AE, Page K, Feng S, Cooper SL. **KIR genotypic diversity can track ancestries in heterogeneous populations: a potential confounder for disease association studies.** *Immunogenetics.* 64(2):97-109, 2012

Single RM, Martin MP, Meyer D, Gao X, Carrington M. **Methods for assessing gene content diversity of KIR with examples from a global set of populations.** *Immunogenetics.* 60(12):711-25, 2008

Smolen JS, Steiner G. **Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Drug Discov.* 2(6):473-88, 2003

Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. **New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2(11):850-61, 2002

Snyder MR, Weyand CM, Goronzy JJ. **The double life of NK receptors: stimulation or co-stimulation?** *Trends Immunol.* 25(1):25-32, 2004

Souza AW, Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Cruvinel Wde M, Andrade LE, da Silva NP. **Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity.** *Rev Bras Reumatol.* 50(6):665-79, 2010

Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, Li Y, Kurreeman FA, Zhernakova A, Hinks A, Guiducci C, Chen R, Alfredsson L, Amos CI, Ardlie KG; BIRAC Consortium, Barton A, Bowes J, Brouwer E, Burt NP, Catanese JJ, Coblyn J, Coenen MJ, Costenbader KH, Criswell LA, Crusius JB, Cui J, de Bakker PI, De Jager PL, Ding B, Emery P, Flynn E, Harrison P, Hocking LJ, Huizinga TW, Kastner DL, Ke X, Lee AT, Liu X, Martin P, Morgan AW, Padyukov L, Posthumus MD, Radstake TR, Reid DM, Seielstad M, Seldin MF, Shadick NA, Steer S, Tak PP, Thomson W, van der Helm-van Mil AH, van der Horst-Bruinsma IE, van der Schoot CE, van Riel PL, Weinblatt ME, Wilson AG, Wolbink GJ, Wordsworth BP; YEAR Consortium, Wijmenga C, Karlson EW, Toes RE, de Vries N, Begovich AB, Worthington J, Siminovitch KA, Gregersen PK, Klareskog L, Plenge RM. **Genome-wide association study meta-analysis identifies**

seven new rheumatoid arthritis risk loci. Nat Genet. 42(6):508-14, 2010

Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, Alfredsson L; EIRA study group. **Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases.** Ann Rheum Dis. 62(9):835-41, 2003

Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, Alfredsson L; EIRA study group. **Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases.** Ann Rheum Dis. 62(9):835-41, 2003

Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T, Muto M. **Genetic polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris.** J Invest Dermatol. 122(5):1133-6, 2004

Symmons DP. **Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome.** Best Pract Res Clin Rheumatol. 16(5):707-22, 2002

Teixeira RCA, Júnior AG, De Martino MC, Martins LC, Lopes AC, Tufik S. **Marcadores de Ativação Endotelial e Auto-Anticorpos na Artrite Reumatoide.** Rev Bras Reumatol. 47(6): 411-17, 2007

Tian Z, Gershwin ME, Zhang C. **Regulatory NK cells in autoimmune disease.** J Autoimmun. 39(3):206-15, 2012

Tobón GJ, Pers JO, Cañas CA, Rojas-Villarraga A, Youinou P, Anaya JM. **Are autoimmune diseases predictable?** Autoimmun Rev. 11(4):259-66, 2012

Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. **The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis.** J Autoimmun. 35(1):10-4, 2010

Uhrberg M, Parham P, Wernet P. **Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR**

haplotypes contain between seven and eleven KIR genes.

Immunogenetics. 54(4):221-9, 2002

Uhrberg M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. Eur J Immunol. 35(1):10-5, 2005

van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. **Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis.** Arthritis Res Ther. 7(5):R949-58, 2005

van der Linden MP, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TW, Toes RE, van der Helm-van Mil AH. **Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum. 60(8):2232-41, 2009

van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ. **KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects.** Diabetes. 52(10):2639-42, 2003

van Venrooij WJ, Zendman AJ, Pruijn GJ. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev. 6(1):37-41, 2006

Vilches C, Parham P. **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** Annu Rev Immunol. 20:217-51, 2002

Vittecoq O, Lequerré T, Goëb V, Le Loët X, Abdesselam TA, Klemmer N. **Smoking and inflammatory diseases.** Best Pract Res Clin Rheumatol. 22(5):923-35, 2008

Vivier E, Nunès JA, Vély F. **Natural killer cell signaling pathways.** Science. 306(5701):1517-9, 2004

Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. **Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells.** *Science*. 331(6013):44-9, 2011

Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. **Functions of natural killer cells.** *Nat Immunol*. 9(5):503-10, 2008

Vries R. **Genetics of rheumatoid arthritis: time for a change!** *Curr Opin Rheumatol*. 23(3):227-32, 2011

Wang S, Li G, Ge R, Duan Z, Zeng Z, Zhang T, Gao J, Yang T, Liu S, Wu S, Fan D, Xu S, Xu J, Zhang L, Shuai Z, Ye D, Zou Y, Pan F. **Association of KIR genotype with susceptibility to HLA-B27-positive ankylosing spondylitis.** *Mod Rheumatol*. doi 10.1007/s10165-012-0692-z, 2012

Woolf B. **On estimating the relation between blood group and disease.** *Ann Hum Genet*. 19(4):251-3, 1955

Worthington J. **Looking back: developments in our understanding of the genetic epidemiology of rheumatoid arthritis over the last 50 years.** *Rheumatology (Oxford)*. 44 Suppl 4:iv5-iv8, 2005

WTCCC – Wellcome Trust Case Control Consortium. **Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.** *Nature*. 447(7145):661-78, 2007

Yen JH, Lin CH, Tsai WC, Wu CC, Ou TT, Hu CJ, Liu HW. **Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis.** *Scandinavian J Rheumatol*. 35(2):124–12, 2006

Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ. **Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis.** *J Exp Med*. 193(10):1159-67, 2001

Zhi D, Sun C, Sedimbi SK, Luo F, Shen S, Sanjeevi CB. **Killer cell immunoglobulin-like receptor along with HLA-C ligand genes are associated with type 1 diabetes in Chinese Han population.** *Diabetes Metab Res Rev*. 27(8):872-7, 2011

**APÊNDICE A – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO HÁBITO
TABAGISTA COM A PRESENÇA DO FATOR REUMATOIDE
EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

	tabagista	não tabagista	OR	IC 95%	<i>p</i>
Fator Reumatoide+	10	38	3,158	0,715-15,8	0,159
Fator Reumatoide-	3	36			
	tabagista+	não			
	ex-tabagista	tabagista			
Fator Reumatoide+	28	38	2,947	1,134-7,82	0,024
Fator Reumatoide-	9	36			
	ex-tabagista	não			
		tabagista			
Fator Reumatoide+	18	38	2,842	0,924-9,09	0,072
Fator Reumatoide-	6	36			

**APÊNDICE B – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES *KIR*
ATIVADORES NA SUSCETIBILIDADE À ARTRITE
REUMATOIDE**

KIR2DS2	Presença	Ausência	OR	IC 95%	<i>p</i>
Artrite Reumatoide	87	55	1,524	0,94-2,473	0,090
Controle	82	79			
KIR2DS5	Presença	Ausência	OR	IC 95%	<i>p</i>
Artrite Reumatoide	49	95	1,240	0,742-2,072	0,455
Controle	47	113			
KIR2DS3	Presença	Ausência	OR	IC 95%	<i>p</i>
Artrite Reumatoide	41	101	0,728	0,43-1,229	0,256
Controle	53	95			
KIR3DS1	Presença	Ausência	OR	IC 95%	<i>p</i>
Artrite Reumatoide	50	96	0,936	0,564-1,55	0,880
Controle	54	97			
KIR2DS1	Presença	Ausência	OR	IC 95%	<i>p</i>
Artrite Reumatoide	58	86	0,899	0,555-1,456	0,734
Controle	69	92			
KIR2DS4	Presença	Ausência	OR	IC 95%	<i>p</i>
Artrite Reumatoide	137	9	0,706	0,23-2,137	0,675
Controle	151	7			

**APÊNDICE C – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES *KIR*
ATIVADORES NA SUSCETIBILIDADE DA PRESENÇA DE
DADOS CLÍNICOS NA ARTRITE REUMATOIDE E
CONTROLE**

<i>KIR2DS2</i>					
	AR FR+	Controle	OR	IC	<i>p</i>
Presença	43	82	1,429	0,783-2,610	0,271
Ausência	29	79			
<i>AR MA +</i>					
	AR MA +	Controle			
Presença	51	82	1,489	0,842-2,638	0,186
Ausência	33	79			
<i>AR MEA +</i>					
	AR MEA +	Controle			
Presença	48	82	2,312	1,211-4,441	0,010
Ausência	20	79			
<i>AR MA e MEA+</i>					
	AR MA e MEA+	Controle			
Presença	30	82	2,064	0,968-4,446	0,062
Ausência	14	79			

<i>KIR2DS5</i>					
	AR FR+	Controle	OR	IC	<i>p</i>
Presença	22	47	1,037	0,542-1,979	1,000
Ausência	51	113			
<i>AR MA +</i>					
	AR MA +	Controle			
Presença	30	47	1,361	0,746-2,480	0,353
Ausência	53	113			
<i>AR MEA +</i>					
	AR MEA +	Controle			
Presença	20	47	1,002	0,512-1,951	1,000
Ausência	48	113			
<i>AR MA e MEA +</i>					
	AR MA e MEA +	Controle			
Presença	14	47	1,161	0,529-2,529	0,829
Ausência	29	113			

<i>KIR2DS3</i>					
	AR FR+	Controle	OR	IC	<i>p</i>
Presença	20	53	0,676	0,349-1,304	0,272
Ausência	53	95			
	AR MA +	Controle			
Presença	23	53	0,687	0,366-1,284	0,267
Ausência	60	95			
	AR MEA+	Controle			
Presença	23	53	0,916	0,478-1,749	0,896
Ausência	45	95			
	AR MA e MEA+	Controle			
Presença	14	53	0,837	0,383-1,811	0,758
Ausência	30	95			

<i>KIR3DS1</i>					
	AR FR+	Controle	OR	IC	<i>p</i>
Presença	20	54	0,665	0,344-1,278	0,247
Ausência	54	97			
	AR MA +	Controle			
Presença	30	54	0,998	0,550-1,807	1,000
Ausência	54	97			
	AR MEA+	Controle			
Presença	25	54	0,998	0,529-1,878	1,000
Ausência	45	97			
	AR MA e MEA+	Controle			
Presença	16	54	0,991	0,466-2,094	1,000
Ausência	29	97			

<i>KIR2DS1</i>					
	AR FR+	Controle	OR	IC	<i>p</i>
Presença	26	69	0,722	0,392-1,326	0,329
Ausência	48	92			
	AR MA +	Controle			
Presença	33	69	0,880	0,495-1,562	0,743
Ausência	50	92			
	AR MEA+	Controle			
Presença	25	69	0,775	0,361-1,227	0,212
Ausência	43	92			
	AR MA e MEA+	Controle			
Presença	16	69	0,790	0,373-1,664	0,621
Ausência	27	92			

<i>KIR2DS4</i>					
	AR FR+	Controle	OR	IC	<i>p</i>
Presença	65	151	0,502	0,144-1,766	0,365
Ausência	6	7			
	AR MA+	Controle			
Presença	46	151	0,305	0,090-1,029	0,057
Ausência	7	7			
	AR MEA +	Controle			
Presença	43	151	0,664	0,146-3,401	0,849
Ausência	3	7			
	AR MA+MEA +	Controle			
Presença	43	151	0,997	0,180-7,207	1,000
Ausência	2	7			

**APÊNDICE D – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DA PRESENÇA
DOS GENES *KIR* ATIVADORES E MANIFESTAÇÕES
CLÍNICAS EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

<i>KIR2DS2</i>	Presença	Ausência	OR	IC	<i>p</i>
FR +	43	29	0,855438	0,359-2,028	0,852
FR-	26	15			
MA +	51	33	1,159091	0,320-4,136	1,000
MA -	8	6			
MEA +	48	20	2,133333	0,935-4,892	0,074
MEA -	27	24			
MA-MEA+	30	14	8,571429	0,764-218,319	0,103
MA-MEA -	1	4			

<i>KIR2DS5</i>	Presença	Ausência	OR	IC	<i>p</i>
FR +	22	51	0,831933	0,341-2,039	0,817
FR-	14	27			
MA +	30	53	0,943396	0,278-3,281	1,000
MA -	6	10			
MEA +	20	48	0,723684	0,313-1,674	0,529
MEA -	19	33			
MA-MEA+	14	29	2,413793	0,228-58,983	0,750
MA-MEA -	1	5			

<i>KIR2DS3</i>	Presença	Ausência	OR	IC	<i>p</i>
FR +	20	53	0,783745	0,313-1,970	0,723
FR-	13	27			
MA +	23	60	0,638889	0,184-2,258	0,625
MA -	6	10			
MEA +	23	45	1,618519	0,662-3,994	0,342
MEA -	12	38			
MA-MEA+	14	30	2,333333	0,221-56,953	0,776

MA-MEA -	1	5			
----------	---	---	--	--	--

<i>KIR3DS1</i>	Presença	Ausência	OR	IC	<i>p</i>
FR +	20	54	0,448343	0,187-1,069	0,073
FR-	19	23			
MA +	30	54	1,018519	0,306-3,478	1,000
MA -	6	11			
MEA +	25	45	1,25	0,544-2,887	0,705
MEA -	16	36			
MA-MEA+	16	29	8,39	0,533-4801,183	0,211
MA-MEA -	0	7			

<i>KIR2DS1</i>	Presença	Ausência	OR	IC	<i>p</i>
FR +	26	48	0,69213	0,295-1,623	0,468
FR-	18	23			
MA +	33	50	0,7425	0,232-2,386	0,774
MA -	8	9			
MEA +	25	43	0,885936	0,396-1,982	0,895
MEA -	21	32			
MA-MEA+	16	27	1,481481	0,212-12,593	0,987
MA-MEA -	2	5			

<i>KIR2DS4</i>	Presença	Ausência	OR	IC	<i>p</i>
FR +	65	6	0,77381	0,144-3,755	1,000
FR-	42	3			
MA +	46	7	0,469388	0,020-4,474	0,810
MA -	14	1			
MEA +	43	3	2,965517	0,589-16,509	0,251
MEA -	29	6			
MA-MEA+	43	2	1,338	0,002-33,967	1,000
MA-MEA -	6	0			

APÊNDICE E – COMPILAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS GENES *KIR* EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS

	n*	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DS1	3DP1	Ref
Curitiba (PR)	153	0,974	0,594	0,846	1,000	0,519	0,947	0,421	0,592	0,325	0,936	0,319	0,927	1,000	1,000	0,373		a
Maringá (PR)	289	0,972	0,470	0,893	1,000	0,526	0,969	0,408	0,471	0,266	0,938	0,346	0,941	1,000	1,000	0,391	1,000	b
São Paulo (SP)	55	1,000	0,491	0,854	1,000	0,364		0,454	0,473	0,291	0,382	0,327	0,873			0,364		c
Belo Horizonte (MG)	90	0,967	0,522	0,944		0,589		0,378	0,533	0,389	0,956	0,322	0,967			0,400		d
Rio de Janeiro (RJ)	166	0,970	0,560	0,873		0,614		0,416	0,566	0,313	0,952	0,404	0,964			0,386		d
Amazônia - ameríndios (AM)	40	0,930	0,650	0,800		0,850		0,880	0,580	0,100	0,780	0,900	0,650			0,700		e
Porto Alegre (RS)	146	0,980	0,560	0,840	1,000	0,540	1,000	0,380	0,550	0,370	0,955	0,350	0,985	1,000	1,000	0,396		f
Santa Catarina	165	1,000	0,706	0,913	1,000	0,750	0,989	0,429	0,509	0,358	0,956	0,294	1,000	1,000	1,000	0,358	1,000	g

*n: valores de n variam de acordo com o número de indivíduos amplificados para cada gene. Célula em branco significa que não houve resultado deste gene.

a: Augusto *et al.*, 2011

b: Rudnick *et al.*, 2008

c: Morgun *et al.*, 2004

d: Hollenbach *et al.*, 2010

e: Ewerton *et al.*, 2007

f: Jobim *et al.*, 2010a

g: Presente estudo

**APÊNDICE F – COMPILAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DOS
GENES *KIR* EM ESTUDOS COM ARTRITE REUMATOIDE NO
MUNDO E OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES NO BRASIL**

Doença/País	n*	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DP1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS4 del	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DS1	3DP1	Ref
Artrite Reumatoide																			
Irlanda do Norte	331	0,982	0,489	0,949	1,000	0,462		0,344	0,486	0,269	0,964		0,308	0,964	1,000	1,000	0,375		a
Polônia	177	0,994	0,548	0,921				0,362	0,566	0,288	0,305	0,853	0,232	0,938			0,333		b
E.U.A.	70							0,571	0,557										c
Taiwan	572	0,125	0,528	0,570				0,097	0,250		0,208								d
Brasil (Santa Catarina)	147	1,000	0,768	0,944	1,000	0,712	1,000	0,402	0,613	0,289	0,938		0,340	1,000	1,000	1,000	0,343	0,966	e
Diabetes tipo1																			
Brasil (Rio Grande do Sul)	248	0,956	0,492	0,879	0,992	0,560	1,000	0,464	0,528	0,339	0,852		0,371	0,952	1,000	1,000	0,476		f
Esclerose Sistêmica																			
Brasil (Rio Grande do Sul)	100	0,973	0,291	0,827	0,982	0,527	0,991	0,200	0,536	0,300	0,954		0,136	0,964	0,982	0,973	0,382		g
Lúpus Eritematoso Sistêmico																			
Brasil (Santa	165	0,982	0,776	0,933		0,799	0,970	0,509	0,506	0,393	0,872		0,677	0,963			0,558		h

Catarina)																				
Brasil (Pará)	111	0,963	0,762	0,929	0,988	0,750	0,949	0,524	0,548	0,357	0,893		0,595	0,917	0,988	0,952	0,655			i
Pênfigo foliáceo																				
Brasil (Paraná)	233	0,954	0,534	0,842	1,000	0,595	0,958	0,343	0,511	0,217	0,944		0,312	0,940	0,991	1,000	0,338	1,000		j

*n: valores de n variam de acordo com o número de indivíduos amplificados para cada gene. Célula em branco significa que não houve resultado deste gene.

a: Middleton, Meenagh, Wright 2007

b: Majorczyk *et al.*, 2007

c: Yen *et al.*, 2001

d: Yen *et al.*, 2006

e: Presente estudo

f: Jobim *et al.*, 2010b

g: Salim *et al.*, 2010

h: Coêlho, 2011

i: Pedroza *et al.*, 2011

i: Augusto *et al.*, 2012

**APÊNDICE G – COMPILAÇÃO DOS ESTUDOS DE
ASSOCIAÇÃO DOS GENES *KIR* EM DOENÇAS AUTOIMUNES**

Doença	População	n	Gene	OR (CI)	p	Referência
Artrite Reumatoide	EUA (euro-descendente)	30 casos, 76 controle	KIR2DS2/HLA-Cw03 (vasculite)	5,56 (1,92-16,04)	0,001	Yen <i>et al.</i> , 2001
	Taiwan	122 casos, 96 controle	KIR2DS4 KIR2DL1	1,9 (1,1 – 3,4) 2,1 (1,2 – 3,9)	< 0,001 < 0,02	Yen <i>et al.</i> , 2006
	Polônia	177 casos, 243 controle	KIR2DL2+ KIR2DS2+ KIR2DS1- KIR3DS1-	Associação risco e proteção a dados clínicos	<0,05	Majorczyk <i>et al.</i> , 2007
	Reino Unido	331 casos, 354 controle	sem associação			Middleton <i>et al.</i> , 2007
Artrite psoriática	Canadá	366 casos, 299 controle	KIR2DS1/2DS2 HLA-Cw-(lig 2DL2/3)	27% vs 15%	1x10 ⁻⁵	Martin <i>et al.</i> , 2002 Nelson <i>et al.</i> , 2004
Diabetes tipo I	Holanda	149 casos, 207 controle	KIR2DS2/HLAC (Asn 80)	49% vs 41%,	0,03	van der Slik <i>et al.</i> , 2003
	Brasil	248 casos, 250 controle	KIR3DS1/HLABw4 KIR2DL1/HLAC2 KIR2DL2/HLADR3 e DR3/DR4 KIR2DL1/HLAC2- KIR2DL1/C2+ vs. 2DL2/DR3 e DR3/DR4+ KIR2DL1/C2+ vs 2DL2/DR3	>1,0 >1,0 >1,0 <1,0	0,018 0,001 <0,001 0,005 0,008 <0,001	Jobim <i>et al.</i> , 2010
	China	259 casos, 262 controle	KIR2DL2-/HLA-C1+ KIR2DL3+/HLA-C1+ KIR2DS2-/HLAC1+ KIR2DL1+/HLA-C2- KIR2DL2-/HLA-C1- KIR2DL3+/HLA-C1- KIR2DS2-/HLAC1-	2,13(1,48–3,05) 1,95(1,38–2,76) 1,97(1,37–2,82) 0,56(0,40–0,79) 0,55(0,38–0,80) 0,49(0,34–0,69) 0,55(0,38–0,79)	0,0008 0,004 0,004 0,02 0,03 0,001 0,02	Zhi <i>et al.</i> , 2011

Doença	População	n	Gene	OR (CI)	p	Referência
Esclerose sistêmica	Brasil	110 casos, 115 controle	KIR2DL2	0,2 (0,12 – 0,40)	< 0,001	Salim <i>et al.</i> , 2010
			KIR2DS2+/2DL2-	19,3 (4,2–122,3)	< 0,001	
Esclerose Múltipla	Bélgica	763 casos, 967 controle	polim. 2DL4		>0,05	Goris <i>et al.</i> , 2009
Escleroderma	Alemanha	102 casos, 100 controle	KIR2DS2+/2DL2-	12% vs 2%	0,005	Momot <i>et al.</i> , 2004
	Canadá	90 casos, 416 controle	KIR2DL2	>1,0	0,04	Pellet <i>et al.</i> , 2007
			KIR2DS1	>1,0	0,05	
KIR2DS1+/2DS2-2DS1+/HLA-C (+lig inibidor) 2DS1 e/ou 2DS2	>1,0 42% vs 61% >1,0	0,02 0,02 0,001				
Espondilite anquilosante	China	150 casos, 119 controle	KIR2DL5	60% vs 43%,	0,009	Jiao <i>et al.</i> , 2010
	Espanha	270 casos, 435 controle	KIR3DS1*013 KIR3DL1*004 com ou sem HLA	3,17 (2,01–5,02) 0,44 (0,25–0,78)	0,0004 0,045	Díaz-Peña <i>et al.</i> , 2010
	China	60 casos, 60 controles	KIR3DS1 KIR3DL1/3DS1 KIR3DL1-/3DS1-	3,059 (1,35-6,89) 3,059 (1,35–6,9) 0,110 (0,01-0,91)	0,006 0,039 0,032	Wang <i>et al.</i> , 2012

Doença	População	n	Gene	OR (CI)	p	Referência
Lúpus Eritematoso Sistêmico	Canadá	304 casos, 416 controle	KIR2DS1+/2DS2-	19% vs 14%	0,04	Pellet <i>et al.</i> , 2007
	China	93 casos, 123 controle	KIR2DS1 KIR2DL2	4,54 (2,41 –8,56) 6,68 (3,37–13,3)	< 0,001 < 0,001	Hou <i>et al.</i> , 2011
	Brasil, Santa Catarina	165 casos, 225 controle	KIR2DL2+	2,781 (1,47-5,30)	0,001	Coelho, 2011
			KIR2DS5+	4,300 (2,74-6,75)	<0,001	
			KIR2DL5-	0,290 (0,17-0,47)	<0,001	
			KIR3DS1-	0,562 (0,36-0,87)	0,009	
	Brasil, Pará	111 casos, 345 controle	KIR2DS2+/2DS5 +/3DS1+	com LES	0,0102	Pedroza <i>et al.</i> , 2011
			KIR2DS1 com KIR2DS2	r=0,2577	<0,001	
			KIR2DS1 com KIR2DS5	r=0,4890	<0,001	
	Pênfigo foliáceo	Brasil, Paraná	razão ativadores/inibidores	0,44	0,001	Augusto <i>et al.</i> , 2012
KIR3DS1 e HLA-Bw4			0,34	<10 ⁻³		
KIR2DS1			85% vs 51%	< 0,009		
Psoríase	Polônia	116 casos, 123 controle	KIR2DS1	45% vs 28%	< 0,05	Łuszczek <i>et al.</i> , 2004
	Japão	96 casos, 50 controle	KIR2DL5	48% vs 30%	< 0,05	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
			KIR2DS1	1,47 (1,10– 1,96)	0,01	
	Suécia	396 casos, 372 controle	KIR2DS5/2DS1+	0,2	0,0005	Holm <i>et al.</i> , 2005
	Polônia	116 casos, 123 controle	KIR2DS3/2DS1+	0,2	0,005	Płoski <i>et al.</i> , 2006
KIR2DS2+/2DL2-			15,71% vs 4%	0,01		
Síndrome Sjogren	Reino Unido	72 casos, 223 controle	HLA-C1+/KIR2DL1+/2DL2-/2DS1-	7 casos e 1 controle	0,00026	Lowe <i>et al.</i> , 2009

**ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO E APLICADO NOS PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE**



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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO
PACIENTE**

Projeto de Pesquisa: “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATÓIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA”.

Informações:

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos genéticos e da saúde de controles saudáveis e de pacientes que desenvolveram Artrite Reumatoide. Para isso pedimos sua **colaboração e permissão** para doação de 10 ml de sangue periférico, que contém o DNA (molécula que contém os genes, que carregam as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de medicamentos e de substâncias estranhas ao organismo e, também, relacionados à resposta imunológica), e o aparecimento desta doença. O DNA extraído das amostras coletadas será armazenado no Laboratório, sob responsabilidade da coordenadora do projeto. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, não influenciando no seu atendimento e tratamento. As informações aqui coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com

o Prof. Dr. Ivânio Alves Pereira (no ambulatório de Reumatologia, telefone: 3721-9133).

Procedimentos:

Caso concorde em participar, você irá responder a um questionário com duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram doença autoimune, como artrite reumatoide ou outra doença reumática, etc.

Riscos:

A coleta de sangue é um procedimento normal durante o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer, não representando maiores preocupações.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto logo após participar desta pesquisa, no entanto, os resultados deste estudo poderão permitir, num futuro próximo, um tratamento mais eficaz. Num futuro posterior, poderá permitir novas alternativas para prevenção da doença e identificação de pessoas que possuem risco em desenvolver a doença.

Assinaturas:

Pesquisador auxiliar _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu,

_____, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATOIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, _____

Assinatura: _____ RG: _____

**ANEXO B - QUESTIONÁRIO APLICADO NOS PACIENTES
COM ARTRITE REUMATOIDE**



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

NOME _____ PRONTuário/HU _____
 IDADE: ____anos SEXO:()F ()M COR da Pele: _____
 Procedência: _____ Natural de: _____
 Estado Civil: S C D V Ocupação: _____
 Telefone:() _____ Celular:() _____
 e-mail: _____ Data de nascimento: __/__/____

DATA da coleta: ____/____/____ **AR:** _____

Médico: _____

Entrevistador: _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____

CIDADE onde nasceu: _____ Profissão: _____

ASCEndência Materna _____ Paterna _____

NOME da mãe: _____

CIDADE onde nasceu: _____ Profissão: _____

ASCEndência Materna _____ Paterna _____

Tempo de doença diagnosticada: _____

Histórico Familiar: AR S N Parentesco: _____

Outras D. Reumat. S N Parentesco: _____

Manifestações Iniciais: Febre Rigidez Matinal

Articulações acometidas

<input type="checkbox"/> Ombro	<input type="checkbox"/> Cotovelo	<input type="checkbox"/> Punho	<input type="checkbox"/> MCF
<input type="checkbox"/> IFPM	<input type="checkbox"/> Quadril	<input type="checkbox"/> Joelho	<input type="checkbox"/> Tornozelo
<input type="checkbox"/> MTF	<input type="checkbox"/> IFPP	<input type="checkbox"/> Outras _____	

Manifestações Extra-articulares:

<input type="checkbox"/> Pleurite	<input type="checkbox"/> Pericardite
<input type="checkbox"/> Vasculite Reumatóide	<input type="checkbox"/> Nódulos Reumatóides
<input type="checkbox"/> Acometimento Ocular	<input type="checkbox"/> Acometimento Pulmonar
<input type="checkbox"/> Acometimento Renal	<input type="checkbox"/> Amiloidose
<input type="checkbox"/> Outras _____	

Evolução: **Internações:** S N Informações _____

Observações: Osteoporose? Diabetes? Depressão? _____

Sintomatologia Recente:
(Nos últimos 10 dias)

Articulações acometidas

<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Rigidez Matinal		
<input type="checkbox"/> Derrame Articular	<input type="checkbox"/> Dor Articular		
<input type="checkbox"/> Ombro	<input type="checkbox"/> Cotovelo	<input type="checkbox"/> Punho	<input type="checkbox"/> MCF
<input type="checkbox"/> IFPM	<input type="checkbox"/> Quadril	<input type="checkbox"/> Joelho	<input type="checkbox"/> Tornozelo
<input type="checkbox"/> MTF	<input type="checkbox"/> IFPP	<input type="checkbox"/> Outras _____	

Manifestações Extra-articulares:

<input type="checkbox"/> Pleurite	<input type="checkbox"/> Pericardite
<input type="checkbox"/> Vasculite Reumatóide	<input type="checkbox"/> Nódulos Reumatóides
<input type="checkbox"/> Acometimento Ocular	<input type="checkbox"/> Acometimento Pulmonar
<input type="checkbox"/> Acometimento Renal	<input type="checkbox"/> Amiloidose
<input type="checkbox"/> Outras _____	

Envolvimento Cardiovascular:

<input type="checkbox"/> HAS	<input type="checkbox"/> Doença Coronariana
<input type="checkbox"/> Angina	<input type="checkbox"/> 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 _____

Tratamento Atual: CORTICosteróide: S N Nome _____

Dose _____ Frequência _____

METOTrexato: S N Dose _____ Frequência _____

SULFASSALazina: S N Dose _____ Frequência _____

ANTIMALárico: S N Dose _____ Frequência _____

CICLOFosfamida: S N Dose _____ Frequência _____

INFLIXImab: S N Dose _____ Frequência _____

ETANERcept: S N Dose _____ Frequência _____

AINE: S N Dose _____ Frequência _____

ANALGésicos: S N Dose _____ Frequência _____

Outros S N Dose _____ Frequência _____

Idade da MENARCA: _____ anos MENOPAÚA: S N Idade _____

Histerectomia S N Idade _____

Ovariectomia S N Idade _____

FASE do Ciclo Reprodutivo Menacme Climatério

GESTAções _____ PARidade _____

Abortos? Induzido Espontâneo

Tratamento Hormonal Antes do Diagnóstico: S N Qual? AC Outro _____

Duração: _____ Parou há quanto tempo: _____

Tratamento Medicamentos S N Qual? _____
 Antes do Diagnóstico:

História de Uso de DROGAS: Alcool: S N Qual? _____
 Quantidade _____ Freqüência: _____
 Cigarro: S N Cigarros/dia _____
 Se fumava, qual a duração? _____
 Quando parou? _____
 Algum familiar ou amigo próximo é fumante? S N _____
 Drogas Ilícitas: S N Qual? _____
 Por quanto tempo? _____

Health Assesment Questionnaire (HAQ)

Você é capaz de:	Nível de dificuldade			
	Sem qualquer	Com alguma	Com muita	Incapaz
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões do sapato e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2. Lavar sua cabeça e seus	0	1	2	3
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braço?	0	1	2	3
4. Deitar-se e levantar-se da 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 comum?	0	1	2	3
8. Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9. Subir 5 degraus?	0	1	2	3
10. Lavar e secar seu corpo após o banho?	0	1	2	3
11. Tomar banho de chuveiro?	0	1	2	3
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 kg que está posicionado pouco acima de sua cabeça?	0	1	2	3
14. Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15. Segurar-se em pé no ônibus ou no metrô?	0	1	2	3
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido abertos previamente?	0	1	2	3
17. Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18. Fazer compras nas redondezas onde mora?	0	1	2	3
19. Entrar e sair de um ônibus?	0	1	2	3
20. Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	0	1	2	3

Escore dos Componentes:

Componente 1	perguntas 1 e 2: _____	Maior escore: _____
Componente 2	perguntas 3 e 4: _____	Maior escore: _____
Componente 3	perguntas 5, 6 e 7: _____	Maior escore: _____
Componente 4	perguntas 8 e 9: _____	Maior escore: _____
Componente 5	perguntas 10, 11 e 12: _____	Maior escore: _____
Componente 6	perguntas 13 e 14: _____	Maior escore: _____
Componente 7	perguntas 15 e 16: _____	Maior escore: _____
Componente 8	perguntas 18, 19 e 20: _____	Maior escore: _____

**ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO APLICADO NO GRUPO CONTROLE**



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos de Pesquisa:

“Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”

e

“Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina.”

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Prof^a. Dra. Iliada Rainha de Souza ou seus orientandos.

Procedimentos:

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

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

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

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

Riscos:

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

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Pesquisador**responsável**

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu,

_____, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina” e “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis,

Assinatura:

RG: _____

**ANEXO D – QUESTIONÁRIO APLICADO NO GRUPO
CONTROLE**



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG
Laboratório de Polimorfismos Genéticos
QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE
IDENTIFICAÇÃO

Data: __/__/__ Coleta: () sangue

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

Idade: _____ Sexo: () M () F Data de nascimento: _____

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não

Escolaridade: () analfabeto () 1º grau incompleto

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

() 2º grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência:

Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente

() Asiático descendente () Indígena descendente

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

Observação:

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência do pai:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

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

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

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

Frequência: () Todos os dias () Fim de semana

() Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

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

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

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

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

Tipo: _____

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

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

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

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

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

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

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

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

Nome: _____

Identificação:

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª gestação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

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

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? () Sim () Não Já utilizou AC? () Sim () Não

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

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

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

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações

Histórico Médico

Caso de **CÂNCER** pessoal? () Sim () Não

Tipo: _____

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

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

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

materna 1º grau () prima paterna 1º grau

() Outros _____

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

Grau de Parentesco e tipo: _____

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

Local: _____

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

Qual? _____

Tempo de diagnóstico: _____

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

Grau de Parentesco e tipo: _____

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

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: ()Sim () Não
 HIPERCOLESTEROLEMIA: ()Sim () Não
 OSTEOPOROSE: ()Sim () Não
 DOENÇA REUMÁTICA: ()Sim () Não
 DIABETES: ()Sim () Não
 ASMA: ()Sim () Não
 HIV: ()Sim () Não () Nunca fez exame
 HEPATITE: ()Sim () Não () Nunca fez exame
 DENGUE: ()Sim () Não
 TUBERCULOSE: ()Sim () Não
 DISTÚRPIO RENAL: ()Sim () Não
 DISTÚRPIO PULMONAR: ()Sim () Não
 DISTÚRPIO HEPÁTICO: ()Sim () Não
 Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: ()Sim () Não
 Grau de parentesco: _____
 Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: ()Sim () Não
 Grau de parentesco: _____
 OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

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

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