



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

**Associação do gene *IL-18* com Artrite Reumatóide em  
um estudo epidemiológico no estado de Santa  
Catarina: estudo caso-controle**

**Ticiano Della Justina Farias**

Florianópolis  
2009



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

## **Associação do gene *IL-18* com Artrite Reumatóide em um estudo epidemiológico no estado de Santa Catarina: estudo caso-controle**

(Este projeto faz parte de um projeto maior, em vigência, intitulado:  
GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATÓIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA)

**Ticiania Della Justina Farias**

Trabalho de conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, apresentado como requisito para o cumprimento da disciplina Estágio II (BIO 5156).

**Orientadora: Prof. Dra. Ilíada Rainha de Souza**  
**Co-orientadora: Msc. Lia Kubelka de Carlos Back**

Florianópolis  
2009

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer à minha família que me fornece toda a sustentação necessária e que constitui um lar cheio de amor, carinho, alegrias e exemplos de caráter e dedicação. Grata a Jô por ser sempre compreensível com os deveres da faculdade e estágios, incentivando a vencer dificuldades e se alegrando com as conquistas, e ao seu Orlando que, por mais que não entendesse o que eu tanto fazia no laboratório nas férias, sempre me apoiou em qualquer decisão e não mediu esforços para sustentar o conforto e bem-estar na família.

Aos meus irmãos que são o meu “*tudo*” e se eu pudesse escolher seria do mesmo “jeitinho”. Ao Thiago por ser um exemplo de dedicação, personalidade e me inspirou com as suas músicas um tanto “peculiares” as quais me alegraram em muitos momentos e à Thaís como uma admiração de pessoa, mulher e, agora, mãe do pequeno Benjamin, que faz de sua eterna alegria e inteligência o sucesso de sua vida antes dos 30 anos. Não posso deixar de citar meu querido cunhado Wanks, por ter me mostrado força e amizade em momentos mais importantes, e por vezes difíceis, e por ser uma bela inspiração, eu sou muito grata de tê-lo como irmão.

À minha orientadora professora Ilíada, a quem devo agradecer por fazer da genética humana a minha paixão, por ser amiga, conselheira, pelo amor maternal que faz com que ela chame atenção quando necessário e que nos afague em momentos de desilusões, e o bom humor que sempre inspirou a harmonia e dedicação de seus orientandos e orientados.

A minha co-orientadora Lia que me iluminou com a tarefa de estudar a auto-imunidade e conhecer um pouco sobre as pessoas além da doença. Luz que me inspirou em momentos da vida profissional e pessoal de uma forma tão sutil e simples. Que me trouxe grandes conquistas, juntamente com meu outro anjo-da-guarda a Aline Sereia, propiciando a alegria de poder trabalhar no que gostamos e, a partir disso, ter todo o sucesso que desejamos.

À banca, Prof<sup>a</sup> Karin Braun-Prado e Dr. Ivânio Alves Pereira, agradeço pelo aceite da participação da avaliação deste trabalho, trazendo sugestões e críticas que irão aperfeiçoar o estudo realizado. E novamente ao Dr. Ivânio por ter sido quem abriu as portas do ambulatório de Reumatologia e sempre esteve disposto a nos auxiliar nesta pesquisa.

Às minhas colegas de TCCs, Luisa e Mayara, que me acompanharam na luta desde as coletas de pacientes, experimentos em laboratório, análises de dados, momentos de ansiedade e confraternizações. Foi com a força que este trio mantinha que nos propiciou o sucesso desta importante etapa.

Aos colegas lapogeanos em geral, dos mais antigos – que sempre serão considerados amigos de trabalho – aos mais novos, cheios de energia. Enfim, todos auxiliaram de alguma forma para a elaboração deste estudo com o ensino das técnicas, auxílio nas coletas e nos mutirões das extrações de DNA, além das risadas, conselhos e idéias perante as dificuldades.

Aos meus amigos de todas as horas, estudantes de biologia, biólogos que compartilharam muitos momentos ao longo destes 5 anos de faculdade, amadurecimento, companheirismo, amizades, amores e paixões pela biologia, respeitando cada um a sua área de afeto.

Aos meus amados amigos de longa data que me acompanharam durante essa trajetória e que sempre se mantiveram próximos mesmo estando longe, atarefados, e por muitas vezes só mantendo contato virtual, ainda assim cultivando amizades lindas e eternas.

Aos pacientes e controles que nos dedicaram muito do seu tempo para conversar e responder os questionários, superando todas as dificuldades que os pacientes possuem e mostrando a força e a alegria de viver quando se supera o que antes se julgava impossível de acontecer.

*“One must from time to time attempt things  
that are beyond one’s capacity.”*  
Pierre-Auguste Renoir

## RESUMO

A doença auto-imune é causada por uma disfunção no sistema imunológico, onde as células de defesa do organismo reconhecem moléculas próprias como provenientes de células exógenas, levando a uma resposta imunológica contra o próprio organismo. A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica, cujo principal alvo são as articulações de mãos e pés. No entanto, sabe-se que há comprometimento de outros órgãos como pulmão, coração, olhos e vasos sanguíneos. A etiologia da AR é desconhecida, contudo, acredita-se que o sistema imunológico tenha um papel importante no quadro inflamatório que acomete as articulações e regiões vizinhas. Entre as células e moléculas responsáveis pela resposta inflamatória, pode-se destacar a citocina pró-inflamatória interleucina-18 (IL-18), a qual se mostra em níveis elevados na circulação em caso de inflamação, além de possuir um efeito estimulatório amplo na resposta imunológica. Os polimorfismos do gene *IL-18* (-607 e -137) estão localizados na região promotora do gene que altera o sítio de ligação de fatores de transcrição, e acredita-se que haja um decréscimo na produção da citocina quando da ocorrência de mutações nestas posições. O objetivo deste trabalho foi analisar o envolvimento dos polimorfismos da *IL-18* em pacientes com AR (n=97) e em um grupo controle de indivíduos saudáveis (n=151) residentes no estado de Santa Catarina. Foram identificadas mudanças de um nucleotídeo (SNP) nas posições -607 C>A e -137 G>C do gene *IL-18* pelos métodos PCR-RFLP e PCR-SSP, respectivamente. As frequências alélicas obtidas, nos casos e controles, de *IL-18*\*A (-670) foram 0,443 e 0,424 e as de *IL-18*\*C (-137) foram 0,304 e 0,291, respectivamente. Quanto à distribuição das frequências genotípicas do loco *IL-18* (-607) tanto em casos como em controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), bem como à de pacientes no loco *IL-18* (-137). Porém, a distribuição no grupo controle não se encontrou em EHW nesta posição ( $p=0,006$ ). A *Odds Ratio* (OR) foi calculada entre casos e controles e não se encontrou associação com os polimorfismos estudados. Além disso, a OR foi calculada em pacientes para alguns fatores como fator reumatóide (FR), proteína C-reativa (PCR), fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), como colesterol alto, pressão arterial alta e tabagismo.

Não foram encontrados valores significativos, entretanto encontrou-se risco aumentado entre o genótipo *CC* do loco *IL-18* (-137) e histórico familiar de DCV,  $p= 0,03$ . Os valores de OR para FR e PCR com o tabagismo mostraram-se risco a estes fatores combinados, porém  $p>0,05$ . As freqüências genóticas se assemelharam a outros estudos realizados, no entanto, para controles, o loco *IL-18* (-137) que está em desequilíbrio de HW, pode ter influenciado em valores de OR, sugerindo uma falsa associação.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das doenças auto-imunes de acordo com a sua natureza “órgão-específica” ou “sistêmica”. Tabela adaptada de JANEWAY <i>et al.</i> , 2002. ....	13
Tabela 2: Fatores genéticos de risco para a artrite reumatóide (AR). Adaptado de KLARESKOG <i>et al.</i> 2009. ....	19
Tabela 3: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos polimorfismos estudados do gene <i>IL-18</i> . Adaptado de TAKADA <i>et al.</i> 2002. ....	33
Tabela 4: Protocolos da reação em cadeia da polimerase (PCR – <i>Polimerase Chain Reaction</i> ) para os dois SNPs (-607 e -137) do gene <i>IL-18</i> . Adaptado de TAKADA <i>et al.</i> , 2002. ....	33
Tabela 5: Programa do termociclador utilizado para a amplificação de cada SNP (-607 e -137) do gene <i>IL-18</i> . Adaptado de TAKADA <i>et al.</i> , 2002. ....	34
Tabela 6: Tabela 2x2 para o cálculo do risco relativo ( <i>Odds Ratio</i> – OR) entre casos e controles. ....	37
Tabela 7: Freqüências alélicas e genóticas do SNP <i>IL-18</i> (-607) em indivíduos caso e controles. ....	40
Tabela 8: Associação dos alelos e genótipos do SNP <i>IL-18</i> (-607).....	41
Tabela 9: Freqüências alélicas e genóticas do SNP <i>IL-18</i> (-137) em indivíduos caso e controles. ....	41
Tabela 10: Associação dos alelos e genótipos do SNP <i>IL-18</i> (-137).....	42
Tabela 11: Associação dos alelos e genótipos do loco <i>IL-18</i> (-137) ao analisar o polimorfismo e histórico familiar de doenças cardiovasculares. Considerou-se o alelo C como alelo de risco..	45
Tabela 12: Associação dos polimorfismos do gene <i>IL-18</i> (-607 e -137) e o hábito tabagista nos pacientes analisados. ....	46
Tabela 13: Associação da proteína C-reativa (PCR) e do fator reumatóide (FR) com tabagismo. ....	47
Tabela 14: Estudos de associação caso-controle realizados no SNP <i>IL-18</i> (-607) em diferentes populações e distintas doenças. Pode-se observar a freqüência do alelo variante, alelo A, as freqüências genóticas, valores de OR e de <i>p</i> . ....	50
Tabela 15: Estudos de associação caso-controle realizados no SNP <i>IL-18</i> (-137) em diferentes populações e distintas doenças. Pode-se observar a freqüência do alelo variante, alelo C, as freqüências genóticas, valores de OR e de <i>p</i> . ....	53



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A Artrite Reumatóide pode danificar diferentes partes da articulação, como a cartilagem e ossos, primeiramente, a mais comum é a membrana sinovial (em destaque). Adaptação de RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000.....	14
Figura 2: Articulações que podem ser acometidas pela Artrite Reumatóide. Adaptado de RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000. ....	15
Figura 3: Pontos de checagem imunopatológicos envolvidos na patogênese da artrite inflamatória crônica. Esses podem influenciar a ativação, expansão e/ou respostas efetoras. Figura adaptada de COPE, 2003. ....	22
Figura 4: Articulação normal (esquerda) com apenas uma camada de tecido e, à direita a articulação reumática acometida pelo <i>pannus</i> , em destaque. Figura retirada de FELDMANN <i>et al.</i> , 1996.....	24
Figura 5: Rede de citocinas envolvidas na AR que são produzidas pelos macrófagos e fibroblastos produzem. As citocinas pró-inflamatórias são (+) e anti-inflamatórias são (-). Figura retirada de FIRESTEIN, 2003. ....	25
Figura 6: Figura ilustrativa do gene <i>IL-18</i> . A região em vermelho é a parte do gene codificante (éxon) e em azul é a região não codificante. Fonte: NCBI, 2008. ....	26
Figura 7: Esquema da transdução do sinal do IL-18R. Figura importada THOMPSON & HUMPHRIES, 2007.....	27
Figura 8: Foto de eletroforese em gel de agarose 3% no qual foram analisadas amostras do polimorfismo do gene <i>IL-18</i> (-607) .....	34
Figura 9: Foto de eletroforese em dois géis 1,5% de agarose no qual foram analisadas amostras de PCR do polimorfismo do gene <i>IL-18</i> (-137) .....	35
Figura 10: Distribuição do número de mulheres e de homens que compõem casos e controles no presente estudo.....	38
Figura 11: Frequência (%) das idades separadas em classes nos casos e controles.....	39
Figura 12: Frequência (%) de casos e controles caracterizados por grupos étnicos.....	40
Figura 13: Frequência (%) de tabagistas em casos e controles.....	45

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>11</b>
1.1	Auto-imunidade	11
1.2	Artrite Reumatóide	13
1.3	Suscetibilidade Genética da AR	17
1.4	Imunopatologia	20
1.4.1	Gene <i>IL-18</i>	25
<b>2</b>	<b>Justificativa</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>30</b>
3.1	Objetivos específicos	30
<b>4</b>	<b>Materiais e métodos</b>	<b>31</b>
4.1	Coleta	31
4.2	Processamento das amostras de sangue	32
4.3	Extração e quantificação de DNA	32
4.4	Gene <i>IL-18</i>	32
4.4.1	Polimorfismo do gene <i>IL-18</i> -607	32
4.4.2	Polimorfismo do gene <i>IL-18</i> -137	35
4.5	Análise e tratamento dos dados	36
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>38</b>
5.1	Caracterização da amostra	38
5.2	Análise de genótipos do gene <i>IL-18</i>	40
5.2.1	Polimorfismo <i>IL-18</i> (-607)	40
5.2.2	Polimorfismo <i>IL-18</i> (-137)	41
5.3	Análise de desequilíbrio de ligação entre os dois locos do gene <i>IL-18</i>	42
5.4	Análise de dados clínicos e epidemiológicos	42
5.4.1	Fator Reumatóide	43
5.4.2	Proteína C-reativa	43
5.4.3	Acometimento cardiovascular	43
<b>6</b>	<b>Discussão</b>	<b>48</b>
6.1	Caracterização da amostra	48
6.2	Análise de genótipos do gene <i>IL-18</i>	49
6.2.1	Polimorfismo <i>IL-18</i> (-607)	49
6.2.2	Polimorfismo <i>IL-18</i> (-137)	52
6.3	Análise de desequilíbrio de ligação entre os dois locos do gene <i>IL-18</i>	55
6.4	Análise de dados clínicos e epidemiológicos	56
6.4.1	Doença cardiovascular	56
6.4.2	Tabagismo	58
<b>7</b>	<b>Conclusão</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>Referências</b>	<b>62</b>
	<b>Anexo A</b>	<b>71</b>
	<b>Anexo B</b>	<b>75</b>
	<b>Anexo C</b>	<b>77</b>

## 1 Introdução

As doenças de etiologia complexa resultam da combinação de fatores genéticos, ambientais, comportamentais, imunológicos entre outros. Fazem parte desse grupo as doenças auto-imunes, os distúrbios neurológicos e neurodegenerativos e doenças como hipertensão, diabetes, obesidade e câncer (BACK, 2007). Nessas doenças, a presença do alelo variante não é condição suficiente nem essencial para o estabelecimento do fenótipo alterado, contudo, o alelo pode fornecer ao portador uma susceptibilidade genética que, em combinação a um conjunto de fatores exógenos, tais como: idade, sexo, dieta, exposição ambiental e hormonal, atuação do seu sistema imunológico, entre outros, são considerados importantes no desenvolvimento das doenças complexas (BRAUN-PRADO, 2006).

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica que atinge principalmente as articulações de mãos e pés e que por vezes adquire caráter sistêmico, lesando tecidos do coração, pulmão, rins, olhos e vasos sanguíneos (SUGIMOTO, 2005). As condições clínicas de cada indivíduo são heterogêneas, como o quadro clínico no início da doença, a progressão e severidade da patologia e, também, variação de respostas às terapias medicamentosas dos pacientes, no entanto acredita-se que a variação genética está relacionada a todos estes fatores (OLIVER *et al.*, 2006).

A etiologia da AR é desconhecida, contudo sabe-se que o sistema imunológico do organismo participa ativamente no desenvolvimento da inflamação e nos danos articulares, incluindo regiões circunvizinhas, que ocorrem na artrite reumatóide (RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000).

### 1.1 Auto-imunidade

O sistema imunológico protege os organismos de agentes externos, como microorganismos e parasitas, células cancerosas, órgãos e tecidos transplantados. Estes agentes possuem substâncias que estimulam o sistema imunológico conhecidas como antígenos, os quais são moléculas localizadas no interior ou na superfície celular de bactérias, vírus ou células cancerosas (ABBAS *et al.*, 2008).

O sistema imunológico está também constantemente exposto a antígenos do próprio organismo sem, no entanto, estimular os linfócitos, evento esse que é conhecido como “tolerância ao próprio”. Porém, os linfócitos podem reconhecer os auto-antígenos como se fossem agentes estranhos ao organismo, estimulando a resposta chamada “auto-imune” (JANEWAY *et al.*, 2002).

O termo “auto-imunidade” foi cunhado pelo bacteriologista Paul Erlich, no século XIX. Ele previa o ataque do sistema imunológico aos tecidos do próprio corpo, mesmo que na época diversos pesquisadores não acreditavam que isso poderia acontecer. Aos poucos, entretanto, diversas doenças misteriosas passaram a ser reconhecidas como casos de *horror autotoxicus* – entre elas a esclerose múltipla, diabetes dependente de insulina e artrite reumatóide (FEHERVARI & SAKAGUCHI, 2006).

A tolerância ao próprio não é uma característica herdada e sim o resultado da interação errônea de vários mecanismos destinados a distinguir linfócitos com potencial de ligar-se a antígenos próprios e aqueles com afinidade específica por antígenos estranhos. A diversidade imunológica é decorrente da combinação de genes altamente polimórficos que codificam moléculas receptoras das células do sistema imunológico e, além disso, estes genes são combinados de forma aleatória, permitindo que o linfócito reconheça uma ampla variedade de antígenos estranhos (PARSLOW *et al.*, 2004).

A resposta auto-imune está relacionada com o sistema imunológico e seus mediadores. A partir disto, observa-se que os fatores que contribuem para o desenvolvimento da auto-imunidade são anomalias nas células apresentadoras de antígenos (APCs) ou nos linfócitos, ou em fatores do próprio tecido-alvo (auto-antígenos), no qual há uma permanente resposta imunológica pode levar à lesão tecidual e, por fim, desenvolve o quadro da doença auto-imune (JANEWAY *et al.*, 2002). Aproximadamente 3% da população mundial é afetada por alguma desordem auto-imune conhecida segundo GERGERSEN & BEHRENS (2006).

Entre as doenças auto-imunes é possível distinguir dois padrões: doenças auto-imunes “órgão-específicas”, nas quais a auto-imunidade é restrita

a órgãos específicos, e as doenças auto-imunes “sistêmicas”, em que diversos tecidos do corpo são afetados pela resposta auto-imune (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das doenças auto-imunes de acordo com a sua natureza “órgão-específica” ou “sistêmica”. Tabela adaptada de JANEWAY *et al.*, 2002.

<b>Doenças auto-imunes órgão-específicas</b>	<b>Doenças auto-imunes sistêmicas</b>
Diabete melito tipo I	Artrite reumatóide
Esclerose múltipla	Escleroderma
Anemia auto-imune de Addison	Lúpus eritematoso sistêmico
Vitiligo	Síndrome de Sjögren primária
Doença de Graves	Polimiosite
Tireoidite de Hashimoto	
Síndrome de Goodpasture	

## 1.2 Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma forma comum de artrite (*art*= articulação e *ite*= inflamação) que causa inflamação no revestimento das articulações (membrana sinovial) e se estende às articulações e ossos, causando erosões e deformidades (Figura 1). Se manifesta por calor, febre generalizada, inchaço local e dor. O dano às articulações pode persistir por muitos anos gerando um impacto significativo na qualidade de vida da maioria dos pacientes afetados, uma vez que, características subseqüentes como dor, rigidez e deformidades articulares geram acentuado desconforto e incapacidade funcional, podendo diminuir a sobrevida dos pacientes (RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000).

A AR caracteriza-se por ser um tipo de artrite simétrica (articulações análogas são acometidas ao mesmo tempo nos dois lados do corpo) e poliarticular (acometimento de mais de duas articulações) que afeta primeiramente as pequenas articulações dos dedos, mãos e pés, sendo que costumeiramente há rigidez matinal de uma hora ou mais, limitando os movimentos dessas articulações (ARTHRITIS FOUNDATION, 2008). Outras articulações que podem ser afetadas pela AR são punhos, cotovelos, ombros,

pescoço, quadris, joelhos, tornozelos e articulações têmporo-mandibulares (RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000), como pode ser observado na Figura 2.

É uma doença que, apesar do acometimento preferencial do tecido sinovial, gera distúrbios inflamatórios em virtualmente todos os sistemas do corpo (RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000). Manifestações sistêmicas como fadiga, perda de apetite, febres baixas e anemia são constantemente observadas, além de outros sintomas extra-articulares como acometimentos de pulmões, coração, rins e presença de nódulos reumatóides (RADU, não datado; SILVA *et al.*, 2003; SUGIMOTO, 2005). Além disso, pode haver sobreposição de outras doenças como esclerodermia e síndrome de Sjögren (LEVY *et al.*, não datado; SILVA *et al.*, 2003).

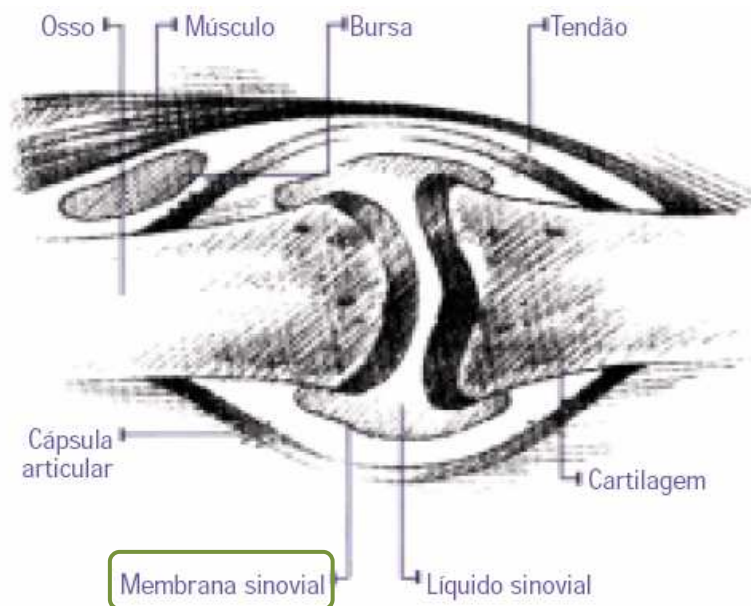


Figura 1: A Artrite Reumatóide pode danificar diferentes partes da articulação, como a cartilagem e ossos, primeiramente, a mais comum é a membrana sinovial (em destaque). Adaptação de RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000.

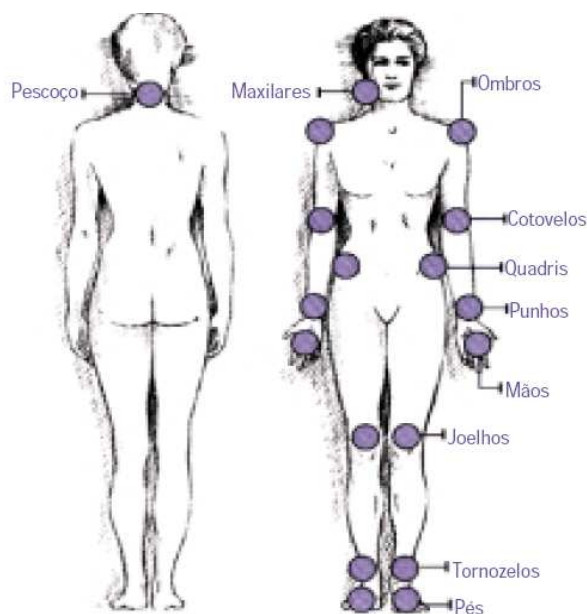


Figura 2: Articulações que podem ser acometidas pela Artrite Reumatóide. Adaptado de RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000.

Segundo WYETH (2007), a Artrite Reumatóide atinge cerca de 1% da população adulta mundial e a prevalência aumenta com a idade, podendo chegar até 5% em mulheres com mais de 55 anos. Nos Estados Unidos o número de pessoas afetadas é cerca de 1,3 milhão e no Brasil estima-se que haja 1,5 milhão de pessoas afetadas, a maioria mulheres em idade economicamente ativa (REVISTA VIGOR, 2008). As mulheres são a maioria quando se trata de incidência da AR, a proporção mundial entre mulheres e homens com AR é de 3:1 (RADU, não datado). Porém, um estudo recente realizado pelas associações latino-americanas de reumatologia, Liga Pan-Americana de Associações para Reumatologia (PANLAR – *Pan-American League of Associations for Rheumatology*) e o grupo Latino-Americano de estudos da Artrite Reumatóide (GLADAR – *Grupo Latinoamericano de Estudio de Artritis Reumatoide*), indica que entre os países da América Latina a proporção de pacientes com artrite reumatóide é de um homem para cada oito mulheres, tornando-se maior que a média mundial (PANLAR & GLADAR, 2006).

A AR atinge pessoas na faixa etária reprodutiva, usualmente na meia-idade, mas pode aparecer em pessoas com 20 e 30 anos (ARTHRITIS

FOUNDATION, 2008). Segundo o documento produzido pela World Health Organization (WHO - *Organização Mundial da Saúde*), a ocorrência da AR de idade abaixo de 16 anos é considerada Artrite Reumatóide Juvenil (SYMMONS *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos, a média de idade de doentes é de 66,8 anos, segundo a ARTHRITIS FOUNDATION (2008).

O custo para a economia americana para o tratamento de artrite e condições relacionadas (como a artrite reumatóide) é de cerca de \$128 bilhões de dólares por ano em tratamento médico e despesas indiretas, como a perda da produtividade pessoal e aposentadoria por invalidez (em doença avançada, a pessoa aposenta-se por não poder mais realizar as tarefas básicas do emprego) (ARTHRITIS FOUNDATION, 2008). Segundo o relatório elaborado pelas Associações Latino-americanas de Reumatologia, PANLAR & GLADAR (2006), o impacto econômico da AR na Venezuela chega a U\$ 3.500 anuais *per capita*, no México este valor pode chegar a U\$ 2.700 e na Argentina trata-se de U\$1.300 anuais. Sabe-se que no Brasil o tratamento de casos agressivos chega a custar R\$ 5.000 por mês por pessoa, excluindo outros valores de impacto sócio-econômico (SUGIMOTO, 2005).

Os acometimentos das articulações na artrite reumatóide ocorrem inicialmente nos primeiros dois anos da doença, elevando os riscos da limitação de movimentos e podendo levar à morte do paciente (ARTHRITIS FOUNDATION, 2008). Segundo SYMMONS (2006), geralmente a mortalidade dos pacientes com AR é menor em pacientes cujo quadro clínico da AR é mais severo e a mortalidade em países desenvolvidos é maior. No entanto, pessoas acometidas pela AR possuem duas vezes mais chances de morrer que pessoas com a mesma idade sem a doença, e as mortes por AR correspondem a 22% de todas as mortes por artrite ou quaisquer outras condições reumáticas (ARTHRITIS FOUNDATION, 2008). A mortalidade está relacionada com a gravidade da AR como a qualidade de vida reduzida, aumento do risco de infecções, dano radiológico e manifestações extra-articulares (SILVA *et al.*, 2003). A expectativa de vida dos pacientes tem aumentado com o uso de tratamentos medicamentosos mais agressivos, como o fármaco metotrexato (SYMMONS, 2006).



O acometimento cardiovascular é uma das manifestações extra-articulares comuns em pacientes diagnosticados com artrite reumatóide, e, por muitas vezes, é a principal causa de morbidade e mortalidade (PASCERI & YEH, 1999, SNOW & MIKULS, 2005, TORIGOE & LAURINDO, 2006).

A maioria dos estudos epidemiológicos demonstrou que a mortalidade cardiovascular está aumentada na AR, devido ao infarto agudo do miocárdio (IAM) e à insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (AVIÑA-ZUBIETA *et al.*, 2008, SHERINE, 2008, TORIGOE & LAURINDO, 2006). Entretanto, a contribuição de fatores de risco tradicionais, como tabagismo, diabete mellito, hipertensão, dislipidemia, obesidade, sedentarismo, idade e sexo, adicionados às características da doença e aos tratamentos de AR ainda não estão bem estabelecidos (SHERINE, 2008).

Em particular, o processo inflamatório que ocorre na patologia está sendo considerado um fator importante para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (SHERINE, 2008), a qual possui uma frequência de 50% dos eventos de doenças coronárias na população em geral (PEREIRA & BORBA, 2008).

### **1.3 Suscetibilidade Genética da AR**

A Artrite Reumatóide é uma doença clássica multifatorial e de origem desconhecida, no entanto se busca entender o envolvimento dos fatores hereditários no aparecimento da patologia. WORTHINGTON (2005) trabalhou com análises comparativas entre grupo de família com portadores de AR com presença do fator reumatóide (FR), anticorpo IgM encontrado nos pacientes de AR, e grupo controle (indivíduos saudáveis) e, contudo, concluiu-se que o fator reumatóide foi 4 vezes mais freqüente nas famílias de portadores da patologia que no grupo controle, todavia, não se determinou se este fato era causado por fatores genéticos ou ambientais. Em estudos com gêmeos, WORTHINGTON (2005) também comparou a presença do FR em gêmeos idênticos (monozigóticos) e não-idênticos (dizigóticos) e relatou que o índice de concordância para soropositivos em AR foi de 30% em gêmeos monozigóticos e apenas 5% em gêmeos dizigóticos.

Outros estudos foram realizados em famílias com AR na investigação do fenótipo heterogêneo de susceptibilidade observado em pacientes com AR, como o estudo de Alan Silman, confirmando a susceptibilidade da AR com fatores genéticos e ambientais (SILMAN, *et al.*, 1987).

A partir deste ponto começa a busca de marcadores genéticos em estudos de associações em famílias. Inicialmente, foram feitas análises de ligação em regiões de microssatélites polimórficas de genes como *NRAMP1* (natural resistance associated macrophage protein 1), *CYP19* (oestrogen synthase) e *CRH* (corticotrophin releasing hormone). Utilizando este mesmo método, foram analisados genes que codificam citocinas e achou-se associação de três genes: *IL-5R* (receptor da interleucina 5), *INF- $\gamma$*  (interferon  $\gamma$ ) e *IL-2* (interleucina 2). No estudo realizado por WORTHINGTON (2005), foram genotipadas mais de 180 famílias pertencentes ao grupo pacientes e controle em 365 regiões de microssatélites e o resultado mostrou associação do FR com a região do *MHC*, complexo de histocompatibilidade, no cromossomo 6 e mais 11 locos adicionais.

KLARESKOG *et al.* (2009) realizam um levantamento de dados e atualizam a lista de genes que foram encontrados associados à doença ou que estão necessitando de confirmações de outros estudos, de acordo com a Tabela 2.

Atualmente está bem estabelecida a associação de alelos do MHC com a auto-imunidade (PIARCE & MERRIMAN, 2006). Os genes dos antígenos leucocitários humanos (*HLA*) estão localizados no MHC e as moléculas codificadas pelos genes são essenciais para o funcionamento normal do sistema imunológico, pois participam da apresentação do antígeno às células T – importante no desenvolvimento da AR – e uma forte associação genética entre *MHC* e AR está na terceira região hipervariável da cadeia DR $\beta$ , especialmente no aminoácido 70 até 74 (FIRESTEIN, 2003). Pela localização do epítipo suscetível na molécula de MHC, sugere-se que o polimorfismo da molécula *HLA-DR* deva alterar a habilidade da molécula de ligar-se e apresentar peptídeos específicos das articulações envolvidas no desenvolvimento da AR (FIRESTEIN, 2003; PARSLOW, 2004).

O epítipo suscetível parece influenciar a gravidade da doença, pois o risco extra-articular e a erosão da doença são maiores em pacientes que possuem os genes *HLA-DR4*, *HLA-DR14* e *HLA-DR1* e é mais grave quando em homozigose (FIRESTEIN, 2003). Segundo SUGIMOTO (2005), em pacientes brasileiros brancos houve a prevalência do subtipo *HLA-DR1*, mas os pacientes de quadro mais grave da doença de AR pertenciam ao grupo *HLA-DR4* (alelos \*0401 e \*0404 vinculados a agressividade da doença). Já os pacientes afro-brasileiros, considerados uma população miscigenada, outro subtipo HLA está relacionado com a susceptibilidade à AR, o alelo *HLA-DR1\*09* (SUGIMOTO, 2005).

Tabela 2: Fatores genéticos de risco para a artrite reumatóide (AR). Adaptado de KLARESKOG *et al.* 2009.

<b>Fatores genéticos de risco</b>	<b>Comentários</b>
<b>Alelos HLA-DRB1</b>	Forte evidência, associado FR positivo
<b>PTPN22</b>	Forte evidência, associado FR positivo
<b>Loco TRAF1-C5</b>	Forte evidência
<b>Loco OLIG3-AIP3</b>	Forte evidência
<b>STAT4</b>	Forte evidência
<b>Genes MHC não-DRB1</b>	Necessita confirmação
<b>IRF5</b>	Necessita confirmação
<b>CLEC4A</b>	Necessita confirmação
<b>HLA DRB1*03</b>	Necessita confirmação
<b>PADI4</b>	Forte evidência em populações asiáticas

Esta diferença nas frequências e alelos entre as populações (pacientes brancos e afro-descendentes) é um exemplo da importância de replicação dos experimentos realizados em outros países, relatando o comportamento genético da doença para aquela população em especial. Nos países europeus, asiáticos e alguns africanos estudos genéticos epidemiológicos estão bem estabelecidos, todavia no Brasil há uma relevante miscigenação étnica populacional. Este aspecto é notado quando observado o histórico de colonização do país por europeus, africanos e ameríndios (nativos)

predominantemente. Formando, assim, uma população triíbrida e diferenciada em termos genéticos populacionais (SUGIMOTO, 2005).

Segundo PEARCE & MERRIMAN (2006), populações distintas com a mesma desordem podem carregar diferentes suscetibilidades alélicas. Isso se deve aos polimorfismos genéticos envolvidos na resposta imunológica selecionada para a sobrevivência da população a doenças infecciosas e, no entanto, cada população era exposta a diferentes variantes de agentes infecciosos. Isso quer dizer que se deve cuidadosamente avaliar os estudos de replicações em grupos étnicos distintos.

Ultimamente, as doenças complexas e multifatoriais vêm sendo estudadas através da identificação de genes envolvidos utilizando estudos de associação, buscando genes candidatos baseados no conhecimento da biologia celular e molecular da resposta imunológica (GERGERSEN & BEHRENS, 2006). Assim, é realizada a análise de variantes destes genes e a sua interferência no desenvolvimento da doença. A variação mais freqüente é a mudança de um único nucleotídeo (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*), seja na região de éxons, íntrons ou no promotor do gene. Dependendo do local do SNP, a mudança do nucleotídeo pode acarretar mudança funcional da proteína a ser codificada, alterar mecanismo de regulação ou modificar a expressão do gene (KWOK, 2003).

#### **1.4 Imunopatologia**

O poder destrutivo e a complexidade do sistema imunológico humano necessitam da presença de um sofisticado mecanismo que regule a atividade das células imunológicas. O entendimento da regulação do sistema imunológico tem avançado em estudos com ratos, revelando que a regulação ocorre em diversos níveis que envolvem muitas vias celulares e bioquímicas (PEARCE & MERRIMAN, 2006).

A auto-imunidade se desenvolve através de desordens de funções variáveis em três pontos importantes: no tecido-alvo do processo auto-imune, nas células apresentadoras de antígeno (APCs) e nos linfócitos que estão envolvidos na resposta imune adaptativa (PEARCE & MERRIMAN, 2006).

No tecido-alvo, o antígeno que interage com o sistema imune pode ter diferentes formas e isto reflete na mudança de estrutura, quantidade, localização do tecido ou subcelular, e regulação da expressão do antígeno (PEARCE & MERRIMAN, 2006). No timo estes fatores são importantes porque é neste órgão que há seleção de células T de acordo com a tolerância por antígenos próprios (PARSLOW *et al.*, 2004). Se o linfócito T reage fortemente aos auto-antígenos ele é selecionado negativamente e é levado à apoptose; o mesmo fim cabe aos linfócitos que não reagem aos antígenos apresentados. Entretanto, se a célula T interage sensivelmente ao antígeno ela é selecionada positivamente e torna-se célula T madura que migrará para a periferia. Além do timo há seleção das células T na região periférica através da reatividade do receptores dessas células com antígenos e esta seleção é feita também medindo a reatividade do linfócito T por auto-antígenos por outro grupo de células T maduras, as células T reguladoras ou célula T<sub>REG</sub> (PEARCE & MERRIMAN, 2006).

Segundo PEARCE & MERRIMAN (2006), as APCs são essenciais para seqüestrar os antígenos, processá-los e apresentá-los às células T auxiliares (células T *helper* ou células T<sub>H</sub>). As principais células apresentadoras de antígenos são as células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, que fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imune dos humanos, e as APCs são a chave do início e perpetuação da resposta imune adaptativa. Essas células medeiam o efeito do *MHC*, cujos alelos (ou combinação de alelos) possuem distintas afinidades a antígenos que implicam a auto-imunidade (PEARCE & MERRIMAN, 2006).

As células T<sub>H</sub> (CD4<sup>+</sup>), que conduzem à resposta adaptativa, possuem diversos variantes alélicos de genes que participam de vias na auto-imunidade como *CTLA-4* e *PTPN22*. Nos últimos anos, as células T<sub>REG</sub> (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e CD69<sup>-</sup>) têm sido reconhecidas como cruciais no controle de auto-reatividade da resposta imune (PEARCE & MERRIMAN, 2006).

A imunorregulação tem sido o alvo de pesquisas com intuito de entender que falhas nesse mecanismo devem estar relacionadas com as doenças auto-imunes. Os defeitos da imunorregulação podem ser adquiridos em diversos

pontos durante a fase inicial e tardia da resposta auto-imune. Em linfócitos T CD4+, a interação ligante-receptor entre o complexo peptídeo-MHC e receptor da célula T (TCR) é importantíssima, desde que isso determine aspectos qualitativos e quantitativos dos sinais transduzidos através do TCR (ABBAS *et al.*, 2008, COPE, 2003). Considerando a auto-reatividade das células T, a evolução da AR pode ser observada por uma série de pontos de regulação (pontos de checagem) observados na Figura 3. Estes pontos de regulação mostram uma visão para entender não somente como a doença pode progredir, mas também para explorar como a evolução das respostas auto-imunes pode diferir qualitativamente no evento não-suscetível.

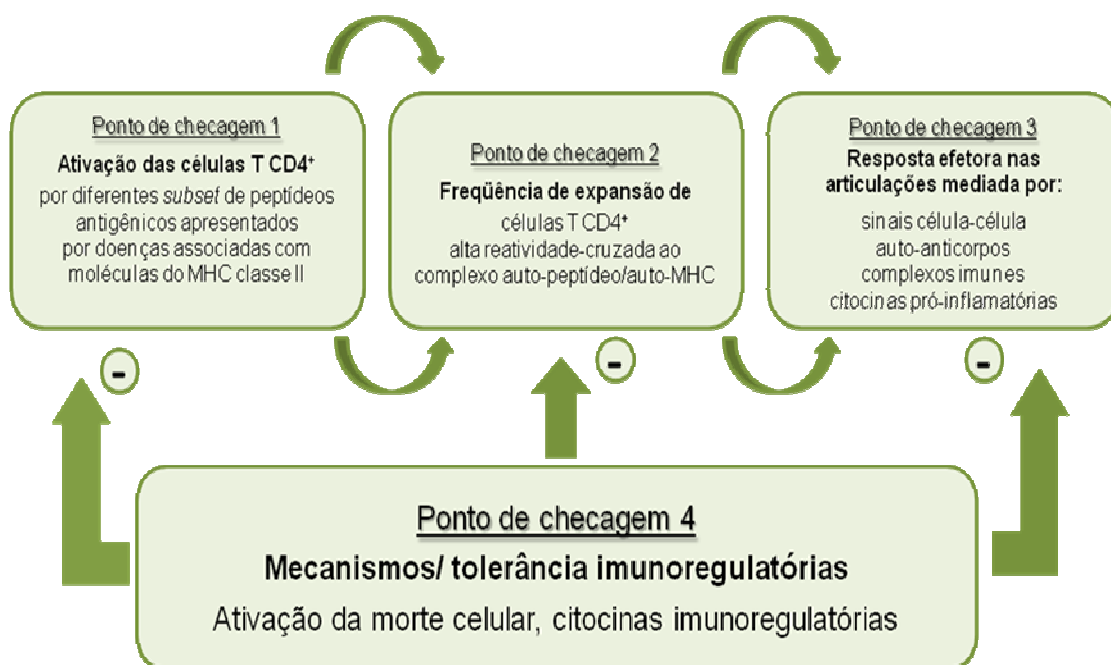


Figura 3: Pontos de checagem imunopatológicos envolvidos na patogênese da artrite inflamatória crônica. Esses podem influenciar a ativação, expansão e/ou respostas efetoras. Figura adaptada de COPE, 2003.

A sinalização dos receptores da célula T (TCR) começa através da cascata de sinais no interior celular, no qual há proteínas intracelulares, as tirosinas fosfatases (PTPs), cujo papel é diverso na regulação negativa desta cascata de sinais, entretanto as PTPs são reconhecidas como chave na

manutenção da homeostase celular imunológica (SIMINOVITCH, 2004). Um tipo de proteína do grupo PTP está fortemente envolvido com a etiologia das doenças auto-imunes, PTP *non-receptor* 22 (PTPN22). Além de ter um efeito regulador negativo à função das células T, em geral a inibição das fosfatases resulta na proliferação policlonal das células T ativadas ou podem induzir ativação espontânea e produção de citocinas por linfócitos T (GREGERSEN & BATLIWALLA, 2005).

FELDMANN *et al.* (1996) lembram que o papel dos linfócitos B na AR tem sido intensamente estudado desde que se observou que a maioria dos pacientes possuem o anticorpo IgM (imunoglobulina M), o fator reumatóide, que reconhece a região Fc da IgG (imunoglobulina G). Ambos os anticorpos, IgM e IgG, diferem da seqüência da linhagem germinal, sugerindo que o processo da fabricação destes anticorpos é estimulado pela presença de antígeno. O complexo imunológico do fator reumatóide e IgG podem contribuir para a doença, ativando o processo do complemento e estimulando a produção de citocinas.

A fisiopatologia da AR é caracterizada pela inflamação intensa que envolve a articulação, especificamente na membrana sinovial, levando à hipertrofia do tecido e a transformação funcional das células componentes desta membrana, os sinoviócitos. A membrana sinovial é normalmente composta por apenas uma camada de tecido que quando inflamada pode aumentar para dez camadas devido ao grande acúmulo dos macrófagos (sinoviócitos tipo A) e fibroblastos transformados (sinoviócitos tipo B) e produtores de uma série de mediadores inflamatórios – interleucinas. O tecido sinovial povoado de células inflamatórias (Figura 4) é rico em enzimas lesivas à articulação (metaloproteínas), denomina-se *pannus*, destacado na Figura 4 (FELDMANN *et al.*, 1996). O primeiro evento na estimulação do processo inflamatório que leva ao desenvolvimento do *pannus* parece ser a apresentação pelo macrófago ou célula dendrítica de uma proteína, ainda não identificada, previamente processada e ligada à molécula de superfície de HLA-DRB1. A apresentação é feita para o linfócito T auxiliar (T<sub>H</sub>) através de seu receptor específico, formando, por fim, um complexo de três moléculas:

molécula HLA, antígenos não identificados e o receptor do linfócito T auxiliar. Esta última célula, quando formado esse complexo, muda suas características fenotípicas e passa a lançar citocinas estimuladoras da proliferação de linfócitos e macrófagos, IL-2 e IFN- $\gamma$ , respectivamente, passando a ser denominado linfócito T<sub>H</sub>1. (SILVA *et al.*, 2003).

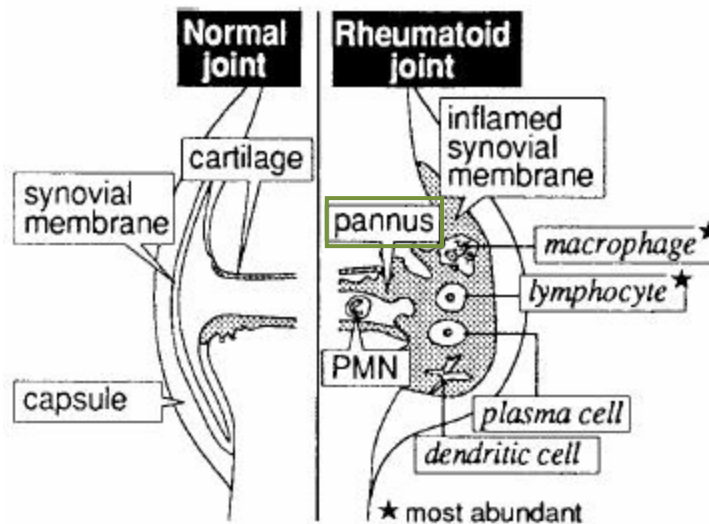


Figura 4: Articulação normal (esquerda) com apenas uma camada de tecido e, à direita a articulação reumática acometida pelo *pannus*, em destaque. Figura retirada de FELDMANN *et al.*, 1996.

As citocinas encontradas na membrana sinovial e no fluido sinovial de pacientes de AR, IL-2 e IFN- $\gamma$ , estão em baixas concentrações, enquanto que os produtos de macrófagos e fibroblastos estão abundantes, como as citocinas: IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e fator estimulador colonial de macrófago-granulócito (GM-CSF), diversas quimiocinas, entre outros. As interleucinas IL-1, IL-6, IL-15 e IL-18 e TNF- $\alpha$  são os produtos essenciais para o processo inflamatório (FIRESTEIN, 2003).

Os sinoviócitos tipo A e tipo B na lâmina íntima da articulação podem produzir fatores que mantêm a inflamação ativando células locais, figura 5. Células adjacentes expressam outras citocinas, como as metaloproteínas, prostaglandinas e óxido nítrico os quais destruirão as células da região



inflamada. As moléculas de adesão são induzidas no endotélio, mobilizando células circulantes que se acumulam no líquido sinovial (os linfócitos T), as quais devem ser ativadas por antígenos articulares que não possuem relação com fatores etiológicos (FIRESTEIN, 2003).

Um outro fator importante no processo de inflamação é a presença da proteína C-reativa, a qual possui níveis séricos elevados no processo inflamatório. Proteína C-reativa (PCR) é produzida pelos hepatócitos no início da resposta química do organismo a um evento inflamatório, desta forma ela é conhecida como “proteína da fase aguda”. A PCR está presente em níveis baixos no soro, no entanto seu nível cresce rapidamente em resposta a uma variedade de infecções ou condições inflamatórias (CLYNE & OLSHAKER, 1999). Por ter esta característica, a PCR é utilizada como marcador inespecífico da atividade da doença e de diagnóstico de inflamação oculta.

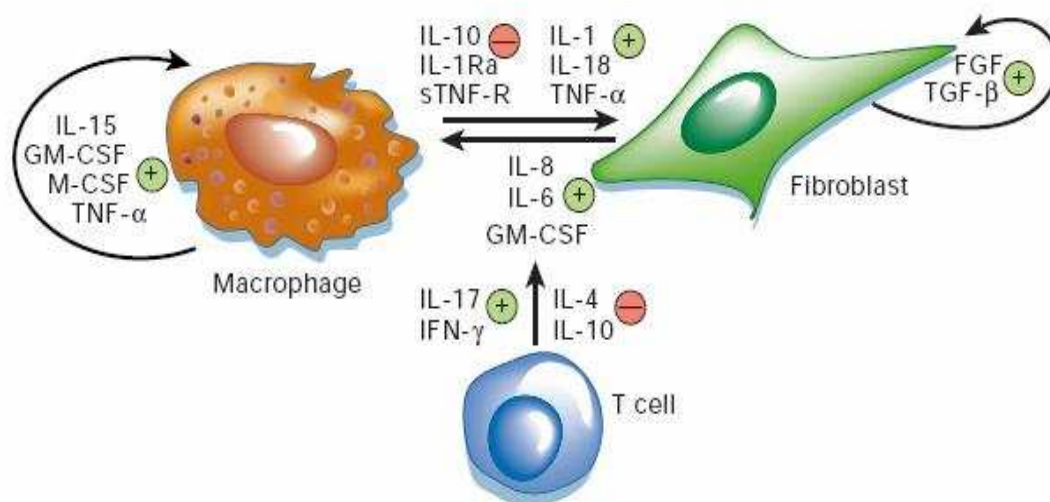


Figura 5: Rede de citocinas envolvidas na AR que são produzidas pelos macrófagos e fibroblastos produzem. As citocinas pró-inflamatórias são (+) e anti-inflamatórias são (-). Figura retirada de FIRESTEIN, 2003.

#### 1.4.1 Gene *IL-18*

A interleucina 18 (IL-18) foi identificada como indutora de interferon gama (INF- $\gamma$ ), mas como a sua estrutura é compartilhada com a interleucina-1 $\beta$ , a molécula foi incorporada à família das IL-1. Além da semelhança na

estrutura, ambas interleucinas são produzidas como moléculas precursoras inativas, que são processadas pela caspase-1 (GIEDRAITIS *et al.*, 2001).

O gene humano está no cromossomo 11q22.2-22.3, apresenta seis éxons, tamanho maior que 20 quilobases (kb, Figura 6), codificando um polipeptídeo de 193 aminoácidos.

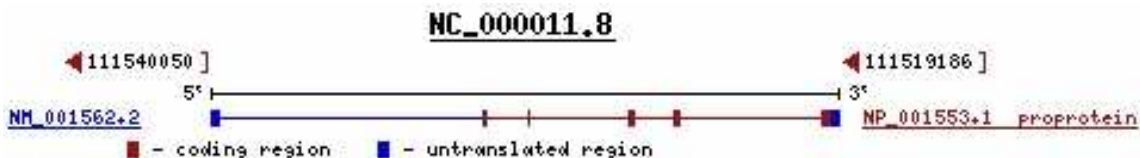


Figura 6: Figura ilustrativa do gene *IL-18*. A região em vermelho é a parte do gene codificante (éxon) e em azul é a região não codificante. Fonte: NCBI, 2008.

A IL-18 é produzida por macrófagos ativos e possui a habilidade de induzir IFN- $\gamma$  e, de fato, a IL-12 e a IL-18 possuem um sinergismo com a indução de IFN- $\gamma$ , baseando-se na regulação da expressão do receptor da IL-18 em células-alvo (GIEDRAITIS *et al.*, 2001). IL-18 induz a proliferação e a regulação da expressão de IL-2R $\alpha$ , promove fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e produção de GM-CSF pelos clones de células T<sub>H1</sub>, agindo nos linfócitos T e nas células *natural killers* (NK). A IL-18 pode ser produzida também por condrócitos articulares, osteoblastos, queratinócitos (GRACIE *et al.*, 1999).

Na ligação IL-18 ao receptor IL-18R $\alpha$ , o receptor IL-18R $\beta$  é recrutado e induz vias de sinalização comuns aos membros da família IL-1R, como a diferenciação mielóide 88 (MyD88), quinase associada ao IL-1R (IRAK), receptor do fator de necrose tumoral associado ao receptor do fator 6 (TRAF6), fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), como pode ser observado na figura 7 (THOMPSON & HUMPHRIES, 2007).

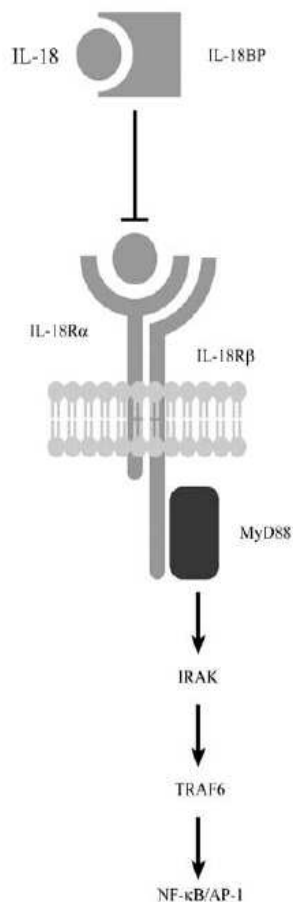


Figura 7: Esquema da transdução do sinal do IL-18R. Figura importada THOMPSON & HUMPHRIES, 2007.

A cascata inflamatória produzida pela IL-18 faz com que haja aumento na expressão de receptores para a mesma em linfócitos e células NK, levando a produção de TNF- $\alpha$ . A IL-18 também ativa a translocação de NF- $\kappa$ B em células T periféricas e fibroblastos.

Na AR, a IL-18 tem uma ação interessante sobre os osteoclastos, que são células responsáveis pela degradação do tecido ósseo, comumente afetado na patogenia. A IL-18 inibe células multinucleadas semelhantes a osteoclastos através da indução de fatores estimulantes de macrófagos e, ainda, possui ação inibitória sobre produção de osteoclastos na presença de agentes geradores dessas células. Além disso, a interleucina-18 tem sido utilizada em tratamentos de câncer, com o objetivo de diminuir tumores através da ativação das células NK, produzindo, por conseguinte, IL-12 (DINARELLO *et al.*,1998).

Esta citocina, por ter um efeito sistêmico e pleiotrópico, é também encontrada nas placas ateroscleróticas. A citocina IL-18 foi associada à instabilidade das placas em pacientes com síndromes agudas coronarianas, o que pode levar à morte (TIRET *et al.*, 2004, EVANS *et al.*, 2007).

O gene *IL-18* possui cerca de 90 polimorfismos conhecidos na região promotora e na porção codificadora do gene (IIPGA, 2008). THOMPSON & HUMPHRIES (2007), estudando a susceptibilidade a doenças inflamatórias, observaram que no fragmento de 909pb na região promotora há três SNPs (G-137C, T+113G e C+127T), cujas variações alélicas alteram a transcrição do gene. Em outro estudo de polimorfismo da mesma região, GIEDRAITIS *et al.* (2001) analisaram outro fragmento da região promotora no qual apresentou cinco polimorfismos (G-656T, C-607A, G-137C, T+113G e C+127T).

A importância de estudar a região promotora é a de observar a relação entre a variação genética do gene *IL-18* e os níveis da citocina no plasma e, como a artrite reumatóide é uma doença inflamatória que ocorre principalmente nas articulações, a interleucina-18 é encontrada no líquido sinovial sendo que o excesso de sua atividade pode agravar o dano local (GIEDRAITIS *et al.*, 2001).

A expressão de RNA mensageiro do gene da *IL-18* e a presença da citocina nos tecidos sinoviais de pacientes com AR foram encontradas em níveis altos quando comparados aos controles com osteoartrite (GRACIE *et al.*, 1999).

Neste trabalho foram analisados dois SNPs da região promotora, localizados nas posições -607 e -137, nos quais a mudança de nucleotídeo pode influenciar na transcrição, alterando o sítio de interação dos fatores transcricionais, como proteínas CREB (*cAMP response-element binding proteins*) e fator nuclear H4TF-1, respectivamente (GIEDRAITIS *et al.*, 2001). Estas mudanças de nucleotídeos nas posições da região promotora citadas anteriormente diminuem a expressão da região promotora que, por conseguinte, há a menor produção da citocina e menores níveis séricos da mesma na circulação do organismo (SIVANLIGAM *et al.*, 2003 e PAVLOVNA *et al.*, 2008).

## 2 Justificativa

A artrite reumatóide, por ser uma doença de etiologia complexa e indefinida, leva a dificuldade de diagnóstico e prognóstico. Embora haja marcadores para o diagnóstico que permitam o acompanhamento da evolução da doença, a AR possui uma característica de heterogeneidade de fatores clínicos e epidemiológicos visíveis à medida que é acompanhado o cotidiano do ambulatório de Reumatologia.

A incidência de AR é considerável na população mundial e com a evolução dos quadros clínicos graves dos doentes traz à sociedade um grande problema de invalidez, problemas sociais, de trabalhos e um aumento na taxa de mortalidade. Estes fatores vêm chamando atenção da sociedade, dos médicos e da indústria farmacêutica.

No Brasil a AR é pouco estudada, não se sabe sobre as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes, uma vez que a população brasileira é caracterizada como geneticamente singular, e não se podem realizar comparações diretas quando utilizados dados e informações de outros países, os quais possuem características genéticas populacionais distintas. Por isso, há necessidade de reproduzir estudos de diversos lugares do mundo para se averiguar quais condições são características da população e da doença.

Com este trabalho buscou-se levantar dados clínicos e epidemiológicos da amostra estudada com o intuito de caracterizar a doença, e como que fatores genéticos podem estar contribuindo a patogênese. Dentre os fatores genéticos, foi estudado o gene que codifica a citocina pró-inflamatória Interleucina-18 (*IL-18*), a qual possui um papel pleiotrópico que está relacionada com o desenvolvimento da AR, gravidade das manifestações articulares e/ou extra-articulares, mortalidade dos pacientes e etc. (GIEDRAITIS *et al.*, 2001). A região estudada do gene, região promotora, possui um papel fundamental sobre a regulação desta citocina que, uma vez em altas concentrações no sangue, pode levar a um quadro grave do paciente. Além do que, o entendimento da importância desta molécula na imunopatologia da AR possa sugerir a IL-18 como um alvo terapêutico.

### 3 Objetivos

Analisar associação dos polimorfismos da região promotora do gene *IL-18* (-137 e -607) com Artrite Reumatóide (AR) no estado de Santa Catarina, comparando os pacientes com AR a um grupo de indivíduos saudáveis (estudo caso-controle). Foram observadas as freqüências alélicas e genotípicas obtidas neste trabalho, confrontando-as com dados em outras populações descritos na literatura.

#### 3.1 Objetivos específicos

1. Aumentar o número de pacientes e controles no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE).
2. Elaborar um banco de dados dos pacientes, incluindo dados clínicos e epidemiológicos da Artrite Reumatóide.
3. Otimizar as técnicas necessárias para genotipagem do gene *IL-18*.
4. Identificar e determinar as freqüências dos alelos e dos genótipos dos SNPs -604 e -137 do gene *IL-18*, em pacientes e controles.
5. Realizar análise estatística dos resultados, tal como a verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os locos estudados do gene *IL-18*, nas amostras de pacientes e de controles.
6. Realizar um estudo de associação caso-controle para avaliação do papel dos diferentes alelos acima citados na suscetibilidade à Artrite Reumatóide.
7. Comparar as freqüências obtidas nas populações estudadas com outras populações verificadas na literatura.
8. Caracterizar a amostra de pacientes com AR através de dados clínicos e epidemiológicos e realizar análises estatísticas da influência dos dados com os polimorfismos estudados e entre si.

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 Coleta

A amostra foi constituída de pacientes com diagnóstico de Artrite Reumatóide, de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology – ACR*), atendidos no ambulatório de Reumatologia no Hospital Universitário (HU) vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de março de 2007 a agosto de 2009. Foram obtidas 97 amostras de pacientes com AR e o grupo controle foi constituído com 151 pessoas saudáveis, participantes como controles de um projeto de pesquisa desenvolvido paralelamente pela equipe de pesquisa do LAPOGE, sobre câncer de mama. Como no estudo com câncer de mama havia somente mulheres, alguns homens foram incluídos no grupo controle, mas sem pareamento por sexo e idade. Indivíduos com histórico familiar de doença auto-imune foram eliminados do grupo controle.

Os dados familiares e epidemiológicos das pacientes foram obtidos durante entrevista, através de questionários estruturados (ANEXO A). Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários. Após a obtenção do consentimento informado assinado pelo paciente (ANEXO B) e da entrevista, foram coletados 10 ml de sangue periférico, em tubo com anticoagulante EDTA para extração de DNA e análise dos polimorfismos genéticos no LAPOGE. Os dados familiares e epidemiológicos do grupo controle foram obtidos de maneira similar, bem como o consentimento livre e esclarecido e a coleta de sangue periférico (ANEXO C).

Este trabalho faz parte de um projeto maior em vigência no LAPOGE chamado “Genética da auto-imunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide 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.

## 4.2 Processamento das amostras de sangue

O material biológico obtido das coletas foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto (rpm), durante 20 minutos para a separação dos constituintes do sangue. O plasma foi estocado para futuras pesquisas, a camada de leucócitos (*buffy coat*) foi armazenada para a extração de DNA genômico destas células. As amostras separadas foram armazenadas a -20°C.

## 4.3 Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA genômico será de acordo com SAMBROOK & RUSSEL (2001), pela técnica de Fenol-clorofórmio. Após a extração, o DNA constituiu um banco de DNA organizado a partir do número de matrícula dos indivíduos, contendo dados clínicos e epidemiológicos. Este banco de DNA genômico é estocado a -20°C e foi analisado neste projeto e será utilizado em futuras análises moleculares.

Após a extração, uma alíquota de DNA foi quantificada através da eletroforese em gel de agarose 1% e pela absorbância medida em 260nm e 280 nm em espectrofotômetro (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A partir da quantificação, as amostras foram diluídas à concentração padrão do laboratório (20µg/ml).

## 4.4 Gene *IL-18*

### 4.4.1 Polimorfismo do gene *IL-18* -607

Os polimorfismos analisados neste gene estão presentes na região promotora do mesmo. A genotipagem do SNP da posição -607 foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e pelo método de detecção do polimorfismo pelo tamanho do fragmento com o uso de enzima de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR, R e F na tabela 3, amplificam um fragmento de 301pb (pares de bases) que abrange o polimorfismo em questão.



Tabela 3: Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos polimorfismos estudados do gene *IL-18*. Adaptado de TAKADA *et al.* 2002.

Posição	Seqüência dos iniciadores*
-607	F: 5'-CTTTGCTATCATTCCAGGAA-3' R: 5'-TAACCTCATTGAGGACTTCC-3'
-137	controle F: 5'-CCAATAGGACTGATTATTCCGCA-3' controle R: 5'-AGGAGGGCAAATGCACTGG-3' F1 específico: 5'-CCCCAACTTTTACGGAAGAAA <b>G</b> -3' F2 específico: 5'-CCCCAACTTTTACGGAAGAAA <b>C</b> -3'

\* F: forward primer; R: reverse primer

**G e C** alelos em destaque

O protocolo utilizado para a amplificação do gene através da técnica de PCR está contido na tabela 4 e o programa utilizado no termociclador para a amplificação está descrito na tabela 5.

Tabela 4: Protocolos da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*) para os dois SNPs (-607 e -137) do gene *IL-18*. Adaptado de TAKADA *et al.*, 2002.

	(-607)	(-137)
Tampão 10x	2,5µl	1,20µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,0µl	0,30µl
dNTP 10mM	0,6µl	0,28µl
Primer R 50µM	0,2µl	0,12µl
Primer F 50µM	0,2µl	0,12µl
Primer F1 ou F2 50µM	---	0,12µl
BSA 10mg/ml	0,2µl	---
Taq polimerase 5U/µl	0,2µl	0,08µl
Água ultra-purificada	16,1µl	7,98µl
DNA 20ng	4,0µl	2,00µl
Total	25,0µl	12,0µl

O produto de PCR do SNP *IL-18* -607 foi digerido com 6U (unidades) da enzima *MseI* (Biolabs, New England) a 37°C por 12 horas e, o produto da digestão foi submetido a eletroforese em um gel de agarose 3% que recebe um banho de brometo de etídeo (1%). A enzima *MseI* reconhece o sítio de restrição T/TAA e corta o fragmento de DNA de 301pb para indivíduos

Tabela 5: Programa do termociclador utilizado para a amplificação de cada SNP (-607 e -137) do gene *IL-18*. Adaptado de TAKADA *et al.*, 2002

(-607)		
94°C	3 minutos	1 ciclo
94°C	20 segundos	35 ciclos
57°C	40 segundos	
72°C	40 segundos	
72°C	3 minutos	1 ciclo
(-137)		
94°C	2 minutos	1 ciclo
94°C	20 segundos	5 ciclos
68°C	60 segundos	
94°C	20 segundos	25 ciclos
62°C	20 segundos	
72°C	40 segundos	1 ciclo

homozigotos CC em 199, 73 e 29pb. O indivíduo homozigoto AA tem o fragmento cortado em 101, 98, 73 e 29pb e os indivíduos heterozigotos CA possuem os fragmentos 199, 101, 98, 73 e 29pb (Figura 8), como esperado (TAKADA *et al.*, 2002).

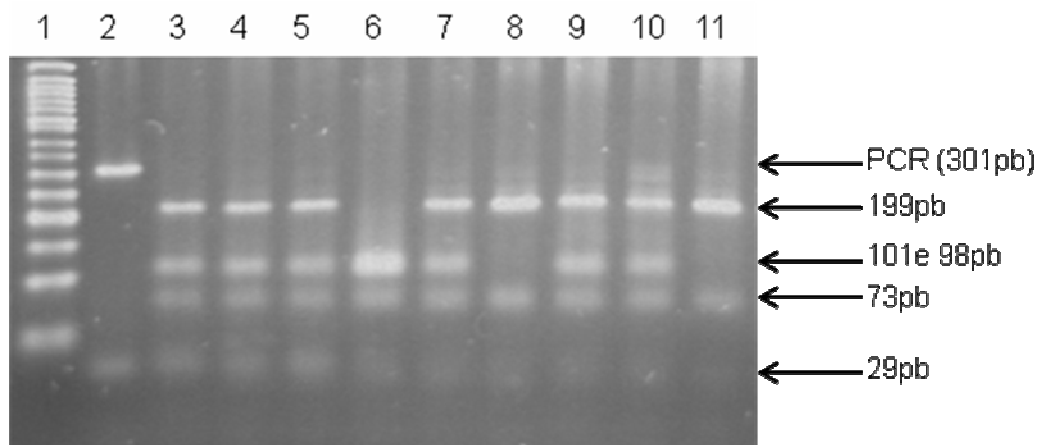


Figura 8: Foto de eletroforese em gel de agarose 3% no qual foram analisadas amostras do polimorfismo do gene *IL-18* (-607) tratado com enzima de restrição *MseI* (PCR-RFLP) que detecta o polimorfismo. Na raia 1 peso molecular de 50pb, na raia 2 produto de PCR de 301pb não submetido a digestão da enzima *MseI*. As amostras nas raias 3, 4, 5, 7, 9 e 10 são genótipos CA (199pb, 101pb, 98pb e 73pb), a amostra da raia 6 tem o genótipo AA (101pb, 98pb e 73pb) e as amostras das raias 8 e 11 são genótipos CC (199pb e 73pb).

#### 4.4.2 Polimorfismo do gene *IL-18* -137

O polimorfismo do gene *IL-18* na posição -137 foi analisado pelo método de PCR de oligonucleotídeos iniciadores de seqüências específicas (SSP – *Sequence Specific Primers*) como descrito por GIEDRAITIS *et al.* (2001). Os oligonucleotídeos iniciadores da reação em cadeia da polimerase são compostos por um oligonucleotídeo iniciador *reverse* comum a ambos os alelos (controle R tabela 3) e dois iniciadores *forward* de seqüência específica (F1 e F2 específicos na tabela 3). Amplificou-se um produto de 261pb. E como controle interno foi usado um oligonucleotídeo iniciador *forward* (controle F na tabela 2) que abrange a região polimórfica, garantindo, assim, que há DNA na amostra analisada, e amplificando um fragmento de 446pb (TAKADA *et al.*, 2002).

O protocolo da PCR para este loco está na tabela 4 e o programa utilizado no termociclador para a amplificação dos fragmentos está na tabela 5.

Os produtos de PCR foram visualizados na eletroforese de um gel de agarose 1,5% que foi banhado por brometo de etídio (1%) (TAKADA *et al.*, 2002), como pode ser observado na figura 9.

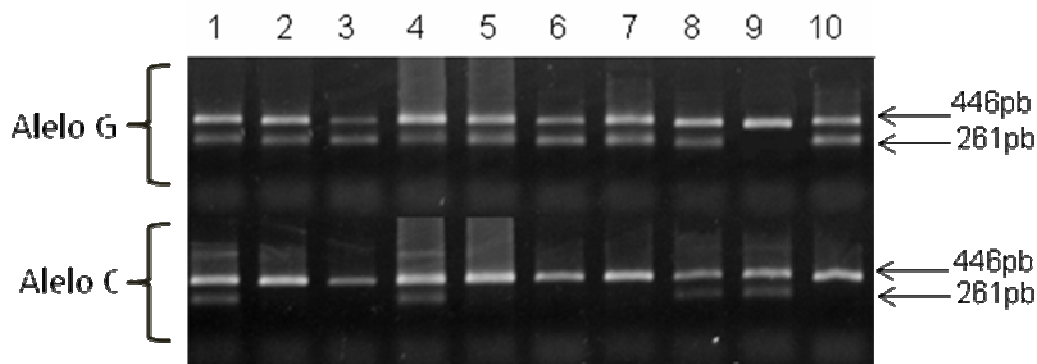


Figura 9: Foto de eletroforese em dois géis 1,5% de agarose no qual foram analisadas amostras de PCR do polimorfismo do gene *IL-18* (-137) por iniciadores (*primers*) de seqüências específicas (PCR-SSP). Na foto superior, o indicador do alelo G, são amostras que amplificaram para o protocolo de PCR-SSP para tal alelo (F1), sendo que a banda de maior tamanho (446pb) é o controle interno do sistema e a banda de 261pb contém o alelo G. As amostras na foto de baixo estão indicadas para o alelo C que, por conseguinte, foram amplificadas por PCR-SSP para o alelo C (F2), sendo que a banda de 446pb é o controle interno no sistema e a banda menor de 261pb contém o alelo C. As raias (vertical) são os mesmos indivíduos que foram submetidos a ambos os sistemas, desta forma a raia 1, 4 e 8 possuem o genótipo GC. Já as raias 2, 3, 5, 6, 7, 10 são amostras genotipadas como GG e por fim, a amostra da raia 9 é genotipada como CC.

#### 4.5 Análise e tratamento dos dados

As freqüências alélicas e genotípicas em cada grupo de amostras foram estimadas por contagem direta, submetidas ao teste do  $\chi^2$  com o intuito de verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), e o valor de  $p$  foi considerado estatisticamente significativo quando menor que 0,05. Para confirmação dos cálculos utilizou-se o software GenePop, disponível em <http://genepop.curtin.edu.au/>. Adotou-se grau de liberdade (GL) igual a 1, pois retirou-se do número de classes genotípicas de resultados, o número de informações da amostra necessário ao cálculo dos valores esperados para essas classes (BEIGUELMAN, 2008).

O teste de homogeneidade foi calculado entre casos e controles quanto à composição étnica em uma tabela de contingência 3x2, adotando o GL igual a 2. O valor de  $p$  foi obtido através do software Chi Square Calculator, disponível em <http://www.stat.tamu.edu/~west/applets/chisqdemo.html>.

A análise da ocorrência não aleatória de certas combinações alélicas entre os dois SNPs do gene *IL-18* (-607 e -137) para a verificação haplotípica foi realizada através do uso do software GenePop. Este teste de desequilíbrio de ligação é utilizado com o intuito de verificar se os dois SNPs estão sendo segregados independentes entre si. Se as combinações alélicas observadas dos dois polimorfismos analisados estão segregando juntos numa freqüência acima da esperada, apresentando desvios significativos, considera-se que estes locos estão em desequilíbrio de ligação.

Na comparação entre os dois grupos foram aplicados os métodos clássicos de análise epidemiológica para estudos caso-controle (BRESLOW & DAY, 1980). Para uma estimativa da associação entre os diversos alelos estudados e a artrite reumatóide, foi calculada uma razão de probabilidade, *odds ratios* (OR), segundo WOOLF (1955), através do software EpiMax Table Calculator disponível em <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>.

O valor de OR é muito próximo ao do risco relativo, que exprime quantas vezes o caráter em estudo (no caso, a artrite reumatóide) é mais

freqüente entre os portadores de um determinado fator (no caso, um alelo específico) do que entre aqueles que não possuem o mesmo fator. O valor de OR foi obtido através da construção de uma tabela 2x2 na qual são considerados os pacientes com o fator (casa a), os pacientes sem o fator (casa b), os controles com o fator (casa c) e os controles sem o fator (casa d). O valor de OR resulta de efetuar a operação matemática  $(a.d)/(b.c)$ , de acordo com a tabela 6.

Tabela 6: Tabela 2x2 para o cálculo do risco relativo (*Odds Ratio* – OR) entre casos e controles.

	Casos	Controles
Risco	a	b
Não-risco	c	d

Valores de OR iguais a 1 significam que o fator não está associado à característica em questão. Valores maiores do que 1 ( $OR > 1$ ) indicam maior probabilidade de desenvolver a doença, enquanto que valores menores do que 1 ( $OR < 1$ ) apontam para uma certa proteção, conferida pelo fator estudado ou por um outro fator ligado ao primeiro, contra o desenvolvimento da patologia.

A *odds ratio* e os respectivos intervalos de confiança (IC) de 95% foram estimados e considerados valores estatisticamente significativos quando o valor de  $p$  foi inferior a 0,05 (5%).

## 5 Resultados

### 5.1 Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por 248 mulheres e homens, sendo 151 controles e 97 casos, residentes no estado de Santa Catarina. No grupo de casos foi composto por 86 mulheres e 11 homens em uma proporção de 7,82:1 respectivamente; já o grupo de controles foi composto por 134 mulheres e 5 homens, perfazendo uma proporção de 26,8:1 respectivamente (Figura 10).

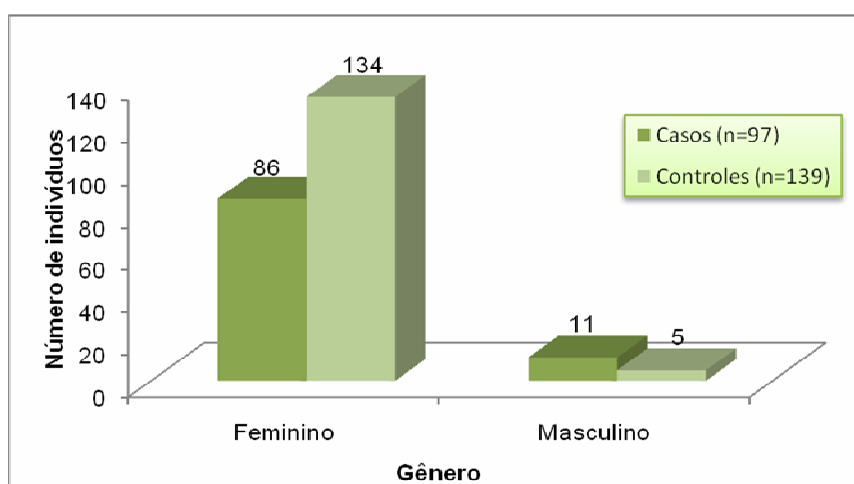


Figura 10: Distribuição do número de mulheres e de homens que compõem casos e controles no presente estudo.

A média da idade dos casos é de 54,63 ( $\pm 12,48$ ), possuindo maior prevalência de indivíduos com idades entre as classes de 40 e 69 anos, como pode ser visualizado na figura 11. Quanto aos controles, a média da idade é de 48 anos ( $\pm 15,56$ ), também com prevalência de idade entre 40 e 69 anos. No entanto, este grupo possui uma freqüência de indivíduos pertencentes à classe 20-29 acima ao do grupo de casos.

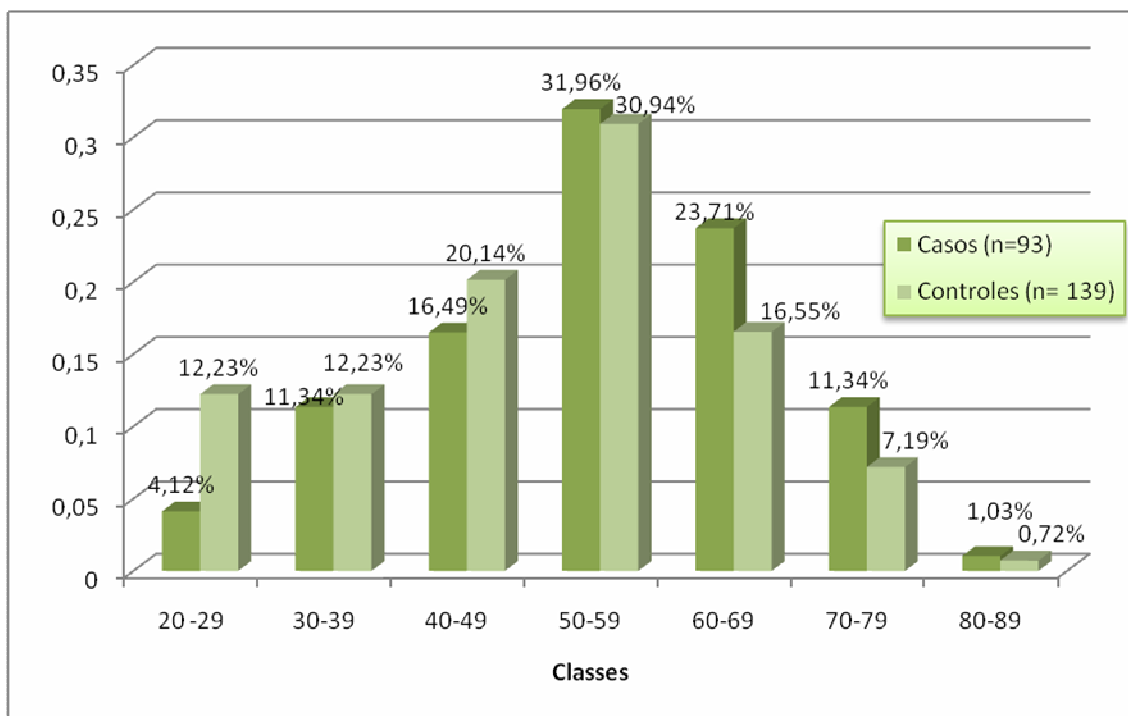


Figura 11: Frequência (%) das idades separadas em classes nos casos e controles.

As amostras foram classificadas por etnias de acordo com o histórico de ascendência da família relatado pelos indivíduos participantes do estudo. A figura 13 mostra que há prevalência de euro-descendentes em ambos os grupos analisados (75,82% em casos e 88,32% em controles), presença de indivíduos afro-descendentes (21,98% em casos e 10,95% em controles) e uma pequena frequência de indivíduos ameríndio-descendentes (2,20% em casos e 0,73% em controles). Sendo que estes dois últimos grupos étnicos com prevalência nos casos, não apresentando homogeneidade com o grupo controle ( $\chi^2 = 7,219$ ,  $p = 0,027$ ).

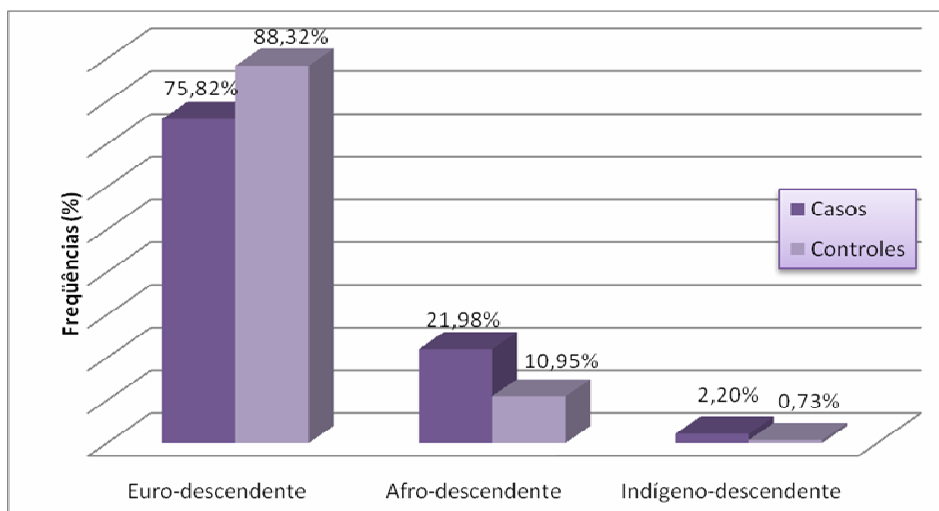


Figura 12: Frequência (%) de casos e controles caracterizados por grupos étnicos.

## 5.2 Análise de genótipos do gene *IL-18*

### 5.2.1 Polimorfismo *IL-18* (-607)

No estudo do polimorfismo do gene *IL-18* (-607), foram analisados 97 indivíduos casos e 151 indivíduos controles. Na tabela 7 encontram-se as frequências alélicas e genóticas encontradas para este loco em casos e controles, mostrando, também, que as duas amostras possuem frequências genóticas em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Tabela 7: Frequências alélicas e genóticas do SNP *IL-18* (-607) em indivíduos caso e controles.

	Casos (%) n= 97	Controles (%) n= 151
<b>ALELOS</b>		
C	0,557	0,576
A	0,443	0,424
<b>GENÓTIPOS</b>		
CC	31 (0,32)	48 (0,32)
CA	46 (0,47)	78 (0,52)
AA	20 (0,21)	25 (0,16)
EHW	$\chi^2=0,149$ , $p=0,8367$	$\chi^2=0,502$ , $p=0,3325$

EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg,  $p$ = probabilidade.



Na tabela 8, é possível verificar os valores de OR encontrados para os alelos e genótipos, sem resultados significativos. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os diferentes alelos e genótipos desse SNP e AR.

Tabela 8: Associação dos alelos e genótipos do SNP *IL-18* (-607).

	OR	IC 95%	p
<b>ALELOS</b>			
C	1,0 (Ref.)	-	-
A	1,064	0,732-1,547	0,804
<b>GENÓTIPOS</b>			
CC	1,0 (Ref.)	-	-
CA	0,914	0,497-1,681	0,869
AA	1,164	0,522-2,593	0,830
(CA+AA) x CC	0,974	0,550-1,729	1,000

OR= Odds Ratio, IC= Intervalo de Confiança 95%, p<0,05 foi considerado significativo

### 5.2.2 Polimorfismo *IL-18* (-137)

No estudo do polimorfismo do gene *IL-18* (-137), foram analisados 97 indivíduos casos e 151 indivíduos controles.

Tabela 9: Freqüências alélicas e genóticas do SNP *IL-18* (-137) em indivíduos caso e controles.

	Casos (%) n= 97	Controles (%) n= 151
<b>ALELOS</b>		
G	0,696	0,709
C	0,304	0,291
<b>GENÓTIPOS</b>		
GG	45 (0,46)	70 (0,46)
GC	45 (0,46)	74 (0,49)
CC	7 (0,07)	7 (0,05)
<b>EHW</b>	$\chi^2 = 0,599$ , p= 0,3455	$\chi^2 = 5,264$ , p= 0,0059

EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg, p= probabilidade.

Na tabela 9 encontram-se as freqüências alélicas e genóticas encontradas para este loco em indivíduos caso e controles, bem como os valores de qui-quadrado e de probabilidade em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Para os controles as freqüências genóticas não se encontram em equilíbrio ( $\chi^2 = 5,264$  ,  $p = 0,0218$ ,  $GL=1$ ).

Para avaliar o risco dos alelos e genótipos entre casos e controles foi calculado o OR, considerando o alelo C como o alelo de risco e o alelo G como referência (OR=1,0). O genótipo CC possui freqüência maior em casos que em controles, sendo o valor de OR= 1,556, entretanto não foram encontrados valores de OR significativos entre as amostras (Tabela 10).

Tabela 10: Associação dos alelos e genótipos do SNP *IL-18* (-137).

	OR	IC 95%	p
<b>ALELOS</b>			
G	1,0 (Ref.)	-	-
C	1,063	0,703-1,606	0,840
<b>GENÓTIPOS</b>			
GG	1,0 (Ref.)	-	-
GC	0,946	0,540-1,658	0,943
CC	1,556	0,452-5,365	0,621
(GC+CC) x GG	0,999	0,580-1,720	1,000

OR= Odds Ratio, IC= Intervalo de Confiança 95%,  $p < 0,05$  foi considerado significativo

### 5.3 Análise de desequilíbrio de ligação entre os dois locos do gene *IL-18*

Análise de desequilíbrio de ligação entre os locos *IL-18* (-607) e *IL-18* (-137) foi realizada pelo programa *Genepop* e observou-se que estes dois locos considerados como haplótipos, estão fortemente em desequilíbrio de ligação, (o valor de  $\chi^2$  foi infinito e o valor de  $p$  foi altamente significativo,  $p < 0,05$ ).

### 5.4 Análise de dados clínicos e epidemiológicos

Nos casos, foram analisados fatores importantes para o desenvolvimento da doença ou que apontam a gravidade da mesma.

Primeiramente, foi observado possíveis relações destes dados aos polimorfismos do gene *IL-18*, realizando análise de valores de OR destas informações com alelos e genótipos.

Os dados reumatológicos considerados pertinentes a este estudo foram:

- fator reumatóide (FR): positivo ou negativo, fator de risco FR+;
- proteína C-reativa (PCR): positivo ou negativo, fator de risco PCR+;

#### 5.4.1 Fator Reumatóide

O fator reumatóide positivo foi encontrado em 66,3% dos casos. Quando analisada a presença do FR e os alelos ou genótipos dos locos *IL-18* (-607 e -137), valores do OR não mostraram associação entre a presença do fator reumatóide e determinados alelos e genótipos.

#### 5.4.2 Proteína C-reativa

A proteína C-reativa estava presente em 52,38% dos casos e, ao analisar PCR+ e os locos *IL-18* (-607 e -137), os valores de OR não evidenciaram associação dos alelos ou genótipos estudados com a presença do marcador.

#### 5.4.3 Acometimento cardiovascular

Além de dados relacionados à reumatologia, pacientes com AR possuem manifestações extra-articulares, sendo que o acometimento no sistema cardiovascular é prevalente em pacientes e o maior responsável pela mortalidade de pacientes. Em relação aos polimorfismos estudados, foi possível verificar:

- níveis de colesterol: alto/baixo, sendo alto considerado fator de risco;
- pressão alta: presença ou ausência, fator de risco é a presença;
- histórico familiar de doenças cardiovasculares: presença ou ausência, considerando presença de doença cardiovasculares na família um fator de risco.

#### 5.4.3.1 Colesterol alto

Ao analisar os altos níveis de colesterol e os genótipos dos locos do gene *IL-18* (-607 e -137), através dos valores de OR e de  $p$  não se encontrou associação alguma entre os fatores analisados.

#### 5.4.3.2 Pressão alta

Os valores de OR e  $p$  calculados entre os genótipos dos locos do gene *IL-18* (-607 e -137) e a presença de pressão alta não demonstraram associação entre estes fatores.

#### 5.4.3.3 Histórico Familiar

No loco *IL-18* (-607), o alelo *A* apresentou um aumento no risco quando se trata de histórico familiar de doenças cardiovasculares, porém não foi significativa esta diferença (OR= 1,235, IC 95%= 0,658-2,320,  $p= 0,578$ ), cuja situação foi semelhante quando este alelo está presente em homozigose, *AA*, (OR= 1,509, IC 95%= 0,401-5,772,  $p= 0,695$ ), como pode ser verificado na tabela 11.

No entanto, loco *IL-18* (-137) o alelo variante, alelo *C*, mostrou um risco 2 vezes maior em pessoas com casos na família de doenças cardiovasculares, entretanto o  $p$  ficou próximo ao limiar de significância ( $p=0,055$ ). Ao analisar a presença dos genótipos foi conferida a relação de um risco maior na presença do alelo em heterozigose, *GC*, e em combinação genotípica a qual leva em consideração a presença de pelo menos um alelo *C* (**GC+CC** x *GG*), ambos valores com o  $p$  significativo (Tabela 11). Quando avaliado separadamente, *CC* não apresentou associação. Enfatizamos que o genótipo *GC* está associado com o histórico familiar de doenças cardiovasculares.

Tabela 11: Associação dos alelos e genótipos do loco *IL-18* (-137) ao analisar o polimorfismo e histórico familiar de doenças cardiovasculares. Considerou-se o alelo C como alelo de risco

Histórico familiar	OR	IC 95%	<i>p</i>
G	1,00 (Ref.)	-	-
C	2,004	(0,985-4,107)	<i>p</i> = 0,055
GG	1,00 (Ref.)	-	-
GC	2,742	(1,040-7,323)	<b><i>p</i>= 0,040</b>
CC	2,875	(0,418-24,296)	<i>p</i> = 0,415
(GC+CC) X GG	2,760	(1,087-7,080)	<b><i>p</i>= 0,031</b>

OR= Odds Ratio, IC= Índice de Confiança 95%, *p*<0,05 foi considerado significativo

#### 5.4.3.4 Tabagismo

Em relação ao tabagismo, foi possível observar que a frequência de indivíduos que possuem esse hábito é maior em casos que em controles, de acordo com a figura 13. Porém, não foi encontrada associação entre o tabagismo e risco de AR (*OR*= 1.691, IC 95%= 0,930 – 3,079 e *p*= 0,088).

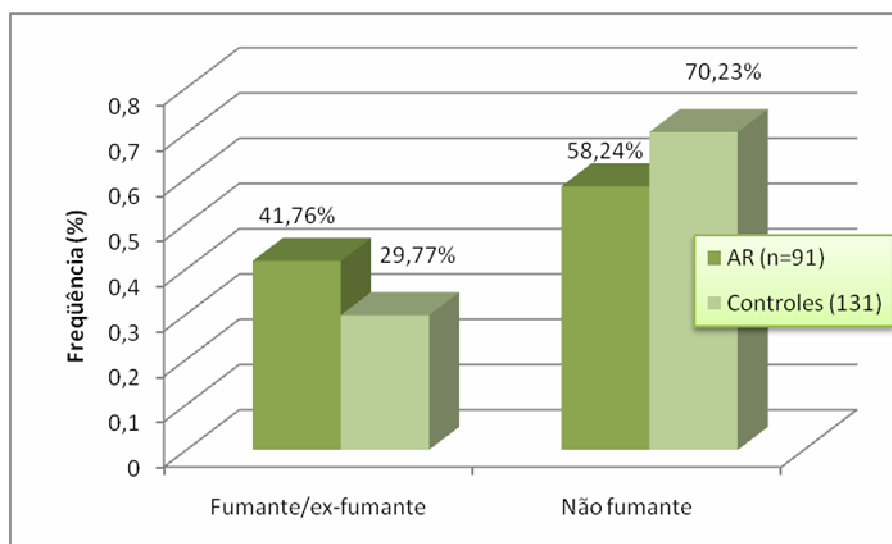


Figura 13: Frequência (%) de tabagistas em casos e controles.

Sabendo que o consumo de drogas, como cigarro e álcool, podem estar interferindo no aparecimento ou agravamento da doença, foram observadas

relações dos polimorfismos e entre tabagismo, sendo que esse hábito foi considerado fator de risco.

Ao analisar o risco do tabagismo e os genótipos do gene *IL-18* (-607 e -137), não foram encontrados valores que demonstrassem alguma relação entre os fatores analisados (Tabela 12).

Entre estas informações, foram comparados dados clínicos como fator reumatóide (positivo/negativo) e tabagismo (sim/não), PCR com tabagismo, como pode ser observado na tabela 13.

Quando analisados os elevados níveis de PCR e o hábito de fumar, observou-se que há elevação do risco em 2,67 vezes e o valor de  $p$  chegou próximo ao limiar de significância ( $p= 0,061$ ).

O hábito de fumar foi relacionado com a presença do fator reumatóide (FR), indicando que o tabagismo possua associação com a presença de FR (OR= 2,199), no entanto o valor de  $p$  não é estatisticamente significativo (Tabela 13).

Tabela 12: Associação dos polimorfismos do gene *IL-18* (-607 e -137) e o hábito tabagista nos pacientes analisados.

	OR	IC 95%	$p$
<b>SNP (-607)</b>			
C	1,00 (Ref.)	-	-
A	0,703	(0,370-1,334)	$p= 0,315$
<b>CC</b>			
CA	0,894	(0,312-2,5630)	$p= 1,000$
AA	0,490	(0,124-1,877)	$p= 0,377$
(CA+AA) X CC	0,741	(0,280-1,962)	$p= 0,660$
<b>SNP (-137)</b>			
G	1,00 (Ref.)		
C	0,566	(0,294-1,203)	$p= 0,163$
<b>GG</b>			
GC	0,687	(0,263-1,782)	$p= 0,526$
CC	0,175	(0,007-1,738)	$p= 0,198$
(GC+CC) X GG	0,591	(0,233-1,489)	$p= 0,310$

OR= Odds Ratio, IC= Índice de Confiança 95%,  $p<0,05$  foi considerado significativo

Tabela 13: Associação da proteína C-reativa (PCR) e do fator reumatóide (FR) com tabagismo.

	OR	IC 95%	<i>p</i>
PCR X CIGARRO	2,673	(0,961-7,546)	<i>p</i> = 0,061
FR X CIGARRO	2,199	(0,739-6,677)	<i>p</i> = 0,182

OR= *Odds Ratio*, IC 95%, *p*<0,05 foi considerado significativo

## 6 Discussão

### 6.1 Caracterização da amostra

A proporção encontrada de mulheres para homens é de 7,82:1, incidência maior de mulheres que a estimada para a população mundial (2,5:1) pela ARTHRITIS FOUNDATION (2008), entretanto quando comparada a proporção de mulheres e homens do atual estudo com uma pesquisa realizada em países da América Latina, a relação entre mulheres e homens é semelhante a 8:1. Esta aproximação dos dados com o esperado na América Latina pode ser sustentada pela característica heterogeneidade da população nesta região na qual o Brasil está inserido (PANLAR & GLADAR, 2006).

ARTHRITIS FOUNDATION (2008) relata que a AR acomete pessoas na faixa etária reprodutiva, normalmente na faixa da meia-idade e a média de idade dos pacientes americanos é de 66,8 anos, no entanto o presente estudo possuiu uma média de idade um pouco menor de 54,63 ( $\pm 12,48$ ), possuindo maior prevalência de indivíduos com idades entre as classes de 40 e 69 anos, como observado na Figura 11. No entanto, o desvio padrão encontrado foi alto, o que aproxima o valor médio das idades encontrados no presente estudo e na literatura. Quanto aos controles, a média de idade foi inferior a dos casos, ou seja, 48 anos ( $\pm 15,56$ ), além de ter valores distintos na classe referente às idades entre 20 e 29 (Figura 13).

Analisar aspectos étnicos da população estudada é muito importante, pois a prevalência de um grupo étnico ou a mistura de vários pode influenciar na relevância de dados clínicos e epidemiológicos.

As amostras analisadas possuíam a contribuição de três etnias (triíbrida) com prevalência de euro-descendentes 75,82% em casos e 88,32% em controles. Contudo, houve uma prevalência de afro-descendentes e ameríndio-descendentes nos casos (21,98% casos e 10,95% em controles, e 2,20% em casos e 0,73% em controles, respectivamente). De acordo com o teste de homogeneidade, percebeu-se que a composição étnica entre casos e controles é distinta, considerando, então, amostras heterogêneas ( $p < 0,05$ ). Sabe-se que



a AR possui prevalência maior em afro-americanos e afro-caribenhos (afro-descendentes) que na população negra africana (PANLAR & GLADAR, 2006).

## 6.2 Análise de genótipos do gene *IL-18*

### 6.2.1 Polimorfismo *IL-18* (-607)

Os genótipos do loco estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto nos casos como nos controles. A frequência dos alelos foi semelhante (tabela 7), sendo que o valor para o alelo A foi próximo em casos e controles (0,44 e 0,42, respectivamente) e o valor de OR= 1,064 (IC 95% 0,732 – 1,547 e  $p=0,804$ ). A distribuição das frequências dos genótipos foi similar entre casos e controles (tabela 7) sem diferença significativa entre os mesmos (tabela 8).

As frequências alélicas e genotípicas são semelhantes em outros estudos que envolveram a análise do polimorfismo do gene *IL-18* na posição -607 (tabela 14) com AR em europeus (PAWLIK *et al.*, 2006, RUEDA *et al.*, 2005), com sarcoidoses em uma população japonesa (TAKADA *et al.*, 2002), com diabetes tipo 1 em britânicos (SZESZKO *et al.*, 2006), com pacientes com hepatite B crônica em uma população chinesa Han (ZHANG *et al.*, 2005) e casos de câncer de ovário (DEHAGHANI *et al.*, 2009) e de próstata (LIU *et al.*, 2007). Em outros estudos, observou-se que o genótipo AA possuía uma frequência mais baixa de 0,03 ( $p= 0,03$ ) em AR de um estudo em chineses (SIVALINGAN *et al.*, 2003) e Lúpus Eritematoso Sistêmico em uma população da China com a frequência de 0,07 ( $p<0,01$ ) (XU *et al.*, 2007) (Tabela 14).

As frequências genotípicas e alélicas deste estudo se aproximaram a valores de estudos realizados em grupos da Europa, Japão e China. Dentre essas populações, a Europa seria a mais semelhante à composição étnica que a amostra analisada em Santa Catarina, lembrando que tanto em controles como casos houve uma grande prevalência de euro-descendentes. No entanto, não há dados de outras populações como de origem africana nem ameríndia para realizar tal comparação e avaliar a distribuição alélica e/ou genotípica do presente estudo. Não houveram muitas diferenças entre as populações asiáticas observadas na tabela 14, e o presente estudo, podendo ser inferido

Tabela 14: Estudos de associação caso-controle realizados no SNP *IL-18* (-607) em diferentes populações e distintas doenças. Pode-se observar a frequência do alelo variante, alelo A, as frequências genotípicas, valores de OR e de *p*.

	Origem	N Caso/controle	Frequência alelo A Caso/controle	Frequência Caso/controle CC/CA/AA	OR (IC95%) CC/CA/AA	<i>p</i>
GIEDRAITIS <i>et al.</i> , 2001	Europa (suecos)	414 / 278	0,41/0,38	NI	NI	NI
SIVALINGAM <i>et al.</i> , 2003 (Artrite Reumatóide)	Ásia (chineses)	74/ 235	0,43/0,46	0,18/0,19	NI	<i>p</i> >0,05
				0,80/0,69	NI	<i>p</i> >0,05
				0,03/0,12	NI	0,030
RUEDA <i>et al.</i> , 2005 (Artrite Reumatóide)	Europa (espanhóis)	362/339	0,40/0,38	0,35/0,33	NI	0,600
				0,49/0,57	NI	
				0,15/0,10	NI	
PAWLIK <i>et al.</i> , 2006 (Artrite Reumatóide)	Europa (poloneses)	305/309	0,36/0,41	0,35/0,40	1,27 (0,92-1,77)	0,146
				0,47/0,46	0,95 (0,71-1,57)	0,754
				0,17/0,13	0,71 (0,45-1,10)	0,126
XU <i>et al.</i> , 2007 (Lúpus Eritematoso Sistêmico)	Ásia (chineses)	226/436	0,20/0,34	0,66/0,46	NI	0,01
				0,27/0,39	NI	0,048
				0,07/0,15	NI	<i>p</i> >0,05
TAKADA <i>et al.</i> , 2002 (Sarcoidose)	Ásia (japoneses)	119/130	0,79/0,38	0,20/0,17	1,943 (0,943-4,003)	0,072
				0,53/0,39	2,200 (1,246-3,887)	0,007
				0,27/0,44	Referência (OR=1,0)	

Tabela 14: continuação.

SZESZKO <i>et al.</i> , 2006 (Diabetes Tipo 1)	Europa (Reino Unido)	1.560/1.715	0,39/0,38	0,36/0,38	Referência (OR=1,0) 1,08 (0,91-1,27) 1,12 (0,89-1,41)	0,540
				0,48/0,47		
				0,15/0,14		
ZHANG <i>et al.</i> , 2005 (Hepatite B crônica)	Ásia (chineses)	231/300	0,48/0,51	0,27/0,22	NI	0,196
				0,50/0,53	NI	0,476
				0,23/0,25	NI	0,645
DEHAGHANI <i>et al.</i> , 2009 (Câncer de ovário)	Ásia (iranianas)	85/158	0,44/0,40	0,25/0,36	NI	NI
				0,60/0,47	NI	NI
				0,14/0,17	NI	NI
LIU <i>et al.</i> , 2007 (Câncer de Próstata)	Ásia (chineses)	265/280	0,54/0,52	0,19/0,23	Referência (OR=1,0) 1,357 (0,877-2,100) 1,200 (0,736-1,956)	0,170 0,464
				0,54/0,49		
				0,27/0,28		
<b>Presente estudo, 2009</b> (Artrite reumatóide)	Brasil (miscigenados, com predominância de eurodescendentes)	97/151	0,44/0,42	0,32/0,32	Referência (OR=1,0) 0,914 (0,497-1,681) 1,164 (0,522-2,593)	0,869 0,830

N: número da amostra

NI: Não informado

NC: Não calculado

que a distribuição das freqüências deste polimorfismo é muito semelhante em diversas populações.

### 6.2.2 Polimorfismo *IL-18* (-137)

Os genótipos da posição -137 para os casos estão em equilíbrio de HW, porém nos controles a distribuição genotípica não obedeceu ao equilíbrio (tabela 9), sendo o valor de  $\chi^2= 5,26359$ , com  $p= 0,0059$ . De acordo com as distribuições das freqüências alélicas e genotípicas, pode-se observar que o alelo variante *IL-18* -137C possui menor freqüência tanto em casos como em controles e nota-se que há um excesso de heterozigotos nos controles, deslocando a freqüência do alelo variante para esta classe.

As freqüências genotípicas encontradas possuem uma distribuição semelhante a outros estudos do polimorfismo do gene *IL-18* (-137), sendo que as freqüências de CC são inferiores a 1%, em chineses como AR (SIVALINGAN *et al.*, 2003), em casos de sarcoidoses em uma população japonesa (TAKADA *et al.*, 2002), em Lúpus Eritematoso Sistêmico em uma população da China (XU *et al.*, 2007). O genótipo CC possui maiores freqüências em outros estudos de AR na Polônia (PAWLIK *et al.*, 2006, RUEDA *et al.*, 2005), em estudos com hepatite B crônica em uma população chinesa Han (ZHANG *et al.*, 2005) e em pacientes com diabetes tipo 1 no Reino Unido (SZESZKO *et al.*, 2006). Também em mulheres com câncer de ovário (DEHAGHANI *et al.*, 2009) e homens com câncer de próstata (LIU *et al.*, 2007), como podem ser conferidos na Tabela 15.

Tabela 15: Estudos de associação caso-controle realizados no SNP *IL-18* (-137) em diferentes populações e distintas doenças. Pode-se observar a frequência do alelo variante, alelo C, as frequências genotípicas, valores de OR e de *p*.

	Origem	N Caso/controlado	Frequência alelo C Caso/controlado	Frequência Caso/controlado GG/GC/CC	OR (IC95%) GG/GC/CC	<i>p</i>
GIEDRAITIS <i>et al.</i> , 2001	Europa (suecos)	414/278	0,30/0,25	NI	NI	NI
SIVALINGAM <i>et al.</i> , 2003 (Artrite Reumatóide)	Ásia (chineses)	74/ 235	0,16/0,12	0,73/0,77	NI	<i>p</i> >0,05
				0,23/0,22	NI	<i>p</i> >0,05
				0,04/0,01	NI	<i>p</i> >0,05
RUEDA <i>et al.</i> , 2005 (Artrite Reumatóide)	Europa (espanhóis)	362/339	0,28/0,27	0,53/0,51	NI	0,300
				0,39/0,42	NI	
				0,08/0,05	NI	
PAWLIK <i>et al.</i> , 2006 (Artrite Reumatóide)	Europa (poloneses)	305/309	0,26/0,25	0,53/0,55	1,07 (0,78-1,46)	0,695
				0,36/0,39	1,14 (0,82-1,58)	0,432
				0,10/0,50	0,15 (0,28-0,95)	0,045
XU <i>et al.</i> , 2007 (Lúpus Eritematoso Sistêmico)	Ásia (chineses)	226/436	0,17/0,13	0,74/0,75	NI	<i>p</i> >0,05
				0,17/0,24	NI	<i>p</i> >0,05
				0,09/0,01	NI	0,030
TAKADA <i>et al.</i> , 2002 (Sarcoidose)	Ásia (japoneses)	119/130	0,22/0,24	0,77/0,75	Referência (OR= 1,0)	0,849 NC
				0,22/0,23	0,944 (0,519-1,716)	
				0/0,15	NC	

Tabela 15: continuação.

	Origem	N Caso/controle	Frequência alelo C Caso/controle	Frequência Caso/controle GG/GC/CC	OR (IC95%) GG/GC/CC	p
SZESZKO <i>et al.</i> , 2006 (Diabetes Tipo 1)	Europa (Reino Unido)	4.323/4.610	0,26/0,27	0,54/0,54 0,39/0,39 0,06/0,067	Referência (OR= 1,0) 0,98 (0,90-1,07) 1,02 (0,86-1,22)	0,860
ZHANG <i>et al.</i> , 2005 (Hepatite B crônica)	Ásia (chineses)	231/300	0,11/0,18	0,78/0,67 0,19/0,30 0,017/0,027	NI NI NI	0,003 0,006 0,472
DEHAGHANI <i>et al.</i> , 2009 (Câncer de ovário)	Ásia (iranianas)	85/158	0,74/0,69	0,54/0,51 0,40/0,36 0,06/0,12	NI NI NI	NI NI NI
LIU <i>et al.</i> , 2007 (Câncer de Próstata)	Ásia (chineses)	265/280	0,74/0,82	0,56/0,69 0,36/0,26 0,07/0,04	Referência (OR= 1,0) 1,721 (1,187-2,496) 2,181 (1,034-4,603)	0,004 0,037
<b>Presente estudo, 2009</b> (Artrite reumatóide)	Brasil (miscigenados, com predominância de eurodescendentes)	97/151	0,304/0,291	0,46/0,46 0,46/0,49 0,07/0,05	Referência (OR=1,0) 0,946 (0,540-1,658) 1,556 (0,452-5,365)	0,943 0,621

N: tamanho da amostra

NI: não informado

NC: não calculado

Neste loco, pôde-se observar a semelhança na distribuição alélica e genotípica no presente estudo com populações que, a princípio, não são próximas a população catarinense e brasileira estudada, tratando-se de contribuição étnica. No entanto, os estudos que se aproximaram às freqüências obtidas estão relacionados com doenças reumatológicas, o que poderia ser apontada como uma provável relação da baixa freqüência do genótipo CC e as características das doenças. As freqüências do alelo variante C são semelhantes nos estudos entre casos e controles, no entanto as mesmas são relativamente baixas na maioria das pesquisas, com exceção quando se relacionaram câncer de ovário e de próstata realizados no continente asiático, que por sua vez possui grande heterogeneidade, quando comparadas as duas populações consideradas asiáticas, iraniana e chinesa, respectivamente.

A freqüência do genótipo CC é maior nos casos que nos controles OR= 1,556 (IC 95% 0,452-5,365 e  $p= 0,621$ ), porém sem diferença significativa (tabela 10). Em câncer de próstata este genótipo, CC, confere risco à doença (OR=2,18,  $p= 0,03$ ) (LIU *et al.*, 2007).

ZHANG *et al.* (2005) relatam que, no loco -137, GG possui uma alta freqüência em pacientes com hepatite B crônica em relação aos controles ( $p<0,05$ ), enquanto que na posição -607, o genótipo AA está próximo de associação com a inibição de replicação do DNA-HBV.

Em câncer de ovário em mulheres iranianas, não foi encontrada associação com o gene *IL-18* e a patologia, no entanto o nível sérico da citocina é aumentado nesse tipo de câncer (DEHAGHANI *et al.*, 2009)

RUEDA *et al.* (2005) não encontraram associação alguma com AR e o gene *IL-18*, semelhante à diabetes tipo 1 no estudo de SZESZKO *et al.* (2006), que não encontrou associação.

### **6.3 Análise de desequilíbrio de ligação entre os dois locos do gene *IL-18***

Os locos estudados do gene *IL-18* encontram-se em forte desequilíbrio de ligação ( $p<0,05$ ), de acordo com estudos de LIU *et al.* (2007), DEHAGHANI *et al.* (2009), ZHANG *et al.* (2005), PAWLIK *et al.* (2006), GIEDRAITIS *et al.* (2001), RUEDA *et al.* (2005).

Desta forma é possível elaborar estudos haplotípicos do gene e a relação com dados clínicos e epidemiológicos, que infelizmente não foram realizados neste estudo.

LIU *et al.* (2007), encontraram associação do haplótipo (-137C/ -607A) com o risco de câncer de próstata, sugerindo que o gene contribui com a predisposição a doença. PAWLIK *et al.* (2006) estudaram diplótipos e encontraram como fator de proteção para AR os diplótipos AC/AC e AG/AG ( $p=0,045$ ).

## **6.4 Análise de dados clínicos e epidemiológicos**

### **6.4.1 Doença cardiovascular**

O acometimento cardiovascular é uma das características de manifestações extra-articulares em pacientes com AR, sendo a principal causa de mortalidade. Entre as doenças cardiovasculares (DCV) a aterosclerose é a principal, a qual tem um caráter inflamatório, que se desenvolve pela união de fatores de risco, genéticos e administração de medicamentos, todavia a contribuição de cada fator é desconhecida (SHERINE, 2008).

Segundo PEREIRA & BORBA (2008), estudos prévios sobre a patogênese da placa aterosclerótica a associou a elevados níveis de colesterol total. Nos últimos anos, evidenciou-se que o processo inflamatório age de forma importante no acúmulo, sugere-se que haja contribuição celular e produção de auto-anticorpos contra as placas ateroscleróticas (WICK *et al.* 2004).

Os polimorfismos na região promotora do gene *IL-18* analisados no presente estudo alteram a expressão do gene, ocasionando uma produção da molécula em níveis séricos distintos, de acordo com o genótipo. Não foi possível realizar um estudo com os polimorfismos e a presença de DCV nos pacientes com AR, no entanto foram observadas relações dos polimorfismos com alguns fatores de risco.

Em relação aos níveis elevados de colesterol total, não houve relação entre os genótipos e a condição de colesterol alto. Segundo TORIGOE & LAURINDO (2006), há estudos contraditórios a respeito dos níveis de



colesterol total e da fração de LDL na AR, no entanto acredita-se na tendência de que os baixos níveis de colesterol total é caracterizado na patogênese. HUNG *et al.* (2005) encontraram relação entre os altos níveis da IL-18 com fatores de risco metabólicos (índice de massa corporal (IMC), triglicerídeos, glicose e níveis de insulina).

O estudo de SNOW & MIKULS (2005) sugerem que os valores séricos de lipídeos oscilem de acordo com a duração e severidade da doença. Em AR ativa e severa, acredita-se que os pacientes tenham baixos níveis de colesterol total, HDL e LDL. Já pacientes no início na doença possuem decréscimo dos níveis de HDL e aumento de LDL e colesterol total, o perfil de lipídeos que está relacionado com ao aumento de incidência de DCV.

No entanto, os fármacos comumente utilizados no tratamento da AR, como os antimaláricos, diminuem os níveis de colesterol total, quanto que outro fármaco amplamente utilizado – ciclosporina – possui o efeito inverso, dificultando a análise do risco de acúmulo de colesterol e o desenvolvimento de aterosclerose nos pacientes (TORIGOE & LAURINDO, 2006, RANG *et al.*, 2007).

A hipertensão arterial é comum na AR, ocorrendo numa frequência de 28,1% a 56% (TORIGOE & LAURINDO, 2006). Contudo, não houve associação entre os genótipos estudados e o risco de pressão alta no presente estudo. EVANS *et al.* (2007), em mulheres negras da África do Sul, analisaram o polimorfismo do *IL-18* (-137) e encontraram associação do genótipo GC com a elevada pressão arterial, sendo que os níveis séricos da citocina está associado com pressão arterial alta.

Os antiinflamatórios não-hormonais (AINH) que são utilizados no tratamento de AR elevam de maneira significativa a pressão arterial (TORIGOE & LAURINDO, 2006).

As doenças cardiovasculares destacam-se como a mais freqüente causa de óbito e entre elas a patogenia mais encontrada é indiscutivelmente a aterosclerose coronária, que pode acometer inclusive pacientes jovens (SHERR *et al.*, 1999). A presença do histórico familiar DCV tem se estabelecido como um fator de risco genético (CDC, 2009). Com a análise dos polimorfismos

do gene *IL-18*, pode-se notar que presença do alelo *IL-18 -137C* está associada com o histórico de doenças cardiovasculares ( $p=0,03$ ).

Estudos têm demonstrado que fatores de risco para aterosclerose estão presentes desde a infância. Com base em tal informação, passa a ser importante componente da prevenção de doença coronariana, na idade adulta, a investigação de dislipidemia e dos demais fatores de risco na infância (SHERR *et al.*, 1999).

Segundo *World Heart Federation* (2009), estudos mostram que o componente genético para hipertensão e níveis anormais de lipídeos no sangue são fatores relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Um destes fatores herdados é o alto nível de colesterol, conhecido como hipercolesterolemia e, também, observou que a diabetes tipo 2 é considerado um componente genético para o desenvolvimento de DCV (CDC, 2009). Histórico familiar de DCV também está relacionado com o aumento do diâmetro da carótida e a diminuição de sobrevivência em pacientes com síndrome de Marfan (SILVERMAN *et al.*, 1995).

Histórico familiar é um de muitos fatores de risco da DCV, especialmente nas populações jovens. Sugerindo que jovens sintomáticos possuem um elevado fator de risco que deve controlar esta condição de risco através de mudanças de comportamento (estilo de vida) e tratamentos medicamentosos (ELIS *et al.*, 2007).

#### 6.4.2 Tabagismo

O tabagismo foi mais freqüente nos casos (OR= 1,691), porém o valor de  $p$  não foi considerado significativo ( $p= 0,088$ ). Da mesma forma, sabe-se que o tabagismo aumenta o risco de desenvolver AR e, particularmente, uma AR mais erosiva e com mais nódulos reumatóides (VITTECOQ *et al.* 2008, TORIGOE & LAURINDO, 2006). Esse hábito possui efeitos biológicos diretos no processo da AR, aumentando os níveis séricos do fator reumatóide (FR), e mudando funções imunológicas no pulmão e no organismo como um todo (SAAG *et al.*,1997).

O genótipo *AA* para o loco *IL-18* (-607) foi mais freqüente em casos não tabagistas do que os que possuem o hábito, no entanto não foi considerado significativo ( $p > 0,05$ ). No entanto, o hábito tabagista foi relacionado com a presença do fator reumatóide (FR), observando que há associação entre estes dois fatores (OR= 2,199), no entanto não foi estatisticamente significativo. Quando o fator reumatóide é analisado isoladamente com os polimorfismos do gene *IL-18*, não se encontrou resultados significativos de maneira semelhante aos estudos de SIVALINGAM *et al.* (2003) e REUDA *et al.* (2005).

Acredita-se que imuno-complexos que contém FR constitui um sistema de perpetuação própria que amplifica o processo inflamatório sinovial (TUOMI *et al.*, 1990). O tabagismo tem mostrado um aumento no número de células brancas e os pacientes que consomem altos níveis de cigarro possuem anormalidades nos linfócitos T circulantes e elevada produção de anticorpos anti-nucleares, o que predispõem a infecção ou severidade (SAAG *et al.*, 1997, TUOMI *et al.*, 1990).

Os casos com AR possuem um grande risco de morte prematura em relação à população em geral. O excesso de mortalidade está relacionado com DCV, a qual é promovida pela doença em si (inflamação crônica, tratamento) e fatores de riscos convencionais (VITTECOQ *et al.*, 2008). Como a mortalidade cardiovascular na AR é mais prevalente nas formas mais agressivas, ou seja, na artrite mais erosiva, com mais manifestações extra-articulares e com fator reumatóide positivo, pode-se especular se o tabagismo teria uma ação aterogênica exacerbando a AR (TORIGOE & LAURINDO, 2006). WOLFE *et al.* (2004) notaram que o tabagismo é um fator de risco significativo no aumento de mortalidade cardiopulmonária em AR (OR = 1.5, 95% CI (1.4, 1.7)).

Ao analisar os elevados níveis de PCR e o hábito de fumar, observou-se que há elevação do risco em 2,67 vezes e o valor chegou próximo ao limiar de significância ( $p = 0,061$ ). Como a Proteína C-reativa (PCR) age em resposta a uma variedade de infecções ou condições inflamatórias (CLYNE & OLSHAKER, 1999), a sua presença aumentada em pessoas que fumam sugere a relação entre estes dois parâmetros, pois o hábito de fumar causa inflamações nas vias aéreas, causando patologias graves.

Como a aterosclerose é uma desordem inflamatória semelhante ao que ocorre na membrana sinovial e possui a característica da formação do *pannus*, ambas as patologias envolvem a produção de citocinas inflamatórias, elevados níveis séricos de reagentes de fase aguda (PCR, fibrinogênio e amilóide-A), ativação de células T e expressão local de moléculas de adesão. A inflamação que ocorre na aterosclerose possui elevados níveis de PCR, o que pode relacionar os altos níveis da proteína com doenças cardiovasculares (DCV) (SNOW & MIKULS, 2005). Entretanto, quando a PCR foi analisada com polimorfismos do gene *IL-18*, não foram encontrados dados significativos em relação a seus altos níveis e o gene, mostrando a não-relação entre ambos.

## 7 Conclusão

Na Artrite Reumatóide, as frequências de mulheres realmente são maiores que as de homens acometidos pela doença, o que indica fatores hormonais ou apenas sociais, pois este grupo busca mais auxílio médico. A prevalência de pacientes é da faixa etária reprodutiva, de atividade profissional e pessoal. Os casos possuíam uma caracterização étnica distinta dos controles.

Na análise das frequências dos genótipos em ambas as posições do gene da *IL-18*, -607 e -137, as mesmas mostraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), com exceção para o loco -137 em indivíduos controles. Não foram encontradas associações nem fatores de proteção dos genótipos em casos, em relação aos controles.

Os fatores que poderiam predispor à doença como o tabagismo e a presença do FR e da PCR, não foram relacionados com os polimorfismos do gene estudado (*IL-18* -607 e -137) e sim com outros fatores, como o tabagismo, no entanto não foi significativo.

Entre as manifestações extra-articulares presentes na AR, foram analisados fatores que são considerados de risco para DCV e a sua possível relação com o gene que codifica a interleucina-18, como níveis de colesterol total altos e pressão arterial alta, entretanto nenhum resultado foi significativamente aceito. Em outra análise, todavia, encontrou-se associação significativa do polimorfismo do gene *IL-18* -137CC com pessoas que tenham histórico de doenças cardiovasculares na família, supondo uma maior suscetibilidade para aquele genótipo e pessoas com histórico familiar de DCV.

O estudo foi realizado com uma amostragem pequena de casos e controles o que poderia ser um fator de grande influência na não significância dos resultados encontrados. Com o intuito de avaliar os dados próximos a significância, seria interessante analisar novos casos de AR.

Cabe ressaltar que a análise do polimorfismo do gene *IL-18* em pacientes com AR é um estudo inédito na região do sul do País e, também, brasileiro, que enriquece a pesquisa no País e na reumatologia.

## 8 Referências

ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H., PILLAI, Shiv, *Imunologia Celular e Molecular*, 6ª edição (Tradução por Claudia Reali et al.), Editora Elsevier, 564p., 2008.

ARTHRITIS FOUNDATION, News from the Arthritis Foundation, Rheumatoid Arthritis Fact Sheet. Disponível em [www.arthritis.org](http://www.arthritis.org) Acesso em setembro de 2008.

AVIÑA-ZUBIETA, J. Antonio, CHOI, Hyon K, SADATSAFAVI, Mohsen, ETMINAN Mahyar, ESDAILE, John M., LACAILLE, Diane, Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis of Observational Studies. **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)**. Vol. 59, No. 12, p. 1690–1697, 2008.

BACK, Lia Kubelka de Carlos, *Lúpus Eritematoso Sistêmico: Pesquisa de Marcadores Moleculares de Susceptibilidade e Prognóstico*. Florianópolis, 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2007.

BEIGUELAMAN, Bernardo, *Genética de Populações*, SBG, 2008. Disponível em [http://www.sbg.org.br/ebook/Novo/genetica\\_de\\_populacoes.pdf](http://www.sbg.org.br/ebook/Novo/genetica_de_populacoes.pdf). Acesso em novembro de 2009.

BRAUN-PRADO, Karin, *Estudo do polimorfismo dos genes *IL4*, *IL13* e *PDCD1* e investigação de possíveis interações gênicas no pênfigo foliáceo endêmico*. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Programa de Pós-Graduação Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

BRESLOW, N.E. & DAY, N.E. *Statistical methods in cancer research*. Vol. 1. The analysis of case-control studies. **International Agency for Research on Cancer Scientific Publication**, Vol. 32, p. 5-338, 1980.

CDC – Center for Disease Control and Prevention  
<[www.cdc.gov/ncbddd/BD/family\\_history\\_IDdiabetes.htm](http://www.cdc.gov/ncbddd/BD/family_history_IDdiabetes.htm)>. Acesso em novembro de 2009.

CLYNE , Brian & OLSHAKER, Jonathan S. The C-Reactive Protein **The Journal of Emergency Medicine**, Vol. 17, No. 6, pp. 1019–1025, 1999.

COPE, A. P., Exploring the reciprocal relationship between immunity and inflammation in chronic inflammatory arthritis, **Rheumatology**, Vol. 42, p. 716-731, 2003.

DEHAGHANI, Alamtaj Samsami, SHAHRIARY, Khatere, KASHEF, Mohammad Amin, NAEIMI, Sirous, FATTAHI, Mohammad Javad, MOJTAHEDI, Zahra , Interleukin-18 gene promoter and serum level in women with ovarian cancer, **Mol Biol Rep**, 2009.

DINARELLO, Charles A., NOVICK, Daniela, PUREN, Adrian J., FANTUZZI, Giamila, SHAPIRO, Leland, MÜHL, Heiko, YOON, Do-Young, RAZNIKOV, Leonid L., KIM, Soo-Hyun, RUBINSTEIN, Menachem, Overview of interleukin-18: more than interferon- $\gamma$  inducing factor, **Journal of Leucocyte Biology**, Vol. 63, p. 658-663, 1998.

ELIS, A., PEREG, D., TIROSH, A., SHOCHAT, T., TEKES-MANOVA, D., LISHNER, M. Family history of cardiovascular disease does not predict risk-reducing behavior. Abstracts of the 76th Congress of the European Atherosclerosis Society. **Atherosclerosis Supplements** Vol. 8, n. 1, p. 131, 2007.

EVANS, Juliet, COLLINS, Malcom, JENNINGS, Courtney, MERWE, Lize van der, SÖDERSTRÖM, Ingegerd, OLSSON, Tommy, LEVITT, Naomi, LAMBERT, Estelle V., GOEDECKE, Julia H., The association of interleukin-18 genotype and serum levels with metabolic risk factors for cardiovascular disease, **European Journal of Endocrinology**, Vol. 157, p. 633-640, 2007.

FEHERVARI, Zoltan & SAKAGUCHI, Shimon, As tropas de paz do sistema imunológico, **Scientific American Brasil**, ano 5, nº54, p. 50-57, 2006.

FELDMANN, Marc; BRENNAN, Fionula M.; MAINI, Ravinder N., Rheumatoid Arthritis, **Cell**, Vol. 85, p. 307-310, 1996.

FIRESTEIN, Gary S., Evolving concepts of rheumatoid arthritis, **Insight Review Articles**, Nature, Vol. 423, p. 356-361, 2003.

FREITAS JÚNIOR, Ismael Forte, CASTOLDI, Robson Chacon, MORETI, Diego Grando, PEREIRA Miguel Luis, CARDOSO, Mauro Leandro, CODOGNO, Jamile Sanches, FERNANDES, Rômulo Araújo, BUENO Denise Rodrigues, GOMES, Jaime de Oliveira. Aptidão Física, História Familiar e Ocorrência de Hipertensão Arterial, Osteoporose, Doenças Metabólicas e Cardíacas entre Mulheres. **Ver. SOCERJ**. Vol. 22, n.3, p.158-164, 2009.

GIEDRAITIS, Vilmantas; HE, Bing; HUANG, Wen-Xin; HILLERT, Jan, Cloning and mutation analysis of the human *IL-18* promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation, **Journal of Neuroimmunology**, Vol. 112, p. 146-152, 2001.

GRACIE, J. Alastair; FORSEY, Rosalyn J.; CHAN, Woon L.; GILMOUR, Ashley; LEUNG, Bernard P.; GREER, Morag R.; KENNEDY, Kirsty; CARTER, Robert; WEI, Xiao-Qing; XU, Damo; FIELD, Max; FOULIS, Alan; LIEW Foo Y.; MCINNES, Iain B., A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis, **The Journal of Clinical Investigation**, Vol.104, nº10, p. 1393-1401, 1999.

GREGERSEN, Peter K. & BEHRENS, Timothy W., Genetics of autoimmune diseases – disorders of immune homeostasis. **Nature Reviews Genetics**, Vol. 7, p. 917-926, 2006.

GREGERSEN, Peter K., Pathways to gene identification in rheumatoid arthritis: *PTPN22* and beyond, **Immunological Reviews**, Vol.120, p. 74-86, 2005.



HUNG, Joseph, MCQUILLAN, Brendan M., CHAPMAN, Caroline M. L., THOMPSON, Peter L., BEILBY, John P., Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** Vol. 25, p. 1268-1273, 2005.

Innate Immunity PGA (IIPGA) collaboration. Disponível em <http://innateimmunity.net> Acesso em novembro de 2008.

JANEWAY, Charles A.; Travers, Paul; WALPORT, Mark; SHLOMCHIK, Mark, *Imunobiologia – O sistema immune na saúde e na doença*; tradução Cristina Bonorino *et al.*, 5ª edição, **Editora ARTMED**, p. 527-548, 2002.

KLARESKOG, Lars, CATRINA, Anca Irinel, PAGET, Stephen, Rheumatoid Arthritis, Seminar, **The Lancet**, Vol. 09, p. 1-14, 2009.

KLARESKOG, Lars, CATRINA, Anca Irinel, PAGET, Stephen, Rheumatoid arthritis, **Seminar**, 2009.

KWOK, Pui-Yan, Single nucleotide polymorphisms: methods and protocols, *Methods in molecular biology*<sup>TM</sup>, **Humana Press**, Vol. 212, p. 1-14, 2003.

LEVY, Roger A.; KLUMB, Evandro M.; PINHEIRO, Geraldo da Rocha C.; RODRIGUEZ, Mariana Schaefer; ROMEIRO, Leonardo D.; ALBUQUERQUE, Elisa M. N., **Atlas Ilustrado Reumatologia**, Fascículo 4 – Artrite Reumatóide, p. 1-20, não datado.

LIU, Yunguang, LIN, Na, HUANG, Li, XU, Qunqing, PANG4, Guangfu, Genetic polymorphisms of the interleukin-18 gene and risk of prostate cancer, **DNA and Cell Biology**, Vol. 26, nº 8, p. 613-18, 2007.

MCCUSKER ME; YOON PW; GWINN M; MALARCHER AM; NEFF L; KHOURY MJ. Family history of heart disease and cardiovascular disease risk-reducing behaviors. **Genet. Med.** Vol.6, n. 3, p.153-8, 2004.

MERCK & CO., INC., Where the patients come first - The Merck Manuals – Online Medical Library. 1995-2008. Disponível em [www.merck.com](http://www.merck.com) Acesso em outubro de 2008.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) – PubMed Home. Disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) Acesso em outubro de 2008.

PANLAR (Pan-American League of Associations for Rheumatology) & GLADAR (Grupo Latinoamericano de Estudio de Artritis Reumatoide), First Latin American position paper on the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis, **Rheumatology**, Vol. 45, p. ii7-ii22, 2006.

PARSLOW, Tristram G.; STITES, Daniel P.; TERR, Abba I.; IMBODEN. John B., *Imunologia Médica*, 10ª Edição, **Editora Guanabara Koogan**, p. 353-355, 2004.

PASCERI Vincenzo, YEH, Edward T.H., A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. **Circulation**. Vol. 100, p. 2124-2126, 1999.

PAVLOVNA, K.O., SERGEEVNA, S.N., ANATOLIEVNA, L.J., IVANOVICH, K.J., LEONIDOVICH, F.M., ALEXANDROVICH, K.E., L'VOVICH, G.E., VLADIMIROVNA, Y.E., ALEXANDROVICH, K.V., VITALIEVICH, S.S., Association os single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with production os IL-18 proteina by mononuclear cells from healthy donors, **Mediators of Inflammation**, Vol. 2008, p. 1-6, 2008.

PAWLIK, A., KURZAWSKI, M., CZERNY, B., GAWRONSKA-SZKLARZ, B., DROZDZIK, M., HERCZYNSKA, M., Interleukin-18 promoter polymorphism in patients wiht rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**. Vol. 67, p. 451-418, 2006.

PEREIRA, Ivânio Alves & BORBA, Eduardo Ferreira, The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. **Swiss Med. Wkly**. Vol. 138, nº 37-38, p. 534-539, 2008.

PIARCE, Simon H. S. & MERRIMAN, Tony R., Genetic progress toward the molecular basis of autoimmunity, **Trends in Molecular Medicine**, Vol. 12, nº2, p. 90-97, 2006.

RADU, Ari Stiel, Artrite Reumatóide: Entendendo a doença, seus aspectos e conseqüências, Panorama Geral, **Revista Racine**, p. 8-20, não datado. Disponível em <http://www.ceunes.ufes.br/downloads/2/vanessabeijamini-artrite%20reumatoide%20panorama%20geral.pdf> Acesso em outubro de 2008.

RANG, H.P., DALE, M.M. & RITTER, J.M. "Farmacologia". 6ª edição, **Elsevier**, Rio de Janeiro, 2007.

Revista Vigor – Movimento e Saúde. Disponível em <http://www.revistavigor.com.br/2008/10/02/dia-mundial-de-conscientizacao-sobre-a-artrite-reumatoide/> Acesso em outubro de 2008.

RHEUMATOID ARTHRITIS. Produzida pela Arthritis Foundation 2000. Tradução para o português autorizada pela Dra. Rejane Leal Araújo. **Sociedade Brasileira de Reumatologia**. Disponível em [www.reumatologia.com.br](http://www.reumatologia.com.br) Acesso em agosto de 2008.

RUEDA, B., CONZÁLEZ-GAY, M.A., MATARAN, L., LÓPEZ-NEVOT, M.A., MARTÍN, J. Interleukin-18-promoter polymorphisms are not relevant in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, Vol. 65, p. 544-548, 2005.

SAMBROOK & RUSSEL, Molecular cloning: a laboratory manual, 3ª Edição, 2001.

SCHERR, Carlos, MAGALHÃES, Cynthia Karla, LOYOLA, Luiz Henrique, Hiperlipidemias na infância. **Hiper Ativo**. Vol. 2, p. 145-147, 1999.

SHAO, Xue-Ting, FENG, Lei, GU, Li-Juan, WU, LI-Juan, FENG, Ting-Ting, Yang, Yun-Mei, WU, Nan-Ping, YAO, Hang-Ping, Expression of interleukin-18, IL-18BP and IL-18R in serum, synovial fluid, and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis, **Clin. Exp. Med.**, 2009.

SHERINE E. Gabriel, Cardiovascular Morbidity and Mortality in Rheumatoid Arthritis, **The American Journal of Medicine** Vol.12, p. S9–S14, 2008.

SILMAN, A. J.; OLLIER, W. E.; CURREY, H. L., Failure to find disease similarity in sibling pair with rheumatoid arthritis. **Annals Rheumatoid Disease**, Vol. 46, p. 135-138, 1987.

SILVA, Raíssa G.; VANNUCCI, Andréa B.; LATORRE, Luiz C.; ZERBINI, Cristiano A. F., Como diagnosticar e tratar: Artrite Reumatóide, **Revista Brasileira Médica**, Vol. 60, nº8, p. 554-576, agosto de 2003.

SILVERMAN, David I., GRAY, Jonathon, ROMAN, Mary J., BRIGDES Allan, BURTON, Kevin, BOXER, Maureen, DEVEREUX, Richard, TSIPOURAS Petros. Family history of severe cardiovascular disease in Marfan Syndrome is associated with increase aortic diameter and decreased survival. **J. Am. Coll. Cardiol.** Vol. 26, p. 1062-1067, 1995

SIVALINGAM, S.P., YOON, K.H., KOH, D.R., FONG, K.Y., Single-nucleotide polymorphisms on the interleukin-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients: protective effect of AA genotype. **Tissue Antigens**. Vol. 62, p. 498-504, 2003.

SNOW M.H., MIKULS T.R. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease: the role of systemic inflammation and evolving strategies of prevention. **Curr. Opin. Rheumatol.** Vol. 17, p. 234-41, 2005.

SUGIMOTO, Luiz, Pesquisadores buscam nos genes as marcas da artrite reumatóide, **Jornal da Unicamp**, Universidade Estadual de Campinas, p. 3, 7 a 13 de novembro 2005.

SYMMONS, Deborah; MATHERS, Colin; PFLEGER, Bruce, The Global burden of rheumatoid arthritis in the year 2000, 2006. Disponível em <http://www.who.org> Acesso em outubro de 2008.

SZESZKO, Jeffrey S., HOWSON, Joanna M. M., COOPER, Jason D., WALKER, Neil M., TWELLS, Rebecca C. J., STEVENS, Helen E., NUTLAND, Sarah L., TODD, John A., Analysis of polymorphisms of the interleukin-18 gene in type 1 diabetes and Hardy-Weinberg Equilibrium testing., **Diabetes**, Vol. 55, p.559-563, 2006.

TAKADA, T., SUZUKI, E., MOROHASHI, K., GEJYO, F., Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population. **Tissue Antigens**. Vol. 60, p. 36-42, 2002.

THOMPSON, S.R. & HUMPHRIES, S.E., Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility, Review, **Genes and Immunity, Nature**, p. 1-9, 2007

TIRET, L., GODEFROY, T., LUBOS, E., NICAUD, V., TREGOUET, D.A., BARBAUX, S., SCHNABEL, R., BICKEL, C., ESPINDOLA-KLEIN, C., POIRIER, O., PERRET, C., MÜNZEL, T., RUPPRECHT, H.J., LACKNER, K., CAMBEIN, F., BLANKENBERG, S., Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease, **Circulation**, Vol 112, p. 643-650, 2005.

TORIGOE, Dawton Yukito & LAURINDO, Iêda Maria Magalhães, Artrite Reumatóide e Doenças Cardiovasculares. **Rev Bras Reumatol**, Vol. 46, supl.1, p. 60-66, 2006.

TUOMI, Tiinamaija, HELIOVAARA, Markku, PALOSUO, Timo, AHO, Kimmo. Smoking, lung function, and rheumatoid factors. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Vol. 49, p. 753-756, 1990.

VANG, Torkel; MILETIC, Ana V.; ARIMURA, Yutaka; TAUTZ, Lutz; RICKERT, Robert C.; MUSTELIN, Tomas, Protein tyrosine phosphatases in Autoimmunity, **Annual reviews Immunology**, Vol. 26, p. 29-55, 2008.

VITTECOQ, Olivier, LEQUERRE, Thierry, GOEB, Vincent, LE LOET , Xavier, ABDESSELAM, Tassadit Ait, KLEMMER, Nathalie. Smoking and inflammatory

diseases. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. Vol. 22, No. 5, p. 923–935, 2008.

WICK, Georg, KNOFLACH, Michael, XU, Qingbo. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Annu. Rev. Immunol.** Vol. 22, p. 361–403, 2004.

WOLFE F, MITCHELL DM, SIBLEY JT, FRIES JF, BLOCH DA, WILLIAMS CA. The mortality of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** Vol. 37, p. 481-94, 1994.

WOOF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annual Human Genetics**, Cambridge, v. 19, p. 251-253, 1955.

World Heart Federation <[www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/cardiovascular-disease-risk-factors/family-history/](http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/cardiovascular-disease-risk-factors/family-history/)> Acesso em novembro 2009.

WORTHINGTON, J., Looking back: developments in our understanding of genetics epidemiology of rheumatoid arthritis over the last 50 years, **Rheumatology**, Vol. 44, p. iv5 – iv8, 2005.

WYETH Brasil – Indústria Farmacêutica, 2007. Disponível em <http://www.wyeth.com.br/br/noticiasinterna.asp?id=475> Acesso em outubro de 2008.

XU, Qian, TIN, Soe Kyaw, PARAMALINGAM, Sivalingan Suppiah, THUMBOO, Julian, KOH, Dow-Rhoon, FONG, Kok-Yong, Interleukina-18 promoter gene polymorphisms in Chinese patients with Systemic Lupus Erythematosus: association with CC genotype at position -607. **Ann. Acad. Med. Singapore**, Vol. 36, p. 91-95, 2007.

ZHANG, Ping-An, WU, Jian-Min, LI, Yan, YANG, Xiang-Sheng, Association of polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in Chinese Han Population. **World J. Gastroenterol.** Vol. 11, nº 11, p. 1594-1598.

## Anexo A



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

**NOME:** \_\_\_\_\_ **PRONTUÁRIO/HU:** \_\_\_\_\_  
**IDADE:** \_\_\_\_\_ anos **SEXO:** ( )F ( )M **COR da Pele:** \_\_\_\_\_  
**Procedência:** \_\_\_\_\_ **Natural de:** \_\_\_\_\_  
**Estado Civil:** ( )S ( )C ( )D ( )V **Ocupação:** \_\_\_\_\_  
**Telefone:** \_\_\_\_\_  
**DATA:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ **AR:** \_\_\_\_\_

**Médico:** \_\_\_\_\_  
**Responsável:** \_\_\_\_\_

**DADOS Familiares:**

**NOME do pai:** \_\_\_\_\_  
**CIDADE onde nasceu:** \_\_\_\_\_ **Profissão:** \_\_\_\_\_  
**DESCENDÊNCIA:** Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

**NOME da mãe:** \_\_\_\_\_  
**CIDADE onde nasceu:** \_\_\_\_\_ **Profissão:** \_\_\_\_\_  
**DESCENDÊNCIA:** Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

**Tempo de doença diagnosticada:** \_\_\_\_\_

**Histórico Familiar:** AR: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_  
 Outras D. Reumat.: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_

**Manifestações Iniciais:** ( ) Febre ( ) Rigidez Matinal  
 ( ) Derrame Articular ( ) Dor Articular  
Articulações Acometidas:  
 ( ) Ombro ( ) Cotovelo ( ) Punho ( ) MCF  
 ( ) IFPM ( ) Quadril ( ) Joelho ( ) Tornozelo  
 ( ) MTF ( ) IFPP Total: \_\_\_\_\_ articulações

Manifestações Extra-articulares:

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

Outras

Quais? \_\_\_\_\_

**Evolução: Internações:**  S  N Quantas? \_\_\_\_\_ Motivos? \_\_\_\_\_

**Observações:** Osteoporose? Diabetes? Depressão? \_\_\_\_\_

**Sintomatologia Recente:**

(Nos últimos 10 dias)

Febre

Rigidez Matinal

Derrame Articular

Dor Articular

Articulações Acometidas:

Ombro  Cotovelo  Punho  MCF

IFPM  Quadril  Joelho  Tornozelo

MTF  IFPP Total: \_\_\_\_\_ articulações

Manifestações Extra-articulares:

Pleurite  Pericardite

Vasculite Reumatóide  Nódulos Reumatóides

Acometimento Ocular  Acometimento Pulmonar

Acometimento Renal  Amiloidose

Sjögren Secundário

Outras Quais? \_\_\_\_\_

**Envolvimento Cardiovascular:**

HAS

Doença Coronariana

Angina

IAM Prévio

Revascularização do Miocárdio

Cateterismo Prévio

**Envolvimento Neurológico:**  AVC  AIT  Ateroma em Carótidas

**Dislipidemia:**  Hipercolesterolemia  Hipertrigliceridemia

**Hist. Familiar de Doença Cardiovascular:**  S  N

Parentesco: \_\_\_\_\_

DAS 28 =



**Health Assesment Questionnaire (HAQ)**

Você é capaz de:	Nível de Dificuldade			
	Sem Qualquer	Com alguma	Com muita	Incapaz de fazer
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões do sapato e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos?	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: \_\_\_\_\_



## Anexo B



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

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO

#### **Informações aos participantes,**

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

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

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

## DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

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

**Florianópolis,**

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_



## Anexo C

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 lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina...”**

#### *Informações:*

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

**Procedimentos:**

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

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

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

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

**Riscos:**

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

**Custos:**

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

**Benefícios**

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

**Assinaturas:****Pesquisador****responsável**

---

Florianópolis, \_\_/\_\_/\_\_\_\_

## 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 lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.**

Florianópolis,

Assinatura:

\_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_







**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

Freqüência: ( ) 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 Freqüência (nº de cigarros por dia): \_\_\_\_\_

Tempo que fuma ou fumou:

---

Há quanto tempo parou:

---

--

**Entrevistador:** \_\_\_\_\_ **Data da entrevista:**

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

**Nome:**

**Identificação:**

---

### **Histórico Hormonal e Reprodutivo**

Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_

MENOPAUSA: ( ) Sim ( ) Não Idade: \_\_\_\_\_

HISTERECTOMIA: ( ) Sim ( ) Não

PARIDADE:

Nº de gestações \_\_\_\_\_ Idade da 1ª  
estação \_\_\_\_\_

Nº de filhos ( ) nulípara N: \_\_\_\_\_

Abortos ( ) P ( ) E N: \_\_\_\_\_

Amamentou: ( ) Sim ( ) Não Tempo total (meses):  
\_\_\_\_\_

TRAT. HORMONAL:

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

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do

AC: \_\_\_\_\_

Tempo que usa ou usou

AC: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo

parou? \_\_\_\_\_

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

Nome do

Hormônio: \_\_\_\_\_

Tempo que faz ou fez

TRH: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo

parou? \_\_\_\_\_

---