



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Polimorfismos dos genes metilenotetrahidrofolato redutase, fator de crescimento transformador $\beta 1$ e linfotoxina- α e susceptibilidade à artrite reumatoide



Olfat G. Shaker^a, Amina M. Alnoury^{b,c}, Gehan A. Hegazy^{b,d}, Hemmat E. El Haddad^e, Safaa Sayed^f e Ahmed Hamdy^{e,*}

^a Medical Biochemistry and Molecular Biology Department, Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo, Egito

^b Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, King Abdulaziz University, Jeddah, Arábia Saudita

^c Medical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Ain Shams University, Cairo, Egito

^d Medical Biochemistry Department, National Research Center, Cairo, Egito

^e Internal Medicine Department, Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo, Egito

^f Rheumatology & Rehabilitation Department, Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo, Egito

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 17 de outubro de 2015

Aceito em 16 de março de 2016

On-line em 18 de abril de 2016

Palavras-chave:

Artrite reumatoide

Polimorfismo genético

MTHFR C677 T e A1298 C

TGF- $\beta 1$ T869 C

LT- α A252G

R E S U M O

Antecedentes: A artrite reumatoide é uma doença autoimune amplamente prevalente com sugerida predisposição genética.

Objetivos: Detectar o padrão de polimorfismo dos genes metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR C677 T e A1298 C), fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ T869 C) e linfotoxina- α (LT- α A252G) em pacientes com artrite reumatoide e correlacionar esses padrões com a atividade da doença e os níveis séricos de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator ativador de linfócitos B (BAFF) e osteopontina.

Métodos: Foram genotipados 194 indivíduos – 90 controles e 104 com artrite reumatoide – à procura de polimorfismos dos genes MTHFR C677 T e A1298 C, TGF- $\beta 1$ T869 C e LT- α A252G com uma metodologia baseada na PCR-RFLP. Mensuraram-se também os níveis séricos de TNF- α , osteopontina e BAFF com kits de Elisa.

Resultados: O genótipo CT e o alelo T do MTHFR C677 T e o genótipo GG e alelo G do LT- α A252G estão associados ao risco de AR e a níveis mais elevados da citocina pró-inflamatória TNF- α em pacientes com artrite reumatoide.

Conclusão: Os achados do presente estudo sugerem que há associação entre os polimorfismos dos genes MTHFR C677 T e LT- α A252G e um risco aumentado de AR nessa amostra da população egípcia.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC

BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

E-mail: ahramadan777@gmail.com (A. Hamdy).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2016.03.005>

0482-5004/© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Methylene tetrahydrofolate reductase, transforming growth factor- β 1 and lymphotoxin- α genes polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis

A B S T R A C T

Keywords:

Rheumatoid arthritis
Gene polymorphism
MTHFR C677 T and A1298 C
TGF- β 1 T869 C
LT- α A252G

Background: Rheumatoid arthritis is a widely prevalent autoimmune disorder with suggested genetic predisposition.

Objectives: The aim of this study is to detect the pattern of genetic polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR C677 T and A1298 C), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1 T869 C) and lymphotoxin- α (LT- α A252G) in patients having rheumatoid arthritis and correlate these patterns to disease activity and serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), B-Cell Activating Factor (BAFF), and osteopontin.

Methods: A total of 194 subjects, 90 controls and 104 patients with rheumatoid arthritis were genotyped for MTHFR C677 T and A1298 C, TGF- β 1 T869 C and LT- α A252G polymorphisms using a methodology based on PCR-RFLP. Also serum levels of TNF- α , osteopontin and BAFF were measured by ELISA kits.

Results: The CT genotype and T allele of MTHFR C677 T and GG genotype and G allele of LT- α A252G are associated with the risk of RA and with higher levels of the pro-inflammatory cytokine, TNF- α in patients with rheumatoid arthritis.

Conclusion: Our findings suggest that there is association between MTHFR C677 T and LT- α A252G genes polymorphisms and increased risk of RA in this sample of Egyptian population.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune muito prevalente, que afeta aproximadamente 1% da população nos países desenvolvidos; as mulheres são mais frequentemente afetadas do que os homens (aproximadamente 3:1).¹ Nessa doença, as articulações são o principal alvo de ataque, com grande tendência à destruição das articulações e, conseqüentemente, a déficits em todos os aspectos da qualidade de vida.² As causas exatas da doença são desconhecidas, mas fatores ambientais e predisposição genética estão envolvidos. Embora esses fatores não sejam suficientes para o desenvolvimento da doença, podem desempenhar um papel na heterogeneidade do quadro clínico e na resposta ao tratamento e ser o alvo de agentes terapêuticos. Formas polimórficas do gene metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR) e alguns genes de citocinas têm sido estudados como possíveis marcadores da susceptibilidade, gravidade e/ou proteção na AR.³

O C677 T (Ala 222 Val) e o A1298 C (Glu 429 Ala) são dois polimorfismos genéticos comuns do gene MTHFR. Ambos estão associados à diminuição na atividade da enzima 5, 10 metileno-tetrahydrofolato redutase (MTHFR), com menor grau para o polimorfismo A1298 C em comparação com o C677 T.⁴ Essa enzima é responsável pela síntese de metileno-tetrahydrofolato, necessária para a síntese de purina e pirimidina e regeneração da metionina a partir da homocisteína.⁵ A diminuição na atividade dessa enzima resulta em níveis elevados de homocisteína, que são comumente encontrados em pacientes com artrite reumatoide (AR) e são parcialmente responsáveis pela alta taxa de complicações cardiovasculares nesses indivíduos.⁶

O fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) é um fator de crescimento que regula a proliferação celular, a

cicatrização de feridas e a angiogênese de um modo específico à célula.⁷ Está presente em abundância em articulações reumatóides e tem uma função anti-inflamatória, porque a sobre-expressão desse gene reduziu a artrite em um modelo animal.⁸ Indivíduos com polimorfismos nas regiões de codificação e regulação do TGF- β 1 têm uma maior propensão a desenvolver transtornos imunes. O polimorfismo TGF- β 1 (T869 C) afeta os níveis séricos de TGF- β 1 e é usado como marcador para o aumento no risco de doença em várias enfermidades.⁹

As citocinas desempenham um papel importante na patogênese da AR e seus processos inflamatórios associados e destruição articular. Isso ocorre principalmente por meio do desvio do equilíbrio para níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias à custa de citocinas anti-inflamatórias. Assim, a concentração de membros da superfamília pró-inflamatória TNF- α está diretamente correlacionada com a patologia da doença.¹⁰ O TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos. É considerado um dos principais mediadores inflamatórios da inflamação e destruição articular na AR ao induzir outras citocinas inflamatórias e estimular a expressão de moléculas de adesão pelos fibroblastos.¹¹ A linfotoxina- α (LT- α), outro membro da superfamília do TNF anteriormente conhecida como fator de necrose tumoral- β (TNF- β), induz à apoptose celular e a respostas inflamatórias após a ligação ao receptor de TNF tipos 1 e 2, respectivamente.¹² Detectou-se um polimorfismo de nucleotídeo único (A252G) no primeiro intron do gene LT- α e relatou-se que esse aumenta a expressão do nível plasmático de LT- α .¹³ Os dois alelos resultantes desse polimorfismo de nucleotídeo único são designados LT- α (10,5 kb) e LT- α (5,5 kb). O alelo LT- α (5,5 kb) está associado a níveis plasmáticos mais elevados de LT- α , malignidades linfóides e a um pior desfecho de doenças autoimunes.¹⁴

Outro membro da família TNF é o fator ativador de linfócitos B (BAFF), que pode se ligar a linfócitos B, estimular a sua proliferação e promover a sua sobrevivência e, conseqüentemente, ajudar na regulação da resposta imune inata e adaptativa. Observou-se uma desregulação do BAFF em pacientes com doenças autoimunes como a artrite reumatoide.¹⁵ A osteopontina (OPN) também é uma citocina pró-inflamatória que tem efeitos imunorreguladores em doenças autoimunes e pode estar envolvida na patogênese da AR.¹⁶

O objetivo deste estudo é detectar o padrão de polimorfismo do gene MTHFR dos tipos (C677T) e (A1298C), TGF- β 1 (T869C) e LT- α (A252G) em pacientes com artrite reumatoide egípcios e se há alguma correlação daqueles padrões com a atividade da doença e os níveis séricos de TNF- α , BAFF e osteopontina.

Amostra e métodos

Seleção da amostra

Trata-se de um estudo observacional transversal comparativo que foi feito na Unidade de Reumatologia Kasr Al Aini da Faculdade de Medicina da Universidade do Cairo, de maio a dezembro de 2013. O estudo foi feito de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque e foi aprovado pelo comitê de ética local da Faculdade de Medicina da Universidade do Cairo.

Foi obtido um consentimento informado por escrito de todos os participantes, depois de se explicarem a finalidade e a natureza da pesquisa. Foram incluídos 104 pacientes com artrite reumatoide (16 homens e 88 mulheres) e 90 indivíduos saudáveis de idade e sexo correspondentes que atuaram como controle. Os pacientes estavam em tratamento regular com fármacos anti-inflamatórios não esteroides (Aine) (n = 42), metotrexato (n = 88), prednisona (n = 24), leflunomida (n = 32) e hidroxiquina (n = 56). Os pacientes eram tratados com diferentes combinações dos fármacos anteriores. Fizeram-se uma anamnese completa e exame físico de todos os pacientes e calcularam-se o escore de atividade da doença em 28 articulações (DAS-28) e a pontuação total do Health Assessment Questionnaire (HAQ).

Exames laboratoriais

Mensuraram-se os níveis séricos de BAFF, OPN e TNF- α com kits de Elisa obtidos da R&D Systems, Minneapolis, MN para os dois primeiros e da AviBion, Helsinki, Finlândia para o TNF- α , de acordo com o protocolo do fabricante.

Análise molecular

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico com o mini-kit QIAamp DNA (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. A genotipagem foi feita por reação da polimerase em cadeia – polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

Genotipagem do MTHFR A1298C¹⁷

Usou-se um conjunto de *primers forward* “5'-TGG CTT GGA GCT GAA GGA CTA C-3'” e *reverse* “5'-CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG-3'” para a amplificação de um fragmento de 241 pares de bases; em seguida, o fragmento amplificado foi digerido pela enzima MboII. O perfil de PCR foi: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 30 segundos cada a 94 °C, 51 °C e 72 °C, depois durante 10 min a 72 °C. O genótipo AA produz duas bandas de 211 e 30 bp, o genótipo CC produz uma banda única de 241 bp (não dividida), e os genótipos AC produzem três bandas de 241, 211 e 30 bp.

Genotipagem do MTHFR C677T¹⁸

Usou-se um conjunto de *primers forward* “5'-CAT CCC TAT TGG CAG GTT AC-3'” e *reverse* “5'-GAC GGT GCG GTG AGA GTG-3'” para a amplificação de um fragmento de 198 pares de bases; em seguida, os fragmentos amplificados foram digeridos pela enzima HinfI. O perfil de PCR foi: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 30 segundos cada a 94 °C, 61 °C e 72 °C e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. O genótipo CC selvagem foi identificado por um fragmento único de 198 bp, o genótipo (TT) pelos fragmentos de 175/23 bp e o genótipo heterozigoto (CT) pelos fragmentos de 198, 175 e 23 bp.

Genotipagem dos genótipos TGF- β 1 T869C¹⁹

Usou-se um conjunto de *primers forward* “5'-TTCCCTCGAGG-CCCTCCTA-3'” e *reverse* “5'-GCCGCAGCTTGGACAGGATC” para a amplificação de fragmentos de 294 bp do gene TGF- β 1. Os produtos da PCR foram então digeridos pela enzima MspA1I. O perfil de PCR foi: desnaturação a 96 °C durante 10 minutos, seguido por 35 ciclos de 75 segundos cada a 96 °C, 62 °C e 72 °C, e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. O alelo T resultou em quatro fragmentos de 161, 67, 40 e 26 bp. O alelo C resultou em fragmentos de 149, 67, 40, 26 e 12 bp.

Genotipagem do LT- α (A252G)²⁰

Um fragmento de 782 bp do intron 1 (+252A/G) do gene LT- α foi amplificado por PCR com um conjunto de *primers: (forward)* “5'-AGAGGGGTGGATGCTTGGGTTTC-3'” e *(reverse)* “5'-CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA-3'”. Os produtos da PCR foram digeridos pela enzima de restrição NcoI. O alelo G produz um fragmento único de 782 bp (não digerido). O alelo G é digerido em bandas de 586 bp e 196 bp. O perfil de PCR foi: incubação durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 52 °C e 1 min a 72 °C, com uma extensão final a 72 °C durante 7 min.

Análise estatística

Usou-se o programa Statistical Package of Social Science Software (SPSS), versão 19, para analisar os dados. Os dados foram resumidos com a frequência e a percentagem para os dados qualitativos ou média e desvio padrão para os quantitativos. A análise de qui-quadrado foi usada para testar o desvio da distribuição dos genótipos do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A comparação entre pacientes e controle saudáveis foi feita por meio do teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher para dados qualitativos e teste t de Student e análise de variância para os quantitativos. Usou-se a análise

Tabela 1 – Características dos pacientes

Parâmetros	Min	Max	Média ± DP
Idade (anos)	22,0	70,0	42,7 ± 12,1
Duração da doença (meses)	6	216	66,7 ± 52,5
Rigidez matinal (min)	3,0	120,0	29,9 ± 38,2
Número de articulações inchadas	0,0	18,0	3,3 ± 5,5
Número de articulações dolorosas	0,0	20,0	5,0 ± 5,9
VHS	5	125,0	36,4 ± 36,0
DAS-28	1,4	7,7	3,9 ± 1,6

de regressão bivariada para detectar a associação entre as diferentes formas genéticas polimórficas e a doença. A análise da curva Receiver Operating Characteristics (ROC) foi feita para explorar a capacidade de discriminação da osteopontina e TNF em pacientes com AR. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

As características dos pacientes, incluindo idade, duração da doença, manifestações clínicas, atividade da doença e VHS são mostradas na [tabela 1](#).

A comparação entre os níveis séricos de osteopontina, BAFF e TNF- α (expressos como a média \pm DP) em pacientes e controles mostrou que os níveis séricos de OPN e de TNF- α foram significativamente maiores nos pacientes em comparação com os controles ($p < 0,001$). O nível sérico de BAFF não apresentou diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles ($p = 0,6$) ([tabela 2](#)).

Ao comparar a capacidade do TNF, da osteopontina e do BAFF de discriminar os controles dos pacientes com artrite reumatoide, a curva ROC mostrou que o TNF- α tem uma maior capacidade de discriminação do que a OPN, com sensibilidade (94,2%) e especificidade (84,4%) no valor de ponto de corte de 15,2 pg/mL. Por outro lado, a OPN tem sensibilidade (71,2%) e especificidade (53,3%) no valor de ponto de corte de 5,7 ng/mL, tal como calculado pela curva ROC ([fig. 1](#)).

Os resultados deste estudo mostraram que as frequências genotípicas de todos os casos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o MTHFR C677 T e A1298 C e TGF- β 1 T869 C. Quanto ao LT- α A252G, as frequências genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg somente no grupo controle.

Analizou-se a associação entre a artrite reumatoide e diferentes formas polimórficas do MTHFR C677 T, MTHFR A1298 C, TGF- β 1 T869 C e LT- α A252G ([tabela 3](#)). Os resultados dessa análise mostraram uma associação estatisticamente significativa entre a artrite reumatoide e o genótipo CT, alelo T do MTHFR C677 T e genótipo GG e alelo G do LT- α A252G. Por outro

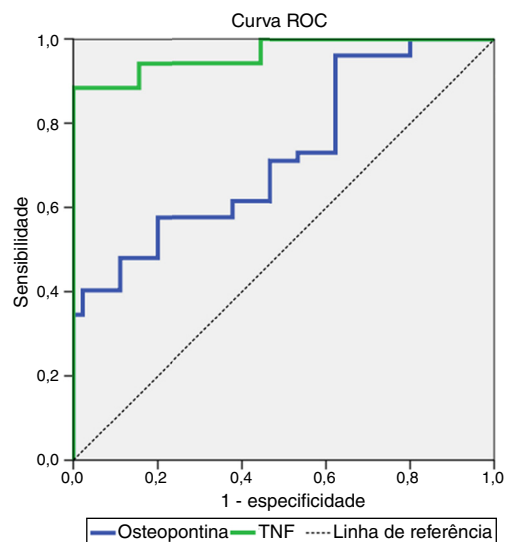


Figura 1 – Curva ROC que mostra a capacidade de TNF, osteopontina e BAFF de discriminar os controles dos pacientes com artrite reumatoide.

lado, o genótipo AC do MTHFR A1298 C mostrou um efeito protetor para a doença, quando comparado com o genótipo AA selvagem. Além disso, não foi detectada associação estatisticamente significativa entre as diferentes formas polimórficas do polimorfismo T869 C do gene TGF- β 1 e a artrite reumatoide ([tabela 3](#)).

O HAQ total não apresentou qualquer associação com diferentes formas polimórficas do polimorfismo MTHFR C677 T ($\chi^2 = 5,5$, $p = 0,06$), MTHFR A1298 C, ($\chi^2 = 2,26$, $p = 0,32$), TGF- β 1 T869 C ($\chi^2 = 1,31$, $p = 0,52$) ou LT- α ($\chi^2 = 1,1$, $p = 0,57$). Além disso, a atividade da doença, conforme mostrada pelo DAS-28, não esteve associada a formas polimórficas de qualquer dos genes examinados – MTHFR C677 T ($\chi^2 = 0,4$, $p = 0,81$), MTHFR A1298 C ($\chi^2 = 0,69$, $p = 0,7$), TGF- β 1 T869 C ($\chi^2 = 4,27$, $p = 0,12$) e LT- α ($\chi^2 = 4,54$, $p = 0,1$).

Descobriu-se que os níveis séricos de TNF- α diferem significativamente nas diferentes formas polimórficas de todos os genes estudados, com exceção do MTHFR A1298 C, como mostrado na [tabela 4](#). O teste *post hoc* mostrou que o TNF- α sérico é significativamente maior no genótipo CT do que no genótipo CC do MTHFR C677 ($p = 0,009$), no genótipo CT do que no genótipo TT do TGF- β 1 T869 C ($p = 0,005$), no genótipo GG quando comparado com o genótipo AA ($p = 0,008$) e genótipo AG ($p = 0,005$) do LT- α A252G. Não há diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de OPN e BAFF nos diferentes genótipos dos genes examinados ([tabela 4](#)).

Tabela 2 – Comparação entre os níveis séricos de osteopontina, BAFF e TNF- α (expressos como a média \pm desvio padrão) em pacientes e controles

	Pacientes (n = 104) Média \pm DP	Controles (n = 90) Média \pm DP	p
Osteopontina (ng/mL)	12,9 \pm 10,6	5,9 \pm 2,5	< 0,001
BAFF (pg/mL)	474,5 \pm 151,1	489,7 \pm 145,6	0,6
TNF- α (pg/mL)	36,0 \pm 14,3	8,9 \pm 6,3	< 0,001

Tabela 3 – Associação entre a artrite reumatoide e diferentes formas polimórficas de MTHFR C677 T, MTHFR A1298 C, TGF-β1 T869 C e LT-α A252G

	Genótipo e alelo	Pacientes		Controles		p	OR (IC 95%)		
		n	%	n	%				
MTHFR C677 T	CC	46	44,2	64	71,1	0,011	3,16 (1,30-7,69)		
	CT	50	48,1	22	24,4				
	TT	8	7,7	4	4,4	0,260	2,78 (0,47-16,5)		
	C	142	68,3	159	83,3	0,028	2,18 (1,09-4,38)		
T	66	31,7	30	16,7					
MTHFR A1298 C	AA	46	44,2	20	22,2			0,006	0,26 (0,10-0,69)
	AC	34	32,7	56	62,2				
	CC	24	23,1	14	15,6	0,629	0,75 (0,23-2,45)		
	A	126	60,6	96	53,3	0,383	0,74 (0,42-1,32)		
C	82	39,4	84	46,7					
TGF-β1 T869 C	TT	18	17,3	20	22,2			0,173	2,10 (0,72- 6,10)
	CT	68	65,4	36	40,0				
	CC	18	17,3	34	37,8	0,390	0,59 (0,18-1,97)		
	C	104	50%	104	58%	0,313	0,73 (0,41-1,29)		
T	104	50%	76	42%					
LT-α A252G	AA	6	5,8	16	28,9			0,252	2,33 (0,55-9,95)
	AG	42	40,4	48	17,8				
	GG	56	53,8	26	53,3	0,021	5,74 (1,31-25,26)		
	A	54	26	80	44	0,007	2,28 (1,25-4,18)		
	G	154	74	100	56				

Tabela 4 – Comparação entre os níveis séricos de osteopontina, TNF-α e BAFF nos diferentes genótipos em todos os casos estudados (n = 194)

	Genótipo	Osteopontina sérica (ng/mL)		TNF sérico (pg/mL)		BAFF sérico (pg/mL)	
		Média ± DP	p	Média ± DP	p	Média ± DP	p
MTHFR C677 T	CC	8,32 ± 7,75	0,248	19,20 ± 15,076	0,031	505,16 ± 149,65	0,162
	CT	11,24 ± 9,92		28,93 ± 19,817		444,67 ± 133,17	
	TT	11,62 ± 7,91		25,62 ± 16,080		486,83 ± 197,19	
MTHFR A1298 C	AA	12,27 ± 11,30	0,076	23,61 ± 16,05	0,233	486,49 ± 136,9793	0,233
	AC	7,79 ± 6,00		20,58 ± 18,17		480,98 ± 157,43	
	CC	9,293 ± 8,00		28,75 ± 17,85		474,47 ± 151,22	
TGF-β1 T869 C	CC	6,79 ± 5,99	0,151	22,17 ± 11,99	0,018	518,42 ± 164,63	0,137
	CT	10,54 ± 8,66		27,09 ± 19,39		482,25 ± 139,42	
	TT	10,91 ± 11,07		14,04 ± 15,32		429,32 ± 139,09	
LT-α A252G	AA	14,99 ± 16,98	0,075	14,43 ± 3,62	0,004	525,27 ± 174,13	0,542
	AG	9,44 ± 7,86		19,35 ± 15,45		469,87 ± 135,90	
	GG	8,35 ± 5,53		29,82 ± 19,66		482,71 ± 155,02	

Discussão

Embora a etiologia da AR permaneça pouco clara, fatores de susceptibilidade – que incluem fatores ambientais e genéticos – são evidentes. Os fatores genéticos constituem cerca de 50% desses fatores.³ As citocinas pró-inflamatórias amplificam o processo inflamatório e a destruição das articulações reumatóides. O fator de necrose tumoral, a osteopontina e o BAFF estão entre essas citocinas.³

Neste estudo, os níveis séricos de TNF-α foram significativamente mais elevados em pacientes em comparação com os controles. Os resultados referentes ao TNF-α coincidem com os resultados de estudos anteriores, como os de Gheita et al.²¹ e Ismail et al.,²² esses autores explicaram os resultados por seu papel vital e central na etiologia e patogênese da AR, daí os inibidores do TNF terem sido os primeiros fármacos biológicos antirreumáticos modificadores da doença (DMARD) a ser

aprovados para o tratamento da AR. Esses medicamentos são agora parte do tratamento de rotina dos pacientes com essa doença.²³ No entanto, Ebrahimi et al.²⁴ relataram um aumento não significativo nos níveis séricos de TNF-α em pacientes quando comparados com os controles.

Além disso, nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis séricos de OPN em pacientes com AR em comparação com o grupo controle saudável; isso concorda com os achados de Ji et al.²⁵ e Chen et al.,²⁶ que explicaram esses resultados pelo papel fundamental da OPN e seus receptores na patogênese da AR. Assim, vários estudos experimentais com o objetivo de usar a OPN como alvo terapêutico estão sendo feitos e os desfechos desses resultados são promissores.²⁷

Por outro lado, os níveis séricos de BAFF não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, o que concorda com os resultados encontrados previamente por Eldin et al.²⁸ No entanto, Mahdy et al.²⁹ e Moura et al.³⁰

relataram um aumento significativo nos níveis séricos de BAFF entre pacientes com AR, em especial naqueles com maior atividade da doença e duração da doença mais curta. Essa discrepância de resultados pode ser atribuída à diferente atividade e duração da doença no grupo estudado.

O genótipo CT e o alelo T do MTHFR C677T estão associados à AR e a um nível sérico superior de TNF- α , mas não têm efeito significativo sobre os níveis séricos de OPN e BAFF. Por outro lado, as diferentes formas polimórficas do MTHFR A1298C não estiveram associadas à AR ou aos níveis séricos de TNF- α , OPN ou BAFF. O genótipo AC do MTHFR A1298C mostrou efeito protetor para a doença. Isso pode ser decorrente do maior efeito do MTHFR C677T na enzima MTHFR, que resulta em hiper-homocisteinemia e subsequente ativação da cascata de citocinas. Os resultados de estudos prévios foram heterogêneos; alguns não mostraram associação entre o risco de AR e as diferentes formas polimórficas do MTHFR C677T e A1298C.^{31,32} Outros relataram associação do alelo T, mas não de alguma das formas polimórficas do MTHFR C677T com a AR.³ Rubini *et al.*³³ relataram uma associação entre o genótipo CC do MTHFR A1298C, mas não de alguma das formas polimórficas do MTHFR C677T com a suscetibilidade à AR na população italiana. Essa heterogeneidade de resultados pode ser atribuída às variações étnicas nas frequências alélicas e genotípicas, conforme relatado por Hughes *et al.*;³² esses autores encontraram um aumento significativo no alelo T do MTHFR C677T e no alelo C do MTHFR A1298C (independentemente do status de doença) em brancos quando comparados com negros americanos. Além disso, foi descrita uma interação significativa entre os polimorfismos MTHFR e fatores nutricionais/ambientais (ou seja, níveis de folato, idade, tabagismo e ingestão de álcool).⁴ O fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1) é uma citocina anti-inflamatória associada à remissão da doença; além disso, tem o potencial de ser uma citocina pró-inflamatória. Relatou-se que polimorfismos do TGF- β 1 estão associados a variações nos níveis séricos de TGF- β 1 e a diversas doenças.³⁴ Neste estudo, os genótipos do TGF- β 1 (T869C) não estiveram associados à AR. No entanto, o genótipo CT esteve associado a um aumento significativo no TNF sérico quando comparado com o genótipo TT. Isso vem associado aos resultados de dois estudos de metanálise feitos por Zhang *et al.*³⁵ e Chang *et al.*,³⁶ que não mostraram associação clara do polimorfismo T869C e alelo T do TGF- β 1 com a AR em uma população mundial; contudo, foi sugerida associação apenas nas pessoas de ascendência asiática. Os resultados de Hussein *et al.*³⁷ foram diferentes; eles encontraram associação do alelo T do TGF- β 1 com a suscetibilidade à AR em pacientes egípcios. Os resultados do presente estudo também mostraram associação do alelo G e do genótipo GG do LT- α A252G com a AR e níveis séricos mais elevados de TNF- α . Esses resultados concordam com os achados de Karray *et al.*³⁸ e Al-Rayes *et al.*,³⁹ que relataram associação entre os genótipos GG e AA com a AR, enquanto o genótipo GA foi refratário.

Do exposto, pode-se concluir que o genótipo CT do MTHFR C677T, o genótipo AC do MTHFR A1298C e o genótipo GG do LT- α A252G estão associados a um risco aumentado de AR em pacientes egípcios.

Que se tem conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar, simultaneamente, a associação entre os polimorfismos MTHFR C677T e A1298C, TGF- β 1 T869C e LT- α A252G com a AR e com as citocinas pró-inflamatórias TNF, BAFF e OPN em pacientes egípcios.

Este estudo apresenta algumas limitações, como a inclusão de um grupo muito amplo de pacientes quanto à duração da doença, atividade da doença e fármacos usados pelos pacientes, além de não fazer qualquer menção à positividade do fator reumatoide e anti-CCP. Os níveis de citocinas podem variar amplamente com esses fatores e também com outros detalhes metodológicos, como o tempo entre a amostra ser coletada e processada, a pontuação no DAS-28, os fármacos usados e suas doses quando as amostras são coletadas.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, *et al.* Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum.* 2008;58(1):15-25.
- Vinay DS, Kwon BS. Targeting TNF superfamily members for therapeutic intervention in rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2012;57(3):305-12.
- Inanir A, Yigit S, Tekcan A, Tural S, Kismali G. IL-4 and MTHFR gene polymorphism in rheumatoid arthritis and their effects. *Immunol Lett.* 2013;152(2):104-8.
- De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J Cancer.* 2009;45(8):1333-51.
- Spyridopoulou KP, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with methotrexate toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(2):117-33.
- Erb N, Kitas G. Homocysteine modulation as a reason for continuous folic acid supplementation in methotrexate-treated rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology.* 2001;40(6):715-6.
- Epstein FH, Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1350-8.
- Evans CH, Ghivizzani SC, Kang R, Muzzonigro T, Wasko MC, Herndon JH, *et al.* Gene therapy for rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1999;42(1):1-16.
- Aoki CA, Borchers AT, Li M, Flavell RA, Bowls CL, Ansari AA, *et al.* Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005;4(7):450-9.
- Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *Autoimmun Rev.* 2011;10(10):599-608.
- Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR J Rheumatol.* 2007;10(4):270-4.
- Lu R, Dou X, Gao X, Zhang J, Ni J, Guo L. A functional polymorphism of lymphotoxin-alpha (<i></i> gene rs909253 is associated with gastric cancer risk in an Asian population. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(6):e380-6.

13. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med*. 1991;173(1):209-19.
14. Partida-Rodríguez O, Torres J, Flores-Luna L, Camorlinga M, Nieves-Ramírez M, Lazcano E, et al. Polymorphisms in TNF and HSP-70 show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer. *Int J Cancer*. 2010;126(8):1861-8.
15. Sun J, Lin Z, Feng J, Li Y, Shen B. BAFF-targeting therapy, a promising strategy for treating autoimmune diseases. *Eur J Pharmacol*. 2008;597(1-3):1-5.
16. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(5-6):333-45.
17. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998;62(5):1044-51.
18. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995:111-3.
19. Wood NA, Thomson SC, Smith RM, Bidwell JL. Identification of human TGF-beta1 signal (leader) sequence polymorphisms by PCR-RFLP. *J Immunol Methods*. 2000;234(1-2):117-22.
20. Vasconcelos DF, Da Silva MA, Marques MR, De Brito Junior RB, Vasconcelos AC, Barros SP. Lymphotoxin-Alpha Gene Polymorphism +252A/G (rs909253, A/G) Is Associated with Susceptibility to Chronic Periodontitis: A Pilot Study. *ISRN Dent*. 2012; 2012:617245. PubMed PMID: 23050158. Pubmed Central PMCID: 3463161.
21. Gheita TA, Azkalany GS, Gaber W, Mohey A. Clinical significance of serum TNF α and -308 G/A promoter polymorphism in rheumatoid arthritis. *Egypt Rheumatol*. 2015;37(2):49-54.
22. Ismail F, Ali H.A-h Ibrahim HM. Possible role of leptin, and tumor necrosis factor-alpha in hypoandrogenicity in patients with early rheumatoid arthritis. *Egypt Rheumatol*. 2011;4(33):209-15.
23. Willrich MA, Murray DL, Snyder MR. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res*. 2015;165(2):270-82.
24. Ebrahimi AA, Noshad H, Sadreddini S, Hejazi MS, Mohammadzadeh Sadigh Y, Eshraghi Y, et al. Serum levels of TNF-alpha, TNF-alpha RI, TNF-alpha RII and IL-12 in treated rheumatoid arthritis patients. *Iran J Immunol*. 2009;6(3):147-53.
25. Ji H-I, Lee S-H, Song R, Yang H-I, Lee Y-A, Hong S-J, et al. Serum level of osteopontin as an inflammatory marker does not indicate disease activity or responsiveness to therapeutic treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2014;33(3):397-402.
26. Chen G, Zhang X, Li R, Fang L, Niu X, Zheng Y, et al. Role of osteopontin in synovial Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(10):2900-8.
27. Zhang F, Luo W, Li Y, Gao S, Lei G. Role of osteopontin in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2015;35(4):589-95.
28. Eldin AB, Sayed S, Hegazy G, Shaker O. B-Cell Activating Factor (BAFF) in Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, and Behçet's Disease. *Arch Rheumatol*. 2012;27(3):185-94.
29. Mahdy AA, Raafat HA, El-Fishawy HS, Gheita TA. Therapeutic potential of hydroxychloroquine on serum B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) in rheumatoid arthritis patients. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2014.
30. Moura RA, Cascão R, Perpétuo I, Canhão H, Vieira-Sousa E, Mourão AF, et al. Cytokine pattern in very early rheumatoid arthritis favours B-cell activation and survival. *Rheumatology*. 2010, keq338.
31. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodríguez TR, Rodríguez L, Miranda-Filloo JA, Fernandez-Gutierrez B, et al. Research article A1298 C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Heart Fail*. 2010;5:2.3.
32. Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, et al. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(9):1213-8.
33. Rubini M, Padovan M, Baricordi O, Fotinidi M, Govoni M, Trotta F. The c. 1298A> C polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with rheumatoid arthritis susceptibility in Italian patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(1):163.
34. Alayli G, Kara N, Tander B, Canturk F, Gunes S, Bagci H. Association of transforming growth factor beta1 gene polymorphism with rheumatoid arthritis in a Turkish population. *Joint Bone Spine*. 2009;76(1):20-3.
35. Zhang L, Yan J-w, Wang Y-X, Wan Y-n, Li J-p, Liu P, et al. Association of TGF- β 1+ 869 C/T promoter polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013;40(8):4811-7.
36. Chang W-W, Su H, He L, Zhao K-F, Wu J-L, Xu Z-W. Association between transforming growth factor- β 1 T869 C polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology*. 2010;49(4):652-6.
37. Hussein YM, Mohamed RH, El-Shahawy EE, Alzahrani SS. Interaction between TGF- β 1 (869 C/T) polymorphism and biochemical risk factor for prediction of disease progression in rheumatoid arthritis. *Gene*. 2014;536(2):393-7.
38. Karray EF, Bendhifallah I, Benabdelghani K, Hamzaoui K, Zakraoui L. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in regional Tunisian population. *J Infect Dis Immun*. 2011;3(2):30-5.
39. Al-Rayes H, Al-Swailem R, Albelawi M, Arfin M, Al-Asmari A, Tariq M. TNF-alpha and TNF-beta Gene Polymorphism in Saudi Rheumatoid Arthritis Patients. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2011;4:55-63.