

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Renan Mantovani Rabelo

**REPINTANDO A REALIDADE:
DOIS POLIMORFISMOS NO GENE *MTHFR* (C677T E A1298C) E SUA
ASSOCIAÇÃO À PREDISPOSIÇÃO À ARTRITE REUMATOIDE NA
POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA - BRASIL**

Florianópolis

2019

Renan Mantovani Rabelo

**REPINTANDO A REALIDADE:
DOIS POLIMORFISMOS NO GENE *MTHFR* (C677T E A1298C) E SUA
ASSOCIAÇÃO À PREDISPOSIÇÃO À ARTRITE REUMATOIDE NA POPULAÇÃO
DE SANTA CATARINA - BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.
Orientadora: Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza
Coorientadora: Profa. Dra. Yara Costa Netto Muniz

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra

Rabelo, Renan Mantovani

Repintando a realidade : Dois polimorfismos no gene MTHFR (C677T e A1298C) e sua associação à predisposição à artrite reumatoide na população de Santa Catarina - Brasil / Renan Mantovani Rabelo ; orientadora, Iliada Rainha de Souza, coorientadora, Yara Costa Netto Muniz, 2019.
82 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Artrite reumatoide. 3. MTHFR. 4. SNP. 5. Imunogenética. I. Souza, Iliada Rainha de. II. Muniz, Yara Costa Netto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Renan Mantovani Rabelo

**REPINTANDO A REALIDADE: DOIS POLIMORFISMOS NO GENE *MTHFR*
(C677T E A1298C) E SUA ASSOCIAÇÃO À PREDISPOSIÇÃO À ARTRITE
REUMATOIDE NA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA - BRASIL**

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

Florianópolis, 08 de julho de 2019

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti,
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

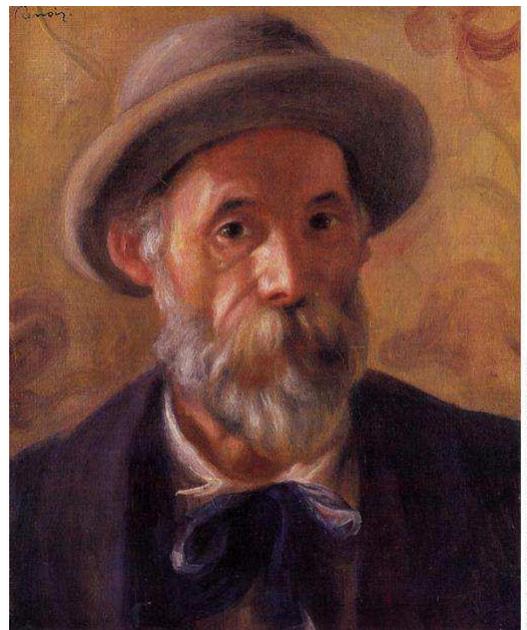
Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza,
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Yara Costa Netto Muniz,
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Juliana Dal-Ri Lindenau,
Membra Efetiva
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Alice Heidrich Prompt,
Membra Efetiva
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a toda/o cidadã(o) brasileira/o que acredita nos ‘bons frutos’ de uma educação pública, gratuita e de qualidade, sobretudo àquelas/es que o fazem, porém já não conseguem erguer-se em sua defesa por encontr(AR)-se em condição adversa. Por todas/os elas/es empunho aqui a melhor de minhas “armas”: meu lápis!



Self Portrait – Pierre-Auguste Renoir¹, 1878.

When looking at Renoir's paintings it is easy to forget that he suffered a great deal (...). Painting was almost a physical need and sometimes a cure, as if Renoir wanted to create on the canvas those things which he had to miss in real life because of his disability (BOONEN et al., 1997).

¹ Pierre-Auguste Renoir (1841-1919), célebre artista plástico francês e um dos pintores de maior renome do movimento impressionista, sofreu com as manifestações da artrite reumatoide durante considerável parte de sua vida. A doença que teve início por volta dos 50 anos, tornou-se mais agressiva a partir de 1903, aos seus 60 anos, culminando com a quase completa incapacidade após os 70. Não obstante as deformidades que a artrite impingiu a Renoir tenham sido incapacitantes, o artista nunca deixou de pintar ou apresentou queda na qualidade de suas obras devido à artrite. Seu legado é prova da imensurável magnitude da capacidade de superar a dor e a limitação física (BOONEN et al., 1997).

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica e inflamatória crônica de etiologia multifatorial que visa principalmente as articulações. Ademais, é uma enfermidade com consequências biopsicossociais que apresenta dificuldade diagnóstica e alto índice de morbidade. Por conseguinte, o presente estudo tem como objetivo investigar a associação de dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) à predisposição à AR, por meio de um estudo de caso-controle (ECC) na população de Santa Catarina (SC), Brasil. O grupo caso constitui-se por 161 pacientes com AR atendidos no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), enquanto o grupo controle conta com 161 voluntários hígidos sem relação conhecida com a doença. Mediante o uso de questionários foram levantadas informações epidemiológicas, características terapêuticas e parâmetros clínicos dos integrantes dos grupos caso e controle, que também forneceram sob consentimento amostras de sangue periférico. A partir dessas amostras foi possível extrair e genotipar os DNA para os SNP C677T e A1298C por reação em cadeia da polimerase para o marcador polimórfico no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). A estimativa das frequências alélicas nas populações amostrais permitiu verificar que elas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), considerando um intervalo de confiança (IC) de 95% e valor de $p < 0,05$. As frequências para o alelo C677T*T foram de 0,287 e 0,345 para os grupos caso e controle e do alelo A1298C*C foram de 0,346 e 0,431, respectivamente. A análise da diferenciação genética dos grupos amostrais demonstrou que há homogeneidade gênica ($p = 0,068$) e genotípica ($p = 0,074$) para os loci 677 e 1298, sugerindo representatividade da amostra. Em seguida, foi confirmado que os SNP estudados estão em desequilíbrio de ligação, logo, são herdados em bloco ($p = 0,017$). A análise de associação estatística para o polimorfismo C677T demonstrou que a presença do alelo selvagem *C (OR = 2,374; IC 95% = 1,027–5,592; $p = 0,042$) provavelmente é um fator de risco para o desenvolvimento da AR. Pelo modelo de herança recessivo comum foi possível corroborar a conferência de proteção pelo alelo *T, porém apenas quando em duplicidade, caracterizando o genótipo *TT (OR = 0,421; IC 95% = 0,179–0,974; $p = 0,042$). Com relação ao polimorfismo A1298C, a análise de associação de alelos e genótipos demonstrou que não há relação significativa entre esse SNP e a propensão à AR. Para além, o haplótipo 'T/C' (OR = 0,358; IC 95% = 0,125–0,996; $p = 0,049$) e a combinação haplotípica 'TA/TC' (OR = 0,050; IC 95% = 0,000–0,716; $p = 0,016$) foram identificados como passíveis de assinalar proteção para AR naqueles que o possuem. Assim sendo, este estudo foi capaz de prover informações pioneiras referentes à associação dos SNP C677T e A1298C do gene *MTHFR* à predisposição à AR na população de SC. Além disso, forneceu subsídios para uma melhor compreensão da etiologia da AR. Num futuro próximo se espera que tais informações sejam aplicadas de modo a compor marcadores genéticos de suscetibilidade que facilitem o processo de diagnóstico da doença. Outrossim, esses resultados servem de estímulo ao desenvolvimento de estudos que procurem associar esses SNP à eficácia e/ou toxicidade terapêutica de fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento dessa enfermidade no estado, como o metotrexato (MTX). Àqueles pacientes que ainda convivem em desarmonia com a AR, trabalhos como este somam-se para avigorar a esperança de dias melhores ao fornecer “novos tons às suas paletas na necessária busca por repintar suas realidades”.

Palavras-chave: Doenças autoimunes. Imunogenética. rs1801131. rs1801133.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory systemic autoimmune disease of multifactorial etiology that mainly attacks the joints. It is also a disease that presents diagnostic difficulty and high rates of morbidity with biopsychosocial consequences. This study aims to investigate the association of two single nucleotide polymorphisms (SNP) of the *MTHFR* gene (C677T and A1298C) to the predisposition to RA, by means of a case-control study in the population of Santa Catarina (SC), Brazil. The case group is composed of 161 RA patients treated at the Polydoro Ernani de São Thiago University Hospital, Federal University of Santa Catarina (HU-UFSC), while the control group has 161 volunteers with no relation to the disease. Through questionnaires, epidemiological information, therapeutic characteristics and clinical parameters were collected from the members of the case and control groups, who also provided, with consent, peripheral blood samples. From these samples it was possible to extract the DNA and genotype it to the SNP C677T and A1298C by polymerase chain reaction by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The estimation of the allele frequencies in the samples allowed to verify that they adhere to the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), considering a CI of 95% and $p < 0.05$. The frequencies for the C677T**T* allele were 0.287 and 0.345 for the case and control groups and, for the A1298C**C* allele, they were 0.346 and 0.431, respectively. The analyze of the genetic differentiation of the sample groups showed that there are both genic ($p = 0.068$) and genotypic ($p = 0.074$) homogeneity for loci 677 and 1298, suggesting the adequate sampling. Afterwards, it was confirmed that the SNP studied are in linkage disequilibrium, and therefore they are inherited in block ($p = 0.017$). The association analysis for C677T polymorphism demonstrated that the presence of the wild allele **C* (OR = 2.374; 95% CI = 1.027–5.592; $p = 0.042$) is probably a risk factor for the development of RA. By the common recessive inheritance model it was possible to confirm that the **T* allele confers protection, but only in duplicity, characterizing the **TT* genotype (OR = 0.421; 95% CI = 0.179–0.974; $p = 0.042$). With respect to A1298C polymorphism, the analysis of allele and genotype association demonstrated that there is no significant relationship between this SNP and susceptibility to RA. In addition, the ‘*T/C*’ haplotype (OR = 0.358, 95% CI = 0.125–0.996; $p = 0.049$) and the haplotypic combination ‘*TA/TC*’ (OR = 0.050; 95% CI = 0.000–0.716; $p = 0.016$) were identified as capable of providing protection for RA in those who have it. Thus, the present study was able to provide pioneering information regarding the association of C677T and A1298C SNP of the *MTHFR* gene to the predisposition to RA in the population of Santa Catarina. Also, it provided information that helps in understanding the etiology of RA. In the near future it is expected that such information will be applied in order to compose genetic susceptibility markers that facilitate the process of diagnosis of the disease. These results also stimulate the development of studies that seek to associate these SNP with the efficacy and/or therapeutic toxicity of first-line drugs used in the treatment of this condition in the state, such as methotrexate (MTX). To those patients who do not yet live in harmony with RA, studies like this add up to keep the hope of better days by providing “new tones to your palletes in the quest to repaint their realities”.

Keywords: Autoimmune diseases. Immunogenetics. rs1801131. rs1801133.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação esquemática da estrutura articular sinovial entre indivíduos sem e com AR.....	25
Figura 2 – Tabela D.1 (Apêndice D) do Relatório Mundial Sobre a Deficiência, elaborado originalmente em 2011 pela Organização Mundial da Saúde e Banco Mundial, com destaque para a AR, 19ª colocada dentre as condições com maior prevalência de deficiências moderadas e severas.....	28
Figura 3 – Destaque para a localização molecular do gene <i>MTHFR</i> no cromossomo 1 de <i>Homo sapiens</i>	30
Figura 4 – Representação esquemática simplificada da via metabólica do ácido fólico, com destaque à atuação da enzima MTHFR na biodisponibilidade do folato. O fármaco MTX pode intervir nesta via diminuindo a disponibilidade do metabólito intermediário tetrahidrofolato.	31
Figura 5 – Disposição esquemática dos principais SNP no gene <i>MTHFR</i> com destaque para C677T e A1298C, associados a diferentes percentuais de deficiência da atividade enzimática.	33
Figura 6 – Características estruturais da MTHFR na presença e ausência das alterações Ala222Val e Glu429Ala.	34
Figura 7 – Representação esquemática das possibilidades de haplótipos para os SNP C677T e A1298C.....	35
Figura 8 – Atuação da enzima <i>HinfI</i> no polimorfismo de sítio de restrição C677T.....	44
Figura 9 – Atuação da enzima <i>MboII</i> no polimorfismo de sítio de restrição A1298C.....	44
Figura 10 – Representação esquemática dos possíveis resultados da PCR-RFLP consoante o genótipo do indivíduo para o SNP <i>MTHFR</i> C677T.	45
Figura 11 – Gel de agarose contendo os produtos da digestão da região que flanqueia o SNP C677T após separação por eletroforese (etapa final da PCR-RFLP).	46
Figura 12 – Representação esquemática dos possíveis resultados da PCR-RFLP consoante o genótipo do indivíduo para o SNP <i>MTHFR</i> A1298C.....	47
Figura 13 – Gel de agarose contendo os produtos da digestão da região que flanqueia o SNP A1298C após separação por eletroforese (etapa final da PCR-RFLP).....	48
Figura 14 – Mapa coroplético da distribuição percentual da frequência de pacientes de acordo com a naturalidade.....	56

Figura 15 – Mapa coroplético da distribuição percentual da frequência dos controles de acordo com a naturalidade.....	56
Figura 16 – Distribuição das frequências de pacientes por faixa etária aproximadas pelo modelo normal.....	58
Figura 17 – Distribuição das frequências do grupo controle por faixa etária aproximadas pelo modelo normal.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR dos fragmentos de DNA do gene <i>MTHFR</i> que contêm os SNP C677T e A1298C.	42
Tabela 2 – Tabela de contingência para a composição dos subgrupos amostrais em ECC	53
Tabela 3 – Caracterização quantitativa do contingente de indivíduos genotipados e sua variação conforme o grupo amostral (pacientes ou controle) e SNP do gene <i>MTHFR</i> (C677T ou A1298C), bem como em dois momentos distintos da análise de associação.	55
Tabela 4 – Caracterização epidemiológica dos pacientes com AR e do grupo controle.	57
Tabela 5 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo na posição 677 do gene <i>MTHFR</i> (C677T) em pacientes com AR e no grupo controle.	60
Tabela 6 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo na posição 1298 do gene <i>MTHFR</i> (A1298C) em pacientes com AR e no grupo controle.	60
Tabela 7 – Resultados de <i>odds ratio</i> para medida da associação entre a presença de alelos/genótipos, e sob dois modelos padrão de herança, do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T e a predisposição à AR.	62
Tabela 8 – Resultados de <i>odds ratio</i> para medida da associação entre a presença de alelos/genótipos, e sob dois modelos padrão de herança, do polimorfismo <i>MTHFR</i> A1298C e a predisposição à AR.	62
Tabela 9 – Distribuição das frequências dos haplótipos para os polimorfismo C677T e A1298C do gene <i>MTHFR</i> em pacientes e grupo controle e suas respectivas probabilidades de associação à AR.	63
Tabela 10 – Distribuição das frequências dos diplótipos para os polimorfismo C677T e A1298C do gene <i>MTHFR</i> em pacientes e grupo controle e suas respectivas probabilidades de associação à AR.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

AAHU – Associação Amigos do Hospital Universitário da UFSC

Anti-CCP – *Anti-cyclic Citrullinated Peptide*

AR – Artrite Reumatoide

C – Citosina

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CEPSH/UFSC – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DAI – Doenças Autoimunes

DMARD – *Disease Modifying Antirheumatic Drugs*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

dNTP – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

EBV – *Epstein-Barr Virus*

ECC – Estudo de Caso-Controle

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

FAD – *Flavin Adenine Dinucleotide*

G – Força Centrífuga Relativa ou Força Gravitacional

G – Guanina

gDNA – *Genomic Deoxyribonucleic Acid*

GWAS – *Genome-wide Association Studies*

HCl – Ácido Clorídrico

HinfI – Endonuclease de restrição derivada por engenharia genética da bactéria *Haemophilus influenzae*

HLA – *Human Leukocyte Antigen*

HTLV-1 – *Human T Lymphotropic Virus*

HSP – *Heat Shock Protein*

HU/UFSC – Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da UFSC

IC – Intervalo de Confiança

INSS – Instituto Nacional do Seguro Social

LAPOGE – Laboratório de Polimorfismos Genéticos da UFSC

M – Molar

mA – Miliampere

MAF – *Minor Allele Frequency*

MboII – Endonuclease de restrição derivada por engenharia genética da bactéria *Moraxella bovis*

mM – Milimolar

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase (enzima)

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase (gene)

MTX – Metotrexato

n – Número Amostral

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

NETI – Núcleo de Estudos da Terceira Idade da UFSC

pb – Pares de Base

OR – *Odds Ratio*

p – Probabilidade de Significância

PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction by Restriction Fragment Length Polymorphism*

pH – Potencial Hidrogeniônico

SAM - S-adenosilmetionina

SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*

SUS – Sistema Único de Saúde

T – Timina

Taq – DNA-polimerase derivada por engenharia genética da bactéria *Thermus aquaticus*

TBE – Tris-Borato-EDTA

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alpha*

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UV – Ultravioleta

V – Volts

VHS - Velocidade de Hemossedimentação

μ M – Micromolar

μ g/mL – Micrograma por Mililitro

χ^2 – Qui-quadrado

°C – Grau Celsius

% – Percentagem ou Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	DOENÇAS AUTOIMUNES	23
1.2	ARTRITE REUMATOIDE	24
1.2.1	Patologia	24
1.2.2	Caracterização Epidemiológica.....	27
1.2.3	Aspectos Sociais e de Saúde Pública	27
1.2.4	A Metilenotetrahidrofolato Redutase e sua Associação à Artrite Reumatoide ..	30
1.2.5	Polimorfismos de um Único Nucleotídeo no Gene <i>MTHFR</i>	32
1.3	JUSTIFICATIVA	36
1.5	OBJETIVOS	36
1.5.1	Objetivo Geral	36
1.5.2	Objetivos Específicos.....	37
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	ASPECTOS ÉTICOS E DE AMOSTRAGEM	39
2.2	COLETA E ARMAZENAMENTO DOS DADOS E AMOSTRAS	40
2.3	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO.....	41
2.4	GENOTIPAGEM	41
2.4.1	Amplificação das Regiões de Interesse do DNA por PCR	41
2.4.2	Verificação da Amplificação por Eletroforese.....	42
2.4.3	Digestão Enzimática por RFLP	43
2.4.4	Identificação Genotípica por Eletroforese	44
2.5	TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
2.5.1	Estimativas das frequências alélicas e genotípicas	49
2.5.2	Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	50
2.5.3	Desequilíbrio de Ligação Genotípica	51
2.5.4	Diferenciação Genética dos Grupos Amostrais	51

2.5.5	Análise de Associação Estatística	51
3	RESULTADOS	55
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	55
3.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
3.2.1	Cálculo de Frequências e Adesão ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg	59
3.2.2	Diferenciação Genética dos Grupos Amostrais	61
3.2.3	Desequilíbrio de Ligação.....	61
3.2.4	Análise de Associação Estatística	61
4	DISCUSSÃO	65
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH/UFSC)	81
	ANEXO B – Dados Epidemiológicos e Clínicos do/da Portador(a) de Artrite Reumatoide	82
	ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao/à Portador(a) de Artrite Reumatoide.....	86
	ANEXO D – Dados Epidemiológicos e Clínicos da Pessoa Controle	88
	ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido à Pessoa Controle	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS AUTOIMUNES

Os avanços da genética, principalmente após o sequenciamento do genoma humano, através de projetos sobre a diversidade deste genoma nas diversas populações (*Human Genome Diversity Project, The 1000 Genomes Project, The International HapMap Project, phase I, phase II e phase III*), levaram à descoberta de sequências de variantes de DNA entre os indivíduos de diferentes populações (INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM 2003; 2004; 2005; 2007; GRIFFITHS *et al.*, 2013). O *The 1000 Genomes Project*, por exemplo, sequenciou o genoma de 2.504 indivíduos de 26 populações (envolvendo integrantes da África, América, Ásia e Europa), nos quais foram identificados mais de 88 milhões de variantes genéticas e descritas suas distribuições ao entorno do globo (THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM 2010; 2012; 2015). Desse modo, notou-se que indivíduos de diferentes populações apresentam diferentes perfis de variantes, sejam elas raras ou comuns, assim como foi possível colaborar para a investigação da relação entre genótipo e fenótipo, e, da genética para o desenvolvimento de doenças.

As variantes do DNA têm sido associadas à etiologia de diversas doenças, conhecidas como multifatoriais, em que fatores genéticos e ambientais atuam conjuntamente (ELLIS; KEMP; PONSONBY, 2014). O estudo dessas variantes comuns vem passando por uma grande evolução, acarretando o desenvolvimento de diversas ferramentas de diagnóstico, que têm melhorado a capacidade de se escolher alvos para intervenção terapêutica (INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2010). Ao contrário dos distúrbios genéticos clássicos, a suscetibilidade a essas enfermidades não está concentrada em um único ou poucos genes raros, mas sim na combinação de diversos genes que são comuns na população (KOCHI; SUZUKI; YAMAMOTO, 2014). Nesse grupo encontram-se as doenças autoimunes (DAI), que atingem muitos adultos considerados ainda jovens e que estariam em plena idade produtiva.

Algumas DAI são consideradas relativamente raras, mas seus efeitos de morbidade e mortalidade são extremamente altos, e, se analisadas em conjunto, essas enfermidades afetam de 5 a 7% da população mundial. Ressalta-se ainda suas maiores recorrências em mulheres, sendo uma das maiores causas de morte na faixa etária de 16 até 65 anos (COOPER; STROEHLA, 2003).

As causas das DAI ainda não estão totalmente compreendidas, mas se acredita que uma combinação de fatores exógenos, como infecções, e endógenos, como a influência do perfil

genético, estresse psicológico e disfunções nos linfócitos, como alta reatividade, estejam envolvidos (DORIA *et al.*, 2012). Mais que genes específicos para cada DAI, parecem existir genes da autoimunidade que aumentam o risco para o desenvolvimento de desordens autoimunes nas famílias. Esse desenvolvimento não depende apenas desses genes, mas também de fatores ambientais aos quais as pessoas se encontram expostas. A avaliação da contribuição genética na autoimunidade humana fundamenta-se sobretudo nos estudos de base familiar, com destaque para aqueles envolvendo gêmeos. Esses estudos apontam taxas de concordância de 24% a 50% para doenças como, por exemplo, a artrite reumatoide, enfatizando a importância da contribuição genética para as DAI (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012; YARWOOD; EYRE; WORTHINGTON, 2016).

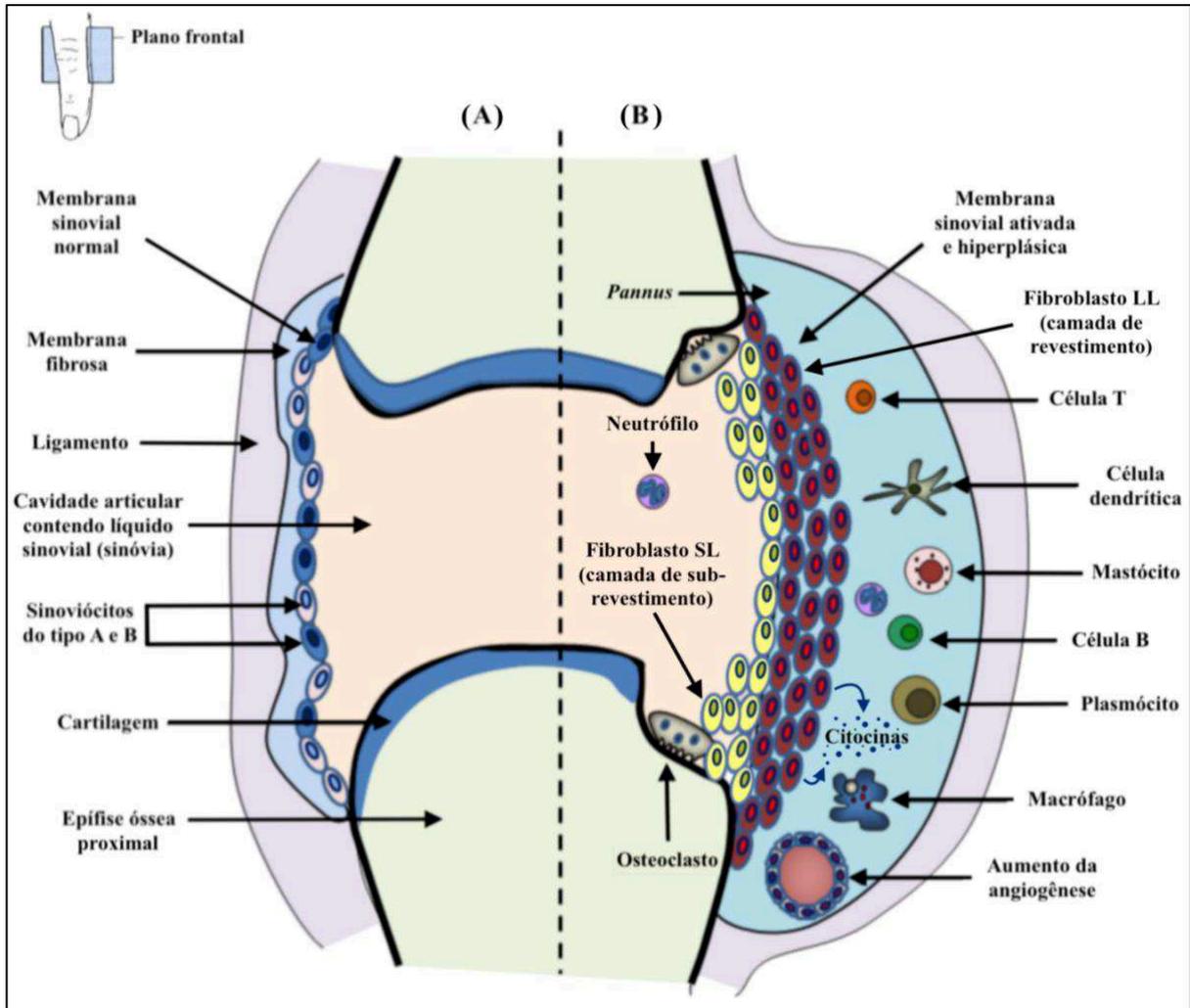
As respostas imunológicas apresentam o potencial de provocar lesões e, portanto, devem atuar mediante condições cuidadosamente controladas para que se mantenha o estado de homeostasia. Dentre os diversos controles se inclui a inibição por retroalimentação, realizada por produtos solúveis, e interações célula-célula que podem intensificar ou reduzir a resposta. Nesse contexto, também é essencial prevenir a resposta imunológica contra antígenos próprios. Assim, células autorreativas costumam ser eliminadas ou silenciadas durante os estágios de desenvolvimento que originam os linfócitos B e T maduros. No entanto, há casos de desenvolvimento de raras células autorreativas que atuam de modo a gerar resposta imunológica contra seus próprios tecidos (COICO; SUNSHINE, 2010). Este tipo de resposta imune chama-se autoimunidade e caracteriza a base das DAI, como a Artrite Reumatoide (AR).

1.2 ARTRITE REUMATOIDE

1.2.1 Patologia

A AR é uma doença sistêmica autoimune e inflamatória crônica de etiologia pouco conhecida que visa principalmente os tecidos sinoviais, tipo de tecido conjuntivo que reveste as articulações. Os tecidos sinoviais se proliferam de forma descontrolada, resultando em uma produção excessiva de líquido e erosão do osso circunvizinho, bem como dano nos tendões e ligamentos (PATAKAS, 2011; MOTA *et al.*, 2017). Na AR a membrana sinovial inflamada permanece densamente povoada por células (macrófagos, linfócitos T e B, *natural killer*, células plasmáticas e dendríticas) que mimetizam o tecido linfoide e induzem a geração de novos vasos sanguíneos (Figura 1). A inflamação crônica das articulações, principalmente nas mãos e pés, gera dor, inchaço e rigidez (COICO; SUNSHINE, 2010; MATOS *et al.*, 2010).

Figura 1 – Comparação esquemática da estrutura articular sinovial entre indivíduos sem e com AR.



A articulação sinovial em condições de homeostase (A) contém superfícies articulares protegidas por uma cartilagem fibrosa que forma uma bolsa que delimita a articulação. A área dentro dessa cápsula articular é chamada de cavidade articular. O líquido sinovial, incluído na cavidade articular, é acelular, nutre a articulação e permite que as superfícies deslizem entre si. O revestimento sinovial é composto pelos sinoviócitos do tipo A (semelhantes a macrófagos) e do tipo B (semelhantes a fibroblastos). Já a membrana sinovial de pacientes com AR (B) é hiperplásica com proliferação local dos sinoviócitos, que têm influência direta sobre a progressão da inflamação. Duas populações dessas células com papéis específicos, provavelmente derivadas dos sinoviócitos tipo B, podem ser distinguidas: aquela que se localiza na camada de revestimento (LL) da membrana sinovial, associada à destruição óssea e cartilaginosa; e aquela encontrada na camada de sub-revestimento (SL), ligada à inflamação observada na doença. Ambas expressam moléculas sinalizadoras, chamadas citocinas, que podem atrair células imunes. Essa membrana inflamada invade de maneira gradual as estruturas articulares, como cartilagem e osso, formando o *pannus* reumatoide. Ocorre angiogênese visando fornecer a oxigenação adequada para todas as células que agora se encontram na membrana sinovial. Fonte: adaptado pelo autor de Patakas (2011) e Croft *et al.* (2019).

Além das articulações a AR pode afetar órgãos como a pele, coração, pulmões, olhos, bem como vasos sanguíneos. Características sistêmicas como fadiga, febres baixas e anemia também são comuns em pacientes com AR. Outra DAI, a síndrome de Sjögren, costuma ser uma comorbidade associada à AR. Chamada neste caso de Sjögren secundário, essa síndrome

apresenta resposta autoimune que leva à inflamação das glândulas dos olhos e da boca, podendo causar *secura grave*, o que dificulta a produção de lágrimas e o processo de deglutição, por exemplo. Destaca-se, ainda, que a AR encurta a sobrevida e gera um impacto negativo significativo na qualidade de vida dos pacientes afetados (COICO; SUNSHINE, 2010).

A AR também é caracterizada clinicamente por elevação de elementos de fase aguda, Velocidade de Hemossedimentação (VHS) e proteína-C-reativa (demarcando uma importante atividade inflamatória), fator reumatoide positivo (o primeiro auto-anticorpo descrito para a AR) e outros auto-anticorpos, como o anti-CCP (anti-peptídeo citrulinado cíclico), que prediz o aparecimento de AR com uma sensibilidade de até 98% (VAN GAALLEN *et al.*, 2004; HUEBER *et al.*, 2005).

A etiologia da AR ainda é pouco compreendida, mas os estudos têm considerado possíveis influências genéticas, socioculturais e ambientais (MATOS *et al.*, 2010). A pesquisa científica em grupos familiares tem evidenciado a associação de vários genes com a AR, de modo a elucidar a suscetibilidade hereditária relacionada a essa doença. Um exemplo envolve os genes *DRB1* que codificam as moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA)-DR4/DR1 (STASTNY, 1978; FUGGER; SVEJGAARD, 2000). Os genes que codificam TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e as proteínas de choque térmico (HSP) também estão frequentemente associados com o início e perpetuação da AR (VASANTHI; NALINI; RAJASEKHAR, 2007; MOUDGIL; DURAI, 2008). Inclusive genes relacionados secundariamente com a resposta imune, como aqueles envolvidos no metabolismo de fármacos, têm apresentado predisposição à doença (BOUGHRARA *et al.*, 2015; SAAD *et al.*, 2015; CEN *et al.*, 2016; SHAKER *et al.*, 2016; YUAN; SHAO; LI, 2017). Outros estudos evidenciam que, tanto em camundongos quanto em ratos, o colágeno II atua como um indutor de relevância na patogênese da doença (TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977; STUART *et al.*, 1979). Infecções bacterianas e virais, como a da bactéria *Porphyromonas gingivalis* e dos vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), *Epstein-Barr* (EBV) e *Rubella*, (gênero rubivírus), também têm sido associadas à AR (OGRA *et al.*, 1975; IWAKURA *et al.*, 1991; CACCESE; ZIMMERMAN; CARLSON, 1992; BARTOLD *et al.*, 2010; KUWANA *et al.*, 2011; WARDE, 2011; MARESZ *et al.*, 2013). A própria microbiota intestinal pode influenciar no desenvolvimento da AR (WU *et al.*, 2010; ROGERS, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Ademais, fatores ambientais podem ter efeitos sobre a função imunológica e, conseqüentemente, na AR (EDWARDS; COOPER, 2006; LIAO; ALFREDSSON; KARLSON, 2009). Dentro dos fatores ambientais é possível exemplificar: o consumo de álcool, o tabagismo, o peso ao nascer, a amamentação e o retardo no crescimento intrauterino.

1.2.2 Caracterização Epidemiológica

A AR é uma doença de impacto mundial. Cerca de 0,5-1% da população global é acometida pela doença, ou seja, ao menos 38.500 pessoas dos aproximados 7,7 bilhões atuais (SILMAN, 2000; MINICHELLO; SEMERANO; BOISSIER, 2016). No Brasil, um estudo realizado em Minas Gerais encontrou prevalência de 0,46%, o que corresponde a cerca de 975 pessoas dos aproximadamente 212 milhões de brasileiros (SENNA *et al.*, 2004).

Pode ocorrer em qualquer idade, mas com o início antes dos 45 anos em homens sendo incomum. Por motivos que ainda não foram elucidados, a prevalência em mulheres é maior que em homens (3:2) (DIAMOND, 2005). Entretanto, essa disparidade na frequência de incidência entre homens e mulheres² pode ser associada às diferenças nas variações hormonais presente nas mulheres (ALPÍZAR-RODRÍGUEZ *et al.*, 2016). Estudos bem realizados com pequenas coortes iniciais sugerem que a incidência anual de AR é de aproximadamente 40/100.000 para mulheres e cerca de metade disso para homens (DIAMOND, 2005).

Ademais, a AR figura dentre as vinte principais condições de saúde associadas à deficiência, com incidência maior em países de baixa e média renda, tanto nos indivíduos com mais de 60 anos quanto com idade inferior (Figura 2). Tal fato evidencia a importância de fatores sócio-econômico-ambientais, além de genéticos, na prevalência da doença, como a exemplo a intervenção tardia ou mesmo ausente em países em desenvolvimento (OMS, 2012).

1.2.3 Aspectos Sociais e de Saúde Pública

Além do grande número de diagnosticados, a importância da AR no cenário brasileiro decorre do impacto socioeconômico a ela vinculado (MOTA *et al.*, 2017). Para diminuir os impactos da doença é necessário investir em diagnóstico precoce e tratamento contínuo com acompanhamento de equipe multidisciplinar.

O recebimento do diagnóstico da AR gera um intenso impacto emocional sobre o paciente e seus familiares, já que se trata de uma doença degenerativa, progressiva e que não tem cura. Muitos pacientes limitam seus sonhos, sua vida profissional e familiar, restringindo-se a viver dentro dos limites trazidos pelo fato noticiado pelo médico. Logo, nota-se que o

² É importante esclarecer que por uma questão de concisão, utilizar-se-á os agrupamentos no masculino, bem como a definição sexual binária, mas que o autor entende e respeita a questão de gênero presente nas determinações feitas ao longo deste trabalho.

impacto da AR não é apenas físico, mas também psicológico, potencializado pela convivência com a dor crônica, podendo levar a situações, como: depressão, isolamento social, baixa autoestima e muitas vezes ao suicídio (TORRES, 2017).

Figura 2 – Tabela D.1 (Apêndice D) do Relatório Mundial Sobre a Deficiência, elaborado originalmente em 2011 pela Organização Mundial da Saúde e Banco Mundial, com destaque para a AR, 19ª colocada dentre as condições com maior prevalência de deficiências moderadas e severas.

Tabela D.1. Prevalência de deficiências moderadas e severas (em milhões), por principal condição de saúde associada à deficiência, por idade e por situação econômica dos países.

Problema de Saúde ^(b, c)	Países de alta renda ^(a) (população total de 977 milhões)		Países de renda baixa e média (população total de 5.460 milhões)		Mundo (população de 6.437 milhões)
	0-59 anos	60 anos ou mais	0-59 anos	60 anos ou mais	Todas as idades
1 Perda de audição ^(d)	7.4	18.5	54.3	43.9	124.2
2 Erros refrativos ^(e)	7.7	6.4	68.1	39.8	121.9
3 Depressão	15.8	0.5	77.6	4.8	98.7
4 Catarata	0.5	1.1	20.8	31.4	53.8
5 Lesões não-intencionais	2.8	1.1	35.4	5.7	45.0
6 Osteoartrite	1.9	8.1	14.1	19.4	43.4
7 Dependência de álcool	7.3	0.4	31.0	1.8	40.5
8 Infertilidade por aborto de risco e sepse materna	0.8	0.0	32.5	0.0	33.4
9 Degeneração macular ^(f)	1.8	6.0	9.0	15.1	31.9
10 Doença obstrutiva crônica pulmonar	3.2	4.5	10.9	8.0	26.6
11 Doença cardíaca isquêmica	1.0	2.2	8.1	11.9	23.2
12 Transtorno bipolar	3.3	0.4	17.6	0.8	22.2
13 Asma	2.9	0.5	15.1	0.9	19.4
14 Esquizofrenia	2.2	0.4	13.1	1.0	16.7
15 Glaucoma	0.4	1.5	5.7	7.9	15.5
16 Alzheimer e outras demências	0.4	6.2	1.3	7.0	14.9
17 Síndrome do pânico	1.9	0.1	11.4	0.3	13.8
18 Doença cérebro-vascular	1.4	2.2	4.0	4.9	12.6
19 Artrite reumatóide	1.3	1.7	5.9	3.0	11.9
20 Dependência de drogas	3.7	0.1	8.0	0.1	11.8

Notas:

a. São considerados países de alta renda aqueles cuja Renda Nacional Bruta per capita era, em 2004, de US\$ 10.066 ou mais, conforme estimativa feita pelo Banco Mundial.

b. Deficiências GBD classe III ou maior.

c. Doença e lesão associadas à deficiência. As condições são listadas em ordem decrescente com prevalência global de todas as faixas etárias.

d. Inclui o estágio inicial de perda de audição em adultos, com exceção dos casos originados por infecções; ajustado para disponibilidade de dispositivos de auxílio à audição.

e. Inclui a apresentação de erros refrativos; ajustado para a disponibilidade de óculos e outros dispositivos corretivos.

f. Inclui outras causas de perda de visão relacionadas com a idade além de glaucoma, catarata e erros refrativos.

Fonte: adaptado pelo autor da OMS (2012).

Nos períodos de atividade inflamatória a AR incapacita o indivíduo para o trabalho, levando à necessidade de afastamentos por auxílio doença, e, frequentemente à aposentadoria por invalidez, com necessidade de recebimento de auxílio pelo governo. Em concordância com esse fato, segundo indicadores do Instituto Nacional do Seguro Social (INSS), no ano de 2016, ocorreram 23.379 concessões de auxílio doença por conta da artrite reumatoide e das artropatias. Assim, além dos impactos físico e psicológico a AR também pode afetar socioeconomicamente o paciente, sua família e a sociedade (TORRES, 2017).

O atraso do diagnóstico e início do tratamento, recorrente nos pacientes brasileiros, dificulta o controle da doença e aumenta as chances de desenvolvimento de sequelas irreversíveis (VAN VILSTEREN *et al.*, 2015). Destaca-se que no Brasil o tempo de espera para consulta com reumatologistas do Sistema Único de Saúde (SUS) leva em média de 2 a 5 anos (TORRES, 2017). Isso é explicado, em parte, pelo fato de existirem apenas cerca de 1.200 profissionais com título de especialista em reumatologia, os quais se concentram nas regiões sul e sudeste (SBR, 2019).

Feito o diagnóstico é necessário que o paciente realize a manutenção do tratamento medicamentoso. No Brasil, o Ministério da Saúde fornece por meio do SUS um conjunto de 23 medicamentos. Entretanto, ocorrem faltas e atrasos no fornecimento, possibilitando a descontinuidade terapêutica e, conseqüentemente, a perda de sua eficácia (TORRES, 2017).

A AR necessita de tratamento com equipe multidisciplinar, ou seja, liderada por um reumatologista, mas associada a outros profissionais da saúde, como psicólogos, terapeutas físicos e ocupacionais, enfermeiros, cirurgiões ortopedistas e assistentes sociais (ARTHRITIS FOUNDATION, 2000). No entanto, no Brasil a dificuldade de acompanhamento multidisciplinar é intensa, pois esses profissionais são raridade no SUS e no setor de convênios (TORRES, 2017).

Além de aspectos clínicos, também há aspectos sociais que devem ser investidos no âmbito da AR. Nesse sentido, é enfatizada a importância da informação e da boa compreensão, por parte do paciente e dos seus familiares, sobre a doença, seu prognóstico e as opções terapêuticas disponíveis. Tal conhecimento pode contribuir para diminuir o isolamento social e quadros depressivos, além de ampliar o acesso aos medicamentos (TORRES, 2017).

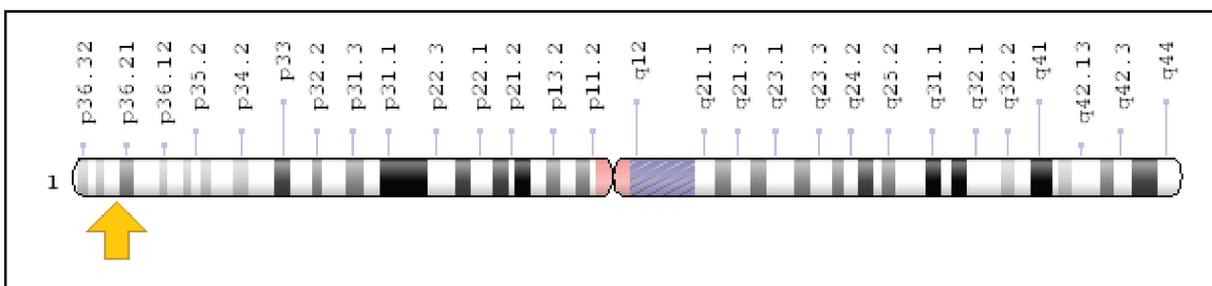
O avanço terapêutico dos medicamentos, nas últimas décadas, tem prevenido deficiências e limitações motoras, o que possibilita maior qualidade de vida às pessoas que convivem com a AR. Atualmente uma pessoa diagnosticada precocemente e tratada de maneira adequada é capaz de ter uma qualidade de vida equiparável a de uma pessoa da mesma idade que não tem a doença (OVERMAN *et al.*, 2014). A esperança de melhores tratamentos ainda

continua com investimentos na pesquisa nas áreas básicas das ciências, incluindo imunologia, biologia molecular e biologia das cartilagens e dos ossos (ARTHRITIS FOUNDATION, 2000).

1.2.4 A Metilenotetrahidrofolato Redutase e sua Associação à Artrite Reumatoide

O gene *MTHFR*, localizado no cromossomo 1, transcreve para a enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase ou simplesmente metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (Figura 3).

Figura 3 – Destaque para a localização molecular do gene *MTHFR* no cromossomo 1 de *Homo sapiens*.



No ser humano, o gene *MTHFR* se localiza na posição 1p36.22 (seta), logo, no braço curto do cromossomo 1, região 3, banda 6, sub-banda 22. Fonte: adaptado pelo autor de NCBI (2019).

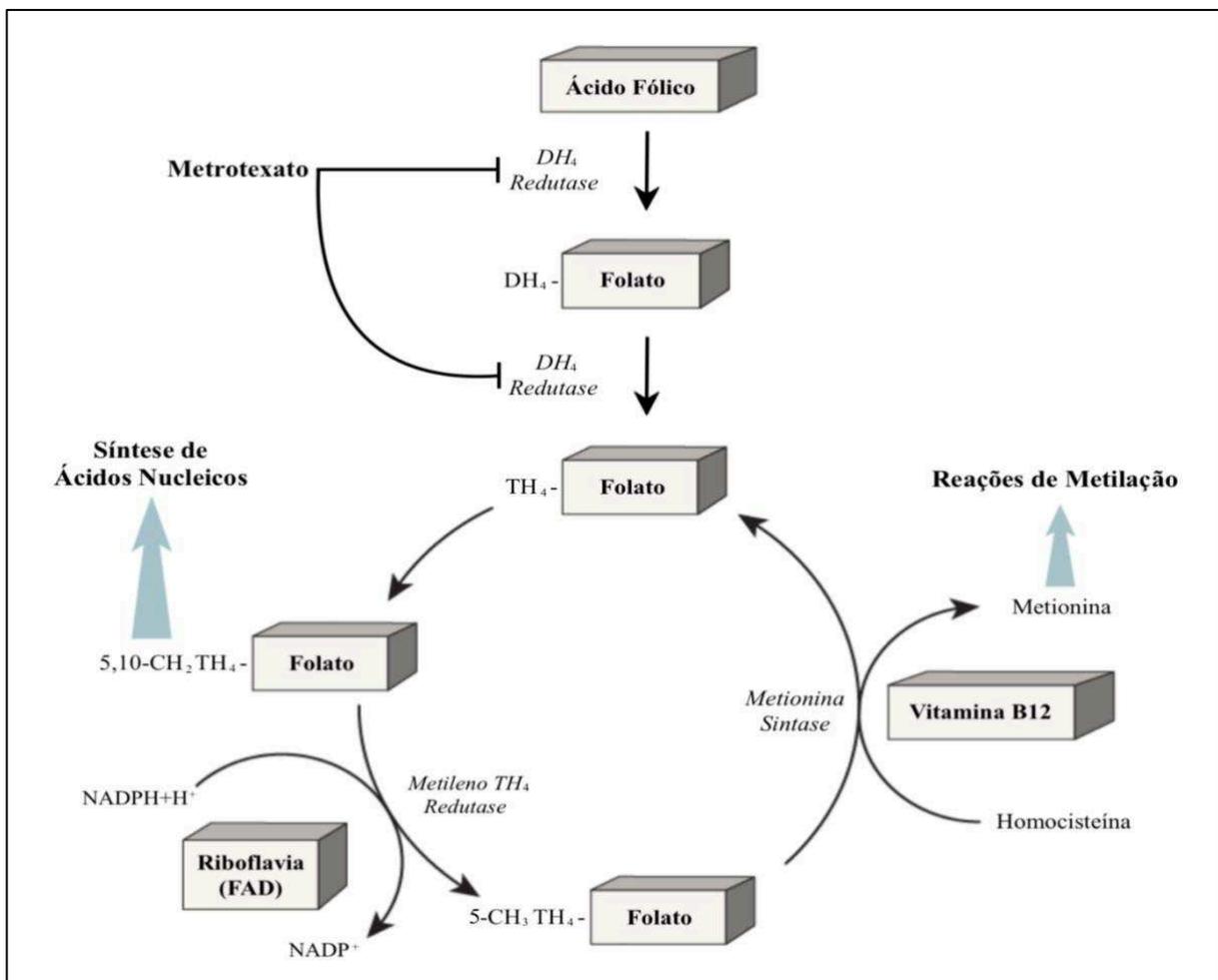
A MTHFR é uma enzima chave no metabolismo de um carbono, grupo de reações assim denominado por terem em comum a transferência de grupos com um único carbono. É encontrada no citosol da maioria das células, com maior concentração em áreas como testículos, cérebro e rins (LECLERC; SIBANI; ROZEN, 2013). A vitamina B2 (riboflavina) é fornecedora do dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) que atua como cofator da reação catalisada pela MTHFR, enzima responsável por reduzir o 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato (LECLERC; SIBANI; ROZEN, 2013). O 5-metiltetrahidrofolato é a forma final do folato no organismo, obtido pela metabolização do ácido fólico/vitamina B9 ingerido na dieta, sendo o principal substrato para a via de transmetilação, em que a homocisteína é remetilada dando origem à metionina (DEAN, 2012). Logo, essa via é a fonte endógena primária da metionina, essencial, dentre outros, para a geração de S-adenosilmetionina (SAM), o principal doador direto de grupos metil nas reações de metilação do DNA (DEAN, 2012; LECLERC; SIBANI; ROZEN, 2013).

Assim, um mal funcionamento da MTHFR pode resultar em baixo nível de metilação do DNA genômico e hiperhomocisteinemia, havendo indícios do envolvimento de ambos os

eventos na patogênese da doença, fazendo do *MTHFR* um gene candidato na suscetibilidade à AR (FUJIMAKI *et al.*, 2009; KLEIN; GAY, 2015).

A metabolização do ácido fólico inicia com a ação da enzima dihidrofolato redutase que o converte em tetrahydrofolato, no entanto ela pode ser inibida pelo fármaco metotrexato (MTX) resultando, por fim, no menor fornecimento de 5,10-metilenotetrahydrofolato, substrato da MTHFR (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática simplificada da via metabólica do ácido fólico, com destaque à atuação da enzima MTHFR na biodisponibilidade do folato. O fármaco MTX pode intervir nesta via diminuindo a disponibilidade do metabólito intermediário tetrahydrofolato.



O ácido fólico (vitamina B9) adquirido pela alimentação é convertido à nível celular em tetrahydrofolato pela enzima dihidro (DH₄) folato redutase, que pode ser inibida pelo fármaco MTX, uma droga antirreumática de primeira escolha empregada na modificação do curso da AR. O tetrahydrofolato, por meio de seguidas reações químicas, é convertido em 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-CH₂-TH₄-Folato), reduzido pela metileno-tetrahidro (TH₄) folato redutase a 5-metiltetrahydrofolato (5-CH₃-TH₄-Folato), reação dependente de FAD. Enquanto o 5,10-CH₂-TH₄-Folato é utilizado na síntese de ácidos nucleicos, o 5-CH₃-TH₄-Folato é necessário para a síntese da metionina utilizada nas reações de metilação. Fonte: adaptado pelo autor de Higdon *et al.* (2015).

O MTX é uma Droga Antirreumática Modificadora do Curso da Doença (DMARD) de primeira escolha em pacientes com AR (MOTA *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2015). Positivamente, o seu custo é relativamente baixo. Contudo, essa droga pode oferecer uma variedade de efeitos adversos que dificultam a continuidade do tratamento, como irritação no estômago, danos hepáticos, feridas na boca, dores de cabeça, tonturas, fadiga e sintomas semelhantes à gripe ou diarreia (TORRES, 2017). Nesse sentido o uso de uma simples vitamina, o ácido fólico, associado ao MTX tem reduzido diversos efeitos colaterais (ARTHRITIS FOUNDATION, 2000). Ainda assim, muitos pacientes parecem não se beneficiar do uso desse medicamento, e necessitam de doses mais altas do que outros. Assim, após dois anos de tratamento 45% dos pacientes necessitam trocar de medicamento. A falta de continuidade no tratamento e o seu atraso podem dificultar os resultados à longo prazo, gerando danos nas articulações, incapacidade, desemprego e mortalidade (PLANT; WILSON; BARTON, 2014).

1.2.5 Polimorfismos de um Único Nucleotídeo no Gene *MTHFR*

Atualmente se considera, por meio dos resultados de sequenciamentos genéticos, que seres humanos diferentes apresentam 99,9% de sua sequência de nucleotídeos idêntica e que quase toda a diferença de 0,1% é devida a diferenças de um único nucleotídeo, seja adenina (A), citosina (C), guanina (G) ou timina (T). Além disso, ambos os alelos³ (selvagem e mutante) são muito comuns na população, ou seja, grande proporção dessas sequências é polimórfica. Assim, essas diferenças entre os indivíduos são denominadas de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

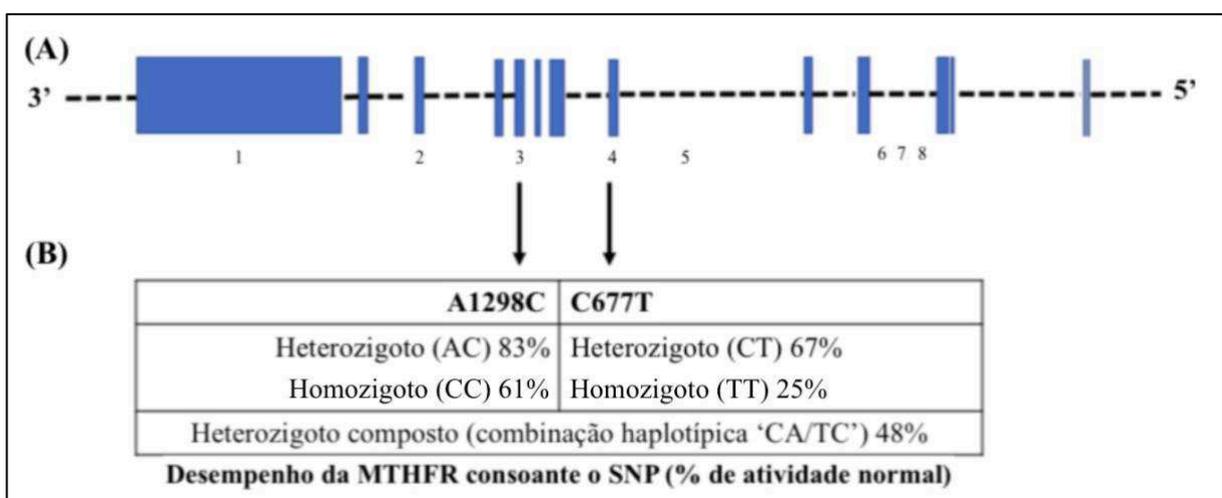
Há SNP que levam à transcrição de anticódons que geram aminoácidos diferentes, provocando alterações à nível fenotípico (mutação referida como ‘*missense*’ ou ‘de sentido trocado’). Para além, há variações alélicas entre cromossomos que não estão localizadas nos genes, ou, porque embora localizadas nos genes, não alteram o produto proteico (mutação ‘silenciosa’). Os SNP são de ocorrência natural, extremamente numerosos, apresentam baixa taxa de mutação e são muito úteis como marcadores moleculares que podem ser usados para localizar regiões de interesse (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

³ Notar que os termos ‘alelo’, ‘locus’, ‘genótipo’ e seus plurais, comumente utilizados ao se referir a genes, designam no âmbito deste trabalho, respectivamente, uma das diferentes formas de um Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP), sua localização e sua composição alélica.

Para detectar um SNP é possível sequenciar um segmento de DNA em cromossomos homólogos e comparar os seguimentos homólogos para descobrir diferenças. No entanto, quando o SNP está localizado em um sítio-alvo de uma enzima de restrição (SNP conhecido como Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição, RFLP) se pode realizar sua detecção por meio da técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase para o Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição). Essa técnica contará com um alelo de RFLP que terá o sítio-alvo da enzima de restrição, enquanto o outro alelo não, de modo que a enzima cortará apenas o DNA no SNP que contém o sítio de restrição alvo, o que poderá ser visto por meio de bandas distintas no gel de eletroforese (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

No gene *MTHFR* há SNP, como o C677T (rs1801133) e o A1298C (rs1801131), que vêm sendo associados a genótipos de risco para AR (BOUGHRARA *et al.*, 2015; SAAD *et al.*, 2015; CEN *et al.*, 2016; SHAKER *et al.*, 2016; YUAN; SHAO; LI, 2017), assim como para a eficácia quanto a incidência de efeitos adversos do MTX (SONG; BAE; LEE, 2014; IQBAL *et al.*, 2015; URIBARRI *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2016; SOUKUP *et al.*, 2017; BERKANI *et al.*, 2017). Esses SNP permitem a funcionalidade por parte da enzima MTHFR, todavia, a exemplo, diminuem a afinidade ao seu cofator, fazendo com que desempenhe insatisfatoriamente sua função (Figura 5), conduzindo à deficiência de 5-metiltetrahydrofolato (DEAN, 2012; LECLERC; SIBANI; ROZEN, 2013).

Figura 5 – Disposição esquemática dos principais SNP no gene *MTHFR* com destaque para C677T e A1298C, associados a diferentes percentuais de deficiência da atividade enzimática.

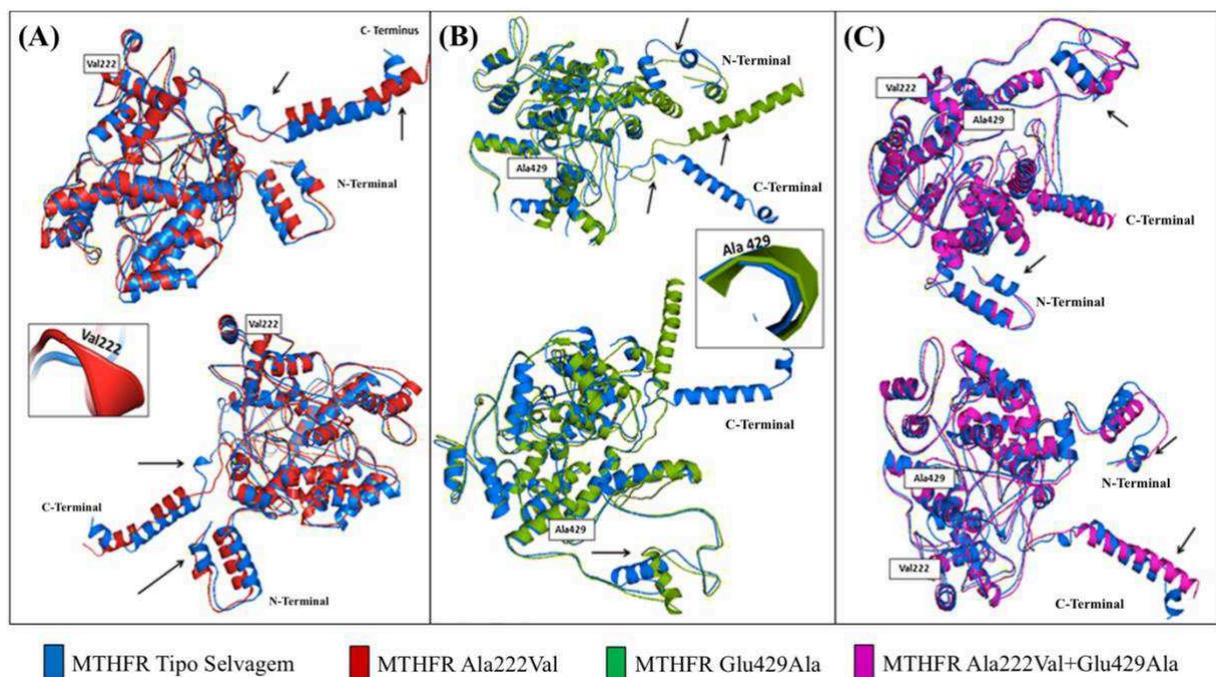


(A) Em azul observa-se os éxons do gene *MTHFR*, com as terminações 5' e 3' representadas à esquerda e à direita, respectivamente. Os números acima das setas representam o número de sequência do SNP, correspondente ao seguinte 'rs' do gene: 1. rs4846080 (A > G); 2. rs1476413 (G > A); 3. rs1801131 (A > C); 4. rs1801133 (C > T); 5. rs17421511 (G > A); 6. rs17037396 (C > T); 7. rs9651118 (T > C); 8. rs17367504 (A > G). (B) Percentual de atividade enzimática em comparação à MTHFR tipo selvagem consoante o genótipo para o SNP C677T e A1298C. Fonte: adaptado pelo autor de Wan *et al.* (2018).

Para ambos os SNP encontrados nos *loci* 677 e 1298 do *MTHFR* a mutação é do tipo de sentido trocado (*missense*). No entanto, no SNP C677T essa é do tipo ‘conservativa’ uma vez que há a substituição de um aminoácido neutro não polar (alanina) por outro de mesma natureza (valina), Ala222Val, enquanto que no SNP A1298C, essa é do tipo ‘não-conservativa’ já que ocorre a troca de um aminoácido polar ácido (glutamato) por um neutro não polar (alanina), Glu429Ala (JADEJA, 2018). As alterações estruturais na proteína MTHFR geradas pela presença dos SNP C677T e A1298C podem ser observadas na Figura 5.

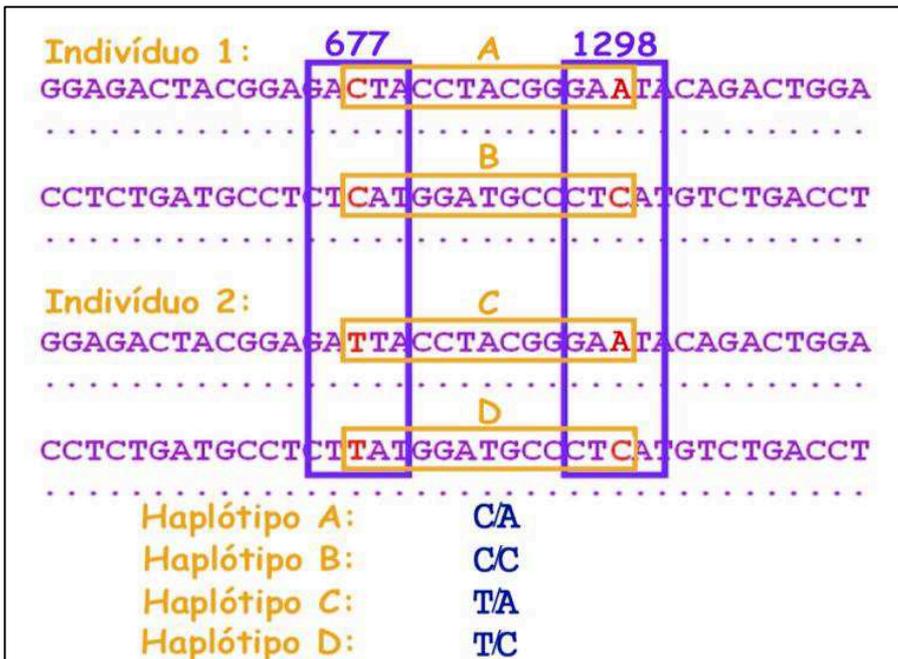
A correlação ou associação não aleatória entre alelos em dois ou mais *loci* é chamada de desequilíbrio de ligação, resultando na ancestralidade compartilhada de uma população de alelos nesses *loci* próximos. A ancestralidade compartilhada denota que esses alelos tendem a ser herdados juntos no mesmo cromossomo, em combinações específicas conhecidos como haplótipos (CLARKE *et al.*, 2011). Logo, o termo haplótipo descreve a combinação de alelos de múltiplos *loci* no mesmo cromossomo homólogo. Para ter o mesmo haplótipo, dois cromossomos homólogos devem compartilhar o mesmo alelo em cada um dos *loci* analisados. Já a existência de genótipos diferentes em até mesmo um *loci* em questão no par de homólogos indica diferentes haplótipos (GRIFFITHS *et al.*, 2013). Neste caso, estando o *locus* 677, com alelos C e T, ligado ao *locus* 1298, com alelos A e C, existem quatro haplótipos possíveis para o segmento cromossômico no qual esses dois *loci* estão localizados (Figura 6).

Figura 6 – Características estruturais da MTHFR na presença e ausência das alterações Ala222Val e Glu429Ala.



As imagens levam em consideração a estrutura da MTHFR tipo selvagem (na ausência de SNP) representada pela cor azul. Essa estrutura da MTHFR é comparada com aquela na presença isolada do SNP C677T (Ala222Val), em vermelho (A), do SNP A1298C (Glu429Ala), em verde (B), e desses dois SNP conjuntamente, em rosa (C). As alterações estruturais estão indicadas por setas. São representadas duas vistas diferentes da MTHFR por condição, dando destaque para a localização dos aminoácidos gerados pela presença do alelo mutante de cada SNP. Fonte: adaptado pelo autor de Jadeja *et al.* (2018).

Figura 7 – Representação esquemática das possibilidades de haplótipos para os SNP C677T e A1298C.



Para os alelos nos *loci* 677 e 1298 são possíveis 4 (quatro) combinações genóticas distintas, das quais 'C/A', 'C/C', 'T/A' e 'T/C'. Fonte: adaptado pelo autor de Villaverde (2011).

Em Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS), os SNP são tipicamente observados em alta densidade em todo o genoma. Embora seja improvável que qualquer simples SNP tenha relevância causal direta na doença, alguns provavelmente estarão em desequilíbrio de ligação com quaisquer variantes causais comuns subjacentes. As matrizes de associação genômica atuais contêm cerca de 1 milhão de SNP e usam padrões conhecidos de desequilíbrio de ligação genômica, de fontes como o *HapMap*, para fornecer a maior cobertura possível de variações genômicas comuns (CLARKE *et al.*, 2011).

Os estudos de genes candidatos, ao contrário dos GWAS, geralmente se concentram na genotipagem de um conjunto menor, porém mais denso de SNP, incluindo polimorfismos funcionais com uma probabilidade potencialmente maior de relevância causal direta (PETTERSSON, 2009).

1.3 JUSTIFICATIVA

A AR apresenta dificuldade diagnóstica e altos índices de morbidade atrelados a consequências biopsicossociais. Nesse contexto, nota-se a necessidade da busca por marcadores genéticos de suscetibilidade que facilitem o processo de diagnóstico da doença. Tal aprimoramento possibilita o início de um tratamento multidisciplinar, precoce e contínuo que permita assegurar a boa qualidade de vida do paciente, gerando impactos positivos a nível de saúde (individual e pública), social e econômico.

Os SNP C677T e A1298C do gene *MTHFR*, caracterizam-se como variantes alélicas que podem predispor o indivíduo ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como AR (BOUGHRARA *et al.*, 2015; SAAD *et al.*, 2015; CEN *et al.*, 2016; SHAKER *et al.*, 2016; YUAN; SHAO; LI, 2017). O estudo pioneiro desses SNP na população de SC, quando unido aos demais estudos que relacionam variantes à suscetibilidade à AR, pode contribuir para que os pacientes catarinenses tenham acesso a um diagnóstico personalizado, que leve em consideração as características genéticas individuais.

A investigação da associação dos polimorfismos nas regiões 677 e 1298 do gene *MTHFR* à predisposição à AR também fornece base e estimula o desenvolvimento de pesquisas que visem relacionar esses SNP à eficácia e/ou toxicidade dos medicamentos utilizados no tratamento dessa doença crônica, fornecendo subsídios para a monitorização farmacogenética da terapêutica.

O estudo dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* também pode auxiliar na compreensão da etiologia da AR. Dessa maneira, as descobertas do presente trabalho virão a somar com os atuais conceitos de etiologia multifatorial e poligênica de doenças autoimunes.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Investigar a associação de dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do gene *MTHFR* (C677T e A1298C) à predisposição à artrite reumatoide (AR), por meio de um estudo de caso-controle (ECC) envolvendo a população do estado de Santa Catarina (SC).

1.5.2 Objetivos Específicos

- Traçar o perfil epidemiológico (idade, sexo biológico, origem étnico-racial e naturalidade) das populações amostrais para, por congruência, selecionar o grupo controle a partir dos pacientes;
- Identificar o genótipo dos indivíduos amostrados para os SNP C677T e A1298C do gene *MTHFR*, por meio da técnica de PCR-RFLP;
- Estabelecer as frequências alélicas e genotípicas das posições polimórficas 677 e 1298 do gene *MTHFR* para as populações estudadas (pacientes e grupo controle);
- Verificar a representatividade da amostra por meio do cálculo de aderência à lei do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e da análise da diferenciação genética dos grupos amostrais;
- Determinar se os SNP estudados são herdados em blocos (linkage) e estão em desequilíbrio de ligação;
- Comparar caso-controle para avaliação do papel dos diferentes alelos, genótipos e haplótipos dos genes estudados na suscetibilidade à AR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS E DE AMOSTRAGEM

A presente pesquisa é fruto de um subprojeto, com cadastro atualizado via Formulário de Pesquisa no NOTES-UFSC (2018.08476), que integra aquele intitulado ‘Genética da Autoimunidade: Polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em Pacientes de Santa Catarina’, coordenado pela Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) em 14/10/2013 por meio do parecer consubstanciado número 423.535 (ANEXO A). Ademais, o mesmo figura como “pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP”, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, podendo a autenticidade de sua aprovação ser confirmada via Plataforma Brasil (plataformabrasil.saude.gov.br) informando o título da pesquisa, número de parecer e/ou número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética, CAAE (19430913.0.0000.0121).

Prezando pela validação externa dos resultados a serem obtidos, estabeleceu-se um número amostral inicial mínimo de 100 (cem) indivíduos. Para isso, por mais que os SNP estudados não se caracterizem como raros, teve-se em consideração sobretudo a própria definição quantitativa de polimorfismo, caracterizado como uma variante comum com frequência alélica mínima (MAF) $> 1\%$, ou seja, de que se observe ao menos uma pessoa em cem que possua o alelo mutante (CLARKE *et al.*, 2011). Assim sendo, o número amostral máximo atingido foi um racional entre o pressuposto supracitado e a disponibilidade de amostras de pacientes portadores de AR.

De igual modo, pela inviabilidade da amostragem da população-fonte deste estudo a partir da população geral (o que seria o ideal) devido ao percentual de incidência da doença estudada, procedeu-se à análise de um possível viés de seleção, afinal, como sublinham Baptista e Campos (2016, página 128), “*o tipo de população-fonte utilizado em um ECC (Estudo de Caso Controle) está diretamente relacionado com a validade da pesquisa*”. Nesse tocante, a diversidade da constituição étnica, e consequentemente genética, brasileira é o principal fator que levou o autor à análise de dados epidemiológicos sobre a procedência geográfica (vide o item ‘Caracterização da Amostra’).

Para os autores supracitados, em casos como este em que não se pode amostrar da população-geral, o uso de hospitais abrangentes ou de referência pode favorecer a

representatividade da amostra, ao menos com maior confiabilidade do que a oferecida pelos estudos com amostras de conveniência (clínicas e hospitais particulares). Isso se justifica pelo fato desses hospitais geralmente atenderem a maior parte dos casos da região em que estão localizados. Entretanto, há de se ter em conta que eles podem não prestar atendimento apenas à população regional e sim a uma população encaminhada de outras áreas geográficas, caracterizando o que Gray (2004) nomeou de população-fonte hipotética, ou seja, aquela população cuja definição se relaciona aos encaminhamentos e à busca de cuidado e não ao limite geográfico.

Essa e outras situações, tais quais o fato de a taxa de internação da população geral não se assemelhar a da população do hospital, de as pessoas hospitalizadas exibirem uma gravidade mais acentuada de seus quadros clínicos do que as não hospitalizadas e de os pacientes internados poderem apresentar outras enfermidades que se relacionem ao evento de interesse que não foram evidenciadas no estudo, representam um viés de seleção peculiar a esse tipo de população-fonte, designado viés de Berkson, que limita os resultados da utilização desse tipo de população-fonte no ECC (GRAY, 2004; GREENBERG *et al.*, 2005; FLETCHER; FLETCHER; FLETCHER, 2014; ROUQUAYROL; GURGEL, 2018).

2.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DOS DADOS E AMOSTRAS

O grupo amostral de casos se constituiu por 161 pacientes com AR, tendo como população-fonte o Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da UFSC (HU-UFSC), onde estes eram atendidos. Os pacientes foram entrevistados por pesquisadores do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE-UFSC) para o preenchimento de questionário estruturado (Anexo B) mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo C). Tais questionários permitiram obter dados de identificação, epidemiológicos e da terapêutica, para além de parâmetros clínicos, os quais foram cruzados com os dados de interesse constantes dos prontuários médicos, também analisados. Após a entrevista 10mL de sangue periférico de cada paciente foram coletados e transferidos para tubo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

A amostra do grupo controle contou com 161 voluntários hígidos e sem grau de parentesco conhecido com portadores de AR, participantes (1) do Núcleo de Estudo da Terceira Idade (NETI) associado à UFSC e (2) da Associação Amigos do Hospital Universitário (AAHU). Após concordância com seus termos e assinatura do TCLE (ANEXO E), informações de identificação, epidemiológicas, características terapêuticas e parâmetros clínicos também

foram obtidas por meio de questionário estruturado (ANEXO D), seguido da coleta de sangue periférico.

Para ambos os grupos esta pesquisa foi conduzida utilizando-se das amostras disponíveis no banco de sangue e informações cadastradas no banco de dados do LAPOGE, o LAPOGEdb (lapoge.ufsc.br).

Todas as amostras de sangue contendo EDTA foram, na ocasião da coleta, centrifugadas (206 BL Excelsa II[®], Fanem) a 3000 rotações por minutos (RPM), ou 806,4G (Força Centrífuga Relativa ou Força Gravitacional), durante 20 minutos à temperatura ambiente para separação de seus componentes. Após a centrifugação, foram isolados, aliqüotados e identificados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada leuco-plaquetária (*buffy coat*). Enquanto o plasma e o concentrado de hemácias foram estocados a -80°C para futuras pesquisas, a camada leuco-plaquetária foi armazenada a -20°C e se destinou à obtenção do DNA genômico (gDNA).

2.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

A extração de gDNA foi realizada por membros do LAPOGE de acordo com o método descrito por SAMBROOK e colaboradores (2001), para células de sangue periférico, utilizando proteinase K e fenol. Após a extração, uma alíquota de DNA foi quantificada através da absorvância em 260nm e 280nm em espectrofotômetro NanoVue Plus[®] (GE Healthcare) e diluída à concentração final de 20 µg/mL, padrão laboratorial. Os DNA extraídos foram estocados a -20°C em refrigeradores adequados a esta finalidade.

2.4 GENOTIPAGEM

2.4.1 Amplificação das Regiões de Interesse do DNA por PCR

A PCR-RFLP foi a técnica de eleição na genotipagem dos indivíduos para os polimorfismos genéticos em estudo. Desse modo, inicialmente, os fragmentos de DNA que flanqueiam as posições dos SNP C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131) do gene *MTHFR* foram replicados por reação enzimática de polimerização *in vitro*. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados como molde para a amplificação enzimática dos segmentos contendo as posições 677 e 1298, descritas por YI e colaboradores (2002) para aquele e FROSST e colabores (1995) para este, são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos *primers* utilizados na amplificação por PCR dos fragmentos de DNA do gene *MTHFR* que contêm os SNP C677T e A1298C.

	Sequência (5' → 3')	T _m (°C)
<i>MTHFR 677</i>		
Senso	TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA	66,6
Antissenso	AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG	65,3
<i>MTHFR 1298</i>		
Senso	CAA GGA GGA GCT GCT GAA GA	62,1
Antissenso	CCA CTC CAG CAT CAC TCA CT	62,1

T_m, temperatura de *melting*. Os nucleotídeos representados em **negrito** englobam no todo ou em parte as sequências de reconhecimento das enzimas de restrição. Os *primers* intrônicos são distinguidos por grafia em *itálico*. Fonte: elaborada pelo autor a partir de Frosst *et al.* (1995) e Yi *et al.* (2002).

As PCR foram conduzidas numa mistura reacional de 25µl contendo: 20mM de tris HCL, pH8,4, e 50mM de KCl (Invitrogen® 10x PCR Buffer - Thermo Fisher Scientific); 1,0-1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP); 0,12µM de cada um dos iniciadores S e AS para as posições 677 e 1298; 1,25 unidades de *Taq* DNA-polimerase Invitrogen Platinum® (Thermo Fisher Scientific); e 2,4-3,2ng de DNA genômico (gDNA), sendo o restante do volume de reação completado com o equivalente em água deionizada.

As misturas reacionais foram incubadas no termociclador Veriti® 96-Well (Applied Biosystems) adotando o seguinte protocolo: 95°C por 5 minutos para ativação da *Taq* DNA-polimerase seguido de 40 ciclos repetidos de amplificação (desnaturação a 95°C por 1 minuto; anelamento a 63°C por 1 minuto para região que contém a posição 677, e, a 67°C por 1 minuto para que contém a 1298 ; extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final da cadeia a 72°C por 7 minutos.

2.4.2 Verificação da Amplificação por Eletroforese

A fim de fundamentar a progressão à etapa seguinte do protocolo, foi verificada a amplificação das regiões de interesse e qualidade do material genético por meio de eletroforese em gel de agarose, onde a comparação das bandas formadas pelos conglomerados de moléculas de DNA de mesmo tamanho com o marcador de peso molecular permitiu suas distinções. Após adição do corante fluorescente GelRed® (Biotium) e solução carreadora (3,7mM de azul de bromofenol + 1,2M de sacarose), procedeu-se à corrida das amostras em gel à concentração de 2% submerso em tampão TBE (44,6mM de tris base + 5,7mM de tris HCL + 44,5mM de ácido bórico + 1,3mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, pH 8,0) por um período de 60

(sessenta) minutos (400mA, 100V). A leitura foi realizada por transluminação com luz ultravioleta (UV) seguida de fotodocumentação, permitindo constatar que a PCR da região contendo a posição 677 gera um produto de 198 pares de base (pb), enquanto o produto da região que contém a posição 1298 apresenta 128 pb. Nos casos de leitura imprecisa, sobretudo, recorreu-se ao software livre de análise de imagem GelAnalyser® (gelanalyzer.com) a fim de tornar a leitura dos resultados em gel o mais fidedigna possível. Por uma questão de transparência, os resultados desta etapa foram depositados em nuvem estando disponíveis para acesso em sua íntegra por meio do link: drive.google.com/drive/folders/1ZnT_sW6QOHd82f2e68qly4PM-Pf6GFN1?usp=sharing.

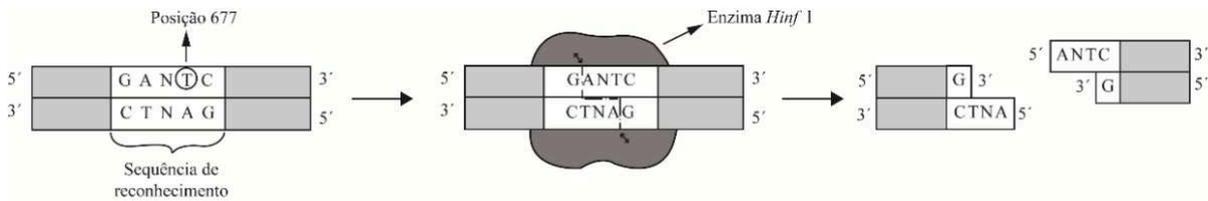
2.4.3 Digestão Enzimática por RFLP

As variantes de nucleotídeos das regiões amplificadas foram identificadas através da digestão dos fragmentos por enzimas de restrição específicas que clivam fragmentos de DNA quando identificam sítios ditos de restrição, reconhecidos por sua singularidade. Esses sítios de restrição podem ser criados ou eliminados esporadicamente pela presença de um polimorfismo ou mutação na região estudada (STRACHAN; READ, 2013). A variabilidade entre os tamanhos dos fragmentos permite identificar se a enzima de restrição clivou o fragmento, possibilitando, assim, verificar se os indivíduos possuem ou não as substituições estudadas.

Aqui duas alterações em um único par de nucleotídeos foram exploradas: a substituição de C por T na posição 677 e de A por C na posição 1298. Para tanto, fez-se uso de duas diferentes enzimas: (a) *HinfI*, endonuclease de restrição do tipo IIP (sistema de reconhecimento de nucleotídeos e clivagem em um único domínio), que reconhece o SNP na região 677, conforme demonstra a Figura 7; e (b) *MboII*, endonuclease de restrição do tipo IIS (sistema de reconhecimento de nucleotídeos e clivagem em dois diferentes domínios), que reconhece o SNP na região 1298, como ilustrado na Figura 8.

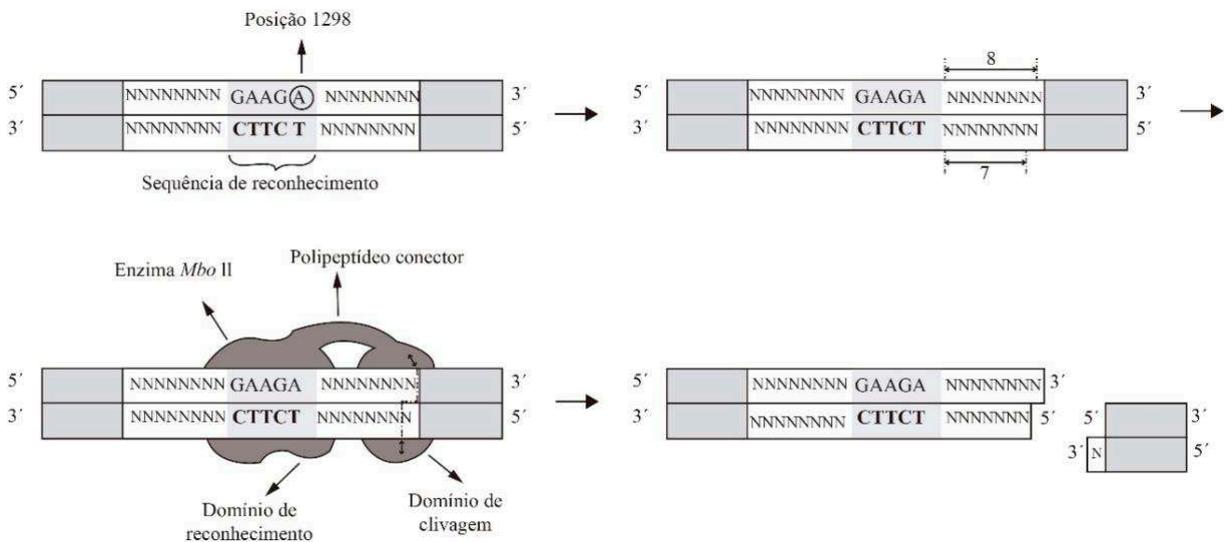
As condições para a digestão em por RFLP seguiram as recomendações descritas pelo fabricante (New England BioLabs, Ipswich, MA), utilizando-se para ambas as enzimas de restrição o tampão CutSmart® (500mM de acetato de potássio; 200mM de tris acetato; 100mM de acetato de magnésio; 100µg/mL de soro albumina bovina - BSA; pH 7,9 à 25°C). O protocolo de incubação para a digestão do fragmento contendo o SNP A1298C foi otimizado para que funcionasse alinhado ao daquele contendo o SNP C677T, logo, também em banho-maria à 37°C por um mínimo de 12 horas (*overnight*).

Figura 8 – Atuação da enzima *Hinf*I no polimorfismo de sítio de restrição C677T



Representação esquemática do reconhecimento e clivagem realizados pela enzima *Hinf*I no sítio de restrição de sequência G↓ANT↑C, efetuados a quando da presença do alelo mutante ‘T’ na posição 677 do gene *MTHFR*. Notar que a restrição é realizada dentro da sequência de reconhecimento, que caracteriza-se por ser palindrômica. ‘N’ corresponde a um nucleotídeo com qualquer uma das bases nitrogenadas. Fonte: o autor (design gráfico por Alessandra Vidal Dias[®]).

Figura 9 – Atuação da enzima *Mbo*II no polimorfismo de sítio de restrição A1298C



Representação esquemática do reconhecimento e clivagem realizados pela enzima *Mbo*II em um dos sítios de restrição de sequência GAAGAN₇↑N↓, efetuados a quando da presença do alelo selvagem ‘A’ na posição 1298 do gene *MTHFR*. Destaca-se que mediante as características estruturais da enzima, a restrição é realizada adjacente à sequência de reconhecimento, que se caracteriza por ser assimétrica. ‘N’ corresponde a um nucleotídeo com qualquer uma das bases nitrogenadas. Fonte: o autor (design gráfico por Alessandra Vidal Dias[®]).

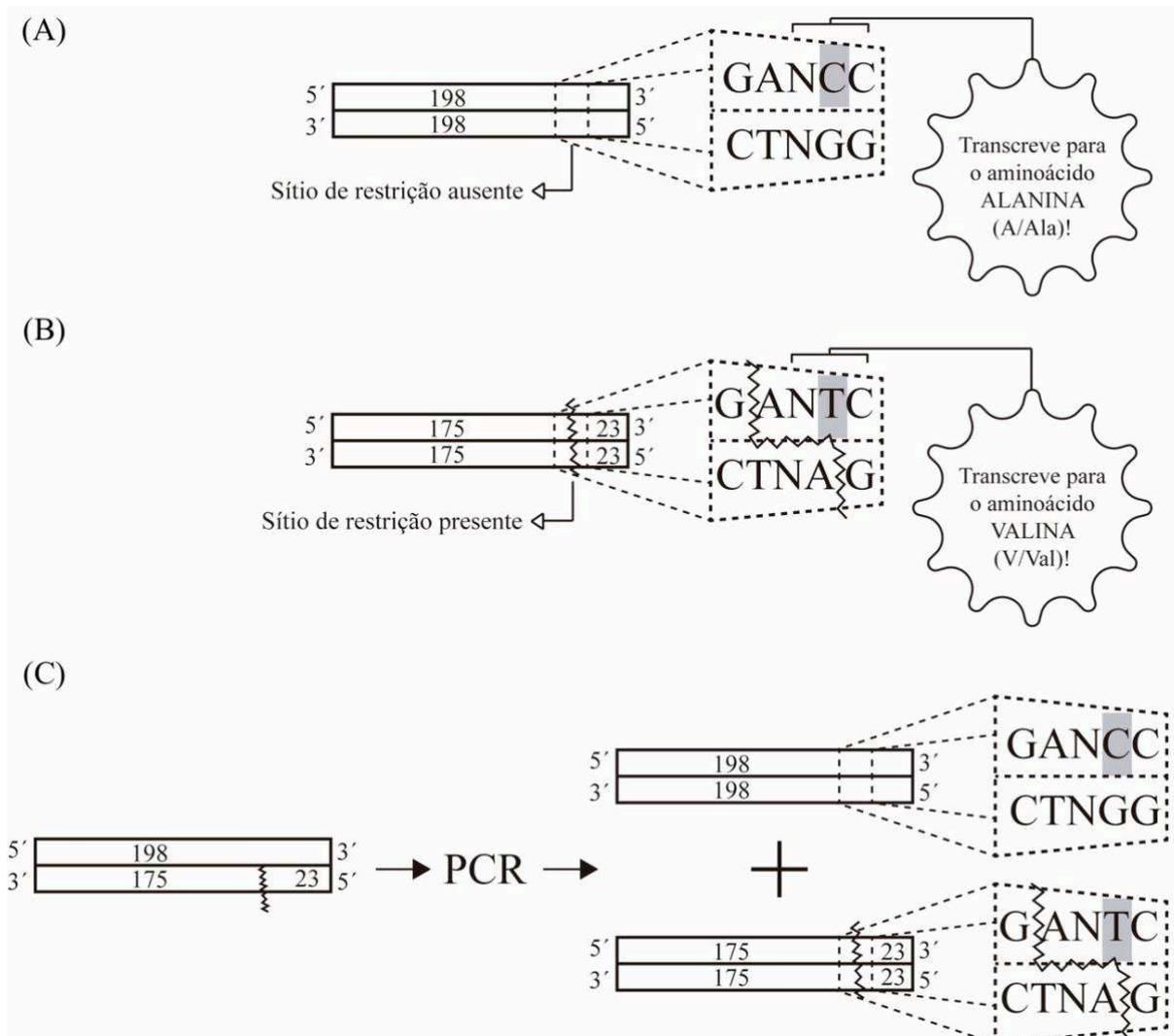
2.4.4 Identificação Genotípica por Eletroforese

A caracterização genotípica dos pacientes e indivíduos controle foi realizada em seguida à digestão enzimática por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose (4,5%; 400mA; 100V; 75 minutos). A visualização dos fragmentos nos géis ocorreu por meio do fotodocumentador MiniBIS Pro[®] (DNR Bio-Image Systems) e o resultado fora arquivado em formato digital por meio do software GelCapture[®]. As análises das imagens ocorreu a posteriori com o auxílio, de igual modo, do programa GelAnalyser[®] para resolução de casos pendentes,

podendo ser acessadas pelo link: drive.google.com/drive/folders/1hVucHUIpZhBSdXLXn8jATVCTXVfWCgGX?usp=sharing.

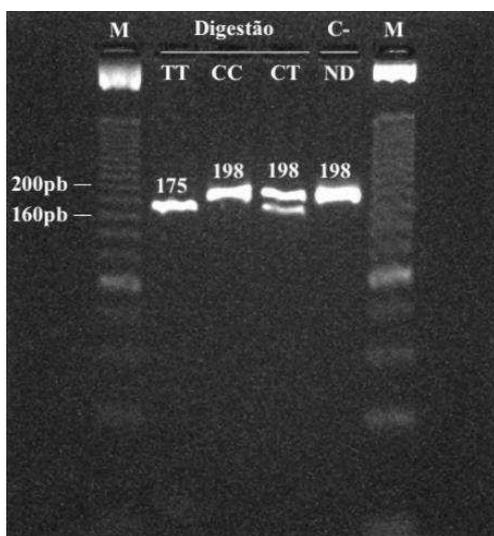
A atuação da enzima *Hinf*I sobre o produto da amplificação por PCR da região que contém a posição 677, gera três situações possíveis: (1) a não digestão do produto devido à ausência do sítio de restrição, o que corresponde ao genótipo CC (Figura 9A); (2) a digestão total do produto, gerando fragmentos menores, de 175 e 23pb, correspondendo aos indivíduos de genótipo TT (Figura 9B); e (3) a digestão parcial do produto por se tratar de indivíduo de genótipo CT (heterozigoto), possibilitando a observação de fragmentos de 198, 175 e 23pb (Figura 9C). A Figura 10 apresenta a fotografia de um gel de agarose após corrida eletroforética, exemplificando como as identificações genótípicas pelas situações acima descritas foram conduzidas.

Figura 10 – Representação esquemática dos possíveis resultados da PCR-RFLP consoante o genótipo do indivíduo para o SNP *MTHFR* C677T.



Em (A) é demonstrada a não digestão do produto de 198pb oriundo da PCR devido à ausência do sítio de restrição em ambas as fitas do DNA, o que permite inferir que neste caso a pessoa é homocigota para C na posição 677. A trinca composta pelos nucleotídeos da posição 677 e das duas posições a ela adjacentes (direita e esquerda), constitui um códon que transcrito traduzirá para o aminoácido **alanina**. Já no caso de indivíduos homocigotos para T, item (B), ocorre a digestão total do produto de PCR devido à presença do sítio de restrição nas duas fitas, produzindo fragmentos de 175 e 23pb. Nesse caso, a sequência composta pelos nucleotídeos da posição 677 e das duas posições diretamente adjacentes a ela, constitui um códon que transcrito traduzirá para o aminoácido **valina**. Por fim, em (C), é exemplificado o caso de uma pessoa heterocigota (CT), em que uma das fitas de DNA apresenta o sítio de restrição e a outra não, sendo que a digestão do produto de PCR gerará fragmentos de 198, 175 e 23pb. Fonte: o autor (design gráfico por Alessandra Vidal Dias[©]).

Figura 11 – Gel de agarose contendo os produtos da digestão da região que flanqueia o SNP C677T após separação por eletroforese (etapa final da PCR-RFLP).

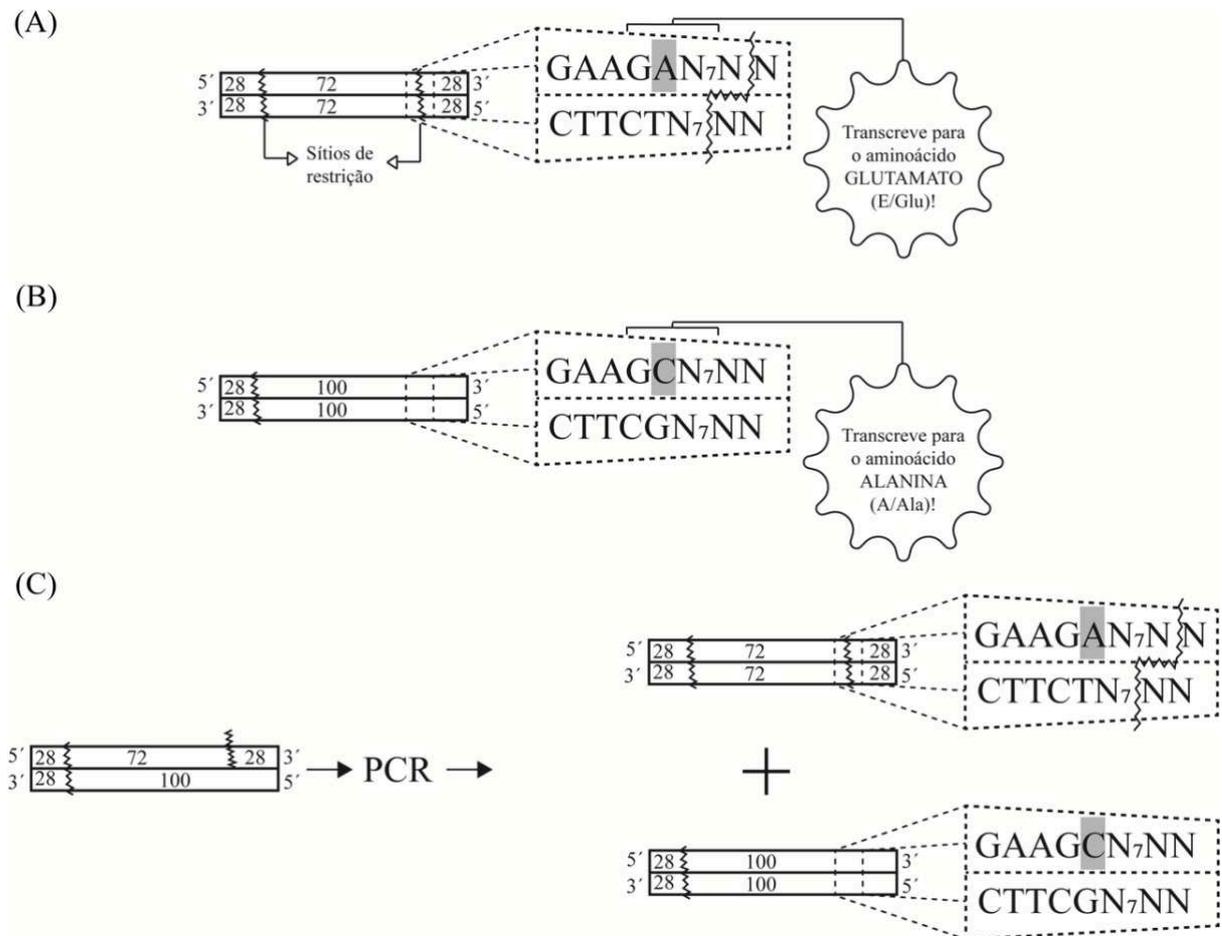


Fotografia de gel à concentração de 4,5% em que a transluminação por luz UV permite a visualização do corante intercalado aos fragmentos de DNA. A digestão da região que contém a posição 677 do gene *MTHFR*, permite que se visualize fragmentos de DNA de dois tamanhos, 198 e 175pb, que indicam a presença dos alelos C e T, respectivamente. Assim, as amostras pertencentes aos indivíduos que, após corrida eletroforética, apresentam apenas um fragmento com 198pb indicam homocigose para o alelo selvagem (CC); as que exibem fragmento com 175pb indicam homocigose para o alelo mutante (TT); e a presença de dois fragmentos, um com 198 e outro com 175pb, é indicio de heterocigose para o SNP (CT). A presença da banda de 23pb é subentendida, pois encontra-se na zona de fronteira da resolução do gel. Algumas bandas são assinaladas para facilitar a interpretação. M, marcador de peso molecular com 20pb de diferença entre os fragmentos. C-, controle negativo de digestão. ND, não digerido. Fonte: o autor.

Por sua vez, a ação da enzima *MboII* sobre o produto de PCR de 128pb contendo a posição 1298, gera também três possíveis situações: (1) os indivíduos homocigotos AA, por contarem com dois sítios de restrição, apresentam três fragmentos, um de 72pb e dois de 28pb (Figura 11A); (2) os indivíduos homocigotos CC apresentam apenas dois fragmentos, sendo um de 100pb e o outro de 28pb, pois a substituição acarreta na alteração de um dos sítios de restrição (Figura 11B); e (3) os indivíduos AC (heterocigotos) são identificados pela presença

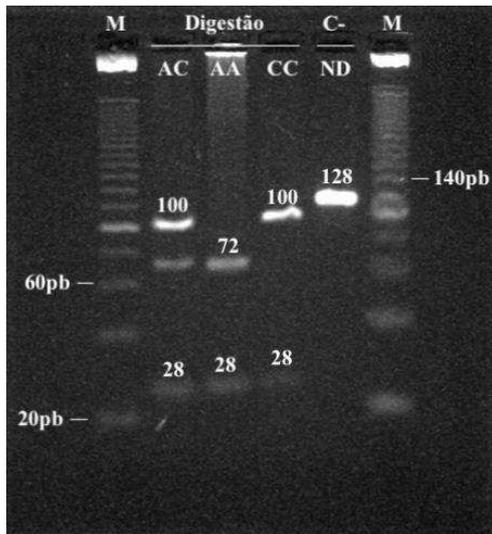
de três fragmentos, de 100, 72 e 28pb (Figura 11C). A fotografia de um gel de agarose resultante de corrida eletroforética pode ser observado na Figura 12, o qual exemplifica como se deram as identificações genóticas pelas situações acima descritas.

Figura 12 – Representação esquemática dos possíveis resultados da PCR-RFLP consoante o genótipo do indivíduo para o SNP *MTHFR* A1298C.



Em (A) é demonstrada a digestão total do produto de 128pb oriundo da PCR devido à presença de dois sítios de restrição em ambas as fitas do DNA, produzindo fragmentos de 72 e 28pb, o que permite inferir que neste caso a pessoa é homocigota para A na posição 1298. A trinca composta pelos nucleotídeos da posição 1298 e das duas posições a ela adjacentes (direita e esquerda), constitui um códon que transcrito traduzirá para o aminoácido **glutamato**. Já no caso de indivíduos homocigotos para C, item (B), ocorre a digestão parcial do produto de PCR devido à presença de um único sítio de restrição em cada uma das fitas, produzindo fragmentos de 100 e 28pb. Nesse caso, a sequência composta pelos nucleotídeos da posição 1298 e das duas posições diretamente adjacentes a ela, constitui um códon que transcrito traduzirá para o aminoácido **alanina**. Por fim, em (C), é exemplificado o caso de uma pessoa heterocigota (CT), em que uma das fitas de DNA apresenta um único sítio de restrição e a outra ambas, sendo que a digestão do produto de PCR gerará fragmentos de 100, 72 e 28pb. Fonte: o autor (design gráfico por Alessandra Vidal Dias[®]).

Figura 13 – Gel de agarose contendo os produtos da digestão da região que flanqueia o SNP A1298C após separação por eletroforese (etapa final da PCR-RFLP).



Fotografia de gel à concentração de 4,5% em que a transluminação por luz UV permite a visualização do corante intercalado aos fragmentos de DNA. A digestão da região que contém a posição 1298 do gene *MTHFR*, permite que se visualize fragmentos de DNA de três tamanhos, 100, 72 e 28pb. As amostras pertencentes aos indivíduos que, após corrida eletroforética, apresentam apenas os fragmentos com 72 e 28pb indicam homozigose para o alelo selvagem (AA); as que exibem apenas os fragmentos com 100 e 28pb indicam homozigose para o alelo mutante (CC); e a presença de todos os três fragmentos, 100, 72 e 28pb, é indicio de heterozigose para o SNP (AC). Algumas bandas são assinaladas para facilitar a interpretação. M, marcador de peso molecular com 20pb de diferença entre os fragmentos. C-, controle negativo de digestão. ND, não digerido. Fonte: o autor.

2.5 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de se obter maior acurácia nas análises estatísticas a que os resultados da genotipagem seriam submetidos, inicialmente foi conduzido o que o autor por conveniência nomeou de ‘semipareamento’. Em suma, de um pequeno banco de indivíduos controle genotipados em parceria com outro integrante do LAPOGE, selecionou-se aqueles que se aproximavam em idade, sexo biológico e origem étnico-racial aos pacientes até obter-se semelhante percentual em relação a estas características, atingindo a proporção caso-controle aproximada de 1:1. Assim sendo, o método caso-controle aqui utilizado caracteriza-se por uma mistura de pareado com não-pareado, logo, modificado (BAPTISTA; CAMPOS, 2016).

Na comparação entre grupo caso e grupo controle, lançou-se mão de métodos estatísticos clássicos de análise epidemiológica para este tipo de desenho experimental (BORGAN *et al.*, 2018). De início, estabeleceu-se as frequências alélicas e genotípicas nos pacientes com AR e indivíduos controle para os polimorfismos nas posições 677 e 1298. A seguir, foi verificado se as distribuições gênicas em ambos os grupos eram passíveis de seguir um padrão de flutuação ao longo das gerações, logo, se se encontravam em equilíbrio de Hardy-

Weinberg (EHW). Feito isso, dado pertencerem ao mesmo gene, confirmou-se estatisticamente se os dois *loci* são herdados em bloco (*linkage*), o que conduz à associação não aleatória entre seus alelos (desequilíbrio de ligação). Admitido que se poderia tomar os alelos e genótipos dos dois *loci* como haplótipos e diplótipos, respectivamente, procedeu-se ao cálculo de frequência das combinações genótípicas e haplotípicas. Por fim, a análise de associação por meio da estatística *odds ratio* (OR) permitiu pressupor se dado alelo, genótipo, haplótipo e/ou diplótipo do SNP C677T ou A1298C ofereceria suscetibilidade ao desenvolvimento de AR.

O nível de confiança adotado para todos os teste de hipótese conduzidos foi de 95%, o que significa dizer que para cada teste estatístico 95% dos intervalos de confiança (IC) construídos a partir das amostras contiveram o resultado calculado. Sendo o nível de significância o complemento do nível de confiança, assumiu-se um valor de p menor que 0,05 (5%) como a probabilidade de erro, logo, de que as associações realizadas fossem espúrias.

2.5.1 Estimativas das frequências alélicas e genótípicas

As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos nas posições 677 e 1298 do gene *MTHFR* em pacientes e grupo controle foram estimadas por contagem direta. Para validação dos cálculos foi utilizado a versão 4.2 do pacote de softwares livre de análises estatísticas para genética de populações GENEPOP® (disponível em wbiomed.curtin.edu.au/genepop), que adota em suas estimativas as equações:

$$x_i = \frac{2n_i + \sum n_{ij}}{2n} \quad (1)$$

e

$$X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \quad (2)$$

Em que:

x_i é a frequência do alelo “ i ”;

X_{ii} é a frequência do genótipo “ ii ”;

n_{ii} e n_{ij} se referem ao número de homocigotos e heterocigotos observados para o alelo i , respectivamente; e

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

2.5.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O princípio de Hardy-Weinberg estabelece um padrão teórico para o comportamento alélico ao longo das gerações. Na prática, ele ajuda a perceber se a população se encontra ou não em equilíbrio, chamando a atenção para os possíveis fatores evolutivos que estão atuando.

Assim sendo, a fim de poder se trabalhar com as observações feitas ao nível gamético, fez-se necessário verificar se as frequências gênicas observadas se aderem às proporções de Hardy-Weinberg, para o que se pode aplicar a expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2 x_i x_j + 2x_j^2 \quad (3)$$

Em que:

x_i^2 é a frequência esperada de homozigotos para o alelo i ;

$2 x_i x_j$ é a frequência esperada do heterozigoto ij ; e

$2x_j^2$ é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

No caso do presente estudo a adesão foi estimada por meio do teste de probabilidade (“teste exato de Hardy-Weinberg”) disponível no programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995a; ROUSSET, 2008), versão 4.2. A hipótese nula de ‘união aleatória dos gametas’ foi testada pelo programa por meio da estatística de qui-quadrado (χ^2), com estimativa sem viés dos valores exatos de p pelo método da cadeia de Markov (GUO; THOMPSON, 1992). O valor p , por sua vez, é obtido a partir da distribuição χ^2 , como a probabilidade de se encontrar um valor maior ou igual ao valor de χ^2 calculado com os dados observados. O teste de χ^2 de aderência é utilizado quando se objetiva verificar se proporções/frequências observadas estão de acordo com proporções/frequências previstas ou esperadas por teorias ou hipóteses, cujo cálculo se dá pela seguinte equação somatória:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad (4)$$

Em que:

O_{ij} é a frequência genotípica observada de homozigotos para o alelo selvagem, heterozigotos ou homozigotos para o alelo mutante; e

E_{ij} é a frequência genotípica esperada para as mesmas categorias.

2.5.3 Desequilíbrio de Ligação Genotípica

A fim de confirmar a pressuposição teórica de herança em bloco (*linkage*) dos sítios polimórficos em estudo devido à proximidade física, testou-se a hipótese de desequilíbrio de ligação. Assim foi explorado se os genótipos em um *locus* independem ou não dos genótipos do outro *locus*. Para tanto, foi empregado o teste de razão de verossimilhança (teste G) para cada par de *loci* em cada população, utilizando o algoritmo da cadeia de Markov (RAYMOND; ROUSSET, 1995b), disponível no programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995a; ROUSSET, 2008), versão 4.2.

2.5.4 Diferenciação Genética dos Grupos Amostrais

Com a análise da diferenciação gênica e genotípica das populações, buscou-se verificar se os grupos caso e controle assemelhavam-se geneticamente, pois esta confirmação serviria de garantia extra acerca da homogeneidade da amostra e adequada genotipagem. Novamente recorreu-se à versão 4.2 do programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995a; ROUSSET, 2008). Neste caso o software gera automaticamente tabelas de contingência RxC para comparação de cada *locus* por par de populações, sendo R o número de populações e C o número de alelos para cada *locus*. Assim, duas hipóteses nulas foram testadas: de que (a) os alelos compartilham da mesma distribuição em ambas as populações, e de que (b) os genótipos compartilham da mesma distribuição em ambas as populações. A estimativa dos valores de *p* foi realizada aplicando o teste G exato baseado na função de log-verossimilhança, correspondente a opção padrão fornecida pelo programa para a análise (GOUDET *et al.*, 1996).

2.5.5 Análise de Associação Estatística

A fim de avaliar os SNP estudados como marcadores de suscetibilidade à AR, utilizou-se como medida da força de associação o cálculo da *odds ratios*⁴ (OR). Em suma, a OR pode ser compreendida como o resultado de uma análise quantitativa que permite estimar o grau de associação entre as variáveis estudadas, dado que, conforme Haddad (2004), exprime quantas

⁴ Diferentes traduções da expressão para a língua portuguesa podem ser consideradas, como, a exemplo, razão de possibilidades (TAPIA; NIETO, 1993), razão de produtos cruzados (LÓPEZ-CERVANTES *et al.*, 1994), razão de vantagens probabilísticas (HADDAD, 2004) ou ainda razão de chance (VIEIRA, 2018).

vezes o caráter em estudo (um alelo específico, por exemplo) é mais frequente entre os portadores de um determinado fator (no caso, a AR) do que entre aqueles que não possuem o mesmo fator (grupo controle). Entretanto, uma consideração aqui tida em conta é que, apesar de a hipótese em estudo propor uma relação de causa e efeito, a OR evidencia somente a probabilidade de associação entre a doença e a exposição ao fator de risco, sendo que para se inferir uma relação causal a quando de uma associação significativa, também se faz necessário ponderar outros fatores de influência (BAPTISTA; CAMPOS, 2016). Assim sendo, somado aos valores dos cálculos da OR, pesou-se que: (1) por se referirem a características genéticas, que a exposição aos fatores de risco é anterior ao desenvolvimento da doença (sequência temporal); (2) quanto maior valor obtido para a OR, maior a probabilidade de relação causal (intensidade de associação); (3) a presença em dobro de um alelo com associação positiva torna mais plausível sua relação causal (gradiente biológico); (4) os resultados obtidos encontram consistência em comparação a estudos semelhantes conduzidos com diferentes populações (consistência); (5) as associações obtidas são coerentes com o conhecimento científico disponível (coerência); (6) que a doença não é decorrente de apenas uma causa, logo, há multicasualidade (especificidade).

Logo, devido à amostragem selecionada, as chances de ter a doença não são diretamente mensuráveis. No entanto, convenientemente, a OR da doença é matematicamente equivalente à OR de exposição (a probabilidade de exposição em casos *versus* controles), podendo ser calculada diretamente a partir das frequências de exposição (CLAYTON, 2007).

Os valores de OR foram calculados por meio de análise estratificada (teste da relação de risco de um único fator por vez) conforme a equação (5), adaptada de Schneider (2002), com seus respectivos IC e valores de p estimados empregando o programa de livre acesso *HDS EpiMax Table Calculator* (HEALTH DECISION STRATEGIES, 2012). A fim de facilitar as operações matemáticas, os subgrupos foram organizados conforme a Tabela 2. A associação pode assim ser testada por χ^2 para independência das linhas e colunas da tabela de contingência.

$$OR = \frac{g1 \times g4}{g2 \times g3} \quad (5)$$

Em que:

$g1$ corresponde ao número de casos expostos ao fator de risco;

$g2$ se refere ao número de casos não expostos ao fator de risco;

$g3$ se refere ao número de controles expostos ao fator de risco; e

$g4$ corresponde ao número de controles não expostos ao fator de risco.

Tabela 2 – Tabela de contingência para a composição dos subgrupos amostrais em ECC

Expostos ao fator de risco	Casos	Controles	Total
Sim	g1	g2	g1+g2
Não	g3	g4	g3+g4
Total	g1+g3	g2+g4	g1+g2+g3+g4

Fonte: adaptada pelo autor de Schneider (2002).

Para além da análise de associação *per se* dos alelos e genótipos dos polimorfismos estudados, esta também foi conduzida sob dois modelos de herança, dos quais o recessivo e o dominante comum, no intuito de fazer observações mais apuradas dos mecanismos que envolvem o risco da presença e investigar a penetrância da AR e sua relação com ambos os pontos de variação. A penetrância da enfermidade associada com um dado genótipo nada mais é do que o risco da doença em indivíduos portadores desse genótipo. Os modelos de penetrância da doença, que implicam uma relação específica entre genótipo e fenótipo, incluem o multiplicativo, o aditivo, o dominante comum e o recessivo comum. Em relação a estes últimos, assumindo um parâmetro de penetrância γ ($\gamma > 1$), um modelo recessivo comum indica que duas cópias do alelo de risco são necessárias para um aumento γ vezes no risco de doença. Já o modelo dominante comum indica que duas ou mesmo uma cópia do alelo de risco basta para um aumento γ vezes no risco de doença (CLARKE *et al.*, 2011). A seleção desses modelos dentre os demais se deu *a priori* e por conveniência, conforme orientam Horita e Kneko (2015).

As reconstruções dos haplótipos para os SNP C677T e A1298C foram realizadas pelo método PHASE (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001; STEPHENS; DONNELLY, 2003), utilizando a versão 2.1 do software homônimo (stephenslab.uchicago.edu/phase).

Para as inferências ('faseamento'), foram considerados apenas os haplótipos com probabilidade de certeza maior ou igual a 90% para as fases alélicas. Aquelas amostras que não alcançaram esse valor foram removidas devido ao seu potencial para introduzir viés às análises. Realizou-se os cálculos das frequências dos haplótipos e das respectivas combinações haplotípicas, bem como de suas *odds ratio* para comparação caso-controle.

Ademais, a fim de dar credibilidade aos haplótipos inferidos, resta assinalar que junto ao faseamento o programa conduzira o chamado 'teste de permutação caso-controle', para o qual a hipótese nula foi a de que os haplótipos de casos e controles são uma amostra aleatória de um único conjunto de frequências de haplótipos; e a hipótese alternativa de que os casos são mais semelhantes a outros casos do que aos controles. O teste utilizado considera a similaridade dos haplótipos (em vez de apenas se são iguais ou diferentes) e, desse modo, pode ter poder mesmo quando cada haplótipo da amostra é único (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001).

3 RESULTADOS

O tabelamento dos resultados sobre os quais a seguir se discorre, tanto em dados brutos como aqueles decorrentes de tratamento estatístico, encontra-se disponível para consulta em sua íntegra pelo seguinte link: https://drive.google.com/file/d/1sxV0lkPqf9Rc_qCFUnnaZ-M4iJXBgdNX/view?usp=sharing.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No presente estudo a amostragem contou com um total de 322 indivíduos. Destes, 161 são pacientes portadores de AR (grupo caso), com os 161 da outra parcela caracterizando o grupo controle, uma vez que, conforme por eles declarado, não possuem histórico pessoal ou parentesco com pessoas acometidas por AR e/ou outras DAI. Dentre os pacientes, 116 indivíduos foram genotipados para ambos os *loci*, 677 e 1298, ao passo que para o grupo controle este número foi o equivalente a 80 indivíduos. Devido à exclusão de amostras que apresentaram elevado nível de incerteza no procedimento de inferência haplotípica, conforme notar-se-á mais adiante no texto, esse número de ‘*matches*’ reduziu-se para 93 e 66 pessoas, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização quantitativa do contingente de indivíduos genotipados e sua variação conforme o grupo amostral (pacientes ou controle) e SNP do gene *MTHFR* (C677T ou A1298C), bem como em dois momentos distintos da análise de associação.

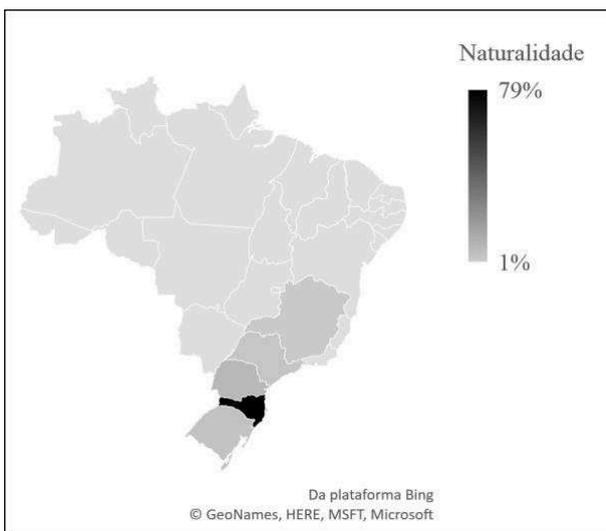
Grupo Amostral	Indivíduos Genotipados, n (%)			
	<i>MTHFR</i>		<i>Match</i>	
	C677T	A1298C	Pré-faseamento	Pós-faseamento
Pacientes	160 (49,85)	117 (59,39)	116 (59,18)	93 (58,49)
Controle	161 (50,15)	80 (40,61)	80 (40,82)	66 (41,51)
Total	321	197	196	159

n, número amostral. Fonte: o autor.

As pessoas amostradas são em sua totalidade residentes do estado de Santa Catarina, em grande parte da região da Grande Florianópolis. Quanto à proveniência, tanto os pacientes (Figura 13) quanto os controles (Figura 14) são em sua maioria catarinenses, com 79% e 68% de prevalência, respectivamente. No caso dos pacientes, a naturalidade se concentra nas regiões sul e sudeste, somente não havendo representação de naturais do Espírito Santo e Rio de Janeiro. Em 7% dentre os casos esta informação não constava no banco de dados. No que diz

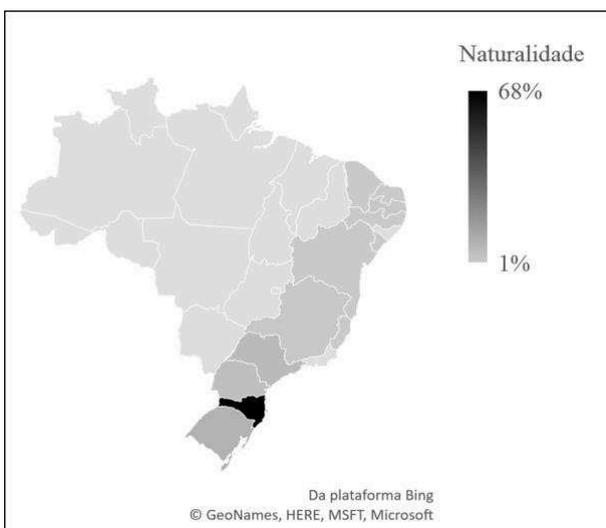
respeito ao grupo controle, em adição às regiões sul e sudeste (com exceção do Rio de Janeiro), também foram amostrados indivíduos naturais da região nordeste, excetuando-se do estado de Alagoas. Coincidentemente, para 7% das amostras também não se teve acesso à informação sobre naturalidade.

Figura 14 – Mapa coroplético da distribuição percentual da frequência de pacientes de acordo com a naturalidade.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 15 – Mapa coroplético da distribuição percentual da frequência dos controles de acordo com a naturalidade.



Fonte: elaborada pelo autor.

Para além da origem geográfica, a Tabela 4 apresenta em números absolutos e percentuais a caracterização epidemiológica dos pacientes com AR e grupo controle também com relação a sexo biológico, idade e origem étnico-racial. No que diz respeito a este último,

cabe ressaltar que o pertencimento dos indivíduos fora definido pela congruência entre a hetero e autoatribuição da cor de pele, bem como ascendência, constantes dos questionários de dados epidemiológicos (Anexos B e D). Nota-se que a maioria do grupo caso e, conseqüentemente, do grupo controle, constitui-se de mulheres (88,82%), euro-brasileiras (80,42% dentre os pacientes, 79,59% para o grupo controle) e com idade variando entre 41 e 66 anos para as pacientes e entre 36 e 63 anos para aquelas do grupo controle.

Tabela 4 – Caracterização epidemiológica dos pacientes com AR e do grupo controle.

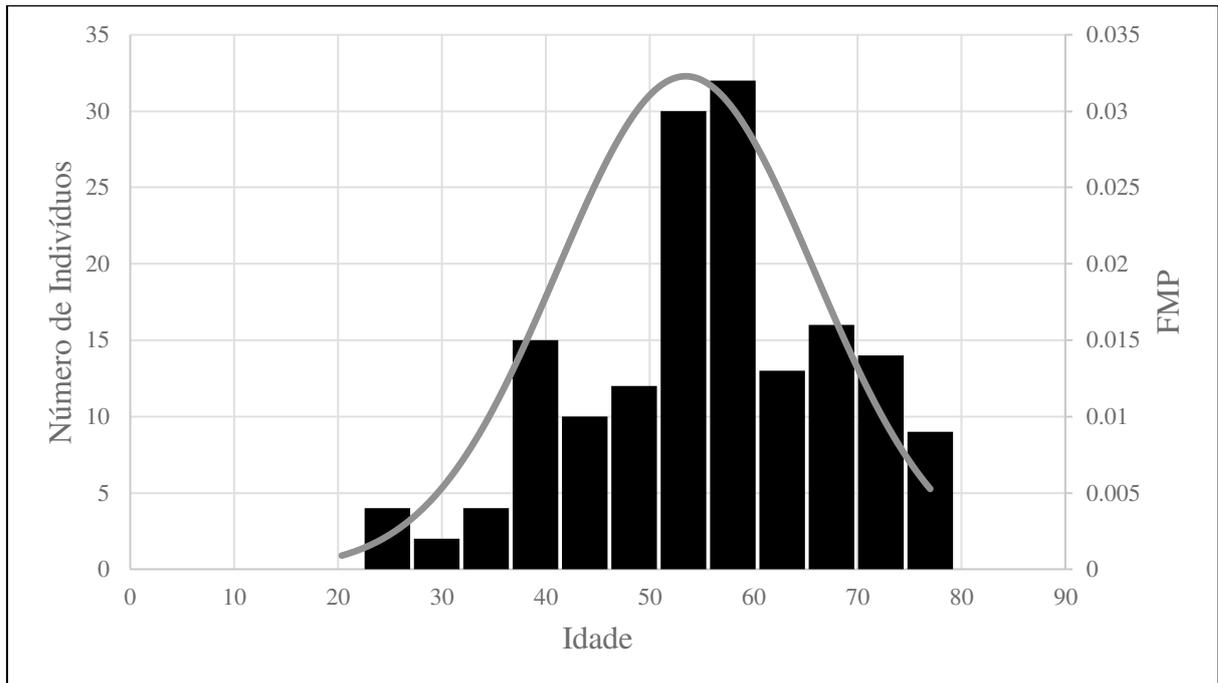
	Pacientes, n (%)	Total, n*	Controle, n (%)	Total, n*
Sexo Biológico				
Feminino	143 (88,82)	161	143 (88,82)	161
Masculino	18 (11,18)	161	18 (11,18)	161
Origem Étnico-racial				
Euro-brasileiro	115 (80,42)	143	117 (79,59)	147
Afro-brasileiro	19 (13,29)	143	21 (14,29)	147
Ameríndio-brasileiro	9 (6,29)	143	9 (6,12)	147
Idade				
(Média ± Desvio Padrão)	53,46 ± 12,36	161	49,53 ± 13,88	161
Naturalidade (por Região Geográfica)				
Sul	145 (96,67)	150	131 (87,33)	150
Sudeste	5 (3,33)	150	12 (8)	150
Nordeste	0 (0)	150	7 (4,67)	150

n, número amostral. * O valor de ‘n’ variou devido à disponibilidade de dados para a categoria. Fonte: o autor.

O aprofundamento da exploração dos dados relativos à idade por meio da distribuição das frequências de pacientes por faixa etária, permitiu evidenciar, dentre outros pela assimetria apresentada (Figura 15), que 71% deles possui mais do que 50 anos. Tal resultado é congruente com o conhecimento já popularizado de que a prevalência de casos de AR se dá a partir da quinta década de vida, bem como de que é mais comum em mulheres do que em homens, como corrobora o presente estudo.

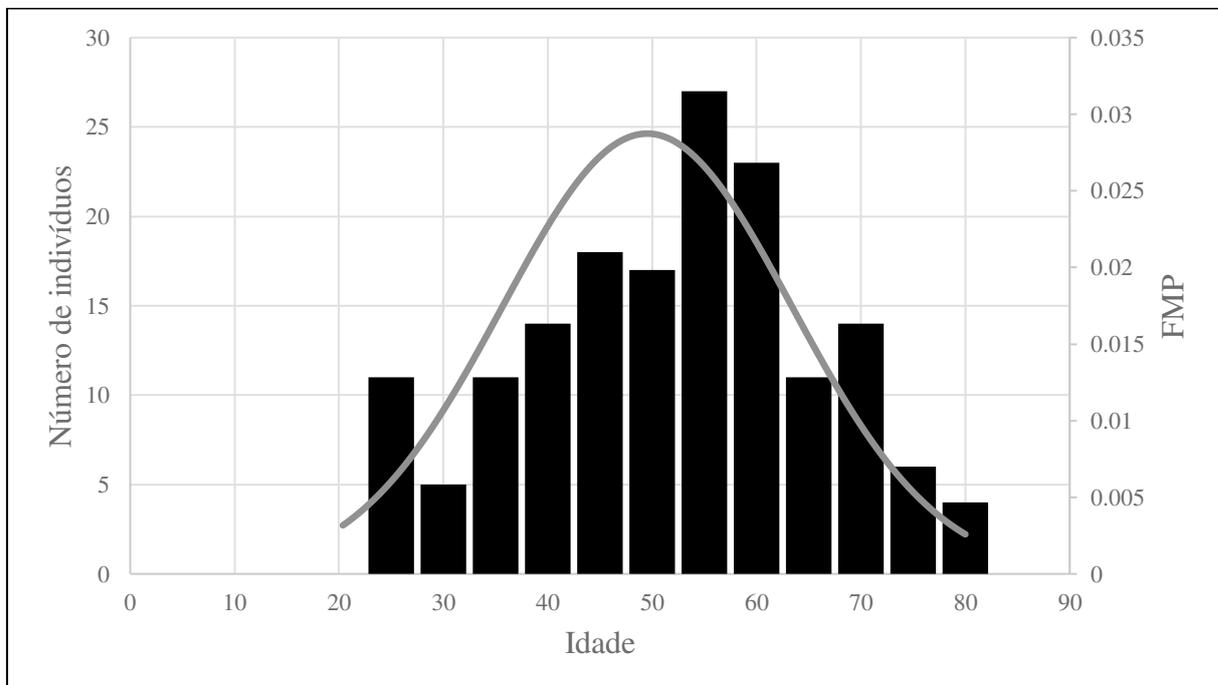
É importante notar que a semelhança que a distribuição das frequências por faixa etária no grupo controle (Figura 16) possui com aquela no grupo caso, origina-se principalmente do fato de ter sido realizado o ‘semipareamento’ entre os grupos, o que apesar de atenuar variáveis de confusão, leva ao enviesamento das idades amostradas para os controles, também evidenciado pela semelhante distribuição assimétrica das frequências.

Figura 16 – Distribuição das frequências de pacientes por faixa etária aproximadas pelo modelo normal.



FMP, Função Massa de Probabilidade. A linha em cinza representa a disposição dos dados esperada caso se distribuíssem simetricamente. Fonte: o autor.

Figura 17 – Distribuição das frequências do grupo controle por faixa etária aproximadas pelo modelo normal.



FMP, Função Massa de Probabilidade. A linha em cinza representa a disposição dos dados esperada caso se distribuíssem simetricamente. Fonte: o autor.

3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.2.1 Cálculo de Frequências e Adesão ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências obtidas para os alelos e genótipos dos polimorfismos na posição 677 (C677T) e 1298 (A1298C) do gene *MTHFR* estão expostas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Não havendo a necessidade de compensar fatores que levassem a desvios das expectativas de Hardy-Weinberg, a adesão ao equilíbrio proposto pela lei foi confirmada em ambos os grupos, tanto caso como controle. Em relação ao SNP C677T o qui-quadrado (χ^2) calculado para os pacientes e grupo controle foi de 0,492 e 0,303, respectivamente (Tabela 5); ambos menores do que o $\chi^2_{c; 0,05; 1}$ (qui-quadrado crítico ao nível de significância de 0,05 e com 1 grau de liberdade) correspondente a 3,841. Já para o polimorfismo A1298C o χ^2 calculado para pacientes foi de 0,573, enquanto que para o grupo controle foi de 0,282 (Tabela 6). O EHW foi confirmado também ao considerar os *loci* conjuntamente (χ^2 de 10,167 < $\chi^2_{c; 0,05; 8}$; $p = 0,253$). Assinala-se que se realizou a adoção de 1 grau de liberdade e não 2 graus, como está implícito nas dimensões da tabela de contingência, pois as frequências alélicas foram estimadas a partir da amostra genotípica sob teste, em vez de obtidas a partir de dados de genotipagem externa.

Tabela 5 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo na posição 677 do gene *MTHFR* (C677T) em pacientes com AR e no grupo controle.

	Pacientes, n (%)		Controle, n (%)		OR (IC 95%)	p
ALELOS						
C	228 (71,25)		211 (65,53)		2,374 (1,027 - 5,592)	0,042*
T	92 (28,75)		111 (34,47)		0,850 (0,535 - 1,351)	0,540
Total	320		322		-	-
GENÓTIPOS	Observados, n (%)	Esperados, n (%)	Observados, n (%)	Esperados, n (%)		
CC	78 (48,75)	81 (50,70)	72 (44,72)	69 (42,87)	1,176 (0,740 - 1,868)	0,540
CT	72 (45,00)	66 (41,10)	67 (41,61)	73 (45,32)	1,148 (0,720 - 1,830)	0,617
TT	10 (6,25)	13 (8,20)	22 (13,66)	19 (11,81)	0,421 (0,179 - 0,974)	0,042*
Total	160		161		-	-
EHW	$\chi^2 = 0,492$		-		-	0,483
	-		$\chi^2 = 0,303$		-	0,582

EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg; IC, intervalo de confiança; n, número amostral; OR, *odds ratio*; p, probabilidade de significância; χ^2 , qui-quadrado. * Valor de p considerado significativo (< 0,05). Fonte: o autor.

Tabela 6 – Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo na posição 1298 do gene *MTHFR* (A1298C) em pacientes com AR e no grupo controle.

	Pacientes, n (%)		Controle, n (%)		OR (IC 95%)	p
ALELOS						
A	153 (65,38)		91 (56,88)		1,529 (0,631 - 3,731)	0,412
C	81 (34,62)		69 (43,13)		0,658 (0,331 - 1,306)	0,259
Total	234		160		-	-
GENÓTIPOS	Observados, n (%)	Esperados, n (%)	Observados, n (%)	Esperados, n (%)		
AA	53 (45,30)	50 (42,65)	28 (35,00)	26 (32,19)	1,519 (0,766 - 3,021)	0,259
AC	47 (40,17)	53 (45,46)	35 (43,75)	39 (49,36)	0,857 (0,435 - 1,687)	0,748
CC	17 (14,53)	14 (11,89)	17 (21,25)	15 (18,44)	0,654 (0,268 - 1,584)	0,412
Total	117		80		-	-
EHW	$\chi^2 = 0,573$		-		-	0,449
	-		$\chi^2 = 0,282$		-	0,592

EHW, Equilíbrio de Hardy-Weinberg; IC, intervalo de confiança; n, número amostral; OR, *odds ratio*; p, probabilidade de significância; χ^2 , qui-quadrado. Fonte: o autor.

3.2.2 Diferenciação Genética dos Grupos Amostrais

Para ambos os *loci* polimórficos em análise os alelos compartilham da mesma distribuição, tanto na população de pacientes quanto na população do grupo controle. Logo, o valor de χ^2 obtido, de 8,718, foi menor do que o $\chi^2_{c; 0,05; 4}$, de 9,488, bem como, o valor de p calculado (0,068) foi maior do que o nível de significância fixado (0,05). De igual modo, os genótipos compartilham da mesma distribuição nas populações de pacientes e grupo controle para ambos os SNP, C677T e A1298C. Neste caso o χ^2 obtido corresponde a 8,513, também menor do que o $\chi^2_{c; 0,05; 4}$, com o valor de p calculado de 0,074.

3.2.3 Desequilíbrio de Ligação

Os genótipos em ambos os *loci* demonstraram-se interdependentes, logo, conforme previsto, são herdados em bloco (*linkage*). O valor de χ^2 obtido, de 12,0593, é maior do que o valor de $\chi^2_{c; 0,05; 4}$ (9,488). Além disso, os valores de p calculados para a grupo dos pacientes e dos pacientes conjuntamente com o grupo controle foram ambos menores do que o nível de significância definido (0,05), dos quais 0,007 e 0,017, respectivamente. Apenas o valor de p para a população do grupo controle foi maior que o nível de significância fixado ($p = 0,328$). Neste tocante, por mais que o valor de p para a população controle não vá ao encontro daquele para os casos, deu-se maior peso para a tomada de decisão ao valor de p quando levado em consideração ambas as populações, inclusive pela literatura fornecer subsídios para que se acredite que de fato os SNP estejam ligados (pertencem ao mesmo gene).

3.2.4 Análise de Associação Estatística

Para o polimorfismo C677T do gene *MTHFR*, a análise de associação de alelos e genótipos por meio do cálculo de OR demonstrou que, devido a alta intensidade de associação (OR = 2,374), a presença do alelo selvagem ‘C’ provavelmente é um fator de risco para o desenvolvimento da AR (Tabela 7). Também foi possível verificar, pelo modelo de herança recessivo comum, que o genótipo ‘TT’ (OR = 0,421), constituído por dois alelos mutante, é possivelmente um fator protetor para a AR. Em congruência aos resultados anteriores, pelo modelo de herança dominante comum, genótipos que contam com o alelo ‘C’ (‘CC’ e ‘CT’; OR = 2,374) foram reconhecidos como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da

AR. Nota-se, ainda, que três das quatro *odds ratio* para os genótipos do SNP C677T, obtiveram valores de *p* próximos ao nível de significância fixado ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Resultados de *odds ratio* para medida da associação entre a presença de alelos/genótipos, e sob dois modelos padrão de herança, do polimorfismo *MTHFR* C677T e a predisposição à AR.

	OR	IC 95%	<i>p</i>
ALELOS			
C	2,374	1,027 - 5,592	0,042 ^a
T	0,850	0,535 - 1,351	0,540
GENÓTIPOS			
CC <i>versus</i> TT	2,383	0,991 - 5,828	0,052 ^b
CT <i>versus</i> TT	2,364	0,997 - 5,816	0,057 ^b
TT <i>versus</i> CC	0,420	0,172 - 1,009	0,052 ^b
CT <i>versus</i> CC	0,992	0,609 - 1,617	0,999
MODELO DE HERANÇA			
Recessivo Comum			
CC <i>versus</i> (CT + TT)	1,176	0,740 - 1,868	0,540
TT <i>versus</i> (CC + CT)	0,421	0,179 - 0,974	0,042 ^a
Dominante Comum			
(CC + CT) <i>versus</i> TT	2,374	1,027 - 5,592	0,042 ^a
(TT + CT) <i>versus</i> CC	0,850	0,535 - 1,351	0,540

IC, intervalo de confiança 95%; OR, *odds ratio* (razão de chance); *p*, probabilidade de significância. ‘a’ indica um valor de *p* considerado significativo ($< 0,05$). ‘b’ se refere ao valor de *p* passível de significância estatística no caso de aumento do número amostral. Fonte: o autor.

Tabela 8 – Resultados de *odds ratio* para medida da associação entre a presença de alelos/genótipos, e sob dois modelos padrão de herança, do polimorfismo *MTHFR* A1298C e a predisposição à AR.

	OR	IC 95%	<i>p</i>
ALELOS			
A	1,587	0,71 - 3,551	0,302
C	0,650	0,347 - 1,217	0,195
GENÓTIPOS			
AA <i>versus</i> CC	1,893	0,777 - 4,625	0,181
AC <i>versus</i> CC	1,343	0,559 - 3,233	0,605
CC <i>versus</i> AA	0,528	0,216 - 1,286	0,181
AC <i>versus</i> AA	0,709	0,358 - 1,403	0,367
MODELO DE HERANÇA			
Recessivo Comum			
AA <i>versus</i> (AC + CC)	1,538	0,822 - 2,886	0,195
CC <i>versus</i> (AA + AC)	0,630	0,282 - 1,409	0,302
Dominante Comum			
(AA + AC) <i>versus</i> CC	1,587	0,710 - 3,551	0,302
(CC + AC) <i>versus</i> AA	0,650	0,347 - 1,217	0,195

IC, intervalo de confiança 95%; OR, *odds ratio* (razão de chance); *p*, probabilidade de significância. Fonte: o autor.

Em relação ao polimorfismo A1298C, a análise de associação de alelos e genótipos demonstrou que simplesmente não há relação significativa entre esse polimorfismo e a predisposição ou não à AR (vide Tabela 8, supracitada).

O cálculo da OR para as combinações genotípicas (haplótipos) dos SNP na posição 677 e 1298 em pacientes e no grupo controle, permitiu identificar o haplótipo T/C (OR = 0,358) como possível fator protetivo em relação ao desenvolvimento da AR (Tabela 9).

Por sua vez, a análise da distribuição das frequências das combinações haplotípicas para os polimorfismos C677T e A1298C possibilitou identificar o diplótipo TA/TC (OR = 0,050) como passível de assinalar proteção para a AR naqueles que o possuem (Tabela 10). Neste caso, em razão de não haver representatividade para o diplótipo TA/TC dentre os pacientes, foi adotada a correção de Haldane-Anscombe (RUXTON; NEUÄUSER, 2013), a qual consistiu em, previamente ao cálculo da *odds ratio*, somar 0,5 aos valores obtidos para o número de pacientes e indivíduos controle, expostos e não expostos ao fator de risco.

Tabela 9 – Distribuição das frequências dos haplótipos para C677T e A1298C do gene *MTHFR* em pacientes e grupo controle e suas respectivas probabilidades de associação à AR

	Pacientes 2n=186 (%)	Controle 2n=132 (%)	OR (IC 95%)	p
Haplótipo (677/1298)				
C/A	90 (48)	49 (37)	1,588 (0,982 - 2,570)	0,060
C/C	51 (27)	43 (33)	0,782 (0,467 - 1,309)	0,386
T/A	38 (20)	27 (20)	0,998 (0,555 - 1,802)	0,999
T/C	7 (4)	13 (10)	0,358 (0,125 - 0,996)	0,049*

IC, intervalo de confiança 95%; n, número amostral; OR, *odds ratio*; p, probabilidade de significância.

* Valor de p considerado significativo (< 0,05). Fonte: o autor.

Tabela 10 – Distribuição das frequências dos diplótipos para C677T e A1298C do gene *MTHFR* em pacientes e grupo controle e suas respectivas probabilidades de associação à AR

	Pacientes n = 116 (%)	Controle n = 80 (%)	OR (IC 95%)	p
Diplótipo				
CA/CA	20 (22)	11 (17)	1,370 (0,567 - 3,350)	0,578
CA/CC	24 (26)	15 (23)	1,183 (0,531 - 2,647)	0,797
CC/CC	12 (13)	12 (18)	0,667 (0,257 - 1,730)	0,489
CA/TA	26 (28)	12 (18)	1,746 (0,758 - 4,068)	0,217
CC/TC	3 (3)	4 (6)	0,517 (0,088 - 2,860)	0,641
TA/TA	6 (3)	5 (8)	0,841 (0,214 - 3,357)	0,999
TA/TC	0 (0)	6 (9)	0,050 (0,000 - 0,716)	0,016*
TC/TC	2 (2)	1 (2)	1,429 (0,099 - 40,170)	0,999

IC, intervalo de confiança 95%; n, número amostral; OR, *odds ratio*; p, probabilidade de significância.

* Valor de p considerado significativo (< 0,05). Fonte: o autor.

4 DISCUSSÃO

No que diz respeito aos aspectos qualitativos, três fatos apontam para a adequada amostragem da população-fonte: (1) o grupo de pacientes apresentarem congruência com o padrão de distribuição de dados epidemiológicos referentes à sexo e idade para a AR; (2) as proporções alélicas para o número amostral total terem aderido ao EHW (χ^2 de 10,167 < $\chi^2_{c; 0,05; 8}$; $p = 0,253$) sem a necessidade de compensação de fatores que levassem ao desvio das expectativas; (3) o fato de o resultado para a análise de ligação ter se mostrado significativo, mesmo diante da ciência de herança em bloco; e (4) os alelos distribuírem-se homogeneamente, conforme demonstra a análise de diferenciação gênica (χ^2 de 8,718 < $\chi^2_{c; 0,05; 4}$; $p = 0,068$) e genotípica (χ^2 de 8,513 < $\chi^2_{c; 0,05; 4}$; $p = 0,074$). Logo, pode-se afirmar que a amostra é representativa da realidade e possibilita a generalização com credibilidade dos resultados para o universo da população catarinense.

Em termos quantitativos, o tamanho amostral aplicado é semelhante ou superior, poucas vezes inferior, aos encontrados na literatura catarinense e brasileira de referência para o mesmo desenho experimental, levando a acreditar na sua adequada estimativa. Ainda assim, o aumento do número amostral pode desvelar nuances não captadas pelo nível de acurácia das análises estatísticas. Isso sobretudo no tocante ao polimorfismo C677T, que apresentou valores de p muito próximos ao estabelecido pelo nível de significância nas análises de associação de risco à doença para algumas das combinações alélicas e genotípicas.

Mesmo sendo o HU-UFSC um hospital de referência regional no atendimento à pacientes com doenças reumáticas, a análise da proveniência dos indivíduos amostrados permitiu descartar a possibilidade de um viés em sua seleção, uma vez que é notável que os portadores de AR buscam por cuidado e/ou são encaminhados devido à proximidade geográfica do hospital com seus lugares de origem. Basicamente, com alguma generalização, o HU-UFSC reúne em um só lugar os pacientes com AR em busca de tratamento de todo o estado de Santa Catarina, permitindo corroborar com a literatura no que diz respeito à boa representatividade para o grupo caso que este tipo de população-fonte fornece. Ademais, outras situações que se somam para a definição do viés de Berkson, são amenizadas se levado em conta o fato de a AR ser uma doença crônica e que, desde que adequadamente tratada, não implica em internações para tratamento intensivo, mas sim em acompanhamento médico continuado de sua evolução.

A maioria dos estudos populacionais relacionando alelos ao risco à DAI foram desenvolvidos em populações de ascendência europeia, evidenciando a necessidade de pesquisas envolvendo outras etnias (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012). Nesse sentido,

é possível caracterizar o presente trabalho como pioneiro na condução desse tipo de estudo visando a associação dos polimorfismos nas regiões 677 e 1298 do gene *MTHFR* à predisposição à AR na população catarinense e, por extensão, brasileira.

Apesar do SNP A1298C levar a uma alteração *missense* não conservativa, a mudança por ele ocasionada tem se verificado menos significativa para a função enzimática do que aquela do SNP C677T, *missense* conservativa (VAN DER PUT *et al.*, 1998). Esta maior influência sobre a diminuição da função enzimática leva este último a se sobressair como marcador molecular. Em concordância, no presente estudo foram encontradas associações significativas apenas para o polimorfismo C677T, as quais apontam para o alelo selvagem *C e os genótipos que o contêm, *CC e *CT, como prováveis fatores de risco para o desencadeamento da AR, com o genótipo *TT, em contrapartida, como passível de assinalar proteção para essa DAI.

Os resultados da associação dos SNP C677T e A1298C à predisposição à AR em outras populações quando comparados com os do presente trabalho, demonstram primeiramente que, de maneira distinta a todos eles, na população de SC para o *locus* 677 a presença do genótipo ‘TT’ (homozigoto mutante) é associada a proteção enquanto que o genótipo ‘CC’ (homozigoto selvagem) é considerado de risco (BERKUN *et al.*, 2004; RUBINI *et al.*, 2008; INANIR *et al.*, 2013; BOUGHRARA *et al.*, 2015; SAAD *et al.*, 2015; CEN *et al.*, 2016; SHAKER *et al.*, 2016; YUAN; SHAO; LI, 2017). A ausência de associação do polimorfismo A1298C à suscetibilidade à AR também foi verificada na pesquisa realizada por Shaker e colaboradores (2016) com a população egípcia, embora na maioria dos estudos seja encontrada a associação entre o SNP e a doença, cuja presença é considerada um fator de risco (BERKUN *et al.*, 2004; RUBINI *et al.*, 2008; BOUGHRARA *et al.*, 2015; YUAN; SHAO; LI, 2017). Cabe pontuar que a presença de um alelo mutante não pode ser considerada por si só uma característica que favoreça o desenvolvimento da doença, nos estudos de Saad e colaboradores (2015) e Cen e coparticipantes (2016), por exemplo, a presença do genótipo ‘AA’ no *locus* 1298 foi vinculada a um fator de risco para as populações egípcias e asiáticas, respectivamente, genótipo esse formado por dois alelos selvagens. Nesse contexto, evidencia-se a importância de estudos genéticos, como os ECC, para afirmar qualquer associação entre genótipos e fenótipos, bem como o importante papel da deriva genética dentre as pressões seletivas nas populações.

Os avanços da genética permitiram que descobertas consistentes referentes à associações entre doenças e genes fossem detectadas, no entanto a percepção de que a maioria das mutações confere aumentos apenas modestos no risco levou a progressos nos desenhos

experimentais das pesquisas. Estudos maiores estão sendo realizados e a replicação interna de descobertas significativas está se tornando uma prática padrão (LEWIS; KNIGHT, 2012; PETTERSSON *et al.*, 2009).

Cabe pontuar o atual papel de destaque das GWAS (do inglês, *Genome Wide Association Studies*), capazes de investigar simultaneamente múltiplos genes e seus SNP. Tais pesquisas permitem associar com maior facilidade os marcadores moleculares às informações epigenéticas e fatores de risco de cunho sócio-econômico-ambiental. Esses avanços também tendem a colaborar com os desafios de distinguir resultados falsos positivos e falsos negativos daquelas associações não espúrias, bem como avaliar a reprodutibilidade dos resultados (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012; XAVIER, 2015).

Por a AR ser decorrente de multicausalidade, acredita-se serem singelas as contribuições do presente trabalho para o melhor entendimento da etiologia da doença. No entanto, pesquisas de maior amplitude são viáveis apenas após alcançados resultados, genéticos e ambientais, para SNP em separado, como no presente caso de estudo. Ademais, outro aspecto desta pesquisa é a possibilidade de os polimorfismos analisados representarem marcadores para a predição de fenótipos clínicos na população em estudo, com consequentes contribuições no tratamento personalizado (dosagem e tipo do fármaco).

Neste tocante e como expectativa para um futuro próximo, é possível que se analise também a associação de dados epidemiológicos ambientais e clínicos para esta população em específico, como o tabagismo e fatores de risco para doenças cardiovasculares, as quais são consideradas uma das principais causas de mortalidade em pacientes com AR (HAN *et al.*, 2006). Tal perspectiva intensifica a relevância do trabalho, contribuindo no caso de publicação e/ou popularização dos resultados.

Para além, e principalmente, há a perspectiva de análise farmacogenética da relação entre os resultados obtidos no trabalho com a adequação às terapias conduzidas com os pacientes de AR do HU-UFSC. Inclusive, neste caso, a significância dos resultados obtidos para o SNP A1298C, mesmo não possuindo relação direta com a causa da doença na população catarinense, pode indiretamente influenciar na adequada adesão ao tratamento medicamentoso.

A história aponta que nenhum país pode prescindir de ciência e tecnologia para alcançar o pleno desenvolvimento econômico e social. Alinhado às novas perspectivas para o progresso científico brasileiro que tem esta prerrogativa como base (ABC, 2018), compreende-se, por fim, que para o avanço da medicina de precisão é imprescindível que haja investimento em ciência e tecnologia com enfoque nas ciências básicas (como, biologia molecular e imunologia) e “ômicas” (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica), visando

facilitar o diagnóstico e a conquista de terapias personalizadas que atenuem a alta morbidade associada à AR, o que já vem sendo colocado em prática em alguns países, dignos de fato de se nomear desenvolvidos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa destaca-se sobretudo por seu ineditismo dentre os estudos de caso-controle (ECC) para os SNP *MTHFR* C677T e A1298C envolvendo a população catarinense e, inclusive, brasileira. Mas, sendo vasta a literatura com semelhante delineamento, seria ela “chover no molhado”? O singelo, porém não simplório, embasamento que tem este autor sobre genética de populações permite-lhe acreditar que não. A variabilidade entre os pacientes na adesão aos tratamentos medicamentosos hoje disponíveis é imensa, reiterando que urge a necessidade de uma busca por marcadores genéticos de suscetibilidade dentre as populações humanas. Conviver efetivamente bem com a Artrite Reumatoide (AR) em estado remissivo já é uma realidade alcançável. Entretanto para muitos pacientes nos quatro cantos do mundo, inclusive aqui, no canto inferior esquerdo, cabe apenas contemplar esta realidade ainda distante, pois permanecem perdendo qualidade de vida enquanto seguem ávidos na busca por um tratamento que lhes seja adequado. A estes ainda não contemplados pela tentativa e erro, trabalhos como este são a esperança de dias melhores ao fornecer “novos tons às suas palhetas na busca por repintar a realidade”.

A análise de associação para o polimorfismo C677T na população catarinense demonstrou que a presença do alelo selvagem *C (OR = 2,374; IC 95% = 1,027–5,592; $p = 0,042$) e os genótipos *CC e *CT (OR = 2,374; 1,027–5,592; $p = 0,042$) provavelmente compõe fatores de risco para o desenvolvimento da AR, bem como o genótipo *TT (OR = 0,421; IC 95% = 0,179–0,974; $p = 0,042$) é passível de assinalar proteção para a doença naqueles que o possuem. Enquanto para o polimorfismo A1298C não foi verificada nenhuma associação com a predisposição à AR. Ademais, o haplótipo ‘T/C’ (OR = 0,358; IC 95% = 0,125–0,996; $p = 0,049$) e a combinação haplotípica ‘TA/TC’ (OR = 0,050; IC 95% = 0,000–0,716; $p = 0,016$) foram identificados como possíveis fatores protetores à predisposição a essa Doença Autoimune (DAI) para a população de Santa Catarina (SC).

A presente investigação também foi capaz de fornecer subsídios para o melhor entendimento da etiologia da AR e de adicionar dados epidemiológicos sobre a doença em SC, onde a miscigenação étnica existente torna a população excepcional para esse tipo de estudo. Assim, foram conquistadas algumas perspectivas para subsidiar políticas públicas de cuidado à AR direcionadas a essa população, por meio da identificação de indivíduos com maior suscetibilidade ao desenvolvimento da doença, embora aprimoramentos ainda possam ser feitos como exposto quando tratado sobre as expectativas futuras.

Por fim, é notável a contribuição do desenvolvimento deste estudo para a formação e capacitação profissional deste graduando enquanto futuro 'Biólogo educador' (BRASIL, 2001), no que tange ao pensar crítico e realização de metodologias científicas inovadoras, enfim, 'fazer ciência' em bom uso da expressão.

REFERÊNCIAS

- ABC. **Projeto de Ciência para o Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2018. 396 p. Jerson Lima Silva, José Galizia Tundisi (Coords.). ISBN: 978-85-85761-47-9. Disponível em: <http://www.abc.org.br/atuacao/nacional/projeto-de-ciencia-para-o-brasil/>. Acesso em: 23 jun. 2019.
- ALPÍZAR-RODRÍGUEZ, D. *et al.* The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, [s. l.], p.318-328, 29 set. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kew318>. Disponível em: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/56/8/1254/2631597>. Acesso em: 14 jul. 2019.
- AMUR, S.; PAREKH, A.; MUMMANENI, P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. **Journal Of Autoimmunity**, [s. l.], v. 38, n. 2-3, p.254-265, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2011.12.001>.
- ARTHRITIS FOUNDATION. **Artrite Reumatoide**. Brasil: Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2000. 24 p. Revisão: American College of Rheumatology; Tradução para o português: Dra. Rejane Leal Araújo. Disponível em: <https://reumatodf.com.br/pacientes/cartilhas/7-artrite-reumatoide>. Acesso em: 12 abr. 2019.
- BAPTISTA, M. N.; CAMPOS, D. C. de (Org.). **Metodologia de pesquisa em ciências: análises quantitativa e qualitativa**. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016. 376 p. ISBN 978-85-216-3044-9.
- BARTOLD, P. M. *et al.* Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Periodontology**, [s. l.], v. 37, n. 5, p.405-411, maio 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051x.2010.01552.x>.
- BERKANI, L. M. *et al.* Association of *MTHFR* C677T and A1298C gene polymorphisms with methotrexate efficiency and toxicity in Algerian rheumatoid arthritis patients. **Heliyon**, [s. l.], v. 3, n. 11, p.557-569, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00467>. Disponível em: <https://www.heliyon.com/article/e00467>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- BERKUN, Y. *et al.* Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the *MTHFR* gene. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 63, n. 10, p.1227-1231, 1 out. 2004. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2003.016337>. Disponível em: <https://ard.bmj.com/content/63/10/1227.long>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- BOONEN, A. *et al.* How Renoir coped with rheumatoid arthritis. **BMJ**, [s. l.], v. 315, n. 7123, p.1704-1708, 20 dez. 1997. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.315.7123.1704>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2128020/>. Acesso em: 14 jul. 2019.
- BORGAN, Ø. *et al.* (Ed.). **Handbook of Statistical Methods for Case-Control Studies**. Boca Raton: CRC Press, 2018. 536 p. (Chapman & Hall/CRC Handbooks of Modern Statistical Methods). ISBN 9781498768580.

BOUGHRARA, W. *et al.* Impact of *MTHFR* rs1801133, *MTHFR* rs1801131 and ABCB1 rs1045642 polymorphisms with increased susceptibility of rheumatoid arthritis in the West Algerian population: a case-control study. **Acta Reumatológica Portuguesa**, [s.l.], v. 1, n. 40, p.363-371, jan. 2015. Disponível em:

http://www.actareumatologica.pt/archive_detail.php?id=205. Acesso em: 15 jul. 2019.

BRASIL. Parecer CNE/CES 1.301 de 06 de novembro de 2001, publicado em 07 de dezembro de 2001. **Diretrizes Curriculares Nacionais para o curso de Ciências Biológicas**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2001. Disponível em:

<http://portal.mec.gov.br/component/content/article?id=12991>. Acesso em: 04 jul. 2019.

CACCESE, R. G.; ZIMMERMAN, J. L.; CARLSON, R. P. Bacterial lipopolysaccharide potentiates type II collagen-induced arthritis in mice. **Mediators of Inflammation**, [s.l.], v. 1, n. 4, p.273-279, 1992. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/s0962935192000425>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/1992/507852/abs/>. Acesso em: 15 jul. 2019.

CEN, H. *et al.* Associations of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T and A1298C polymorphisms with genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p.287-297, 16 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-016-3348-0>.

CLARKE, G. M. *et al.* Basic statistical analysis in genetic case-control studies. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 6, n. 2, p.121-133, fev. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.182>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3154648/>. Acesso em: 26 jun. 2019.

CLAYTON, D. Population Association. *In*: BALDING, D. J.; BISHOP, M.; CANNINGS, C. **Handbook of Statistical Genetics**. 3. ed. [s. l.]: John Wiley & Sons, 2007. Cap. 36. p. 1216-1236. (Volume 2). John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470061619>.

COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 380 p. Tradução de: Eiler Fritsch Toros.

COOPER, G. S.; STROEHLA, B. C. The epidemiology of autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, [s. l.], v. 2, n. 3, p.119-125, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1568-9972\(03\)00006-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1568-9972(03)00006-5).

CROFT, A. P. *et al.* Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. **Nature**, [s. l.], v. 570, n. 7760, p.246-251, 29 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1263-7>.

DEAN, L. M. D. **Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency**. Local: Medical Genetics Summaries [internet]. Bethesda (md): National Center For Biotechnology Information (us), 2012. 6 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66131/>. Acesso em: 20 abr. 2019.

DIAMOND, B. Autoimmunity. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 204, n. 1, p.5-8, abr. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00258.x>.

DORIA, A. *et al.* Autoinflammation and autoimmunity: Bridging the divide. **Autoimmunity Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 1, p.22-30, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.07.018>.

EDWARDS, C. J.; COOPER, C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. **Clinical And Experimental Immunology**, [s. l.], v. 143, n. 1, p.1-5, jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02940.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2249.2005.02940.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 16 jul. 2019.

ELLIS, J. A.; KEMP, A. S.; PONSONBY, A. L. Gene–environment interaction in autoimmune disease. **Expert Reviews In Molecular Medicine**, [s. l.], v. 16, 2014. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/erm.2014.5>.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; FLETCHER, G. S. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

FROSST, P. *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 10, n. 1, p.111-113, maio 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0595-111>. Disponível em: <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1123&context=lawfacpub>. Acesso em: 19 jun. 2019.

FUGGER, L.; SVEJGAARD, A. Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. **Arthritis Research**, [s. l.], v. 2, n. 3, p.208-45, 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/ar89>. Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar89>. Acesso em: 16 jul. 2019.

FUJIMAKI, C. *et al.* Plasma total homocysteine level and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T genetic polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis. **Biomarkers**, [s. l.], v. 14, n. 1, p.49-54, fev. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13547500902730664>.

GOUDET, J., *et al.* Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v.144, n. 4, p. 1933-1940, dez. 1996. Disponível em: <https://www.genetics.org/content/144/4/1933>. Acesso em: 29 jun. 2019.

GRAY, G. E. A busca por respostas. In: GRAY, G. E. **Psiquiatria baseada em evidências**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

GREENBERG, R. S. *et al.* **Epidemiologia clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à Genética**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. E-Book. ISBN 978-85-277-2283-4. Tradução de: Idilia Vanzelloti.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. **Biometrics**, [s. l.], v. 48, n. 2, p.361-372, jun. 1992. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2532296>.

HADDAD, N. **Metodologia de estudos em ciências da saúde**: como planejar, analisar e apresentar um trabalho científico. São Paulo: Roca, 2004.

HAN, C. *et al.* Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. **The Journal Of Rheumatology**, [s. l.], v. 33, n. 11, p.2167-2172, 1 nov. 2006. Disponível em: <http://www.jrheum.org/content/33/11/2167.long>. Acesso em: 16 jul. 2019.

HEALTH DECISION STRATEGIES. **EpiMax Table Calculator**. Disponível em: <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>. Acesso em: 19 jun. 2019.

HIGDON, J. *et al.* **Micronutrient Information Center**: Vitamin B12. 2015. Linus Pauling Institute, Oregon State University. Disponível em: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-B12>. Acesso em: 03 jul. 2019.

HUEBER, W. *et al.* Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 52, n. 9, p.2645-2655, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/art.21269>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.21269>. Acesso em: 16 jul. 2019.

INANIR, A. *et al.* IL-4 and *MTHFR* gene polymorphism in rheumatoid arthritis and their effects. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 152, n. 2, p.104-108, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.05.004>.

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. The International HapMap Project. *Nature*, [s. l.], v. 426, n. 6968, p.789-796, dez. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02168>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature02168>. Acesso em: 16 jul. 2019.

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. Integrating ethics and science in the International HapMap Project. *Nature Reviews Genetics*, [s. l.], v. 5, n. 6, p.467-475, jun. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1351>.

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A haplotype map of the human genome. *Nature*, [s. l.], v. 437, n. 7063, p.1299-1320, out. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04226>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature04226>. Acesso em: 16 jul. 2019.

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, [s. l.], v. 449, n. 7164, p.851-861, out. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06258>.

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*, [s. l.], v. 467, n. 7311, p.52-58, set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09298>.

IQBAL M. P. *et al.* Short Communication: Lack of association between *MTHFR* gene polymorphisms and response to methotrexate treatment in Pakistani patients with rheumatoid arthritis. **Pak J Pharm Sci**, v.28, n.5, p.1789-1792, 2015.

IWAKURA, Y. *et al.* Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science*, [s. l.], v. 253, n. 5023, p.1026-1028, 30 ago. 1991. American Association for the Advancement of Science (AAAS).
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1887217>. Disponível em:
<https://science.sciencemag.org/content/253/5023/1026/tab-pdf>. Acesso em: 16 jul. 2019.

KLEIN, K.; GAY, S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. **Current Opinion In Rheumatology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p.76-82, jan. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/bor.000000000000128>. Disponível em:
<https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/109207/>. Acesso em: 18 jul. 2019.

KOCHI, Y.; SUZUKI, A.; YAMAMOTO, K. Genetic basis of rheumatoid arthritis: A current review. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 452, n. 2, p.254-262, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.085>.

KUWANA, Y. *et al.* Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *Plos One*, [s. l.], v. 6, n. 10, 19 out. 2011. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026630>. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026630>. Acesso em: 16 jul. 2019.

LECLERC, D.; SIBANI, S.; ROZEN, R. **Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms**. Austin: Landes Bioscience, 2013. 29 p. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6561/?report=reader>. Acesso em: 20 abr. 2019.

LIAO, K. P.; ALFREDSSON, L.; KARLSON, E. W. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. **Current Opinion In Rheumatology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p.279-283, maio 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
<http://dx.doi.org/10.1097/bor.0b013e32832a2e16>. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2898190/>. Acesso em: 16 jul. 2019.

LIMA, A. *et al.* Moving toward personalized medicine in rheumatoid arthritis: SNPs in methotrexate intracellular pathways are associated with methotrexate therapeutic outcome. **Pharmacogenomics**, [s. l.], v. 17, n. 15, p.1649-1674, out. 2016. Future Medicine Ltd.
<http://dx.doi.org/10.2217/pgs-2016-0067>.

LÓPEZ-CERVANTES, M. *et al.* Diccionario de términos epidemiológicos. **Salud Pública de México**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 214-242, mar. 1994. ISSN 1606-7916. Disponível em:
<http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5751/6362>. Acesso em: 30 jun. 2019.

MARESZ, K. J. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* Facilitates the Development and Progression of Destructive Arthritis through Its Unique Bacterial Peptidylarginine Deiminase (PAD). **Plos Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 9, 12 set. 2013. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003627>. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003627>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MATOS, G. N. *et al.* O discurso do paciente portador de artrite reumatoide acerca de suas relações sociais: um estudo a partir da Psicologia. **Saúde & Transformação Social**, Florianópolis, v. 1, n. 1, p.99-105, 2010. Disponível em: <http://incubadora.periodicos.ufsc.br/index.php/saudeetransformacao/article/view/414>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MINICHIELLO, E.; SEMERANO, L.; BOISSIER, M.C. Time trends in the incidence, prevalence, and severity of rheumatoid arthritis: A systematic literature review. **Joint Bone Spine**, [s. l.], v. 83, n. 6, p.625-630, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.07.007>.

MOTA, L. M. H. *et al.* 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. **Advances In Rheumatology**, [s. l.], v. 58, n. 1, p.1-17, 24 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s42358-018-0005-0>. Disponível em: <https://advancesinrheumatology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42358-018-0005-0>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MOUDGIL, K. D.; DURAI, M. Regulation of autoimmune arthritis by self-heat-shock proteins. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 29, n. 9, p.412-418, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2008.06.003>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2699402/>. Acesso em: 16 jul. 2019.

NCBI. National Library of Medicine, National Institutes of Health (NLM/NIH). Estados Unidos da América. **Genome Decoration Page**: Place your annotations on the genome. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>. Acesso em: 11 jun. 2019.

OGRA, P. L. *et al.* Rubella-virus infection in juvenile rheumatoid arthritis. **The Lancet**, [s. l.], v. 305, n. 7917, p.1157-1161, maio 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)93136-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(75)93136-0).

OMS. Secretaria dos Direitos da Pessoa Com Deficiência. **Relatório mundial sobre a deficiência**. São Paulo: Lexicus Serviços Linguísticos (tradução), 2012. 360 p. Título original: World report on disability 2011. ISBN 978-85-64047-02-0. Disponível em: http://www.pessoacomdeficiencia.sp.gov.br/usr/share/documents/RELATORIO_MUNDIAL_COMPLETO.pdf. Acesso em: 24 maio 2019.

OVERMAN, C. L. *et al.* Change of Psychological Distress and Physical Disability in Patients With Rheumatoid Arthritis Over the Last Two Decades. **Arthritis Care & Research**, [s. l.], v. 66, n. 5, p.671-678, 22 abr. 2014. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/acr.22211>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/acr.22211>. Acesso em: 16 jul. 2019.

PATAKAS, A. **The role of TH17 cells in a model of rheumatoid arthritis**. 2011. 273 f. Tese (Doutorado) - Curso de Filosofia, University Of Glasgow, Glasgow, 2011. Cap. 1. Disponível em: <http://theses.gla.ac.uk/2867/1/2011patakasphd.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2019.

PETTERSSON, F. H. *et al.* Marker selection for genetic case–control association studies. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 4, n. 5, p.743-752, 23 abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.38>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025519/>. Acesso em: 1º jul. 2019.

PLANT, D.; WILSON, A. G.; BARTON, A. Genetic and epigenetic predictors of responsiveness to treatment in RA. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p.329-337, 18 fev. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2014.16>.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Of Heredity**, [s. l.], v. 86, n. 3, p.248-249, maio 1995a. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573>.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, [s. l.], v. 49, n. 6, p.1280-1283, dez. 1995b. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1558-5646.1995.tb04456.x>. Acesso em: 28 jun. 2019.

ROGERS, G. B. Germs and joints: the contribution of the human microbiome to rheumatoid arthritis. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 8, p.839-841, ago. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3916>.

ROUQUAYROL, M. Z.; GURGEL M. **Epidemiologia e saúde**. 8. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2018.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, [s. l.], v. 8, n. 1, p.103-106, jan. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>.

RUBINI, M. *et al.* The c.1298A>C polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with rheumatoid arthritis susceptibility in Italian patients. **Clinical and Experimental Rheumatology**, [s. l.], v.1, n. 26, p.163, 2008. Disponível em: <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=3291>. Acesso em 16 jul. 2019.

RUXTON, G. D.; NEUHÄUSER, M. Review of alternative approaches to calculation of a confidence interval for the *odds ratio* of a 2x2 contingency table. **Methods In Ecology And Evolution**, [s. l.], v. 4, n. 1, p.9-13, 5 out. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00250.x>. Disponível em: <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.2041-210x.2012.00250.x>. Acesso em: 17 jul. 2019.

SAAD, M. N. *et al.* Genetic Case-Control Study for Eight Polymorphisms Associated with Rheumatoid Arthritis. **Plos One**, [s. l.], v. 10, n. 7, p.2-5, 6 jul. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131960>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131960>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. *In*: SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Cap. 6. p. 126-140. Disponível em: <http://en.mrc.sbmu.ac.ir/index.jsp?fkeyid=&siteid=391&pageid=27600>. Acesso em: 26 jun. 2019.

SBR. **Procure um Reumatologista**. 2019. Disponível em: <https://www.reumatologia.org.br/associado>. Acesso em: 12 abr. 2019.

SCHNEIDER, D. **Principles of epidemiology**: case-control study. New Jersey: Supercourse Lecture, 2002. Color. Disponível em: <http://www.pitt.edu/~super1/lecture/lec8591/index.htm>. Acesso em: 18 jun. 2019.

SENNA, E. R. *et al.* Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach. **The Journal of Rheumatology**, v. 3, n. 31, p.594-597, 2004.

SHAKER, O. G. *et al.* Polimorfismos dos genes metilenotetrahidrofolato redutase, fator de crescimento transformador $\beta 1$ e linfotoxina- α e suscetibilidade à artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 56, n. 5, p.414-420, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbre.2016.04.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2255502116300256?via%3Dihub>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SILMAN, A. H. M. **Epidemiology of rheumatic diseases**. Local: Oxford University Press, 2000.

SINGH, J. A. *et al.* 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p.1-26, 6 nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/art.39480>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.39480>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SONG, G. G.; BAE, S. C.; LEE, Y. H. Association of the *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms with methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clinical Rheumatology*, [s. l.], v. 33, n. 12, p.1715-1724, 3 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-014-2645-8>.

STASTNY, P. Association of the B-Cell Alloantigen DRw4 with Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 298, n. 16, p.869-871, 20 abr. 1978. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm197804202981602>.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A Comparison of Bayesian Methods for Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data. *The American Journal Of Human Genetics*, [s. l.], v. 73, n. 5, p.1162-1169, nov. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/379378>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707619788>. Acesso em: 29 jun. 2019.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *The American Journal Of Human Genetics*, [s. l.], v. 68, n. 4, p.978-989, abr. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/319501>. Disponível em: [https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(07\)61424-4](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(07)61424-4). Acesso em: 29 jun. 2019.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 808 p. ISBN: 9788565852517.

STUART, J. M. *et al.* Collagen-induced arthritis in rats. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 22, n. 12, p.1344-1351, dez. 1979. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780221205>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/art.1780220406>. Acesso em: 16 jul. 2019.

TAPIA, J. A.; NIETO, F. J. Razón de posibilidades: una propuesta de traducción de la expresión *odds ratio*. **Salud Pública de México**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 419-424, jul. 1993. ISSN 1606-7916. Disponível em: <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5678/6216>. Acesso em: 30 jun. 2019.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, [s. l.], v. 467, n. 7319, p.1061-1073, out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09534>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature09534>. Acesso em: 16 jul. 2019.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, [s. l.], v. 491, n. 7422, p.56-65, 31 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11632>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11632>. Acesso em: 16 jul. 2019.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. **Nature**, [s. l.], v. 526, n. 7571, p.68-74, 30 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature15393>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature15393>. Acesso em: 16 jul. 2019.

TORRES, P. **EncontrAR**: A vida após a artrite reumatoide. São Paulo: Casa Flutuante, 2017.

TRENTHAM, D. E.; TOWNES A. S.; KANG A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **Journal Of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 146, n. 3, p.857-868, 1 set. 1977. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.146.3.857>. Disponível em: <http://jem.rupress.org/content/146/3/857.long>. Acesso em: 16 jul. 2019.

URIBARRI, M. *et al.* Influence of *MTHFR* C677T polymorphism on methotrexate monotherapy discontinuation in rheumatoid arthritis patients: results from the GAPAID European project. **Clin Exp Rheumatol**, v.33, n.5, p.699-705, 2015.

VAN DER PUT, N. M. J. *et al.* A Second Common Mutation in the Methylene-tetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects?. **The American Journal Of Human Genetics**, [s. l.], v. 62, n. 5, p.1044-1051, maio 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1086/301825>. Disponível em: [https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(07\)61524-9](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(07)61524-9). Acesso em: 4 jul. 2019.

VAN GAALEN, F. A. *et al.* Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: A prospective cohort study. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 50, n. 3, p.709-715, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/art.20044>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.20044>. Acesso em: 16 jul. 2019.

VAN VILSTEREN, M. *et al.* Productivity at work and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. **Bmc Musculoskeletal Disorders**, [s. l.], v. 16, n. 1, p.20-60, 6 maio 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12891-015-0562-x>. Disponível em: <https://bmcmusculoskeletdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12891-015-0562-x>. Acesso em: 16 jul. 2019.

VASANTHI, P.; NALINI, G.; RAJASEKHAR, G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. **Aplar Journal Of Rheumatology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p.270-274, 5 dez. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1479-8077.2007.00305.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1479-8077.2007.00305.x>. Acesso em: 16 jul. 2019.

VIEIRA, S. **Bioestatística: Tópicos Avançados**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. 308 p.

VILLAVERDE, F. J. N. **Haplotipos de SNPs**. Navarra: Universidad de Navarra, 2011. 1 vídeo (3 min.). Disciplina de Genética Molecular Humana (Faculdade de Ciências). Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=rxg-OF41vBY&feature=youtu.be>. Acesso em: 18 jun. 2019.

WAN, L. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 8, n. 1, 5 nov. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-018-0276-6>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41398-018-0276-6>. Acesso em: 17 jul. 2019.

WARDE, N. EBV induces arthritis in mice. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 7, n. 12, p.683-683, 15 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2011.176>.

WU, H. *et al.* Gut-Residing Segmented Filamentous Bacteria Drive Autoimmune Arthritis via T Helper 17 Cells. **Immunity**, [s. l.], v. 32, n. 6, p.815-827, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.06.001>. Disponível em: [https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(10\)00204-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761310002049%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(10)00204-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761310002049%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 16 jul. 2019.

XAVIER, R. M. Genética das doenças autoimunes: avanços e relevância para o reumatologista. **Reuminds**, São Paulo, v. 2, n. 3, p.10-15, 2015. ISSN: 2318-3675.

YI, P.; POGRIBNY, I.; JAMES, S. J. 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 letter*, v. 181, n. 2, p. 209, 2002.

YUAN, Y; SHAO, W.; LI, Y. Associations between C677T and A1298C polymorphisms of *MTHFR* and susceptibility to rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Rheumatology International**, [s. l.], v. 37, n. 4, p.557-569, 7 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-017-3650-4>.

ZHANG, X. *et al.* The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 8, p.895-905, 27 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3914>.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH/UFSC)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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

ANEXO B – Dados Epidemiológicos e Clínicos do/da Portador(a) de Artrite Reumatoide

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR, EMBRIOLOGIA E
GENÉTICA/CCB
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA/CCS**

NOME: _____ **PRONTUÁRIO/HU:** _____
IDADE: _____ anos **Sexo:** () F () M () I **COR da Pele:** _____
Procedência: _____ **Natural de:** _____
Estado Civil: () S () C () D () V **Data de nascimento:** ___/___/___
Ocupação: _____
E-mail: _____
Telefone: (____) _____ **Celular:** (____) _____

DATA da coleta: ___/___/___ **IDentificação:** ART _____
Médico(a): _____
Entrevistador(a): _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____
CIDADE onde nasceu: _____
Profissão: _____
ASCEndência do pai: Materna: _____ Paterna: _____

NOME da mãe: _____
CIDADE onde nasceu: _____
Profissão: _____
ASCEndência: Materna: _____ Paterna: _____

Tempo de doença diagnosticada: _____
Histórico Familiar: AR: () Sim () Não Parentesco: _____
 Outras Doenças Reumáticas: () Sim () Não Parentesco: _____

Manifestações Iniciais:

() Febre () Rigidez Matinal () Derrame Articular () Dor Articular

Articulações Acometidas:

() Ombro () Cotovelo () Punho () MCF () IFPM
 () Quadril () Joelho () Tornozelo () MTF () IFPP
 () Outras _____

Manifestações Extra-articulares:

() Acometimento Ocular () Pericardite () Vasculite Reumatoide
 () Nódulos Reumatoides () Pleurite () Acometimento Pulmonar
 () Acometimento Renal () Amiloidose () Outras _____

Evolução:**Internações:** () Sim () Não Informações: _____

Observações: Osteoporose? Diabetes? Depressão?

Sintomatologia Recente (últimos 10 dias):

() Febre () Rigidez Matinal () Derrame Articular () Dor Articular

Articulações Acometidas:

() Ombro () Cotovelo () Punho () MCF () IFPM
 () Quadril () Joelho () Tornozelo () MTF () IFPP
 () Outras _____

Manifestações Extra-articulares:

() Pleurite () Pericardite
 () Vasculite Reumatoide () Nódulos Reumatoides
 () Acometimento Ocular () Acometimento Pulmonar
 () Acometimento Renal () Amiloidose
 () Outras _____

Envolvimento Cardiovascular:

() HAS () Doença Coronariana () Revascularização do Miocárdio
 () Angina () IAM Prévio () Cateterismo Prévio

Envolvimento Neurológico: () AVC () AIT () Ateroma em Carótidas**Dislipidemia:** () Hipercolesterolemia () Hipertrigliceridemia**Histórico Familiar de DCV:** () Sim () Não Parentesco: _____**DAS 28 =**

Health Assesment Questionnaire (HAQ)

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

Escore dos Componentes:

Componente 1, perguntas 1 e 2: _____ Maior escore: _____

Componente 2, perguntas 3 e 4: _____ Maior escore: _____

Componente 3, perguntas 5, 6 e 7: _____ Maior escore: _____

Componente 4, perguntas 8 e 9: _____ Maior escore: _____

Componente 5, perguntas 10, 11 e 12: _____ Maior escore: _____

Componente 6, perguntas 13 e 14: _____ Maior escore: _____

Componente 7, perguntas 15 e 16: _____ Maior escore: _____

Componente 8, perguntas 18, 19 e 20: _____ Maior escore: _____

Média Aritmética dos Escores dos Componentes = _____

Escore do HAQ = _____

Tratamento Atual:**CORTICosteroides:** ()Sim ()Não Nome: _____

Dose: _____ Freqüência: _____

METOtrexato: ()Sim ()Não

Dose: _____ Freqüência: _____

SULFASSALazina: ()Sim ()Não

Dose: _____ Freqüência: _____

ANTIMALárico: ()Sim ()Não

Dose: _____ Freqüência: _____

CICLOFosfamida: ()Sim ()Não

Dose: _____ Freqüência: _____

INFLIXImab: ()Sim ()Não

Dose: _____ Freqüência: _____

ETANERcept: ()Sim ()Não

Dose: _____ Freqüência: _____

AINE: ()Sim ()Não

Dose: _____ Freqüência: _____

ANALGésicos: ()Sim ()Não

Dose: _____ Freqüência: _____

Outros: ()Sim ()Não Quais? _____

Dose: _____ Freqüência: _____

Idade MENARCA: ____anos **MENOPAUSA:** ()Sim ()Não Idade: ____

Histerectomia: ()Sim ()Não Idade: _____

Ovariectomia: ()Sim ()Não Idade: _____

FASE do Ciclo Reprodutivo: ()Menacme ()Climatério**GESTAções:** _____ **PARidades:** _____

Abortos: ()Sim ()Não ()Induzido N°: _____ ()Espontâneo N°: _____

Tratamento HORMONAL Antes do Diagnóstico:

()Sim ()Não Qual? ()AC ()Outro _____

Duração: _____ Parou há quanto tempo? _____

Tratamento MEDICAMENTOSO Antes do Diagnóstico:

()Sim ()Não Qual? _____

História de Uso de DROGAS:**Álcool:** ()Sim ()Não Qual? _____

Quantidade: _____ Freqüência: _____

Cigarro: ()Sim ()Não Cigarros/dia: _____

Se fumava, qual a duração? _____ Quando parou? _____

Drogas Ilícitas: ()Sim ()Não Qual? _____

Por quanto tempo? _____

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao/à Portador(a) de Artrite Reumatoide

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

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

Informações:

Pesquisadores(as) da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e medicamentos que podem estar associados ao **aparecimento e diferente adesão ao tratamento de doenças autoimunes, mais especificamente da Artrite Reumatoide (AR)**. Para isso, pedimos sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico (10mL de sangue), uma quantidade pequena de **ADN** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O ADN, será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre um de seus genes, proposto no atual projeto (ligado ao metabolismo de medicamentos e também relacionado à resposta imunológica) e o aparecimento desta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, desde que aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH/CONEP) e mediante sua autorização após novo contato. Salientamos que **sua participação é voluntária** e não influenciará no seu atendimento. A equipe agradece antecipadamente a colaboração e se coloca à disposição para responder a qualquer pergunta que você queira fazer, bem como elucidar quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para (48) 3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com o aluno Renan Mantovani Rabelo, ou ainda com o Prof. Dr. Ivânio Alves Pereira [no ambulatório de reumatologia, telefone: (48) 3721-9133].

Procedimentos:

Caso concorde em participar, você responderá a um questionário de duração aproximada de 5 (cinco) minutos, para sabermos se você teve ou tem outra(s) doença(s), se alguma(s) pessoa(s) na sua família teve/tiveram ou tem/têm doença autoimune, como AR ou outra forma de artrite, dentre outros. O ADN extraído da amostra coletada será guardado no laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue é procedimento comum no acompanhamento da AR. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da punção da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações levantadas, bem como os resultados das análises genéticas, serão mantidos em sigilo e utilizados somente pela equipe da pesquisa.

* Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos desta instituição (<http://cep.ufsc.br>) em 14/10/2013 via parecer consubstanciado número 423.5359.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios:

Você não terá nenhum benefício direto logo após participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão num futuro próximo fornecer um tratamento mais eficaz e resultar em uma melhor alternativa de medicamento. Num futuro posterior, poderá proporcionar novas alternativas para prevenção da doença e identificação de pessoas que têm risco de a desenvolver, podendo beneficiar muitos outros indivíduos.

Assinaturas:

Pesquisador(a) auxiliar _____

Pesquisadora responsável _____

Ilha de Santa Catarina, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO E ARTRITE REUMATOIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA”, de modo que concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado(a) para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste termo.

Ilha de Santa Catarina, _____ de _____ de _____

Assinatura: _____ RG: _____

ANEXO D – Dados Epidemiológicos e Clínicos da Pessoa Controle

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

Projeto de Pesquisa: “ESTRUTURA GENÉTICA E ORIGEM DA POPULAÇÃO DE SANTA CATARINA”.

Data da coleta: ___/___/_____

Identificação: CTR _____

Entrevistador(a): _____

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade/Estado: _____ Telefone comercial: (___) _____

Celular: (___) _____ Telefone residencial: (___) _____

E-mail: _____

Preferência por contato via: () E-mail () Telefone () Celular () Correio

Data de nascimento: ___/___/_____ Estado Civil: _____

Idade: _____ Sexo: () F () M () I Aposentado: () Sim () Não

Profissão: _____

Escolaridade: () Analfabeta(o) () 1º grau incompleto

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

() Superior incompleto () Superior completo () Pós-graduação

Cidade onde nasceu/Estado: _____

Autoidentificação (IBGE): () Branca () Indígena () Preta () Parda () Amarela

Cor da pele (heteroidentificação): () Branca () Negra () Mulata () Amarela

Peso: _____ Altura: _____ Tipo sanguíneo: _____

Observações: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade/Estado onde nasceu: _____

Ascendência do pai: Materna: _____ Paterna: _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade/Estado onde nasceu: _____

Ascendência do mãe: Materna: _____ Paterna: _____

Profissão: _____

Possui irmãos: () Sim () Não Quantos: _____ Mulheres _____ Homens

Observações: _____

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**: Sim Não
 Frequência: Todos os dias Fim de semana Esporadicamente
 Quantidade (copos de 200ml): _____
 Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?
 Cerveja Vinho Cachaça Outra _____

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**: Sim Não Quais? _____

Quantidade: Menos de 30min 30min 1h Mais de 1h
 Frequência: 1x por semana 2-3x por semana 4-6x por semana
 Todos os dias Menos de 1x por semana

FUMA: Sim Não Já **FUMOU**: Sim Não
 Tipo: Cigarro Charuto Cachimbo Outro _____
 Quantidade e frequência (número por dia): _____
 Tempo que fuma ou fumou: _____
 Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo:

Idade da menarca: _____ anos Menopausa: Sim Não Idade: _____
 Histerectomia: Sim Não Idade: _____
 Ovariectomia: Sim Não Idade: _____

Paridade:

Número de gestações: _____ Idade da primeira gestação: _____
 Número de filhos: _____ Mulheres _____ Homens Nulípara
 Abortos: Sim Não Induzido N°: _____ Espontâneo N°: _____
 Amamentou: Sim Não Tempo total (meses): _____

Tratamento Hormonal:

Utiliza anticoncepcional (AC): Sim Não Já Utilizou AC: Sim Não
 Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: _____
 Tempo que usa/usou AC: _____
 Há quanto tempo parou: _____

Faz terapia de reposição hormonal (TRH): Sim Não Já fez TRH: Sim Não
 Nome do Hormônio: _____
 Tempo que faz/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 () Outro _____

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: _____

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:

Alérgica(o) a algum medicamento: _____

Alérgica(o) a algum alimento: _____

Tem/teve **DEPRESSÃO**: _____

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

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

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido à Pessoa Controle

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

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

Informações:

Pesquisadores(as) da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e medicamentos que podem estar associados ao **aparecimento e diferente adesão ao tratamento de doenças autoimunes, mais especificamente da Artrite Reumatoide (AR)**. Para isso, pedimos sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico (10mL de sangue), uma quantidade pequena de **ADN** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O ADN, será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre um de seus genes, proposto no atual projeto (ligado ao metabolismo de medicamentos e também relacionado à resposta imunológica) e o aparecimento desta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, desde que aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH/CONEP) e mediante sua autorização após novo contato. Salientamos que **sua participação é voluntária** e não influenciará no seu atendimento. A equipe agradece antecipadamente a colaboração e se coloca à disposição para responder a qualquer pergunta que você queira fazer, bem como elucidar quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para (48) 3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com o aluno Renan Mantovani Rabelo, ou ainda com o Prof. Dr. Ivânio Alves Pereira [no ambulatório de reumatologia, telefone: (48) 3721-9133].

Procedimentos:

Caso concorde em participar, você responderá a um questionário de duração aproximada de 5 (cinco) minutos, para sabermos se você teve ou tem alguma(s) doença(s), se alguma(s) pessoa(s) na sua família teve/tiveram ou tem/têm doença autoimune, como AR ou outra forma de artrite, dentre outros. O ADN extraído da amostra coletada será guardado no laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue é procedimento comum para o/a doador(a). O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da punção da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações levantadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizados somente pela equipe da pesquisa.

* Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos desta instituição (<http://cep.ufsc.br>) em 14/10/2013 via parecer consubstanciado número 423.5359.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios:

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção e tratamento de doenças autoimunes, em particular, a artrite reumatoide, e para identificação de pessoas que têm risco de desenvolver tal doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador(a) auxiliar _____

Pesquisadora responsável _____

Ilha de Santa Catarina, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO E ARTRITE REUMATOIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma e autorizo a guarda de meu material biológico para o caso de futuras pesquisas, sendo eu contatado(a) para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste termo.

Ilha de Santa Catarina, _____ de _____ de _____

Assinatura: _____ RG: _____