

FERNANDO CURBANI

**ESTUDO CASO-CONTROLE DO GENE *MTHFR* (REGIÕES 677 E 1298)
EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO, EM
SANTA CATARINA - BRASIL**

Florianópolis

2018



Fernando Curbani

**ESTUDO CASO-CONTROLE DO GENE *MTHFR* (REGIÕES 677 E 1298)
EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO,
EM SANTA CATARINA - BRASIL**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel/Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza
Coorientadora: Dra. Alice Heidrich Prompt

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor.

Orientações em:

<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Fernando Curbani

**ESTUDO CASO-CONTROLE DO GENE *MTHFR* (REGIÕES 677 E 1298)
EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO,
EM SANTA CATARINA - BRASIL**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciado em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Programa de Ciências Biológicas

Florianópolis, 07 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti,
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ilíada Rainha de Souza,
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Sara Emelie Löfgren,
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Yara Costa Netto Muniz,
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado ao meu pai Afonso Curbani
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Um longo caminho foi trilhado até aqui, desde 2003 quando pisei pela primeira vez na Universidade Federal de Santa Catarina, até a realização do presente trabalho. Um ciclo de quinze anos finalmente se encerra.

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de estudá-la.

À UFSC na qual me orgulho de ser um estudante e também servidor.

Aos órgãos de fomento, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo financiamento de minha bolsa e pelo apoio aos projetos desenvolvidos no LAPOGE (Laboratório de Polimorfismos Genéticos), do qual esse estudo faz parte.

Gostaria de agradecer a meus pais. Infelizmente meu querido pai não está mais aqui. Com ele compartilhei muitas alegrias e esta seria mais uma. À minha mãe Elizete Curbani, uma mulher que por todos estes anos me ensinou muito (e ainda haverá de ensinar), com seus conselhos e seu exemplo de coragem, pelos quais sou muito grato.

Agradecer a todos os professores e professoras, pelos quais pude, além de aprender, conhecer e me inspirar.

À minha orientadora, Ilíada Rainha de Souza, que me ensinou os conceitos de genética, me recebeu em seu laboratório e incentivou este estudo. À minha coorientadora, Dra. Alice Heidrich Prompt, a qual me ajudou nesta reta final, sempre disposta a atender e ensinar (inclusive “macetes” de informática).

Agradeço a todas as professoras do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética que estiveram presentes: Profa. Dra. Yara Costa Netto Muniz, Profa. Dra. Andrea Rita Marrero, Profa. Dra. Norma Machado da Silva e a Dra. Sara Emelie Löfgren, cada uma contribuindo com informações importantes para este trabalho ou simplesmente com um sorriso.

A todos os colegas que passaram por esse ciclo e com quem tive inúmeras conversas que influenciaram o que sou hoje. Aos colegas recentes do LAPOGE, que puderam ajudar nos experimentos: Leili Hausmann, Emily Justino, Renan Mantovani Rabelo, pelo aprendizado das técnicas de laboratório e apoio. Às irmãs Clisten Staffen e Mari Dalva Staffen, pelo exemplo de como fazer um caderno de laboratório. A todos os demais membros da equipe LAPOGE que estiveram presentes nos experimentos.

Aos pacientes e aos voluntários, os quais cederam seu tempo e material genético ao laboratório para ajudar nessa pesquisa, pois foram muito importantes.

Aos servidores técnicos administrativos, cujo importante trabalho deve ser lembrado. Ao grupo do LAMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia) e aos servidores da secretaria do Curso de Ciências Biológicas que estiveram presentes.

E também, a todos aqueles que de algum modo colaboraram para que esse trabalho se concretizasse.

Meu muito obrigado!

“...Tudo se faz por contraste; da luta dos contrários nasce a mais bela harmonia ...”

“...O movimento, o devenir perpétuo, determina toda a harmonia do mundo...”

(Heráclito de Éfeso, 535 a.C. - 475 a.C)

RESUMO

Introdução: Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença reumática inflamatória e crônica de origem autoimune. Possui a combinação de predisposição genética e ambiental que altera a expressão de genes reguladores principalmente do sistema imune. Por se tratar de uma doença complexa, vários genes estão envolvidos na sua ação. Nesse contexto genético, o papel dos genes que codificam moléculas importantes no metabolismo tem sido alvo de interesse pela importância desses processos no organismo e no desenvolvimento de doenças. Para o metabolismo, a MTHFR (5,10-Metilenetetrahidrofolato Redutase) é uma importante enzima que está envolvida em processos de metilação e síntese de DNA e de vias metabólicas do ácido fólico (vitamina B9). Possui polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em diversas partes do gene *MTHFR*, porém os mais importantes são na região C677T [rs1801133] e A1298C [rs1801131] que diminuem a atividade dessa enzima. Nos pacientes com LES, sabe-se que as células dos leucócitos mononucleares exibem várias alterações. Com isso, ocorre a produção de citocinas anormais, diminuição da função citotóxica e aumento da resposta humoral. Portanto, variações genéticas das enzimas da via folato, que atuam em conjunto para doação de metila na região reguladora do DNA podem causar o mau funcionamento dessas células. Vários estudos comprovam que uma super expressão anormal de citocinas, no qual ocorre um aumento de autoanticorpos, está relacionada a uma baixa metilação em regiões regulatórias do DNA em células T. **Objetivo:** Investigar a associação do SNP do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) a genótipos de risco/proteção para o desenvolvimento da doença através de um estudo caso-controle em pacientes de Santa Catarina - Brasil. **Resultados:** a análise dos genótipos e das frequências alélicas por PCR-RFLP para a região C677T encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Porém, para a região A1298C o grupo de casos está fora do equilíbrio ($p=0,0013$) e grupo dos controles encontra-se em EHW. Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre casos e controles quando calculado o *odds-ratio* considerando cada alelo e cada genótipo como fator de risco/proteção para o desenvolvimento de LES na região *MTHFR* 677. Porém, demonstrou-se que a presença do alelo A na região 1298 do gene *MTHFR* aumenta em 1,618 vezes a chance de desenvolver LES (OR = 1,618; 95% IC: 1,097 – 2,388; $p = 0,014$), sendo que o alelo C atua como fator de proteção (OR = 0,618; 95% IC: 0,419-0,912; $p = 0,014$). Análises de *odds-ratio* foram feitas para oito manifestações clínicas da doença (Artrite, Fotossensibilidade, Eritema malar, Úlcera oral, Nefrite, Anemia, Alterações neurológicas, Serosite). Sendo que duas manifestações foram associadas com a região A1298C a de Fotossensibilidade em que o alelo A atua como fator de risco (OR = 1,947; 95% IC: 1,026 – 3,701; $p = 0,041$) e o alelo C como fator de proteção (OR = 0,513; 95% IC: 0,270 – 0,975; $p = 0,041$) e Úlcera oral em que o alelo C atua como fator de risco (OR = 1,944; 95% IC: 1,073 – 3,528; $p = 0,027$) e o alelo A como fator de proteção (OR = 0,514; 95% IC: 0,283 – 0,932; $p = 0,027$). **Conclusão:** Os resultados mostram uma relação dos polimorfismos do gene *MTHFR* com LES para pacientes do Estado de Santa Catarina - Brasil para a região A1298C, tanto na comparação estatística de Caso-Control quanto nas manifestações clínicas para fotossensibilidade e úlcera oral.

Palavras Chaves: autoimunidade; doenças complexas; fotossensibilidade; imunogenética; SNP; úlcera oral.

ABSTRACT

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory and chronic rheumatic disease of autoimmune origin. It has the combination of genetic and environmental predisposition that alters the expression of metabolic regulatory genes. Because it is a complex disease, several genes are involved in its etiology. In this genetic context, the role of genes encoding important molecules in metabolism has been of interest in the importance of these processes in the body and in the development of diseases. For metabolism, MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase) is an important enzyme that is involved in the methylation and synthesis of DNA and metabolic pathways of folic acid (vitamin B9). It has single nucleotide polymorphisms (SNP) in several parts of the MTHFR gene, but the most important are in the C677T [rs1801133] and A1298C [rs1801131] regions that decrease the activity of this enzyme. In SLE patients, it is known that mononuclear leukocyte cells exhibit various aberrations. This leads to the production of abnormal cytokines, decreased cytotoxic function and increased humoral response. Therefore, genetic variations of the folate pathway enzymes that act together for methyl donation in the DNA regulatory region may cause malfunction of these cells. Several studies have shown that an abnormal cytokine super-expression, with increased autoantibodies production, is related to low methylation in regulatory regions of T-cell DNA. **Objective:** To investigate the association of SNPs in the *MTHFR* gene (C677T and A1298C) to genotypes of risk / protection for the development of systemic lupus erythematosus, through a case-control study in patients from Santa Catarina - Brazil. **Results:** analysis of genotypes and allele frequencies by PCR-RFLP for the C677T region showed a Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). However, for the A1298C region the control group is in HWE, but the case group is out of balance ($p = 0.0013$). No significant association was found between cases and controls and SLE when calculating the odds ratio considering each allele and each genotype as a risk / protective factor for the development of SLE in the MTHFR 677 region. However, the MTHFR 1298 region indicated that individuals with the A allele were more likely to develop the disease (OR = 1.68; 95% CI: 1.097-2.388; $p = 0.014$). Allele C acts as a protective factor (OR = 0.618, 95% CI: 0.419-0.912, $p = 0.014$). Odds ratios were also calculated for eight clinical manifestations of the disease (Arthritis, Photosensitivity, Eritema malar, Oral ulcer, Nephritis, Anemia, Neurological disorders, Serositis). In the A1298C region, two manifestations showed association: photosensitivity in which the A allele acts as a risk factor (OR = 1.947, 95% CI: 1.026 - 3.701, $p = 0.041$) and the C allele as a protection factor (OR = 0.513; 95% IC: 0.270 – 0.975; $p = 0.041$) and Oral ulcer in which the allele C was a risk factor OR = 1.944; 95% IC: 1.073 – 3.528; $p = 0.027$) and the A allele acts as a protection factor (OR = 0.514; 95% IC: 0.283 – 0.932; $p = 0.027$). **Conclusion:** The results indicate an association of the polymorphisms A1298C in the *MTHFR* gene with SLE in patients from the State of Santa Catarina - Brazil, as well as with the specific clinical manifestations photosensitivity and oral ulcers.

Keywords: autoimmunity; complex diseases; immunogenetics; oral ulcer; photosensitivity; SNP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Estrutura molecular do ácido fólico e suas diferentes porções: Pterina, Ácido Paraminobenzóico (PABA) e Ácido Glutâmico (Glu). Fonte: GAZZALI et al., 2016..... 25
- Figura 2** - Via metabólica do ácido fólico. Fonte: GUILLIAMS, 2018..... 26
- Figura 3** - Cromossomo 1 indicando a localização do gene *MTHFR*. Fonte: NCBI. 27
- Figura 4** - Alterações estruturais da proteína com os SNP do gene *MTHFR*. Azul a proteína tipo selvagem. [A]: vermelho mutante C677T, [B]: verde mutante A1298C, [C]: magenta mutante duplo C677T e A1298C. As alterações na estrutura são identificadas com setas. Fonte: JADEJA et al., 2018..... 29
- Figura 5** - Gel de agarose 1,5% realizado para a verificação da qualidade da PCR. Fonte: elaborado pelo autor. 34
- Figura 6** – Identificação dos sítios de clivagem das enzimas *HinfI* e *MBOII*. Fonte: Biolabs®..... 34
- Figura 7** – Leitura dos genótipos do gene *MTHFR C677T* no presente trabalho. As amostras pertencentes aos indivíduos 152, 160 e 165 são identificadas como heterozigotas para o *locus* 677, enquanto as amostras 155 e 156 como homozigotas para os alelos T e C, respectivamente. 35
- Figura 8** - Leitura dos genótipos do gene *MTHFR A1298C* no presente trabalho. As amostras pertencentes aos indivíduos 7, 8 e 10 são identificadas como heterozigotas para o *locus* 1298, enquanto a amostra 9 como homozigota para o alelo A e as amostras 12 e 13 como homozigotas para o alelo C, amostras 6 e 11 não digeridas (ND). 35

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Quadro síntese das trocas no gene <i>MTHFR</i> e conseqüentemente dos aminoácidos estudados no presente trabalho | 27 |
| Quadro 2 – Relação de artigos relacionando a baixa metilação do DNA em regiões regulatórias em células T. | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos que envolvem as posições 677 e 1298 do gene <i>MTHFR</i> | 33 |
| Tabela 2 – Identificação do número total de indivíduos amostrados, formado pelo grupo de Casos e pelo grupo Controle, e número total de indivíduos genotipados para os <i>loci</i> <i>MTHFR</i> C677T e A1298C. | 37 |
| Tabela 3 - Distribuição sexual, da média de idade com desvio padrão, e da origem étnica das amostras de Casos com LES e do grupo Controle, na população de SC, apenas dos indivíduos genotipados para <i>MTHFR</i> C677TN e A1298C. | 38 |
| Tabela 4 – Frequências absolutas e relativas das manifestações clínicas presentes em pacientes com LES, que foram genotipados para os polimorfismos 677 e 1298 do gene <i>MTHFR</i> no presente estudo. | 38 |
| Tabela 5 - Números absolutos de alelos e genótipos observados e esperados e suas respectivas frequências (alélicas e genóticas) identificadas nas regiões 677 e 1298 do gene <i>MTHFR</i> , nos grupos de casos e controle do presente estudo. | 39 |
| Tabela 6 – Valores de p em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas Regiões 677 e 1298 do gene <i>MTHFR</i> , no presente estudo. | 40 |
| Tabela 7 – Homozigiosidade e heterozigiosidade observadas e esperadas para os polimorfismos 677 e 1298 do gene <i>MTHFR</i> para os grupos de Caso e Controle do presente estudo. | 40 |
| Tabela 8 - <i>Odds ratio</i> (<i>OR</i>) de casos e controles para alelos e genótipos do <i>locus</i> <i>MTHFR</i> C677T no presente estudo. | 41 |
| Tabela 9 - <i>Odds ratio</i> de casos e controles para alelos e genótipos do <i>locus</i> <i>MTHFR</i> 1298. | 41 |
| Tabela 10 - Valores de <i>Odds ratio</i> (<i>OR</i>), intervalo de confiança (IC 95%) e valor de p estimados entre a presença dos polimorfismos para alelos do C677T e A1298C do gene <i>MTHFR</i> , e as manifestações clínicas de fotossensibilidade ^(*) e úlcera oral ^(*) , quando comparados o grupo de casos (+) (pacientes que apresentam a manifestação clínica) e o grupo controle (-) (pacientes que não apresentam a manifestação clínica). | 42 |
| Tabela 11 – <i>Odds ratio</i> para fotossensibilidade para alelos e genótipos do <i>locus</i> <i>MTHFR</i> A1298C. | 43 |

Tabela 12 - *Odds ratio* para úlcera oral para alelos e genótipos do *locus MTHFR*
A1298C..... 44

Tabela 13 – Percentual relativo à etnia amostral dos pacientes com LES do Estado de
Santa Catarina 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAHU - Associação Amigos do Hospital Universitário
AVC – acidente vascular cerebral
ACR - *American College of Reumatology*
AR – Artrite Reumatóide
ARMS -*Amplification Refractory Mutation System*)
cDNA – DNA complementar
dbSNP - *Single Nucleotide Polymorphism Database*
DAI – Doenças Autoimunes
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg
GWAS – *Genome-wide association studies*
HLA - *Human Leukocyte Antigens*
LAPOGE - Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico
mRNA – RNA mensageiro
MTHFR - Methylenetetrahydrofolate Reductase enzima
MTHFR - Methylenetetrahydrofolate Reductase gene
NETI - Núcleo de Estudo da Terceira Idade
NK – células *natural killers*
OR – *odds ratio*
PABA - Pterina Ácido Paraminobenzóico
PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction by Restriction Fragment Length Polymorfism*
SAM - S-adenosilmetionina
SBR – Sociedade Brasileira de Reumatologia
SLICC - *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*
SNP – Polimorfismos de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphisms*)
tHcy - *total plasma homocysteine*
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1 | SISTEMA IMUNOLÓGICO..... | 19 |
| 1.1.1 | Autoimunidade..... | 19 |
| 1.2 | DOENÇAS DE ETIOLOGIA COMPLEXA..... | 20 |
| 1.3 | LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)..... | 21 |
| 1.4 | GENÉTICA E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO | 23 |
| 1.4.1 | Polimorfismos De Nucleotídeo Único | 23 |
| 1.4.2 | Vias metabólicas do ácido fólico | 24 |
| 1.4.3 | Enzima MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase) | 26 |
| 1.4.4 | O Gene <i>MTHFR</i> e seus Polimorfismos | 27 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 30 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 31 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 31 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 4.1 | COLETA DE DADOS E DO MATERIAL BIOLÓGICO..... | 32 |
| 4.1.1 | Extração do DNA | 33 |
| 4.1.2 | Amplificação do DNA | 33 |
| 4.1.3 | Enzimas de Restrição..... | 34 |
| 4.2 | GENOTIPAGEM..... | 34 |
| 4.3 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 36 |
| 5 | RESULTADOS | 37 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA..... | 37 |
| 5.1.1 | Frequências Alélicas e Genótípicas nas Regiões 677 e 1298 do gene <i>MTHFR</i>. | 39 |
| 5.1.2 | Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas Regiões 677 e 1298 do gene <i>MTHFR</i> | 39 |
| 5.2 | ANÁLISE DO POLIMORFISMO <i>MTHFR</i> C677T NO ESTUDO CASO- CONTROLE | 40 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.3 | ANÁLISE DO POLIMORFISMO <i>MTHFR</i> A1298C NO ESTUDO CASO-CONTROLE..... | 41 |
| 5.4 | ANÁLISE DO POLIMORFISMO E RELAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS..... | 42 |
| 6 | DISCUSSÃO | 45 |
| 6.1 | CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA | 46 |
| 6.2 | ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO PARA LES | 47 |
| 6.2.1 | <i>MTHFR</i> 677..... | 47 |
| 6.2.2 | <i>MTHFR</i> 1298..... | 47 |
| 7 | CONCLUSÕES | 49 |
| | REFERÊNCIAS | 50 |
| | APÊNDICE A – Genotipagem Total Casos | 55 |
| | APÊNDICE B – Genotipagem Total Controles..... | 59 |
| | APÊNDICE C – Odds ratio dados clínicos | 63 |
| | ANEXO A..... | 69 |
| | ANEXO B..... | 75 |
| | ANEXO C..... | 76 |
| | ANEXO D..... | 79 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

Um dos sistemas necessários à sobrevivência da nossa espécie é o sistema imunológico. Este sistema tem papel fundamental na homeostase do organismo, impedindo o ataque de patógenos e corpos estranhos, criando assim uma defesa humoral e celular eficiente. Estando sob um equilíbrio dinâmico de reconhecimento das próprias células, apresenta diversos mecanismos como: competência imunológica (formação de novos anticorpos) e memória imune (resposta rápida a um determinado antígeno) (SHISHIDO et al., 2012).

Sobre o reconhecimento do próprio, o sistema imune desenvolveu um mecanismo interno, conhecido como tolerância imunológica, que nos protege dos potenciais efeitos destrutivos do sistema. No entanto, o sistema imunológico pode atacar os próprios tecidos, resultando em doenças autoimunes. Compreender os mecanismos envolvidos na indução e manutenção desta tolerância imunológica, assim como a anergia (um estado de não responsividade ao antígeno – inativação funcional), é essencial para elucidar as causas das doenças autoimunes (BRODIN; DAVIS, 2016).

1.1.1 Autoimunidade

A autoimunidade refere-se ao estado anormal quando o sistema imunológico desregulado ataca as células e tecidos saudáveis devido à perda da tolerância imunológica. Este estado aberrante apresenta-se clinicamente na forma de amplo espectro de distúrbios autoimunes caracterizados pela presença de células imunes autorreativas e (ou) o desenvolvimento de autoanticorpos. Essas respostas autoimunes podem ser disseminadas e envolver múltiplos órgãos e sistemas, resultando em doenças autoimunes sistêmicas, como lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumática, esclerose sistêmica e síndrome de Sjögren primária. O dano patológico da autoimunidade também pode ser limitado a órgãos específicos, causando doenças autoimunes específicas do órgão, como: cirrose biliar primária, diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla e doenças da pele, incluindo vitiligo e alopecia areata (LONG et al., 2016).

A etiologia dessas doenças se deve a uma combinação de predisposição genética e fatores ambientais que alteram a expressão de genes reguladores imunológicos através de vários mecanismos, incluindo mecanismos epigenéticos. Elementos humorais e celulares do

sistema imune inato e adaptativo desempenham um papel na patogênese das doenças autoimunes (DAI) e a presença de autoanticorpos foram detectadas na maioria dos casos, antes mesmo do aparecimento de sintomas clínicos (MA et al., 2017).

Estudos epidemiológicos mostram que a taxa de concordância de gêmeos monozigóticos com LES ou Artrite Reumatoide (AR) é entre 10% e 40%, o que sugere o envolvimento de fatores não genéticos, como os impactos ambientais, que geram gatilhos também importantes na patogênese e desenvolvimento dessas doenças (BOGDANOS et al., 2012).

Um dos objetivos da genética é compreender as ligações entre a variação gênica e as doenças (variações fenotípicas). Intuitivamente, poder-se-ia esperar que variantes genéticas causadoras de doenças se agrupassem em vias-chave do metabolismo que conduzem à etiologia. Mas, para doenças complexas, os sinais de associação tendem a se espalhar pela maioria do genoma - incluindo muitos genes sem uma conexão óbvia com a doença (BOYLE; LI; PRITCHARD, 2017a).

1.2 DOENÇAS DE ETIOLOGIA COMPLEXA

Historicamente, havia um debate clássico no início do século XX entre mendelianos, (defensores de características descontínuas) e os biométricos (interessados em traços fenotípicos contínuos como a altura, por exemplo). Os biometristas acreditavam que a genética mendeliana não poderia explicar a distribuição contínua de variação observada para muitas características em humanos e outras espécies. Esse debate foi resolvido em um artigo de Ronald Aylmer Fisher em 1918 (FISHER, 1918) o qual mostrou que se muitos genes afetam uma característica (poligenia), então a amostragem aleatória de alelos em cada gene produz um fenótipo contínuo, normalmente distribuído na população. Como o número de genes cresce muito, a contribuição de cada gene torna-se correspondentemente menor, levando ao limite do famoso "modelo infinitesimal" de Fisher (BOYLE; LI; PRITCHARD, 2017b).

As doenças “complexas” são assim chamadas por não possuírem um erro metabólico evidente, nem uma alteração genética definida ou compreendida, nem um padrão de herança definido, mas sim a combinação de uma série de variações genéticas herdadas ou adquiridas aliadas aos fatores ambientais que desencadeiam uma reação do organismo. São exemplos: LES, AR, Diabetes mellitus, doença de Alzheimer, doenças de Hirschsprung, doenças

cardiovasculares, esquizofrenia, hipertensão, hipotireoidismo, obesidade, osteoporose, entre outras (BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, 2013).

Atualmente, com o crescimento do conhecimento do nosso genoma e o desenvolvimento de novas tecnologias genômicas que permitiram a identificação de fatores de risco das doenças complexas, têm-se utilizado os “Estudos de Associação Genômica Ampla” (GWAS - *Genome-wide association studies*). Como as variantes genéticas de doenças complexas possuem um efeito pequeno, em GWAS, um enorme número de variantes genéticas é testado simultaneamente, não podendo ser observados por análises estatísticas simples, mas sim por técnicas robustas de análise multivariada. Com o intuito de aumentar o poder estatístico, consideram-se os efeitos de forma coletiva destas variantes genéticas. Portanto, é um desafio a tarefa de executar GWAS suficientemente poderoso estatisticamente para mapear genes de doenças complexas (KAO et al., 2017).

1.3 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)

Em 1895, o médico canadense Sir Willian Osler descreveu os sintomas de LES. A descoberta de LE (Lúpus Eritematoso) foi um marco para a pesquisa de patogenias de origem imunológica, pois levou a descoberta de diversos fatores antinucleares, observando os autoanticorpos dirigidos a ácidos nucleicos e a outras variantes (BENEDEK, 1997).

Por se encaixar na categoria de doença complexa ou multifatorial, ela não segue geneticamente os padrões mendelianos simples de herança. Portanto, vários fatores genéticos e ambientais estão presentes, caracterizando um modelo de diversos genes, alguns com efeitos maiores outros com menores. Dessa maneira, o conjunto de alterações alélicas pode determinar um limiar fenotípico que distingue os indivíduos afetados em um determinado ambiente (Nussbaum, R.L.; MCInnes, R.R. E Willard, 2008).

O diagnóstico de LES comumente não é fácil, critérios imunológicos e hematológicos, bem como manifestações clínicas são usados para diagnosticar a doença. Tradicionalmente são utilizados os critérios de diagnóstico da *American College of Rheumatology* (ACR), publicado em 1982 com uma atualização em 1997, juntamente com as informações do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) que valida e expande a classificação da LES em 2012. Segundo a SLICC, foram identificados 17 critérios para o diagnóstico. A regra para o diagnóstico é a de que o paciente deve ter pelo menos 4

manifestações, incluindo pelo menos um critério clínico e um critério imunológico. Ou o paciente deve apresentar inflamações renais, com biópsia comprovada na presença de anticorpos antinucleares, ou anticorpos anti-DNA de dupla hélice (PETRI et al., 2012).

A doença é sistêmica, devido à possibilidade de se manifestar em diversos órgãos e o seu curso é marcado por melhoras e pioras no quadro clínico ao longo do tempo, portanto, varia de paciente para paciente. Porém, os padrões de sintomas mais característicos são: fadiga, febre, mialgias, perda de peso e dores nas articulações. No entanto, sintomas mais graves como uma série de problemas vasculares, inflamações renais, gastrointestinais, pulmonares, cardíacas e do sistema nervoso central, também estão presentes. Os sintomas normalmente se desenvolvem de forma mais lenta e progressiva ou de forma mais rápida (meses ou semanas, respectivamente) (GLADMAN, 2018).

Dados da Portaria nº 100 de 7 de fevereiro de 2013, do Ministério da Saúde, a incidência de LES estimada em diversos locais do mundo é de 1 a 22 casos para cada 100.000 pessoas por ano e a sua prevalência, também mundial, é de 7 a 160 casos para cada 100.000.

Pessoas de qualquer idade, etnia e sexo podem desenvolver a doença. Porém, a maioria dos casos é em mulheres em idade reprodutiva, entre 20 e 45, e também em não caucasianas (FERREIRA BORBA et al., 2008b). No Brasil, segundo um estudo realizado na região Nordeste, mostrou-se uma incidência de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano (VILAR; RODRIGUES; SATO, 2003) e a sua prevalência segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR) é de 65.000 pessoas, com uma estimativa de uma a cada 1.700 mulheres (FERREIRA BORBA et al., 2008a).

Alguns fatores de risco foram descritos, como por exemplo, o microquimerismo (fenômeno biológico referente a uma pequena população de células ou DNA presente em um indivíduo, mas derivada de um outro organismo geneticamente distinto) fetal dos bebês que carregam certos alelos do complexo de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigens*) que foi relacionado ao desenvolvimento de autoimunidade nas mães, em um estudo recente em mulheres grávidas (CRUZ et al., 2016). Outros estudos fazem uma associação entre infecção viral e o desenvolvimento de Lúpus Eritematoso (HANLON, 2014). Mecanismos epigenéticos também têm sido estudados nas últimas décadas, cujas alterações nas histonas, na metilação do DNA, e na ação dos RNAs não codificadores, podem influenciar o desenvolvimento de doenças sem estar relacionada diretamente com a sequência do genoma, e mesmo assim ser passado às próximas gerações (LONG et al., 2016).

1.4 GENÉTICA E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

1.4.1 Polimorfismos De Nucleotídeo Único

A variabilidade genética humana inclui a mudança nucleotídica pontual ou até o ganho (ou perda) de cromossomos inteiros. Quando genomas de diferentes pessoas são comparados, a sequência dos nucleotídeos (Adenina, Citosina, Guanina e Timina) é quase sempre a mesma. Porém, variantes ocasionais podem ser vistas na posição de qualquer nucleotídeo. Cerca de 1 nucleotídeo a cada 300 é polimórfico (apresenta-se na forma de outra base nitrogenada), o que significa que aproximadamente 10 milhões de SNP ocorrem no genoma humano. Estes SNP são catalogados em um banco de dados público dbSNP (SHORT GENETIC VARIATIONS - NCBI, 2018) e são referenciados por números iniciados por “rs” (*reference SNP*). Os geneticistas descrevem uma variante como SNP se sua frequência na população for superior ao valor arbitrariamente definido como 0,01 (1%) (STRACHAN; READ, 2013).

Mais comumente, essas variações são encontradas no DNA em regiões entre os genes. Eles podem atuar como marcadores biológicos, importante para a localização de genes associados a doenças. Quando SNP ocorrem dentro de um gene ou em uma região reguladora próxima de um gene, eles podem desempenhar um papel mais direto na doença, afetando a função deste. A grande maioria dos SNP não tem efeito sobre a saúde ou o desenvolvimento. No entanto, algumas dessas diferenças genéticas, provaram ser muito importantes no estudo da saúde humana. Os SNP também podem ser usados para rastrear a herança de genes de doenças dentro das famílias. (GENETICS HOME REFERENCE, 2018).

Com o advento da tecnologia de GWAS, o número de SNP no genoma associados ao Lúpus Eritematoso Sistêmico aumentou drasticamente. Nos últimos anos, seis grupos publicaram estudos em GWAS que confirmaram e expandiram a lista de *loci* e suas variantes alélicas de risco para um número de 25, somente nesta doença - outros trabalhos demonstram 60 *loci* suscetíveis para esta doença (TERUEL; ALARCÓN-RIQUELME, 2016). Além disso, variantes para doenças inflamatórias compartilham vários destes *loci* de risco com LES. (BUDARF et al., 2011).

1.4.2 Vias metabólicas do ácido fólico

A ciência da Nutrigenética define a interrelação entre a genética de uma pessoa e sua necessidade ou utilização de um nutriente em particular. Na medida em que o sequenciamento de DNA e a pesquisa nutricional tornaram-se mais sofisticados nas últimas décadas, numerosas relações clínicas em Nutrigenética foram elucidadas. Entre os mais conhecidos são os vários polimorfismos no gene *MTHFR* que codifica a enzima Metilenetetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*) necessária para sintetizar a forma ativa do folato (Vitamina B9). Os polimorfismos do *MTHFR* são os mais amplamente estudados entre todos os polimorfismos nutrigenéticos e o teste de genotipagem do *MTHFR* tem se tornado uma prática clínica comum (GUILLIAMS, 2018).

O ácido fólico é uma molécula pequena (441,37 g/mol) e está envolvida em importantes processos bioquímicos em humanos, principalmente em sua forma iônica. Presente na multiplicação celular, regulação da atividade gênica, produção de células vermelhas e brancas, renovação da pele e o revestimento intestinal, bem como na síntese de produtos químicos que modulam a função cerebral. O ácido fólico está disponível naturalmente ou sinteticamente. O folato é a forma aniônica do ácido fólico. Frequentemente, o termo “ácido fólico” refere-se para o composto sintético totalmente oxidado usado em suplementos dietéticos, enquanto “folato” refere-se aos vários derivados de tetrahidrofolato naturalmente presente nos alimentos. No entanto, não há diferença em termos “naturais” ou ácido fólico “sintético”, são a mesma molécula (MARCHETTI et al., 2014).

A descoberta do ácido fólico foi relatada pela primeira vez em 1930, quando a hematologista inglesa Lucy Wills (1888 - 1964) em seu histórico artigo (WILLS, 1931) relatou a presença de uma substância derivada da levedura chamada de fator de Wills (Wills Factor Yeast Extract) que poderia prevenir a anemia megaloblástica, uma doença potencialmente fatal. Em 1941, Herschel K. Mitchell, Esmond Emerson Snell e Roger J. Williams cunharam o termo “ácido fólico”, pois seus experimentos foram com as folhas de espinafre, em latim *folium*, significa folha, já que o ácido fólico está presente em abundância nas folhas verdes (MITCHELL; SNELL; WILLIAMS, 1941). Pesquisas feitas nas décadas seguintes elucidaram melhor os componentes do metabolismo desta substância, bem como suas interrelações com outras vias metabólicas como: da vitamina B12, da metionina e também o papel do ácido fólico na síntese de pirimidina e purina (bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos) (GAZZALI et al., 2016).

A estrutura molecular do ácido fólico pode ser dividida em três partes: ácido glutâmico (Glu), uma porção de ácido p-aminobenzóico (PABA) e uma porção pterina (Figura 1). A porção pterina está ligada ao PABA por uma ponte de metileno e por sua vez PABA está ligado por uma ligação peptídica com o resíduo de Ácido Glutâmico (Glu) para formar o ácido fólico (VORA et al., 2002).

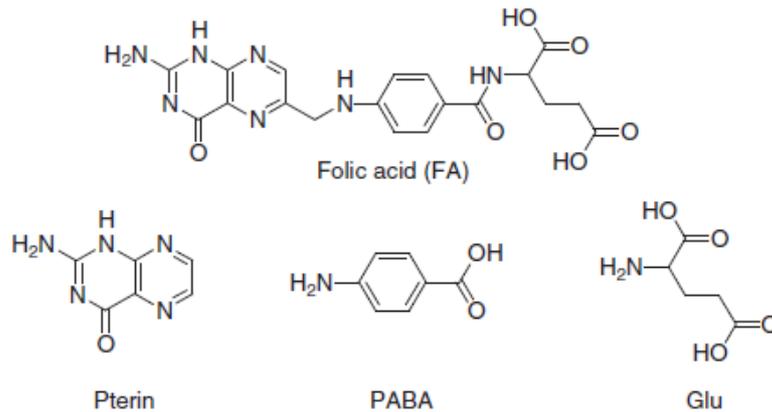


Figura 1- Estrutura molecular do ácido fólico e suas diferentes porções: Pterina, Ácido Paraminobenzóico (PABA) e Ácido Glutâmico (Glu). Fonte: GAZZALI et al., 2016.

A via metabólica desta molécula (Figura 2) faz a mediação de transferências de carbono necessárias para várias reações bioquímicas. Ela desempenha um papel crítico na síntese de S-adenosilmetionina (SAM) que serve como grupo doador em várias reações de metilação: como a metilação de DNA, RNA e proteínas. A metilação do DNA, por sua vez, é um importante determinante epigenético, na expressão gênica, na estabilidade do DNA e na mutagênese. Esta via também desempenha papel essencial na síntese *de novo* de nucleotídeos, que é necessária para replicação do DNA e no seu reparo. Assim, erros nesta via metabólica afetam diretamente a metilação do DNA, seus processos de reparação e síntese implicando no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, defeitos do tubo neural, fissura labiopalatina, e cânceres. (NAZKI; SAMEER; GANAIE, 2014).

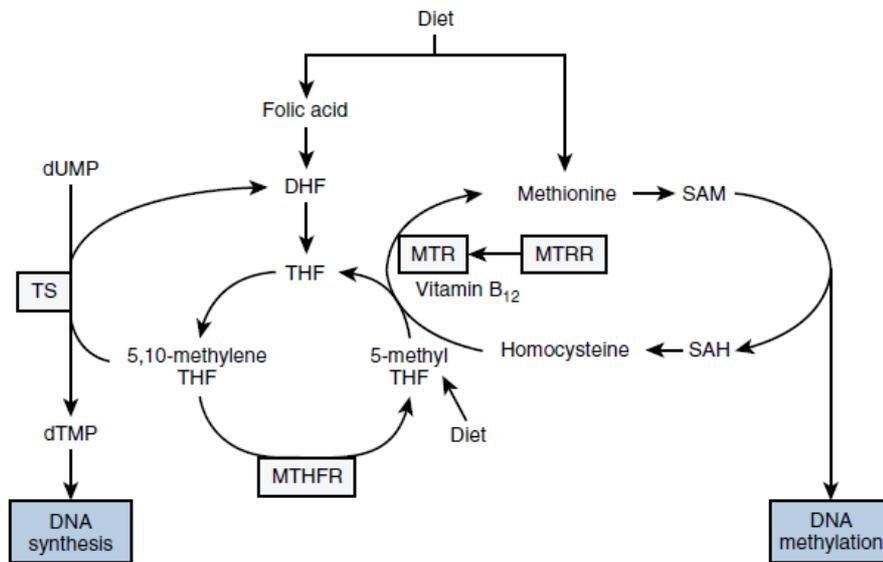


Figura 2 - Via metabólica do ácido fólico. Fonte: GUILLIAMS, 2018

1.4.3 Enzima MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase)

A enzima MTHFR, converte 5,10-metileno-tetrahidrofolato (5,10-methylene THF) - um doador de carbono na biossíntese de nucleotídeos -- em 5-metil-tetraidrofolato (5-methyl THF), um doador de carbono na remetilação da homocisteína em metionina (GOYETTE et al., 1998). Esta é uma reação irreversível e também a única fonte endógena de 5-metil THF para a célula. O composto 5-metil THF tem como única função conhecida ser doador de metila na conversão de homocisteína em metionina, numa reação catalisada pela enzima Metionina Sintetase Redutase (MTR) usando cobalamina (Vitamina B12) como cofator. Deficiências da atividade do *MTHFR* levam à redução da disponibilidade celular de 5-metil THF, o que resulta: 1) níveis elevados de homocisteína sérica ou urinária (tHcy - *total plasma homocysteine*); 2) acúmulo de metabólitos de folato; 3) baixos níveis de metionina, SAM (S-adenosilmethionina) e metilação no geral, causando efeitos epigenéticos a longo prazo (FRISO et al., 2002).

A homocisteína total plasmática elevada (tHcy), hiperhomocisteinemia ou homocistenúria é um fator de risco independente (ou marcador) para uma ampla gama de doenças (LIEW; GUPTA, 2015).

1.4.4 O Gene *MTHFR* e seus Polimorfismos

O gene humano que codifica a enzima MTHFR foi isolado e mapeado na década de 90 por Philippe Goyette e sua equipe através de um fragmento de cDNA (DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro, cujos íntrons foram removidos pelo *splicing* alternativo). O *MTHFR* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.3) (Figura 3), possuindo 20.374 pares de bases e apresentando 13 éxons. Produz um mRNA de 7.105 pares de bases que codifica a MTHFR, formada por 656 aminoácidos (GOYETTE et al., 1994).

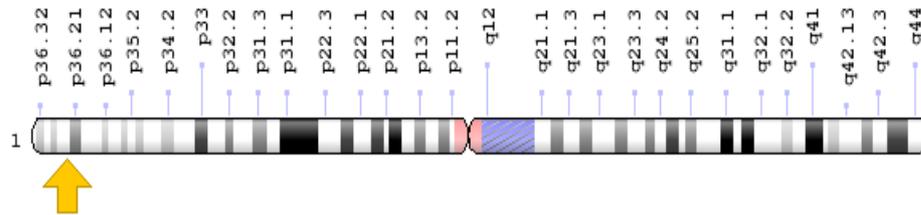


Figura 3 - Cromossomo 1 indicando a localização do gene *MTHFR*. Fonte: NCBI

Mais de 40 variantes genéticas diferentes no gene *MTHFR* foram identificados em pacientes com homocistenúria (LECLERC; SIBANI; ROZEN, 2004). Duas dessas variantes ganharam particular atenção, e ambas são polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Estes dois polimorfismos são *MTHFR* C677T e A1298C. (GUILLIAMS, 2018) (Quadro 1).

Quadro 1 - Quadro síntese das trocas no gene *MTHFR* e consequentemente dos aminoácidos estudados no presente trabalho.

| Gene <i>MTHFR</i> C677T | | | | Gene <i>MTHFR</i> A1298C | | |
|-------------------------|---------------|------------|-----------|--------------------------|--------------|-----------|
| Aminoácido posição 222 | | | | Aminoácido posição 429 | | |
| | Tipo Selvagem | Mutação | | Tipo Selvagem | Mutação | |
| Nucleotídeo (gene) | Citosina (C) | Timina (T) | C677T | Adenina (A) | Citosina (C) | A1298C |
| Aminoácido (proteína) | Alanina (A) | Valina (V) | Ala222Val | Glutamato (E) | Alanina (A) | Glu429Ala |

Fonte: elaborado pelo autor, adaptado de JADEJA et al. (2018).

- *MTHFR* C677T: troca uma Citosina (C) por uma Timina (T) no nucleotídeo número 677, resultando numa troca na posição 222 do aminoácido Alanina (A) por Valina (V) (FROSST et al., 1995).
- *MTHFR* A1298C: troca uma Adenina (A) por uma Citosina (C) no nucleotídeo número 1298, resultando numa troca na posição 429 do aminoácido Glutamato (E) por Alanina (A) (WEISBERG et al., 1998).

A variação C677T ocorre no éxon 4 situado no sítio de ligação da proteína MTHFR e A1298C ocorre no éxon 7 situado num domínio regulatório (SUNDER-PLASSMANN; DINGER, 2003).

No caso de polimorfismos C677T, verificou-se que, em comparação com as variantes homozigotas normais (C677C), o heterozigoto (C677T) têm 65% de seus níveis de atividade enzimática *in vitro* enquanto homozigotos para a variante (T677T) têm 30% de atividade (ROZEN, 1997). Os estudos de ensaios microbiológicos demonstraram que em comparação com homozigotos CC, heterozigotos CT e homozigotos TT têm respectivamente 10% e 18% níveis menores de folato nas hemácias (MOLLOY et al., 1997). Indivíduos com a variante TT também foram encontrados contendo baixos níveis de folato e vitamina B12 no plasma e também elevados níveis de homocisteína (MA et al., 1999).

Similarmente para A1298C, comparado com os homozigotos normais (AA), a atividade enzimática *in vitro* demonstrou ser menor no homozigoto (CC) e ainda em menor grau nas variantes heterozigotos (AC) (VAN DER PUT et al., 1998). Estudos de folato e homocisteína A1298C e plasma são inconsistentes. Atividade enzimática *in vitro* para compostos heterozigotos (isto é, heterozigotos para C677T e para A1298C) não são claros. (NAZKI; SAMEER; GANAIE, 2014). Esta variante enzimática, ao contrário da variante C677T não é termolábil (perde suas propriedades em baixas temperaturas) e não parece estar associada a níveis elevados de homocisteína, mesmo em homozigotos (C1298C). Entretanto, indivíduos que são heterozigotos para ambos os SNP (isto é, A1298C e C677T) têm homocisteína elevada a níveis semelhantes aos indivíduos homozigóticos T677T e a frequência do polimorfismo A1298C é mais alta em populações de ascendência europeia (GUILLIAMS, 2018).

Outros estudos como o de Sunder-Plassmann et al. podem variar em termos do nível de atividade da enzima, heterozigotos 677CT, 1298AC e a combinação da heterozigotidades C677T + A1298C trazem uma redução do nível de atividade para 45%, 68% e 42%, respectivamente (SUNDER-PLASSMANN; DINGER, 2003).

A Figura 04 demonstra uma análise *in silico* do fenótipo da enzima MTHFR em suas diferentes alterações residuais que alteram o formato da proteína (JADEJA et al., 2018).

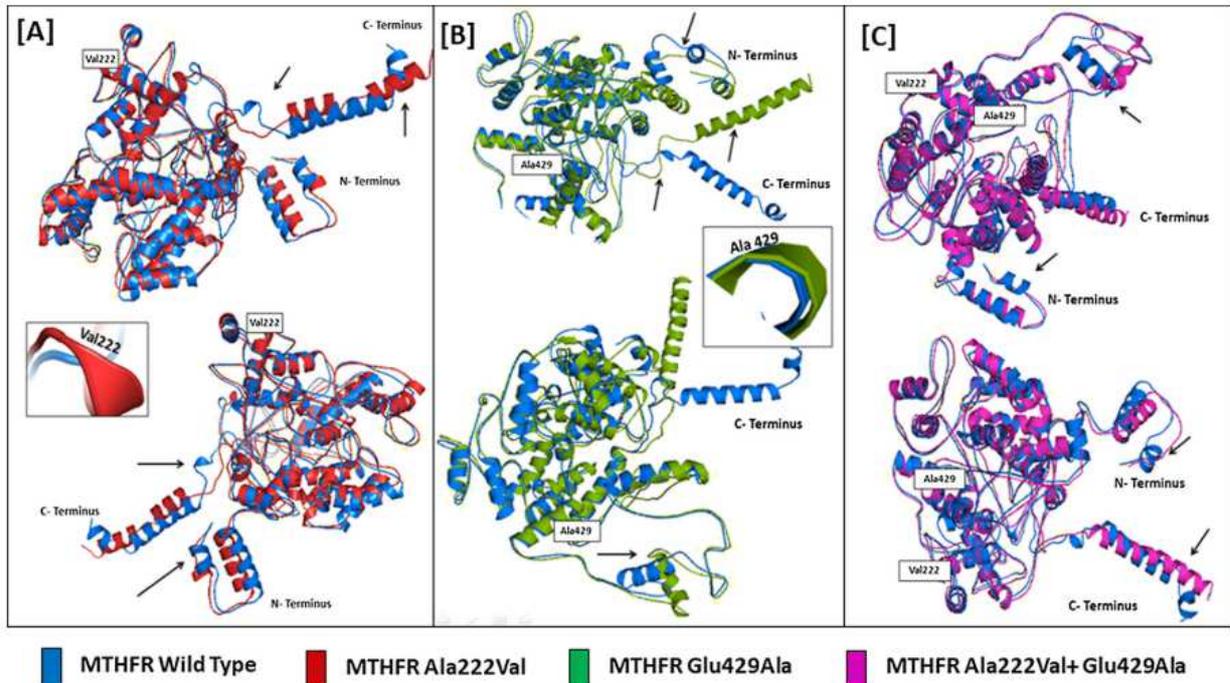


Figura 4 - Alterações estruturais da proteína com os SNP do gene *MTHFR*. Azul a proteína tipo selvagem. [A]: vermelho mutante C677T, [B]: verde mutante A1298C, [C]: magenta mutante duplo C677T e A1298C. As alterações na estrutura são identificadas com setas. **Fonte:** JADEJA et al., 2018.

2 JUSTIFICATIVA

Devido à grande dificuldade diagnóstica de LES, grandes índices de mortalidade e perda da qualidade de vida estão associados à essa doença. Surge então a necessidade de uma busca por marcadores genéticos, não só para o acompanhamento e auxílio diagnóstico, mas também para um melhor entendimento do mecanismo e etiologia da doença. A contribuição desse estudo é na análise de dois SNP nas regiões C677T e A1298C do gene *MTHFR* para obter mais informações sobre estes polimorfismos em pessoas saudáveis e em pessoas portadoras da doença, buscando assim uma possível relação com a doença e suas manifestações clínicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) a genótipos de risco e de proteção para o desenvolvimento da doença Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), através de um estudo caso-controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de PCR-RFLP para o Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) - UFSC;
- Determinar os genótipos dos SNP de duas posições polimórficas do gene *MTHFR* 677 e 1298 para ambos os grupos de casos e controle, bem como calcular as frequências alélicas e genotípicas para estes polimorfismos;
- Testar a hipótese de que os genótipos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto no grupo de casos como no grupo controle;
- Verificar se há associação com a doença e as manifestações clínicas presentes nos pacientes de LES com os alelos e os genótipos de *MTHFR* 1298 e 677.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DE DADOS E DO MATERIAL BIOLÓGICO

Esta pesquisa originou-se de um subprojeto aprovado no SIGPEX (201610359), o qual faz parte de um projeto amplo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH/UFSC), em parecer consubstanciado sob o n.º. 423.535, de 23/09/2013 (Anexo D).

Os dados familiares e epidemiológicos dos 173 pacientes com LES, atendidos no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foram obtidos durante entrevista, através de questionários estruturados (ANEXO A). Eles foram coletados por alunos pertencentes ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - ANEXO B) e os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes com LES. Após a obtenção do consentimento informado assinado pelo paciente e da entrevista, foram coletadas amostras de sangue (10 ml de sangue periférico), em tubo com anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) para extração de DNA e análise dos polimorfismos genéticos no LAPOGE.

Como grupo controle foram utilizadas 157 amostras de voluntários sem manifestação ou histórico da doença, participantes (1) do Núcleo de Estudo da Terceira Idade (NETI) associado à UFSC e (2) da Associação Amigos do Hospital Universitário (AAHU). Os dados familiares e epidemiológicos do grupo controle foram obtidos de maneira similar aos dos pacientes, bem como o consentimento livre e esclarecido (TCLE) e a coleta de sangue periférico (ANEXO C).

Todas estas amostras biológicas com seus dados pessoais, familiares e epidemiológicos obtidos através dos questionários, foram catalogados e constituem um banco de dados e amostras biológicas de pacientes com LES e de indivíduos do grupo Controle, armazenados no LAPOGE. Os dados clínicos foram obtidos de prontuários médicos, cujas informações foram conseguidas na data da coleta e consulta.

Todas as amostras biológicas utilizadas para este trabalho estavam adequadamente armazenadas em freezer -80°C e após terem sido devidamente coletadas, separadas, conservadas em tubo contendo EDTA, que foi feita a partir da extração do DNA, da camada de linfócitos do sangue (*buffy coat*).

4.1.1 Extração do DNA

O material genômico utilizado foi extraído de acordo com o método de Sambrook & Russel (2001) pelos colaboradores do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), a partir de um banco de dados das amostras, contendo um código de matrícula das amostras, juntamente com os questionários obtidos pela entrevista no dia da coleta.

4.1.2 Amplificação do DNA

As técnicas para a análise de polimorfismos genéticos utilizadas no presente estudo foi PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction e Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Eletroforese em Gel de Agarose (BERG, 2012).

Inicialmente, os fragmentos de DNA das regiões *MTHFR* C677T e *MTHFR* A1298C foram amplificadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se para isso oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), cujas sequências constam na Tabela 1 (YI et al., 2002).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos que envolvem as posições 677 e 1298 do gene *MTHFR*.

| <i>Nome</i> | <i>Sequência</i> | <i>Temperatura de anelamento</i> |
|---------------------|---|----------------------------------|
| <i>MTHFR</i> 677 F | 5'- TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA - 3' | 65° C |
| <i>MTHFR</i> 677 R | 5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG - 3' | 65° C |
| <i>MTHFR</i> 1298 F | 5'- CAA GGA GGA GCT GCT GAA GA - 3' | 62° C |
| <i>MTHFR</i> 1298 R | 5'- CCA CTC CAG CAT CAC TCA CT - 3' | 62° C |

Fonte: YI et al., 2002.

Após a amplificação dessas regiões os tamanhos dos fragmentos de DNA são respectivamente de 198 pares de base (relativo à região 677) e 128 pares de base (relativo à região 1298), visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, na forma de bandas coradas na presença do corante fluorescente *GelRed*TM. Com essa técnica é possível verificar se a etapa de PCR foi bem-sucedida (Figura 5).

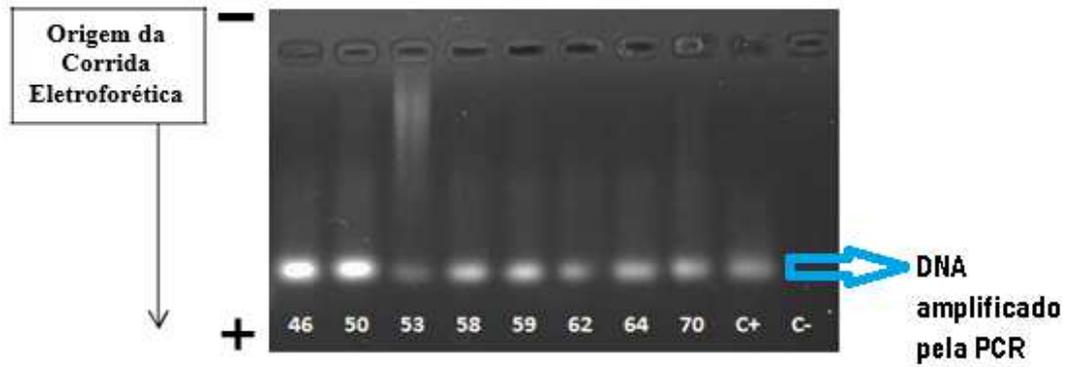


Figura 5 - Gel de agarose 1,5% realizado para a verificação da qualidade do DNA amplificado pela PCR. Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.3 Enzimas de Restrição

Após a PCR, o produto gerado contendo a região específica foi digerido por enzimas de restrição *HinfI* e *MBOII*:

- 1) *HinfI* (gene da *Haemophilus influenzae*) para a região 677 do gene *MTHFR*.
- 2) *MBO II* (gene da *Moraxella bovis*) para a região 1298 do gene *MTHFR*.

Essas enzimas clivam fragmentos de dupla fita de DNA quando identificam locais referidos como sítios de restrição (Figura 6). A variabilidade entre os tamanhos dos fragmentos permite a identificação das referidas substituições em seus alelos (TERRUZZI et al., 2011).

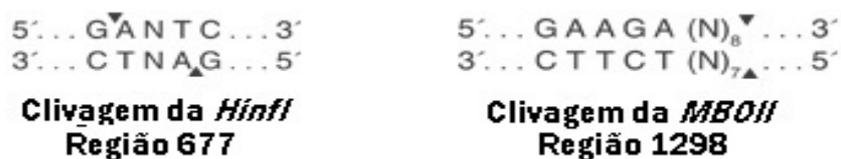


Figura 6 – Identificação dos sítios de clivagem ($\nabla \blacktriangle$) das enzimas *HinfI* e *MBOII*. Fonte: Biolabs®

4.2 GENOTIPAGEM

Após a clivagem enzimática, a técnica utilizada para visualização do resultado foi a Eletroforese em Gel de Agarose (5%) para analisar os devidos polimorfismos no gene de cada indivíduo; tanto no grupo paciente quanto controle. Todos os géis da eletroforese foram analisados no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC com o equipamento ChemiDoc MP®(Bio-Rad) e o *software* ImageLab®(Bio-Rad).

Nas figuras 7 e 8 é possível observar,

- ***MTHFR C677T***: fragmentos de 198 e 175 pares de bases após clivagem enzimática:
 - **C677C**: apenas observável a faixa de 198 pares de base (genótipo CC)
 - **C677T**: observável as duas faixas de 198 e 175 pares de base (genótipo CT)
 - **T677T**: apenas observável a faixa de 175 pares de base (genótipo TT)
- ***MTHFR A1298C***: fragmentos de 100 e 72 pares de bases após clivagem enzimática:
 - **A1298A**: apenas observável a faixa de 72 pares de base (genótipo AA)
 - **A1298C**: observável as duas faixas de 100 e 72 pares de base (genótipo AC)
 - **C1298C**: apenas observável a faixa de 100 pares de base (genótipo CC)

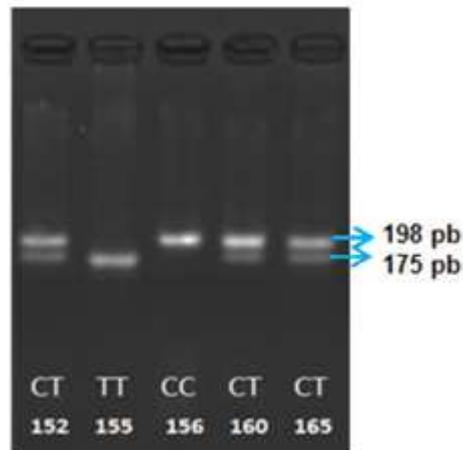


Figura 7 – Leitura dos genótipos do gene *MTHFR C677T* no presente trabalho. As amostras pertencentes aos indivíduos 152, 160 e 165 são identificadas como heterozigotas para o *locus* 677, enquanto as amostras 155 e 156 como homozigotas para os alelos T e C, respectivamente.

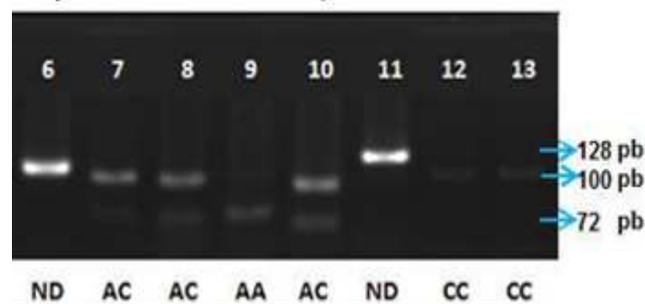


Figura 8 - Leitura dos genótipos do gene *MTHFR A1298C* no presente trabalho. As amostras pertencentes aos indivíduos 7, 8 e 10 são identificadas como heterozigotas para o *locus* 1298 (AC), enquanto a amostra 9 como homozigota para o alelo A (AA) e as amostras 12 e 13 como homozigotas para o alelo C (CC). As amostras 6 e 11 não foram digeridas (ND).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genotípicas de cada grupo foram estimadas por contagem direta. O teste de EHW também foi realizado, para verificação do equilíbrio das distribuições genotípicas observadas. Para confirmação dos cálculos foi utilizado o software GenePop[®], versão 3,4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) adotando-se um grau de liberdade.

Para comparar os dois grupos foram aplicados os métodos clássicos de análise epidemiológica para estudos caso-controle. Para uma estimativa da associação entre os diversos alelos estudados e o LES, foi calculada uma razão de probabilidade, *odds ratio* (OR), utilizando o programa HDS *EpiMax Table Calculator* (HEALTH DECISION STRATEGIES, 2012).

O valor de p menor que 0,05 foi adotado como limite de significância para todos os testes realizados.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra deste estudo constituiu-se de 330 indivíduos residentes no Estado de Santa Catarina predominantemente moradores da região da grande Florianópolis. Destes, 173 são pacientes de LES (grupo de Casos) e 157 são indivíduos sem histórico de doenças autoimunes (grupo Controle), não tendo estes últimos, conforme declarado pelos mesmos, parentesco com indivíduos acometidos por LES ou outras doenças autoimunes. Para a identificação dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR*, obtiveram-se resultados de 296 indivíduos para a genotipagem do *locus* 677 e 241 indivíduos para a genotipagem do *locus* 1298. Cabe salientar que, de todos os indivíduos que foram genotipados, nem todos apresentaram resultados para os dois *loci*, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Identificação do número total de indivíduos amostrados, formado pelo grupo de Casos e pelo grupo Controle, e número total de indivíduos genotipados para os *loci* *MTHFR* C677T e A1298C.

| Indivíduos amostrados | | <i>MTHFR</i> | <i>MTHFR</i> |
|-----------------------|------------|------------------|-------------------|
| | | C677T genotipado | A1298C genotipado |
| Casos | 173 | 167 | 116 |
| Controle | 157 | 129 | 125 |
| Total | 330 | 296 | 241 |

Fonte: elaborado pelo autor

Os indivíduos do grupo Controle foram pareados com as amostras de Casos de acordo com as características deste último grupo (indivíduos com LES) em relação a sexo, idade e etnia. Os indivíduos efetivamente genotipados de acordo com as características citadas se encontram na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição sexual, da média de idade com desvio padrão, e da origem étnica das amostras de Casos com LES e do grupo Controle, na população de SC, apenas dos indivíduos genotipados para *MTHFR* C677T e A1298C.

| Característica Epidemiológica | | <i>MTHFR</i> C677T | | <i>MTHFR</i> A1298C | |
|-------------------------------|-----------|--------------------|----------|---------------------|----------|
| | | Caso | Controle | Caso | Controle |
| Nº indivíduos | | 167 | 129 | 116 | 125 |
| Sexo | | | | | |
| | Feminino | 151 | 112 | 111 | 111 |
| | Masculino | 6 | 17 | 3 | 14 |
| | Ni | 10 | 0 | 2 | 0 |
| Média de idade | | 37,73 | 38,125 | 38,01 | 38,23 |
| Desvio padrão | | SD +-12,08 | +-13,40 | +-12,18 | +-13,31 |
| Etnia (origem) | | | | | |
| | Africana | 17 | 24 | 9 | 22 |
| | Europeia | 105 | 80 | 77 | 80 |
| | Ameríndia | 5 | 7 | 4 | 7 |
| | Outras | 19 | 0 | 14 | 0 |
| | Ni | 21 | 18 | 12 | 16 |

Fonte: elaborado pelo autor. Ni = não informado

De acordo com a Tabela 4 é possível observar algumas das manifestações clínicas em pacientes de LES. Porém, dos 173 indivíduos com LES, 149 possuíam as manifestações clínicas avaliadas no questionário e com informações genotipadas pelo presente estudo.

Tabela 4 – Frequências absolutas e relativas das manifestações clínicas presentes em pacientes com LES, que foram genotipados para os polimorfismos 677 e 1298 do gene *MTHFR* no presente estudo.

| Manifestações clínicas | N (%) |
|--|------------|
| Artrite | 112 (75%) |
| Fotossensibilidade | 94 (63%) |
| Eritema malar | 82 (55%) |
| Úlcera oral | 66 (44%) |
| Nefrite | 61 (41%) |
| Anemia | 54 (36%) |
| Alterações neurológicas | 44 (30%) |
| Serosite | 36 (24%) |
| Total de pacientes genotipados com dados clínicos | 149 |

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.1 Frequências Alélicas e Genóticas nas Regiões 677 e 1298 do gene *MTHFR*.

Os números absolutos de alelos e genótipos observados e esperados e suas respectivas frequências (alélicas e genóticas) podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Números absolutos de alelos e genótipos observados e esperados e suas respectivas frequências (alélicas e genóticas) identificadas nas regiões 677 e 1298 do gene *MTHFR*, nos grupos de casos e controle do presente estudo.

| Polimorfismo | Casos Nº observado (esperado) | Frequência | Controle Nº observado (esperado) | Frequência |
|----------------------------|--|------------|--|------------|
| <i>MTHFR</i> C677T | | | | |
| C | 219 | 0,6557 | 172 | 0,6667 |
| T | 115 | 0,3443 | 86 | 0,3333 |
| Total de alelos | 334 | | 258 | |
| CC | 73 (71,6847) | 0,4371 | 57 (57,2218) | 0,4419 |
| CT | 73 (75,6306) | 0,4371 | 58 (57,5564) | 0,4496 |
| TT | 21 (19,6847) | 0,1258 | 14 (14,2218) | 0,1085 |
| Total de indivíduos | 167 | | 129 | |
| <i>MTHFR</i> A1298C | | | | |
| A | 157 | 0,6767 | 141 | 0,5640 |
| C | 75 | 0,3233 | 109 | 0,4360 |
| Total de alelos | 232 | | 250 | |
| AA | 61 (53,0130) | 0,5259 | 44 (39,6386) | 0,3520 |
| AC | 35 (50,9740) | 0,3017 | 53 (61,7229) | 0,4240 |
| CC | 20 (12,0130) | 0,1724 | 28 (23,6385) | 0,2240 |
| Total de indivíduos | 116 | | 125 | |

Fonte: elaborado pelo autor

5.1.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas Regiões 677 e 1298 do gene *MTHFR*

As distribuições das frequências genóticas e alélicas para a região C677T do gene *MTHFR* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 6), tanto no grupo de Casos como no de Controle. Para a região A1298C do gene, o grupo controle encontra-se em EHW, mas o grupo de casos ficou fora do equilíbrio ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Valores de p em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas Regiões 677 e 1298 do gene *MTHFR*, no presente estudo.

| Locus | Valor de p | |
|---------------|----------------|----------|
| | Casos | Controle |
| C677T | 0,7337 | 1,0000 |
| A1298C | 0,0013* | 0,1410 |

Fonte: elaborado pelo autor. Em destaque * valor de $p < 0,05$, mostrando o *locus* fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As homoziguidade e heteroziguidade observadas e esperadas de ambos os *loci* seguem na Tabela 7.

Tabela 7 – Homoziguidade e heteroziguidade observadas e esperadas para os polimorfismos 677 e 1298 do gene *MTHFR* para os grupos de Caso e Controle do presente estudo.

| | Homoziguidade | | | | Heteroziguidade | | | |
|---------------|---------------|---------|----------|---------|-----------------|---------|----------|---------|
| | Caso | | Controle | | Caso | | Controle | |
| | Obs. | Esp. | Obs. | Esp. | Obs. | Esp. | Obs. | Esp. |
| C677T | 94 | 91,3694 | 71 | 71,4436 | 73 | 75,6306 | 58 | 57,5564 |
| A1298C | 81 | 65,0260 | 58 | 57,5564 | 35 | 50,9740 | 53 | 61,7229 |

Fonte: o autor.

5.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO *MTHFR* C677T NO ESTUDO CASO-CONTROLE

No estudo do polimorfismo *MTHFR* C677T, foram genotipados 167 pacientes e 129 controles. Não foi encontrada nenhuma associação entre casos e controles quando calculado os *odds-ratio* considerando cada alelo e cada genótipo como fator de risco para o desenvolvimento de LES (Tabela 8).

Tabela 8 - Odds ratio (OR) de casos e controles para alelos e genótipos do locus *MTHFR* C677T no presente estudo.

| | OR | IC 95% | p |
|------------------|-------|---------------|-------|
| Alelos | | | |
| C | 0,952 | 0,665 - 1,362 | 0,848 |
| T | 1,050 | 0,734 - 1,503 | 0,848 |
| Genótipos | | | |
| CC vs CT | 1,018 | 0,606 - 1,709 | 1,000 |
| CC vs TT | 0,854 | 0,373 - 1,944 | 0,829 |
| CT vs CC | 0,983 | 0,585 - 1,650 | 1,000 |
| CT vs TT | 0,839 | 0,367 - 1,909 | 0,794 |
| TT vs CT | 1,192 | 0,524 - 2,726 | 0,794 |
| TT vs CC | 1,171 | 0,514 - 2,682 | 0,829 |
| CC vs (CT + TT) | 0,981 | 0,601 - 1,601 | 1,000 |
| CT vs (CC + TT) | 0,951 | 0,583 - 1,550 | 0,924 |
| TT vs (CC + CT) | 1,182 | 0,546 - 2,575 | 0,784 |
| (CC + TT) vs CT | 1,052 | 0,645 - 1,715 | 0,924 |
| (CC + CT) vs TT | 0,846 | 0,388 - 1,832 | 0,784 |
| (CT + TT) vs CC | 1,019 | 0,625 - 1,663 | 1,000 |

Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO *MTHFR* A1298C NO ESTUDO CASO-CONTROLE

No estudo do polimorfismo *MTHFR* A1298C, foram genotipados 116 pacientes e 125 controles.

O *odds-ratio* para essa região gênica apresenta uma associação entre casos e controles. Considerando cada alelo separadamente, o alelo A se mostrou um fator de risco e o alelo C um fator de proteção para o desenvolvimento da doença (Tabela 9).

Avaliando os resultados obtidos entre as comparações genóticas, é possível observar que o genótipo AA em relação aos outros genótipos observados apresenta *odds-ratio* com valores próximos a 2,000, no sentido de aumentar o risco para a doença, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Entretanto, os genótipos AC e CC atuam como fatores de proteção para a doença (*odds-ratio* abaixo de 0,500, com valor de p significativo).

Tabela 9 - Odds ratio de casos e controles para alelos e genótipos do locus *MTHFR* 1298.

| | OR | IC 95% | p |
|------------------|--------------|---------------|---------------|
| Alelos | | | |
| A | 1,618 | 1,097 - 2,388 | 0,014* |
| C | 0,618 | 0,419 - 0,912 | 0,014* |
| Genótipos | | | |
| AA vs AC | 2,099 | 1,133 - 3,899 | 0,017* |
| AA vs CC | 1,941 | 0,919 - 4,117 | 0,086 |
| AC vs AA | 0,476 | 0,256 - 0,882 | 0,017* |

| | | | |
|-----------------|--------------|---------------|---------------|
| AC vs CC | 0,660 | 0,291 - 1,498 | 0,373 |
| CC vs AC | 1,082 | 0,497 - 2,350 | 0,975 |
| CC vs AA | 0,515 | 0,243 - 1,089 | 0,086 |
| AA vs (AC + CC) | 2,042 | 1,178 - 3,543 | 0,010* |
| AC vs (AA + CC) | 0,587 | 0,333 - 1,034 | 0,066 |
| CC vs (AA + AC) | 0,722 | 0,363 - 1,432 | 0,401 |
| (AA + CC) vs AC | 1,704 | 0,967 - 3,005 | 0,066 |
| (AA + AC) vs CC | 1,386 | 0,698 - 2,758 | 0,401 |
| (AC + CC) vs AA | 0,490 | 0,282 - 0,849 | 0,010* |

Fonte: elaborado pelo autor. *valores significativos: $p < 0,05$

5.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO E RELAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Foram feitas as análises de associação (*odds-ratio*) para todas as manifestações clínicas listadas na Tabela 4. Porém, as duas manifestações que apresentaram associação foram **fotossensibilidade** e **úlceras orais** para **A1298C** (Tabela 10). Os dados completos encontram-se no APÊNDICE C.

Tabela 10 - Valores de *Odds ratio* (OR), intervalo de confiança (IC 95%) e valor de *p* estimados entre a presença dos polimorfismos para alelos do C677T e A1298C do gene *MTHFR*, e as manifestações clínicas de fotossensibilidade^(*) e úlcera oral^(*), quando comparados o grupo de casos (+) (pacientes que apresentam a manifestação clínica) e o grupo controle (-) (pacientes que não apresentam a manifestação clínica).

| | OR | IC 95% | p |
|---------------------------|--------------|---------------|---------------|
| Fotossensibilidade | | | |
| MTHFR C677T | | | |
| Alelos | | | |
| C | 0,733 | 0,426 – 1,259 | 0,287 |
| T | 1,364 | 0,794 – 2,347 | 0,287 |
| MTHFR A1298C | | | |
| A | 1,947 | 1,026 – 3,701 | 0,041* |
| C | 0,513 | 0,270 – 0,975 | 0,041* |
| Úlcera Oral | | | |
| MTHFR C677T | | | |
| Alelos | | | |
| C | 1,200 | 0,716 – 2,013 | 0,541 |
| T | 0,833 | 0,497 – 1,396 | 0,541 |
| MTHFR A1298C | | | |
| A | 0,514 | 0,283 – 0,932 | 0,027* |
| C | 1,944 | 1,073 – 3,528 | 0,027* |

(*) Manifestações clínicas que apresentaram resultados significativos. Fonte: elaborado pelo autor.

É possível observar que na manifestação de **fotossensibilidade** o alelo A do A1298C está atuando como fator de risco (OR: 1,947 e $p < 0,05$), e o alelo C como fator de proteção (OR: 0,513 e $p < 0,05$) para o desenvolvimento deste sintoma para LES.

Na manifestação de Úlcera Oral, o alelo A mostrou-se fator protetivo (OR: 0,514) e o alelo C como fator de risco (OR: 1,944) para o sintoma (manifestação).

A análise de associação completa (alelos e genótipos) do *locus MTHFR A1298C* com as manifestações clínicas de fotossensibilidade e úlcera oral encontram-se nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11 – Odds ratio para fotossensibilidade para alelos e genótipos do *locus MTHFR A1298C*.

| | OR | IC 95% | p |
|---------------------------|--------------|---------------|---------------|
| Fotossensibilidade | | | |
| Alelos | | | |
| A | 1,947 | 1,026 – 3,701 | 0,041* |
| C | 0,513 | 0,270 – 0,975 | 0,041* |
| Genótipos | | | |
| AA vs AC | 2,438 | 0,872 - 6,883 | 0,096 |
| AA vs CC | 2,600 | 0,728 - 9,377 | 0,168 |
| AC vs AA | 0,410 | 0,145 - 1,147 | 0,096 |
| AC vs CC | 1,067 | 0,291 - 3,896 | 1,000 |
| CC vs AC | 0,938 | 0,257 - 3,431 | 1,000 |
| CC vs AA | 0,385 | 0,107 - 1,374 | 0,168 |
| AA vs (AC + CC) | 2,492 | 0,990 - 6,342 | 0,052 |
| AC vs (AA + CC) | 0,544 | 0,214 - 1,381 | 0,232 |
| CC vs (AA + AC) | 0,572 | 0,181 - 1,813 | 0,429 |
| (AA + CC) vs AC | 1,838 | 0,724 - 4,676 | 0,232 |
| (AA + AC) vs CC | 1,748 | 0,552 - 5,513 | 0,429 |
| (AC + CC) vs AA | 0,401 | 0,158 - 1,010 | 0,052 |

Fonte: elaborado pelo autor.

É possível observar que o genótipo AA apresenta uma diferença no sentido da predisposição ao sintoma possuindo OR acima de 2,400, mesmo não sendo significativo e os genótipos AC e CC, especialmente esse último, possuem uma tendência a serem genótipos protetivos.

Tabela 12 - Odds ratio para úlcera oral para alelos e genótipos do locus *MTHFR* A1298C.

| | OR | IC 95% | <i>p</i> |
|--------------------|--------------|----------------|---------------|
| Úlcera Oral | | | |
| Alelos | | | |
| A | 0,514 | 0,283 – 0,932 | 0,027* |
| C | 1,944 | 1,073 – 3,528 | 0,027* |
| Genótipos | | | |
| AA vs AC | 1,237 | 0,461 - 3,340 | 0,812 |
| AA vs CC | 0,411 | 0,118 - 1,399 | 0,184 |
| AC vs AA | 0,809 | 0,299 - 2,172 | 0,812 |
| AC vs CC | 0,332 | 0,086 - 1,246 | 0,115 |
| CC vs AC | 3,012 | 0,803 - 11,640 | 0,115 |
| CC vs AA | 2,346 | 0,715 - 8,484 | 0,184 |
| AA vs (AC + CC) | 0,842 | 0,357 - 1,979 | 0,815 |
| AC vs (AA + CC) | 0,640 | 0,252 - 1,609 | 0,406 |
| CC vs (AA + AC) | 2,652 | 0,840 - 8,551 | 0,107 |
| (AA + CC) vs AC | 1,564 | 0,622 - 3,969 | 0,406 |
| (AA + AC) vs CC | 0,377 | 0,117 - 1,190 | 0,107 |
| (AC + CC) vs AA | 1,188 | 0,505 - 2,799 | 0,815 |

Fonte: elaborado pelo autor. *valores significativos: $p < 0,05$

Com relação a análise de associação genotípica com o sintoma de úlcera oral, não foi apresentado nenhuma associação genotípica, apenas alélica ($p = 0,027$). Porém, há uma tendência para AA ser fator de proteção ($OR < 0,5$) e o genótipo CC ser fator de risco ($OR > 2,300$).

As amostras foram todas retiradas de pacientes do Estado de Santa Catarina (sul do Brasil) tratando-se de uma população de origem predominantemente europeia-caucasiana (65%) (Tabela 13).

Tabela 13 – Percentual relativo à etnia amostral dos pacientes com LES do Estado de Santa Catarina

| Etnia | Média |
|----------------------|-------|
| Europeia | 65% |
| Africana | 14% |
| Ni | 12% |
| Outras | 5% |
| Indígena (Ameríndia) | 4% |

Fonte: elaborado pelo autor

6 DISCUSSÃO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune multissistêmica, com uma diversa expressão fenotípica nos pacientes. O entendimento da etiologia e o desencadeamento das doenças autoimunes em geral e particularmente LES ainda permanecem limitadas (MILLER et al., 2012).

As extensas pesquisas dos últimos anos demonstraram diversos *loci* de risco ao desenvolvimento de LES, através de Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS - *Genome-wide association studies*) e casos-controle. Esses estudos apontaram para duas grandes conclusões: Primeira, a maioria das associações GWAS se enquadra em regiões não codificadoras, sugerindo um possível efeito regulatório das variantes na patologia da doença. Segundo, os genes e *loci* associados parecem explicar apenas uma pequena fração da herdabilidade geral da doença, enquanto a maioria permanece inexplicada. Com isso, as modificações epigenéticas foram propostas para explicar parte dessa "herdabilidade ausente", sendo então uma camada adicional de regulação genômica e podendo servir como um elo dinâmico entre genótipo, fenótipo e ambiente (TERUEL; ALARCÓN-RIQUELME, 2016).

Nos pacientes com LES, o que se sabe é que as células dos leucócitos mononucleares, incluindo monócitos/macrófagos, as células NK (*natural killers*), os linfócitos B e os linfócitos T exibem várias alterações. Com isso, ocorre a produção de citocinas anormais, diminuição da função citotóxica e aumento da resposta humoral. Evidências mostram que variações nas regiões de DNA não codificantes de genes relacionados à resposta imune parecem contribuir para a função anormal dos linfócitos T (DAYAL; KAMMER, 1996). Estudos comprovam que uma super expressão anormal de citocinas, no qual ocorre um aumento de autoanticorpos, está relacionada a uma baixa metilação em regiões regulatórias do DNA em células T (Quadro 2). Portanto, as variações genéticas nas enzimas da via folato / homocisteína, que fornecem grupo doador de metila para esta adição ao DNA, podem estar relacionadas ao *status* de metilação na região reguladora de genes nessas células.

Quadro 2 – Relação de artigos relacionando a baixa metilação do DNA em regiões regulatórias em células T.

| Referência | Título do artigo |
|--------------------------------------|---|
| (RICHARDSON et al., 1990) | <i>Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis</i> |
| (WILSON; MAKAR; PÉREZ-MELGOSA, 2002) | <i>Epigenetic Regulation of T Cell Fate and Function</i> |
| (MAKAR; WILSON, 2004) | <i>DNA Methylation Is a Nonredundant Repressor of the Th2 Effector Program</i> |
| | <i>Impaired DNA methylation and its mechanisms in CD4+T cells of systemic lupus erythematosus</i> |
| | <i>Genome-wide assessment of differential DNA methylation associated with autoantibody production in systemic lupus erythematosus</i> |

A MTHFR atua como a principal enzima no metabolismo do ácido fólico em reações de catálise necessárias à remetilação da homocisteína em metionina. Esta última, uma importante precursora da que desempenha o papel fundamental de grupo doador de metil nas reações de metilação (SALIMI et al., 2017a).

6.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Uma das características de LES é apresentar uma resposta imune dirigida a antígenos nucleares (MANSON; RAHMAN, 2006b), que tornam o DNA sensível à degradação e também por diversos manuseios, muitas amostras do banco de dados do LAPOGE-UFSC apresentaram um DNA degradado, o que se mostrou como um desafio na amplificação pelo método da PCR-RFLP. Outra dificuldade foi na caracterização dos genótipos da região A1298C. Após a digestão pela enzima *MBOII* e a posterior utilização do corante *GelRed®* para identificação dos fragmentos na corrida de eletroforese, os fragmentos apresentaram-se pouco visíveis o que dificultou a leitura do genótipo e muitas vezes sem nenhuma visualização

em porcentagem isso significou uma perda de 32,95% para os casos e 20,39% para os controles. Porém para a região C677T as perdas foram bem menores.

Quanto ao sexo, as amostras mostraram uma prevalência de mulheres, e em sua maioria em idade reprodutiva (17-40 anos), com 99 indivíduos representando 61% do total. As amostras se mostraram numa tendência de seguir a distribuição normal, com exceção das idades entre 27-31 anos que tiveram uma frequência amostral menor, com apenas 9 casos. A razão entre homens e mulheres no grupo de Casos foi de 6 para 157 (1:26), ou seja, para cada paciente do sexo masculino, havia vinte e seis pacientes do sexo feminino. Esses dados corroboram com a literatura sobre LES, que mostraram prevalências mais altas em mulheres em idade reprodutiva (20-40 anos) (MARGERY-MUIR et al., 2017).

6.2 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO PARA LES

6.2.1 *MTHFR* 677

A região C677T estava em EHW e as frequências alélicas e genotípicas não mostraram diferenças significativas entre Casos e Controles. Apenas uma leve tendência nos resultados de *odds-ratio* do alelo C ser protetivo e do alelo T ser de risco, porém sem ter significância estatística ($p > 0,700$). Diversos estudos apontam para uma relação deste polimorfismo tanto para doenças (especialmente doenças coronarianas e isquêmicas), quanto para altos níveis de homocisteína (GORACY et al., 2009; KIM et al., 2013; KUMAR et al., 2016; SOMARAJAN et al., 2011; VIJAYAN et al., 2016).

6.2.2 *MTHFR* 1298

O primeiro trabalho identificando o polimorfismo A1298C e mostrando a redução da atividade enzimática e o nucleotídeo Adenina (A), como sendo o alelo mais comum (muito embora o primeiro sequenciamento do gene *MTHFR* humano carregasse o nucleotídeo Citosina) foi de WEISBERG et al. (1998). Em 2001 o mesmo autor sugere que o metabolismo da homocisteína não é suficientemente alterado pelo polimorfismo isolado do *locus* 1298, ao contrário do 677 (WEISBERG et al., 2001).

Na região A1298C este estudo apontou para um desequilíbrio na distribuição genotípica segundo EHW, para o grupo de Casos ($p = 0,0013$), para o qual um maior número de ambos os homozigotos e menor número de heterozigotos foi observado em relação ao esperado nas proporções totais de AA: 61 (53,0130), AC: 35 (50,9740) e CC: 20 (12,0130). Os Controles se encontram em EHW.

Nos resultados para essa mutação (A1298C), é possível observar que pacientes com o alelo A possuem 1,618 mais chances de desenvolver a doença. Enquanto que o alelo C mostra-se como protetivo para o grupo caso, esse alelo se apresentou com uma frequência 31% menor nesse grupo (Tabela 10). Casos que possuem o genótipo AA possuem 2 vezes mais chances de desenvolver LES e Casos com o alelo C em seu genótipo (AC ou CC) possuem a metade das chances para isto ($p < 0,02$, Tabela 10).

SALIMI et al., (2017b), demonstram com resultados contrários ao presente estudo, que apontam para uma maior frequência alélica C, bem como os genótipos AC e CC como sendo genótipos de risco, em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, numa população no sudoeste do Irã.

O; ELGERBY e NASSAR (2018) analisaram o impacto do A1298C em pacientes de Artrite Reumatoide e o uso do Metotrexato, concluindo que existe uma associação estatisticamente significativa entre Genótipo de *MTHFR* A1298C e resposta ao fármaco MTX ($p = 0,047$); 50% do pacientes com genótipo AA apresentaram boa resposta clínica, comparado a 25% e 00% com genótipo AC e CC, respectivamente.

KANG et al., (2014) realizaram uma meta-análise em populações asiáticas e europeias para este polimorfismo em Acidente Vascular Cerebral (AVC) isquêmico. Os resultados demonstram que o alelo C é um fator de risco para a doença. Entretanto, não foi encontrada nenhuma associação entre o genótipo A1298C e o risco de AVC isquêmico na população europeia em nenhum modelo de herança.

Neste estudo, algumas limitações estiveram presentes como a dificuldade de genotipagem da região *MTHFR* 1298, especialmente na etapa de eletroforese após a digestão pela enzima, acarretando perda significativa da leitura das amostras podendo interferir nos resultados sendo o tamanho da amostra relativamente pequeno.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo investigou a associação de SNP do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) a genótipos de risco e de proteção para o desenvolvimento da doença LES, através de um estudo caso-controle na população de Santa Catarina, Brasil, tendo-se observado que:

- O processo de genotipagem através da técnica de PCR-RFLP no LAPOGE foi atualizado e otimizado para este trabalho. Outras técnicas como a de sequenciamento da região do DNA e tetra-primer ARMS podem trazer uma maior efetividade dos resultados para estes polimorfismos, especialmente para o 1298, podendo também ser utilizadas.
- Na verificação dos genótipos dos SNP das duas posições polimórficas (C677T e A1298C), obteve-se uma leitura dos genótipos de 96,53% (casos) e 82,16% (controles) para *MTHFR* 677 e 67,05% (casos) e 79,61% (controles) para *MTHFR* 1298.
- Os dados foram analisados para o EHW, o qual mostrou um desequilíbrio para *MTHFR* A1298C ($p = 0,0013$) no grupo de Casos.
- Os dados também foram avaliados para a associação entre os diferentes alelos das duas regiões do gene e seus genótipos e o desenvolvimento de LES, através da Razão das Possibilidades (*Odds ratio*), sendo que para *MTHFR* C677T não apresentou associação. Enquanto que para *MTHFR* A1298C, o genótipo AA apresentou 2 vezes mais chances de desenvolver LES ($p < 0,02$).
- Foi avaliado associação dos polimorfismos do gene com relação às manifestações clínicas presentes ou não em pacientes com LES através de *Odds ratio*, sendo que para a região 1298 houve associação com Fotossensibilidade, onde o alelo A se mostrou associado como fator de risco, e o alelo C como fator de proteção ($p = 0,04$). Em relação à Úlcera Oral, o alelo C se apresentou associado como fator de risco e o alelo A como fator de proteção ($p = 0,03$).

REFERÊNCIAS

- BENEDEK, T. G. William Osler and development of the concept of systemic lupus erythematosus. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 27, n. 1, p. 48–56, 1997.
- BERG, H. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**, 2012.
- BOGDANOS, D. P. et al. Twin studies in autoimmune disease: Genetics, gender and environment. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, n. 2–3, p. J156–J169, 2012.
- BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. Genética humana. In: ARTMED (Ed.). . **Genética humana**. 3d. ed. Porto Alegre: [s.n.]. p. 775.
- BOYLE, E. A.; LI, Y. I.; PRITCHARD, J. K. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1177–1186, 2017a.
- BOYLE, E. A.; LI, Y. I.; PRITCHARD, J. K. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1177–1186, 2017b.
- BRODIN, P.; DAVIS, M. M. Human immune system variation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, p. 21, 5 dez. 2016.
- BUDARF, M. L. et al. A targeted association study in systemic lupus erythematosus identifies multiple susceptibility alleles. **Genes and Immunity**, v. 12, n. 1, p. 51–58, 2011.
- CHEN, B.; SUN, L.; ZHANG, X. Integration of microbiome and epigenome to decipher the pathogenesis of autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 83, p. 31–42, 2017.
- CHUNG, S. A. et al. Genome-wide assessment of differential DNA methylation associated with autoantibody production in systemic lupus erythematosus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015.
- CRUZ, G. I. et al. A Child's HLA-DRB1 genotype increases maternal risk of systemic lupus erythematosus. **Journal of autoimmunity**, v. 74, 2016.
- DAYAL, A. K.; KAMMER, G. M. The T cell enigma in lupus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 1, p. 23–33, 1996.
- FERREIRA BORBA, E. et al. **Consenso de lúpus eritematoso sistêmico**. [s.l: s.n.]. v. 48
- FERREIRA BORBA, E. et al. **Consenso de lúpus eritematoso sistêmico**. [s.l: s.n.]. v. 48
- FISHER, R. A. XV.—The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, v. 52, n. 2, p. 399–433, 1918.
- FRISO, S. et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5606–5611, 2002.
- FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, v. 10, p. 111, 1 maio 1995.
- GAZZALI, A. M. et al. Stability of folic acid under several parameters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 419–430, 2016.
- Genetics Home Reference**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp>>. Acesso em: 10 out. 2018.
- GLADMAN, D. D. **Overview of the clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in adults**. Disponível em: <<https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-clinical-manifestations->

of-systemic-lupus-erythematosus-in-adults>.

GORACY, I. et al. C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of ischemic stroke in Polish subjects. **Journal of Applied Genetics**, v. 50, n. 1, p. 63–67, 2009.

GOYETTE, P. et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nature genetics**, v. 7, n. 2, p. 195–200, jun. 1994.

GOYETTE, P. et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 9, n. 8, p. 652–656, 1998.

GUILLIAMS, T. G. MTHFR, Homocysteine and Nutrient Needs. **Integrative Medicine**, p. 395–403.e2, 2018.

HANLON, P. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, p. R3, 2014.

HE, Z. et al. Alterations of the gut microbiome in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Gut Pathogens**, v. 8, p. 64, 8 dez. 2016.

HEVIA, A. et al. Intestinal Dysbiosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. **mBio**, v. 5, n. 5, 31 out. 2014.

JADEJA, S. D. et al. Association of elevated homocysteine levels and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 1298 A > C polymorphism with Vitiligo susceptibility in Gujarat. **Journal of Dermatological Science**, v. 90, n. 2, p. 112–122, maio 2018.

KAISER, R. et al. Genetic risk factors for thrombosis in systemic lupus erythematosus. **Journal of Rheumatology**, v. 39, n. 8, p. 1603–1610, 2012.

KANG, S. et al. Association of the A1298C polymorphism in MTHFR gene with ischemic stroke. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 198–202, 2014.

KAO, P. Y. P. et al. Pathway analysis of complex diseases for GWAS, extending to consider rare variants, multi-omics and interactions. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 2, p. 335–353, 2017.

KIM, O. J. et al. Gene–environment interactions between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T and metabolic syndrome for the prevalence of ischemic stroke in Koreans. **Neuroscience Letters**, v. 533, p. 11–16, 2013.

KUHN, A.; WENZEL, J.; BIJL, M. Lupus erythematosus revisited. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 1, p. 97–112, 2016.

KUMAR, A. et al. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism and risk of ischemic stroke in North Indian population: A hospital based case–control study. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 17, n. 4, p. 359–365, 2016.

LECLERC, D.; SIBANI, S.; ROZEN, R. Molecular biology of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and overview of mutations/polymorphisms. **Madame Curie Bioscience Database [Internet]**, p. 63–95, 2004.

LEHMANN, P.; HOMEY, B. Clinic and pathophysiology of photosensitivity in lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 6, p. 456–461, 2009.

LIEW, S. C.; GUPTA, E. DAS. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. **European Journal of Medical Genetics**, v. 58, n. 1, p. 1–10, 2015.

LONG, H. et al. The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 74, p. 118–138, 2016.

LÓPEZ, P. et al. Th17 responses and natural IgM antibodies are related to gut microbiota composition in systemic lupus erythematosus patients. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24072, 5 abr. 2016.

MA, J. et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: Association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 8, n. 9, p. 825–829, 1999.

MA, W. T. et al. Development of autoantibodies precedes clinical manifestations of autoimmune diseases: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 83, p. 95–112, 2017.

MAKAR, K. W.; WILSON, C. B. DNA Methylation Is a Nonredundant Repressor of the Th2 Effector Program. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 7, p. 4402–4406, 2004.

MANSON, J. J.; RAHMAN, A. Systemic lupus erythematosus. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 1, p. 6, mar. 2006a.

MANSON, J. J.; RAHMAN, A. Systemic lupus erythematosus. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 1, p. 6, 27 mar. 2006b.

MARCHETTI, C. et al. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. **OncoTargets and Therapy**, p. 1223, jul. 2014.

MARGERIE-MUIR, A. A. et al. Gender balance in patients with systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 3, p. 258–268, 2017.

MILLER, F. W. et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. **Journal of Autoimmunity**, v. 39, n. 4, p. 259–271, 2012.

MITCHELL, H. K.; SNELL, E. E.; WILLIAMS, R. J. THE CONCENTRATION OF “FOLIC ACID”. **Journal of the American Chemical Society**, v. 63, n. 8, p. 2284–2284, ago. 1941.

MOLLOY, A. M. et al. Thermolabile variant of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. **The Lancet**, v. 349, n. 9065, p. 1591–1593, 1997.

NAZKI, F. H.; SAMEER, A. S.; GANAIE, B. A. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. **Gene**, v. 533, n. 1, p. 11–20, 2014.

NUSSBAUM, R.L.; MCINNES, R.R. E WILLARD, H. . **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 7ed. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

O, A. S.; ELGERBY, A.; NASSAR, E, S. Impact of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) A1298C gene polymorphism on the outcome of methotrexate treatment in a sample of Egyptian rheumatoid arthritis patients. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 11, 2018.

PETRI, M. et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2677–2686, 2012.

RICHARDSON, B. et al. Evidence for impaired t cell dna methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 33, n. 11, p. 1665–1673, nov. 1990.

ROZEN, R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: Deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 1, p. 523–526, 1997.

SALIMI, S. et al. Polymorphisms of the folate metabolizing enzymes: Association with SLE

- susceptibility and in silico analysis. **Gene**, v. 637, n. September, p. 161–172, 2017a.
- SALIMI, S. et al. Polymorphisms of the folate metabolizing enzymes: Association with SLE susceptibility and in silico analysis. **Gene**, v. 637, n. July, p. 161–172, 2017b.
- SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular Cloning**. [s.l: s.n.]. v. 1
- SHISHIDO, S. et al. Humoral innate immune response and disease. **Clin Immunol**, v. 144, n. 2, p. 142–158, 2012.
- Short Genetic Variations - NCBI**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>>. Acesso em: 9 nov. 2018.
- SOMARAJAN, B. I. et al. Evaluation of MTHFR C677T polymorphism in ischemic and hemorrhagic stroke patients. A case–control study in a Northern Indian population. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 304, n. 1, p. 67–70, 2011.
- STRACHAN, TOM; READ, A. P. Genética molecular humana. In: **Genética molecular humana**. 4ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 576.
- SUNDER-PLASSMANN, G.; DINGER, M. F. Genetic determinants of the homocysteine level S-141. **Kidney International**, v. 63, n. 84, p. 141–144, 2003.
- TERRUZZI, I. et al. Genetic polymorphisms of the enzymes involved in DNA methylation and synthesis in elite athletes. p. 965–973, 2011a.
- TERRUZZI, I. et al. Genetic polymorphisms of the enzymes involved in DNA methylation and synthesis in elite athletes. **Physiological Genomics**, v. 43, n. 16, p. 965–973, 24 ago. 2011b.
- TERUEL, M.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. The genetic basis of systemic lupus erythematosus: What are the risk factors and what have we learned. **Journal of Autoimmunity**, v. 74, p. 161–175, 2016.
- VAN DER PUT, N. M. et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **American journal of human genetics**, v. 62, n. 5, p. 1044–51, 1998.
- VIJAYAN, M. et al. MTHFR (C677T) CT genotype and CT-apoE3/3 genotypic combination predisposes the risk of ischemic stroke. **Gene**, v. 591, n. 2, p. 465–470, 2016.
- VILAR, M. J. P.; RODRIGUES, J. M.; SATO, E. I. Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN - Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 6, p. 347–351, 2003.
- VORA, A. et al. Thermal stability of folic acid. **Thermochimica Acta**, v. 392–393, p. 209–220, 2002.
- WEISBERG, I. et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 64, n. 3, p. 169–172, 1998.
- WEISBERG, I. S. et al. The 1298A → C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): In vitro expression and association with homocysteine. **Atherosclerosis**, v. 156, n. 2, p. 409–415, 2001.
- WILLS, L. TREATMENT OF “PERNICIOUS ANAEMIA OF PREGNANCY” AND “TROPICAL ANAEMIA”. **British Medical Journal**, v. 1, n. 3676, p. 1059 LP-1064, 20 jun. 1931.
- WILSON, C. B.; MAKAR, K. W.; PÉREZ-MELGOSA, M. Epigenetic Regulation of T Cell Fate and Function. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. s1, p. S37–S45, 2002.
- YI, P.; POGRIBNY, I.; JILL JAMES, S. Multiplex PCR for simultaneous detection of 677 C→T and 1298 A→C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of

cancer risk. **Cancer letters**, v. 181, n. 2, p. 209, 2002a.

YI, P.; POGRIBNY, I. P.; JILL JAMES, S. Multiplex PCR for simultaneous detection of 677 C → T and 1298 A → C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. **Cancer Letters**, v. 181, n. 2, p. 209–213, 2002b.

ZHANG, Y. et al. Impaired DNA methylation and its mechanisms in CD4+T cells of systemic lupus erythematosus. **Journal of Autoimmunity**, v. 41, p. 92–99, 2013.

APÊNDICE A – Genotipagem Total Casos

| Casos | | | | | | | | | |
|----------------|------------|----------|----------|-------------|----------|----------|--------------|-------------|--------------|
| amostra | 677 | 1 | 2 | 1298 | 1 | 2 | Idade | Sexo | Etnia |
| 1 | CC | C | C | CC | C | C | 49 | F | EURO |
| 2 | CC | C | C | AC | A | C | 19 | F | EURO |
| 3 | CT | C | T | ? | ? | ? | 49 | F | EURO |
| 4 | CT | C | T | AA | A | A | 25 | F | EURO |
| 5 | CT | C | T | AA | A | A | 48 | F | AFRO |
| 6 | CT | C | T | AA | A | A | 21 | F | EURO |
| 7 | CT | C | T | ? | ? | ? | 38 | F | EURO |
| 8 | CT | C | T | ? | ? | ? | 32 | F | EURO |
| 9 | CC | C | C | AA | A | A | 44 | F | Ni |
| 11 | CC | C | C | AA | A | A | 40 | F | EURO |
| 12 | CC | C | C | AA | A | A | 50 | F | EURO |
| 13 | CC | C | C | CC | C | C | 23 | F | EURO |
| 14 | CT | C | T | ? | ? | ? | 25 | F | EURO+AFRO |
| 15 | CT | C | T | ? | ? | ? | 53 | F | EURO |
| 16 | CT | C | T | AA | A | A | 44 | F | EURO |
| 17 | CC | C | C | AA | A | A | 19 | F | EURO |
| 19 | CC | C | C | ? | ? | ? | 46 | F | EURO |
| 20 | TT | T | T | ? | ? | ? | 27 | M | EURO |
| 21 | CT | C | T | ? | ? | ? | 46 | F | EURO |
| 23 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 35 | F | Ni |
| 24 | ? | ? | ? | AA | A | A | 31 | F | EURO |
| 26 | CC | C | C | CC | C | C | 46 | F | EURO |
| 27 | CT | C | T | AA | A | A | 48 | F | EURO |
| 31 | TT | T | T | AA | A | A | 23 | F | EURO |
| 32 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 35 | F | EURO |
| 33 | CT | C | T | AA | A | A | 36 | F | EURO |
| 34 | CC | C | C | ? | ? | ? | 42 | F | EURO |
| 35 | CC | C | C | ? | ? | ? | 0 | 0 | 0 |
| 36 | TT | T | T | ? | ? | ? | 36 | F | AFRO |
| 37 | CC | C | C | ? | ? | ? | 39 | F | EURO |
| 38 | CT | C | T | AA | A | A | 49 | F | EURO |
| 39 | CC | C | C | ? | ? | ? | 52 | F | EURO |
| 40 | CT | C | T | AA | A | A | 39 | F | EURO |
| 41 | CC | C | C | CC | C | C | 26 | F | EURO |
| 42 | CC | C | C | ? | ? | ? | 67 | F | AFRO |
| 43 | CC | C | C | CC | C | C | 53 | F | EURO |
| 44 | CC | C | C | ? | ? | ? | 41 | F | AFRO |
| 45 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 37 | F | EURO |
| 46 | TT | T | T | ? | ? | ? | 0 | 0 | 0 |
| 47 | CC | C | C | AA | A | A | 34 | F | AFRO |

| | | | | | | | | | |
|----|----|---|---|----|---|---|----|---|--------------------|
| 48 | CC | C | C | CC | C | C | 51 | F | EURO |
| 49 | CC | C | C | ? | ? | ? | 47 | F | EURO |
| 50 | CT | C | T | ? | ? | ? | 44 | F | EURO |
| 51 | CT | C | T | ? | ? | ? | 21 | F | EURO |
| 52 | CT | C | T | ? | ? | ? | 0 | 0 | 0 |
| 53 | CT | C | T | ? | ? | ? | 39 | F | EURO |
| 54 | CT | C | T | ? | ? | ? | 0 | 0 | 0 |
| 55 | CT | C | T | AA | A | A | 0 | 0 | 0 |
| 56 | TT | T | T | ? | ? | ? | 24 | M | EURO |
| 58 | CT | C | T | AA | A | A | 0 | 0 | 0 |
| 60 | CT | C | T | AA | A | A | 33 | F | EURO |
| 61 | CT | C | T | ? | ? | ? | 52 | M | EURO |
| 62 | CT | C | T | AA | A | A | 52 | F | EURO |
| 63 | TT | T | T | ? | ? | ? | 42 | F | EURO |
| 64 | CT | C | T | AC | A | C | 39 | F | EURO |
| 65 | CC | C | C | ? | ? | ? | 37 | F | EURO |
| 66 | CC | C | C | CC | C | C | 16 | F | EURO |
| 67 | CC | C | C | ? | ? | ? | 0 | 0 | 0 |
| 68 | CC | C | C | ? | ? | ? | 20 | F | EURO |
| 69 | CT | C | T | ? | ? | ? | 23 | F | EURO |
| 70 | CT | C | T | ? | ? | ? | 28 | F | EURO |
| 71 | CC | C | C | AA | A | A | 32 | F | EURO |
| 72 | CT | C | T | ? | ? | ? | 24 | F | EURO |
| 73 | CT | C | T | AC | A | C | 40 | F | INDÍGENA+/0 |
| 74 | TT | T | T | ? | ? | ? | 19 | F | INDÍGENA/AFRO |
| 75 | CC | C | C | ? | ? | ? | 0 | 0 | 0 |
| 76 | TT | T | T | AA | A | A | 36 | F | EURO+AFRO/INDÍGENA |
| 77 | CC | C | C | CC | C | C | 45 | F | EURO |
| 78 | CC | C | C | ? | ? | ? | 20 | F | EURO |
| 79 | CC | C | C | AC | A | C | 38 | F | Ni |
| 80 | CT | C | T | ? | ? | ? | 0 | 0 | 0 |
| 81 | TT | T | T | AA | A | A | 16 | F | EURO |
| 82 | CT | C | T | ? | ? | ? | 44 | F | EURO |
| 84 | CT | C | T | ? | ? | ? | 44 | F | EURO |
| 85 | CT | C | T | AA | A | A | 34 | F | EURO |
| 86 | CT | C | T | ? | ? | ? | 0 | 0 | 0 |
| 87 | CC | C | C | ? | ? | ? | 22 | F | AFRO |
| 88 | CC | C | C | ? | ? | ? | 38 | F | EURO+AFRO |
| 89 | CT | C | T | ? | ? | ? | 23 | F | EURO |
| 90 | CC | C | C | ? | ? | ? | 21 | F | AFRO |
| 91 | CC | C | C | AA | A | A | 51 | F | EURO |
| 92 | CC | C | C | AC | A | C | 55 | F | EURO |
| 93 | CC | C | C | AA | A | A | 45 | F | EURO+AFRO |
| 94 | CT | C | T | ? | ? | ? | 50 | F | EURO |
| 95 | CT | C | T | AC | A | C | 42 | M | EURO |
| 96 | CC | C | C | ? | ? | ? | 19 | F | EURO |

| | | | | | | | | | |
|-----|----|---|---|----|---|---|----|---|-----------|
| 97 | CT | C | T | ? | ? | ? | 41 | F | EURO |
| 98 | CT | C | T | ? | ? | ? | 41 | F | AFRO |
| 101 | ? | ? | ? | CC | C | C | 27 | F | EURO |
| 102 | ? | ? | ? | AC | A | C | 32 | F | EURO |
| 103 | CC | C | C | AC | A | C | 29 | F | AFRO |
| 104 | CC | C | C | AC | A | C | 32 | F | EURO |
| 105 | CC | C | C | AC | A | C | 18 | F | EURO |
| 106 | CT | C | T | AA | A | A | 46 | F | AFRO |
| 107 | CT | C | T | AC | A | C | 34 | F | EURO |
| 108 | CT | C | T | AA | A | A | 30 | F | EURO |
| 109 | CT | C | T | AA | A | A | 56 | F | EURO |
| 110 | CC | C | C | AC | A | C | 23 | F | EURO |
| 113 | CT | C | T | CC | C | C | 31 | F | EURO |
| 115 | CT | C | T | AC | A | C | 61 | F | EURO |
| 116 | CT | C | T | AC | A | C | 53 | F | EURO |
| 118 | CT | C | T | AC | A | C | 39 | F | EURO |
| 119 | CT | C | T | AA | A | A | 57 | F | AFRO |
| 120 | CT | C | T | AA | A | A | 15 | F | EURO |
| 121 | CC | C | C | AA | A | A | 61 | F | EURO |
| 122 | CC | C | C | AC | A | C | 53 | F | EURO+AFRO |
| 123 | CT | C | T | AC | A | C | 55 | F | EURO |
| 126 | CT | C | T | AC | A | C | 34 | F | EURO |
| 127 | CT | C | T | AA | A | A | 41 | F | Ni |
| 128 | CC | C | C | AC | A | C | 37 | F | EURO |
| 129 | CC | C | C | AA | A | A | 23 | F | Ni |
| 130 | CC | C | C | AC | A | C | 38 | F | EURO |
| 131 | CT | C | T | ? | ? | ? | 51 | F | EURO |
| 132 | CT | C | T | AC | A | C | 20 | F | EURO+AFRO |
| 133 | CT | C | T | ? | ? | ? | 31 | F | EURO+AFRO |
| 134 | CT | C | T | AA | A | A | 37 | F | EURO+AFRO |
| 135 | CC | C | C | AA | A | A | 49 | F | AFRO |
| 136 | CT | C | T | AC | A | C | 60 | F | EURO |
| 137 | CT | C | T | AA | A | A | 49 | M | EURO |
| 138 | CT | C | T | CC | C | C | 34 | F | EURO |
| 140 | CC | C | C | AA | A | A | 45 | F | AFRO |
| 141 | CC | C | C | AC | A | C | 15 | F | EURO |
| 142 | TT | T | T | AA | A | A | 31 | F | EURO+AFRO |
| 143 | CT | C | T | AA | A | A | 24 | F | EURO |
| 144 | CT | C | T | AA | A | A | 44 | F | EURO+AFRO |
| 145 | CT | C | T | AA | A | A | 55 | F | Ni |
| 146 | CT | C | T | AA | A | A | 42 | F | EURO+AFRO |
| 147 | CC | C | C | AC | A | C | 45 | F | EURO+AFRO |
| 148 | CT | C | T | AC | A | C | 40 | F | EURO |
| 149 | CC | C | C | AA | A | A | 38 | F | EURO |
| 150 | CT | C | T | AC | A | C | 36 | F | Ni |
| 151 | CC | C | C | ? | ? | ? | 38 | F | Ni |

| | | | | | | | | | |
|-----|----|---|---|----|---|---|----|---|-----------|
| 152 | CT | C | T | AC | A | C | 32 | M | Ni |
| 153 | CC | C | C | CC | C | C | 68 | F | Ni |
| 154 | CC | C | C | CC | C | C | 37 | F | Ni |
| 155 | CC | C | C | AA | A | A | 23 | F | AFRO |
| 156 | TT | T | T | AA | A | A | 63 | F | EURO |
| 157 | CC | C | C | AC | A | C | 23 | F | INDÍGENA |
| 158 | CT | C | T | AA | A | A | 36 | F | EURO |
| 159 | CC | C | C | AA | A | A | 37 | F | AFRO |
| 160 | TT | T | T | AA | A | A | 19 | F | EURO |
| 161 | CC | C | C | CC | C | C | 40 | F | EURO |
| 162 | CT | C | T | AA | A | A | 40 | F | Ni |
| 163 | CC | C | C | CC | C | C | 33 | F | EURO |
| 164 | CC | C | C | AA | A | A | 40 | F | EURO+AFRO |
| 165 | CC | C | C | AC | A | C | 54 | F | EURO+AFRO |
| 166 | CC | C | C | CC | C | C | 40 | F | EURO |
| 167 | CT | C | T | AA | A | A | 53 | F | EURO+AFRO |
| 168 | TT | T | T | AA | A | A | 32 | F | EURO |
| 169 | TT | T | T | AC | A | C | 21 | F | EURO |
| 171 | CT | C | T | AA | A | A | 39 | F | EURO+AFRO |
| 172 | TT | T | T | AC | A | C | 25 | F | EURO |
| 173 | CC | C | C | AA | A | A | 42 | F | EURO+AFRO |
| 174 | TT | T | T | AA | A | A | 36 | F | EURO+AFRO |
| 175 | TT | T | T | ? | ? | ? | 38 | F | EURO |
| 176 | CC | C | C | AC | A | C | 12 | F | EURO |
| 177 | CC | C | C | AA | A | A | 49 | F | EURO |
| 178 | CC | C | C | CC | C | C | 27 | F | |
| 179 | TT | T | T | ? | ? | ? | 33 | F | |
| 180 | TT | T | T | ? | ? | ? | 54 | F | |
| 181 | CC | C | C | AC | A | C | 42 | F | |
| 182 | CC | C | C | ? | ? | ? | 27 | F | |
| 183 | CC | C | C | CC | C | C | 43 | F | |
| 184 | CC | C | C | AA | A | A | 42 | F | |
| 185 | CC | C | C | CC | C | C | 46 | F | |
| 186 | CT | C | T | AC | A | C | 28 | F | |
| 187 | CC | C | C | AA | A | A | 40 | F | |
| 188 | CC | C | C | CC | C | C | 28 | F | |
| 189 | TT | T | T | AA | A | A | 21 | F | |
| 190 | CT | C | T | ? | ? | ? | 32 | F | |
| 191 | CT | C | T | AC | A | C | 46 | F | |
| 193 | CC | C | C | AA | A | A | 40 | F | |
| 194 | TT | T | T | AA | A | A | 56 | F | |

APÊNDICE B – Genotipagem Total Controles

| Controle | | | | | | | | | |
|-----------------|------------|----------|----------|-------------|----------|----------|--------------|-------------|--------------|
| amostra | 677 | 1 | 2 | 1298 | 1 | 2 | Idade | Sexo | Etnia |
| 12 | CT | C | T | ? | ? | ? | 31 | M | EURO |
| 21 | CT | C | T | AC | A | C | 43 | F | EURO |
| 24 | CT | C | T | AC | A | C | 20 | F | EURO |
| 29 | CC | C | C | AA | A | A | 43 | F | EURO |
| 32 | CC | C | C | AC | A | C | 22 | F | EURO |
| 39 | CT | C | T | AA | A | A | 56 | F | AFRO |
| 40 | CT | C | T | ? | ? | ? | 26 | F | AFRO |
| 58 | ? | ? | ? | AA | A | A | 54 | F | EURO |
| 62 | ? | ? | ? | AA | A | A | 49 | F | AFRO |
| 71 | CT | C | T | AA | A | A | 42 | F | EURO |
| 75 | TT | T | T | AA | A | A | 72 | F | EURO |
| 97 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 50 | F | EURO |
| 101 | CC | C | C | ? | ? | ? | 64 | F | AFRO |
| 102 | CC | C | C | ? | ? | ? | 52 | F | EURO |
| 120 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 53 | F | EURO |
| 121 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 53 | F | EURO |
| 122 | TT | T | T | AC | A | C | 37 | F | EURO |
| 123 | ? | ? | ? | AC | A | C | 42 | F | EURO |
| 124 | CT | C | T | AC | A | C | 45 | M | EURO |
| 125 | CT | C | T | AC | A | C | 45 | F | EURO |
| 129 | CT | C | T | AC | A | C | 26 | F | EURO |
| 131 | CT | C | T | CC | C | C | 66 | F | AFRO |
| 135 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 57 | F | EURO |
| 139 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 60 | F | EURO |
| 143 | ? | ? | ? | CC | C | C | 55 | F | EURO |
| 144 | CT | C | T | AC | A | C | 52 | F | EURO |
| 145 | CT | C | T | AC | A | C | 48 | F | EURO |
| 146 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 43 | F | EURO |
| 147 | CT | C | T | AC | A | C | 25 | F | EURO |
| 148 | CC | C | C | CC | C | C | 36 | F | AFRO |
| 151 | CC | C | C | AC | A | C | 47 | F | AFRO |
| 156 | CT | C | T | AA | A | A | 51 | F | EURO |
| 161 | CT | C | T | CC | C | C | 44 | F | EURO |
| 165 | CT | C | T | AC | A | C | 56 | F | EURO |
| 167 | TT | T | T | AA | A | A | 66 | F | EURO |
| 175 | CC | C | C | AA | A | A | 56 | F | EURO |
| 177 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 59 | M | EURO |
| 180 | CT | C | T | CC | C | C | 55 | F | EURO |
| 182 | CC | C | C | AC | A | C | 56 | F | AFRO |

| | | | | | | | | | |
|-----|----|---|---|----|---|---|----|---|-------------------------|
| 183 | TT | T | T | AA | A | A | 48 | F | EURO |
| 184 | CC | C | C | AC | A | C | 42 | M | EURO |
| 197 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 56 | F | EURO |
| 200 | CC | C | C | CC | C | C | 21 | F | EURO |
| 201 | CC | C | C | CC | C | C | 23 | F | EURO |
| 203 | ? | ? | ? | CC | C | C | 22 | F | EURO |
| 205 | CC | C | C | AC | A | C | 22 | F | EURO |
| 206 | CC | C | C | AC | A | C | 28 | M | EURO |
| 213 | CC | C | C | AC | A | C | 60 | F | EURO |
| 217 | TT | T | T | ? | ? | ? | 41 | F | EURO |
| 221 | CT | C | T | AA | A | A | 24 | M | EURO, AFRO, INDÍGENA |
| 222 | CC | C | C | AC | A | C | 34 | F | EURO |
| 223 | CT | C | T | CC | C | C | 24 | F | EURO |
| 226 | CC | C | C | CC | C | C | 52 | F | EURO |
| 228 | CT | C | T | AC | A | C | 32 | F | Ni |
| 233 | CC | C | C | AA | A | A | 22 | F | Ni |
| 236 | CT | C | T | AC | A | C | 47 | M | Ni |
| 239 | TT | T | T | AC | A | C | 52 | F | Ni |
| 243 | CT | C | T | CC | C | C | 42 | F | EURO |
| 244 | CT | C | T | AC | A | C | 32 | F | EURO |
| 245 | ? | ? | ? | CC | C | C | 31 | F | EURO |
| 247 | CT | C | T | AA | A | A | 42 | F | EURO |
| 249 | TT | T | T | AA | A | A | 50 | F | EURO |
| 251 | ? | ? | ? | AC | A | C | 40 | F | AFRO |
| 252 | CC | C | C | CC | C | C | 46 | M | AFRO |
| 254 | CC | C | C | ? | ? | ? | 45 | F | EURO |
| 255 | CT | C | T | AA | A | A | 47 | F | INDÍGENA |
| 257 | TT | T | T | AA | A | A | 43 | F | EURO |
| 259 | CT | C | T | AA | A | A | 35 | F | AFRO |
| 260 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 38 | F | EURO |
| 261 | CC | C | C | CC | C | C | 30 | F | EURO |
| 263 | CC | C | C | AC | A | C | 44 | F | EURO |
| 267 | TT | T | T | AA | A | A | 47 | F | EURO |
| 268 | CT | C | T | AA | A | A | 47 | F | EURO |
| 270 | CT | C | T | AC | A | C | 38 | F | EURO |
| 275 | TT | T | T | AA | A | A | 36 | F | AFRO |
| 276 | CT | C | T | AC | A | C | 51 | F | EURO |
| 283 | CC | C | C | AC | A | C | 45 | F | EURO |
| 285 | CC | C | C | AC | A | C | 49 | F | EURO |
| 288 | CT | C | T | AA | A | A | 47 | F | EURO |
| 292 | CC | C | C | ? | ? | ? | 52 | F | EURO |
| 295 | CT | C | T | AA | A | A | 24 | F | EURO |
| 296 | CC | C | C | CC | C | C | 47 | F | EURO |
| 300 | CC | C | C | CC | C | C | 46 | M | EURO |
| 306 | CC | C | C | ? | ? | ? | 48 | F | EURO |

| | | | | | | | | | |
|-----|----|---|---|----|---|---|----|---|---------------|
| 308 | CC | C | C | AA | A | A | 36 | F | AFRO |
| 311 | CC | C | C | AC | A | C | 29 | F | INDÍGENA |
| 312 | CT | C | T | AC | A | C | 48 | F | EURO |
| 313 | CC | C | C | AA | A | A | 43 | F | AFRO |
| 316 | CT | C | T | AA | A | A | 25 | F | EURO |
| 318 | CC | C | C | AA | A | A | 33 | F | EURO,INDÍGENA |
| 321 | CC | C | C | AC | A | C | 29 | F | EURO |
| 324 | CT | C | T | AC | A | C | 48 | F | EURO |
| 325 | CT | C | T | CC | C | C | 23 | F | EURO |
| 328 | CT | C | T | AC | A | C | 32 | M | EURO |
| 335 | CT | C | T | ? | ? | ? | 21 | M | AFRO |
| 342 | CC | C | C | AC | A | C | 23 | M | AFRO |
| 343 | CC | C | C | CC | C | C | 17 | F | EURO |
| 346 | CC | C | C | AC | A | C | 17 | F | Ni |
| 348 | CC | C | C | ? | ? | ? | 21 | M | Ni |
| 352 | CC | C | C | ? | ? | ? | 43 | F | Ni |
| 353 | TT | T | T | AC | A | C | 17 | F | Ni |
| 357 | CT | C | T | AA | A | A | 47 | F | EURO |
| 365 | CC | C | C | CC | C | C | 33 | M | INDÍGENA |
| 367 | CT | C | T | AA | A | A | 20 | F | EURO |
| 370 | CC | C | C | AA | A | A | 18 | M | AFRO |
| 372 | CT | C | T | ? | ? | ? | 31 | F | EURO |
| 373 | CT | C | T | AC | A | C | 53 | F | EURO |
| 377 | CT | C | T | AC | A | C | 66 | F | Ni |
| 378 | CC | C | C | AA | A | A | 1 | F | EURO |
| 380 | CC | C | C | CC | C | C | 20 | F | Ni |
| 381 | CT | C | T | AC | A | C | 45 | F | EURO |
| 383 | CC | C | C | CC | C | C | 21 | F | EURO |
| 384 | ? | ? | ? | AA | A | A | 51 | F | AFRO |
| 386 | CC | C | C | AC | A | C | 15 | M | EURO |
| 388 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 50 | F | EURO |
| 389 | CT | C | T | ? | ? | ? | 45 | F | AFRO |
| 391 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 45 | M | EURO |
| 392 | ? | ? | ? | AC | A | C | 27 | F | EURO |
| 393 | CC | C | C | AA | A | A | 42 | F | EURO |
| 394 | TT | T | T | AC | A | C | 47 | F | EURO |
| 397 | CT | C | T | CC | C | C | 20 | F | EURO,INDÍGENA |
| 398 | CT | C | T | AA | A | A | 21 | F | EURO |
| 402 | CT | C | T | AC | A | C | 59 | F | EURO |
| 408 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 23 | F | EURO |
| 411 | CT | C | T | AA | A | A | 52 | F | EURO |
| 413 | TT | T | T | AA | A | A | 60 | F | EURO |
| 415 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 26 | M | EURO |
| 422 | CC | C | C | CC | C | C | 27 | F | Ni |
| 427 | CT | C | T | AA | A | A | 44 | F | Ni |
| 428 | CC | C | C | AA | A | A | 36 | F | Ni |

| | | | | | | | | | |
|----------------|----|---|---|----|---|---|----|---|----------|
| 434 | TT | T | T | CC | C | C | 37 | F | Ni |
| 435 | CC | C | C | AC | A | C | 18 | F | Ni |
| 436 | CT | C | T | AA | A | A | 51 | F | Ni |
| 437 | CT | C | T | AA | A | A | 21 | F | Ni |
| 439 | CT | C | T | AC | A | C | 32 | M | Ni |
| 441 | CC | C | C | AA | A | A | 49 | F | EURO |
| 446 | CT | C | T | AC | A | C | 24 | F | EURO |
| 450 | CT | C | T | AC | A | C | 29 | F | EURO |
| 452 | CC | C | C | AC | A | C | 48 | F | EURO |
| 453 | CC | C | C | AA | A | A | 21 | M | AFRO |
| 459 | CC | C | C | AC | A | C | 56 | F | EURO |
| 460 | CC | C | C | CC | C | C | 37 | F | INDÍGENA |
| 463 | CT | C | T | AC | A | C | 23 | F | EURO |
| PSC0039 | ? | ? | ? | CC | C | C | 35 | F | EURO |
| PSC0071 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 35 | F | EURO |
| PSC0090 | CC | C | C | AC | A | C | 25 | F | AFRO |
| PSC0139 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 35 | F | EURO |
| PSC2013 | CT | C | T | CC | C | C | 25 | F | AFRO |
| PSC2075 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 35 | F | EURO |
| PSC2092 | CT | C | T | AA | A | A | 35 | F | EURO |
| PSC2097 | CC | C | C | AC | A | C | 35 | F | AFRO |
| PSC2106 | CC | C | C | CC | C | C | 25 | F | AFRO |
| PSC2121 | CC | C | C | AA | A | A | 25 | F | AFRO |
| PSC6050 | CC | C | C | AA | A | A | 25 | F | AFRO |
| PSC6161 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 35 | F | EURO |
| PSC6184 | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 35 | F | EURO |
| PSC7021 | CT | C | T | ? | ? | ? | 25 | F | AFRO |

APÊNDICE C – Odds ratio dados clínicos

| RESULTADOS CLÍNICOS | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|--------------------------|------------|-------|-------|-------|
| | | <i>MTHFR</i> | <u>Anemia</u> | <u>Sem anemia</u> | odds ratio | IC | | p |
| MTHFR 677 | <u>Alelos</u> | <i>C</i> | 66 | 125 | 0,805 | 0,475 | 1,366 | 0,468 |
| | | <i>T</i> | 40 | 61 | 1,242 | 0,732 | 2,106 | 0,468 |
| | | <u>Total alelos</u> | 106 | 186 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | <i>CC</i> | 23 | 41 | 0,972 | 0,465 | 2,029 | 1,000 |
| | | <i>CT</i> | 20 | 43 | 0,705 | 0,334 | 1,483 | 0,410 |
| | | <i>TT</i> | 10 | 9 | 2,171 | 0,744 | 6,364 | 0,183 |
| <u>Total indivíduos</u> | | 53 | 93 | | | | | |
| MTHFR 1298 | <u>Alelos</u> | <i>A</i> | 51 | 86 | 1,238 | 0,647 | 2,374 | 0,590 |
| | | <i>C</i> | 23 | 48 | 0,808 | 0,421 | 1,545 | 0,590 |
| | | <u>Total alelos</u> | 74 | 134 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | <i>AA</i> | 20 | 31 | 1,366 | 0,566 | 3,309 | 0,578 |
| | | <i>AC</i> | 11 | 24 | 0,758 | 0,292 | 1,951 | 0,679 |
| | | <i>CC</i> | 6 | 12 | 0,887 | 0,265 | 2,889 | 1,000 |
| <u>Total indivíduos</u> | | 37 | 67 | | | | | |
| MTHFR 677 | | <i>MTHFR</i> | <u>Eritema Malar</u> | <u>Sem Eritema Malar</u> | odds ratio | IC | | p |
| | <u>Alelos</u> | <i>C</i> | 107 | 84 | 1,065 | 0,637 | 1,780 | 0,895 |
| | | <i>T</i> | 55 | 46 | 0,939 | 0,562 | 1,589 | 0,895 |

| | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------|-----------|----------|--------------|
| MTHFR 1298 | <u>Indivíduos</u> | <u>Total alelos</u> | 162 | 130 | | | | |
| | | CC | 37 | 27 | 1,184 | 0,581 | 2,415 | 0,739 |
| | | CT | 33 | 30 | 0,802 | 0,393 | 1,635 | 0,625 |
| | | TT | 11 | 8 | 1,120 | 0,384 | 3,301 | 1,000 |
| | <u>Alelos</u> | <u>Total indivíduos</u> | 81 | 65 | | | | |
| | | A | 79 | 58 | 0,887 | 0,474 | 1,657 | 0,799 |
| | | C | 43 | 28 | 1,127 | 0,604 | 2,110 | 0,799 |
| | <u>Indivíduos</u> | <u>Total alelos</u> | 122 | 86 | | | | |
| | | AA | 29 | 22 | 0,865 | 0,368 | 2,033 | 0,870 |
| | | AC | 21 | 14 | 1,087 | 0,439 | 2,704 | 1,000 |
| CC | | 11 | 7 | 1,131 | 0,360 | 3,622 | 1,000 | |
| <u>Total indivíduos</u> | | 61 | 43 | | | | | |
| MTHFR 677 | | <u>MTHFR</u> | <u>Fotossensibilidade</u> | <u>Sem fotossensibilidade</u> | <u>odds ratio</u> | <u>IC</u> | <u>p</u> | |
| | <u>Alelos</u> | C | 117 | 74 | 0,733 | 0,426 | 1,259 | 0,287 |
| | | T | 69 | 32 | 1,364 | 0,794 | 2,347 | 0,287 |
| | <u>Indivíduos</u> | <u>Total alelos</u> | 186 | 106 | | | | |
| | | CC | 36 | 28 | 0,564 | 0,269 | 1,179 | 0,139 |
| | | CT | 45 | 18 | 1,823 | 0,857 | 3,899 | 0,129 |
| TT | | 12 | 7 | 0,974 | 0,326 | 2,968 | 1,000 | |
| | <u>Total indivíduos</u> | 93 | 53 | | | | | |
| MTHFR 1298 | <u>Alelos</u> | A | 98 | 39 | 1,947 | 1,026 | 3,701 | 0,041 |
| | | C | 40 | 31 | 0,513 | 0,270 | 0,975 | 0,041 |
| | | <u>Total alelos</u> | 138 | 70 | | | | |

| | | | | | | | | |
|------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| | <u>Indivíduos</u> | AA | 39 | 12 | 2,492 | 0,990 | 6,342 | 0,052 |
| | | AC | 20 | 15 | 0,544 | 0,214 | 1,381 | 0,232 |
| | | CC | 10 | 8 | 0,572 | 0,181 | 1,813 | 0,429 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 69 | 35 | | | | |
| | | MTHFR | <u>Serosite</u> | <u>Sem serosite</u> | odds ratio | IC | | p |
| MTHFR 677 | <u>Alelos</u> | C | 41 | 150 | 0,617 | 0,345 | 1,105 | 0,110 |
| | | T | 31 | 70 | 1,620 | 0,905 | 2,898 | 0,110 |
| | | <u>Total alelos</u> | 72 | 220 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | CC | 11 | 53 | 0,473 | 0,196 | 1,127 | 0,097 |
| | | CT | 19 | 44 | 1,676 | 0,736 | 3,828 | 0,251 |
| | | TT | 6 | 13 | 1,492 | 0,458 | 4,711 | 0,641 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 36 | 110 | | | | |
| MTHFR 1298 | <u>Alelos</u> | A | 33 | 104 | 1,185 | 0,564 | 2,508 | 0,759 |
| | | C | 15 | 56 | 0,844 | 0,399 | 1,773 | 0,759 |
| | | <u>Total alelos</u> | 48 | 160 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | AA | 14 | 37 | 1,627 | 0,590 | 4,526 | 0,420 |
| | | AC | 5 | 30 | 0,439 | 0,128 | 1,424 | 0,205 |
| | | CC | 5 | 13 | 1,356 | 0,366 | 4,818 | 0,832 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 24 | 80 | | | | |
| MTHFR 677 | | MTHFR | <u>Úlcera oral</u> | <u>Sem úlcera e oral</u> | odds ratio | IC | | p |
| | <u>Alelos</u> | C | 88 | 103 | 1,200 | 0,716 | 2,013 | 0,541 |

| | | | | | | | | |
|--|--------------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| | | <i>T</i> | 42 | 59 | 0,833 | 0,497 | 1,396 | 0,541 |
| | | <u>Total alelos</u> | 130 | 162 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | <i>CC</i> | 33 | 31 | 1,663 | 0,815 | 3,404 | 0,179 |
| | | <i>CT</i> | 22 | 41 | 0,499 | 0,240 | 1,032 | 0,062 |
| | | <i>TT</i> | 10 | 9 | 1,455 | 0,503 | 4,228 | 0,606 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 65 | 81 | | | | |
| | <u>Alelos</u> | <i>A</i> | 52 | 85 | 0,514 | 0,283 | 0,932 | 0,027 |
| | | <i>C</i> | 44 | 37 | 1,944 | 1,073 | 3,528 | 0,027 |
| | | <u>Total alelos</u> | 96 | 122 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | <i>AA</i> | 20 | 31 | 0,587 | 0,259 | 1,325 | 0,226 |
| | | <i>AC</i> | 12 | 23 | 0,640 | 0,252 | 1,609 | 0,406 |
| | | <i>CC</i> | 11 | 7 | 2,652 | 0,840 | 8,551 | 0,107 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 43 | 61 | | | | |
| | | <i>MTHFR</i> | <u>Artrite</u> | <u>Sem artrite</u> | odds ratio | IC | | p |
| | <u>Alelos</u> | <i>C</i> | 143 | 48 | 1,033 | 0,572 | 1,860 | 1,000 |
| | | <i>T</i> | 75 | 26 | 0,968 | 0,538 | 1,748 | 1,000 |
| | | <u>Total alelos</u> | 218 | 74 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | <i>CC</i> | 49 | 15 | 1,198 | 0,527 | 2,735 | 0,783 |
| | | <i>CT</i> | 45 | 18 | 0,742 | 0,329 | 1,676 | 0,555 |
| | | <i>TT</i> | 15 | 4 | 1,316 | 0,371 | 5,083 | 0,859 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 109 | 37 | | | | |
| | <u>Alelos</u> | <i>A</i> | 108 | 29 | 0,998 | 0,466 | 2,122 | 1,000 |
| | | <i>C</i> | 56 | 15 | 1,002 | 0,471 | 2,147 | 1,000 |

MTHFR 1298

MTHFR 677

R 1298
MTHF

| | | | | | | | | |
|--|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------|-----------|----------|-------|
| | | <u>Total alelos</u> | 164 | 44 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | AA | 40 | 11 | 0,952 | 0,337 | 2,693 | 1,000 |
| | | AC | 28 | 7 | 1,111 | 0,368 | 3,430 | 1,000 |
| | | CC | 14 | 4 | 0,926 | 0,242 | 3,811 | 1,000 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 82 | 22 | | | | |
| | | <u>MTHFR</u> | <u>Nefrite</u> | <u>Sem nefrite</u> | odds ratio | IC | p | |
| | <u>Alelos</u> | <i>C</i> | 77 | 114 | 0,911 | 0,543 | 1,530 | 0,804 |
| | | <i>T</i> | 43 | 58 | 1,098 | 0,653 | 1,843 | 0,804 |
| | | <u>Total alelos</u> | 120 | 172 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | CC | 24 | 40 | 0,767 | 0,372 | 1,577 | 0,541 |
| | | CT | 29 | 34 | 1,431 | 0,697 | 2,941 | 0,376 |
| | | TT | 7 | 12 | 0,814 | 0,268 | 2,419 | 0,878 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 60 | 86 | | | | |
| | <u>Alelos</u> | A | 56 | 81 | 0,945 | 0,507 | 1,761 | 0,966 |
| | | C | 30 | 41 | 1,058 | 0,568 | 1,971 | 0,966 |
| | | <u>Total alelos</u> | 86 | 122 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | AA | 21 | 30 | 0,986 | 0,420 | 2,318 | 1,000 |
| | | AC | 14 | 21 | 0,920 | 0,370 | 2,278 | 1,000 |
| | | CC | 8 | 10 | 1,166 | 0,373 | 3,620 | 1,000 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 43 | 61 | | | | |
| | | <u>MTHFR</u> | <u>Neurologico</u> | <u>Sem neurologico</u> | odds ratio | IC | p | |
| | <u>0 //</u> | | | | | | | |
| | <u>HFR</u> | | | | | | | |
| | <u>MT</u> | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------|------------|-------|-------|-------|-------|
| MTHFR 1298 | <u>Alelos</u> | <i>C</i> | 63 | 128 | 1,669 | 0,927 | 3,020 | 0,091 |
| | | <i>T</i> | 23 | 78 | 0,599 | 0,331 | 1,079 | 0,091 |
| | | <u>Total alelos</u> | 86 | 206 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | <i>CC</i> | 22 | 42 | 1,522 | 0,701 | 3,301 | 0,332 |
| | | <i>CT</i> | 19 | 44 | 1,062 | 0,487 | 2,311 | 1,000 |
| | | <i>TT</i> | 2 | 17 | 0,247 | 0,037 | 1,194 | 0,094 |
| | | <u>Total indivíduos</u> | 43 | 103 | | | | |
| | <u>Alelos</u> | <i>A</i> | 45 | 92 | 1,021 | 0,530 | 1,971 | 1,000 |
| | | <i>C</i> | 23 | 48 | 0,980 | 0,507 | 1,886 | 1,000 |
| | | <u>Total alelos</u> | 68 | 140 | | | | |
| | <u>Indivíduos</u> | <i>AA</i> | 17 | 34 | 1,059 | 0,431 | 2,603 | 1,000 |
| | | <i>AC</i> | 11 | 24 | 0,917 | 0,350 | 2,383 | 1,000 |
| | | <i>CC</i> | 6 | 12 | 1,036 | 0,307 | 3,394 | 1,000 |
| | <u>Total indivíduos</u> | 34 | 70 | | | | | |

ANEXO A

Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico

NOME: _____ PRONTUÁRIO/HU: _____

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

Procedência: _____ Natural de: _____

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

Telefone: _____ Data de nascimento: __/__/____

DATA: __/__/____ LUP: _____

Médico: _____

Entrevistador: _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____ Profissão: _____

Descendência: Materna _____ Paterna _____

NOME da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____ Profissão: _____

Descendência: Materna _____ Paterna _____

TEMPO de doença diagnosticada: _____

História Familiar: Lúpus: ()S ()N Parentesco: _____

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

Manifestações Iniciais: () Febre () Alopecia

() Fenômeno de Raynaud () Eritema Malar

() Eritema Discóide () Fadiga

() Artrite () Fotossensibilidade

() Úlcera oral ou nasal () Serosite

() Distúrbio Renal () Distúrbio Neurológico

() Distúrbio Hematológico () Hipertensão Arterial

() Vasculite () Outras. Quais? _____

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

Manifestações Associadas: ()S ()N Quais? _____

Sobreposição com alguma () Esclerodermia

outra doença reumatológica: () Sjögren

- () Dermatomiosite
 () Síndrome do anticorpo fosfolipídeo (SAF)
 () Fibromialgia
 () Outras Quais? _____

OBServações: diabetes? Depressão?

-
- SINTomatologia REcente:** () Febre () Alopecia
 (últimos 10 dias) () Fenômeno de Raynaud () Eritema Malar
 () Eritema Discóide () Fadiga
 () Artrite () Fotossensibilidade
 () Úlcera oral ou nasal () Serosite
 () Distúrbio Renal () Distúrbio Neurológico
 () Distúrbio Hematológico () Hipertensão Arterial
 () Vasculite () Outras. Quais? _____

.....

Tratamento Atual:

- Corticosteróides:** () S () N Qual? _____
 Dose? _____ Freqüência? _____
- Azatioprina:** () S () N Dose? _____ Freqüência? _____
- Antimalárico:** () S () N Qual? _____
 Dose? _____ Freqüência? _____
- Mrtotrexato:** () S () N Dose? _____ Freqüência? _____
- Ciclosporina:** () S () N Dose? _____ Freqüência? _____
- Ciclosfosfamida:** () S () N Dose? _____ Freqüência? _____
- AINE:** () S () N Qual? _____
 Dose? _____ Freqüência? _____
- Analgésicos:** () S () N Qual? _____
 Dose? _____ Freqüência? _____
- Outros:** () S () N Quais? _____
 Dose? _____ Freqüência? _____

.....

Idade da MENARCA: _____ anos **MENOPAUSA:** () S () N Idade: _____ anos

GESTA: _____ **PARA:** _____ **FASE do Ciclo Reprodutivo:** () Menacme
 () Climatério

Tratamento HORMONAL Antes do Diagnóstico: () S () N Qual? () AC () Outro

Duração: _____ Parou há quanto tempo? _____

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

Quais ?

.....

História de Uso de DROGAS: Álcool: () S () N Tipo? _____

Qtde? _____ Frequência? _____

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

Se fumava, qual a duração? _____

Quando parou? _____

Algum familiar ou amigo próximo é fumante?

Drogas Ilícitas: ()S ()N Qual? _____

Por quanto tempo? _____

SLEDAI

(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)

Modificação SELENA

Avaliação Global do Médico _____

0 1 2 3
Nula Leve Média Severa

* Favor marcar “X” para presença, “0” (zero) para ausência

Score SLEDAI

Marque se a descrição estiver presente no momento da visita ou nos 10 dias anteriores.

| Pes | Pres. | Descritor | Definição |
|-----|-------|----------------------------|---|
| 8 | () | Convulsão | Início recente. Excluir causa metabólica, infecciosa ou farmacológica. |
| 8 | () | Psicose | Alterações na habilidade de exercer atividades normais devido a distúrbio severo na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico, conteúdo pobre de pensamentos. Excluir uremia e causas farmacológicas. |
| 8 | () | Síndrome Cerebral Orgânica | Função mental alterada com diminuição da orientação, memória ou |

| | | | |
|---|-----|-----------------------------|--|
| | | | outras funções inteligentes, com início abrupto e características clínicas flutuantes. Inclui redução da consciência com capacidade reduzida de concentração e incapacidade de manter-se atento ao ambiente, mais pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, fala incoerente, insônia ou sonolência diurna, ou atividade psicomotora aumentada ou diminuída. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou farmacológicas. |
| 8 | () | Distúrbio Visual | Alterações retinianas do lúpus.. Inclui corpos citóides, hemorragias retinianas, hemorragia ou exsudato na coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção ou causas farmacológicas. |
| 8 | () | Distúrbio em Nervo Craniano | Início recente de neuropatia sensorial ou motora envolvendo nervos cranianos. |
| 8 | () | Cefaléia do Lúpus | Cefaléia severa e persistente: pode ser migranosa, mas deve ser não-responsiva a analgesia narcótica. |
| 8 | () | AVC | Início recente de AVC. Excluir aterosclerose |
| 8 | () | Vasculite | Ulceração, gangrena, nódulos moles nos dedos, infarto periungueal, hemorragia em cunha, ou biópsia ou angiograma provando vasculite. |
| 4 | () | Artrite | Mais do que 2 articulações com dor e sinais de inflamação (i.e. edema, derrame articular ou sensibilidade) |
| 4 | () | Miosite | Fraqueza ou dor muscular proximais, associada com CPK/aldolas elevada ou mudanças no eletromiograma ou biópsia mostrando miosite. |
| 4 | () | Cilindros Urinários | Cilindros de hemácias ou heme-granulares. |
| 4 | () | Hematúria | >5 hemácias/campo. Excluir cálculo, infecção ou outra causa. |

| | | | |
|---|-----|----------------------------|--|
| 4 | () | Proteinúria | >0,5 g/24 h. Início recente ou aumento recente de mais que 0,5 g/24 h. |
| 4 | () | Piúria | >5 leucócitos/campo. Excluir infecção. |
| 2 | () | <i>Eritema</i> Novo | Início recente ou recorrência de <i>Eritema</i> do tipo inflamatório. |
| 2 | () | Alopécia | Início recente ou recorrência de perda de cabelo anormal, em placas ou difusa. |
| 2 | () | Úlceras em Mucosas | Início recente ou recorrência de ulcerações nasais ou orais. |
| 2 | () | Pleurisia | Dor torácica pleurítica com atrito pleural ou derrame, ou espessamento pleural. |
| 2 | () | Pericardite | Dor de origem pericárdica ou pelo menos 1 dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrocardiográfica. |
| 2 | () | Complemento Baixo | Diminuição no CH50, C3 ou C4 abaixo do limite inferior do laboratório. |
| 2 | () | Agregação de DNA Aumentada | >25% por ensaio Farr or acima da variação normal para o laboratório |
| 1 | () | Febre | >38°C. Excluir causas infecciosas. |
| 1 | () | Trombocitopenia | <100.000 plaquetas/mm ³ |
| 1 | () | Leucopenia | <3000 leucócitos/mm ³ . Excluir causas farmacológicas |

_____ Score Total (soma dos pesos)

| Crise Leve ou Moderada () | Severa () |
|---|-----------------------------------|
| () Mudança no SLEDAI >3 pontos | () Mudança no SLEDAI >12 pontos |
| () Úlceras nasofaríngeas | () SNC-LES recente ou pior |
| Pleurite | Vasculite (???) |
| Pericardite | Nefrite |
| Artrite | Miosite |
| Febre (LES) | Pk<60.000 |
| Lupus bolhoso, vasculite cutânea, profunda, fotossensível e discóide recente/pior | Hb<7% ou diminuição na HB>3% |
| | Precisando de prednisona em dobro |

| | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Aumento na prednisona, mas não para mais que 0,5 mg/kg/dia | <input type="checkbox"/> Prednisona > 0,5 mg/kg/dia |
| <input type="checkbox"/> Adicionado AINE ou Plaquenil | <input type="checkbox"/> Necessidade de Azatioprina, Metotrexato ou Hospitalização pelo LES |
| <input type="checkbox"/> Aumento na PGA maior ou igual a 1 mas não maior que 2,5 | <input type="checkbox"/> Aumento no PGA para mais de 2,5 |

ANEXO B**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Informações aos participantes,

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos da saúde e genéticos de pacientes que desenvolveram lúpus eritematoso sistêmico 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 feitos 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 autoimunidade” na condição de voluntário de acordo com os critérios expostos no termo de consentimento livre e esclarecido:

Florianópolis, ___/___/_____

Assinatura: _____

RG: _____

ANEXO C

QUESTIONÁRIO INDIVÍDUOS-GRUPO CONTROLE

Dados Pessoais Data: __/__/__

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

Observações: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência do pai: Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe: Materna _____ Paterna _____

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

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

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não

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

() Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

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

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

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

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não

Tipo: _____

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

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

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

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

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

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia)

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou:

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA:

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade:

ISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª gestação _____

Nº de filhos () nulípara N:

Abortos () P () E N:

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

TRAT. HORMONAL:

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

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

Tempo que usa ou usou AC:

Há quanto tempo parou?

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

Nome do Hormônio:

Tempo que faz ou fez TRH:

Há quanto tempo parou?

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações _____

Histórico Médico

Caso de CÂNCER pessoal? () Sim () Não

Tipo:

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

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

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

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

() Outros

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

Grau de Parentesco e tipo:

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

Local: _

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

Qual?

Tempo de diagnóstico:

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

Grau de Parentesco e tipo

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

Qual?

HIPERTENSÃO ARTERIAL: () Sim () Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: () Sim () Não

OSTEOPOROSE: () Sim () Não

DOENÇA REUMÁTICA: () Sim () Não

DIABETES: () Sim () Não

ASMA: () Sim () Não

HIV: () Sim () Não () Nunca fez exame

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

DENGUE: () Sim () Não

TUBERCULOSE: () Sim () Não

DISTÚRBIO RENAL: () Sim () Não

DISTÚRBIO PULMONAR: () Sim () Não

DISTÚRBIO HEPÁTICO: () Sim () Não

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

Grau de parentesco:

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

Grau de parentesco:

OUTRAS DOENÇAS?:

Alérgico a algum medicamento?

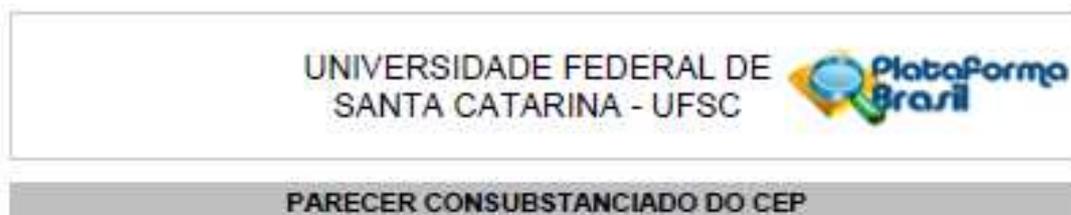
Alérgico a algum alimento? Teve DEPRESSÃO?

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

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

ANEXO D

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC.



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: ILÍADA RAINHA DE SOUZA

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

Versão: 2

CAAE: 19430913.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 423.535

Data da Relatoria: 23/09/2013