



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

**Estudo epidemiológico e de associação
do polimorfismo do gene *PDCD1* à Artrite Reumatóide e
ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em Santa Catarina**

Luisa Matos do Canto

Florianópolis
2009



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

**Estudo epidemiológico e de associação
do polimorfismo do gene *PDCD1* à Artrite Reumatóide e
ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em Santa Catarina**

Luisa Matos do Canto

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

Orientadora: Prof. Dra. Ilíada Rainha de Souza
Co-Orientadora: MSc. Lia Kubelka de Carlos Back

Florianópolis
2009

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos pacientes, que gentilmente cederam seu tempo para contar uma parte de suas vidas à nossa equipe e sem os quais essa pesquisa não se realizaria.

À Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza, por nunca medir esforços para que sempre fosse compreendido aquilo que era necessário, por mais que isso delongasse horas de conversa.

À Lia, por me iniciar no mundo da genética molecular de forma tão apaixonante e “viciante”.

A todos meus colegas do LAPOGE pelo apoio, dedicação e amizade, que foram muito além das bancadas do laboratório.

Ao Dr. Ivânio Alves Pereira e à Dra. Adriana Zimmerman pela paciência e cooperação nesses últimos anos.

Aos professores da graduação em Ciências Biológicas que me deram suporte e subsídios para chegar até aqui!

De forma especial, agradeço, primeiramente, à minha família: à minha mãe, Rochele, pelo apoio incondicional, à minha avó Mafalda pela inspiração de vida, à minha tia Maria Jausina por instigar em mim, desde cedo, a busca pelo conhecimento. Ao meu pai, Valdir, por todas as conversas filosóficas e mudanças de paradigmas. Aos meus tios, Ricardo e Azair, que sempre foram uma fonte de inspiração e busca de conselhos. A todas as minhas tias que sempre confiaram em mim e acreditaram que eu conseguiria concluir este período.

À Mônica, pelo estímulo de sempre e por ser ter sido um presente na minha vida!

Aos meus amigos de infância, que sempre me deram apoio, mesmo que de longe, nesses últimos anos. À Liana, à Lizete e à Dina, por estarem

sempre ao meu lado e fazerem parte daquela família que a gente escolhe. Às GBPVs, sempre prontas a ouvir os desabafos e dar conselhos, especialmente à Lara, que tem me aturado todos esses anos.

À Cleonice e Estefano, sem os quais eu não conseguiria passar por uma das fases mais difíceis da vida e chegar à faculdade.

A todos os amigos que fiz durante o curso, com os quais passei noites estudando, conversando sobre pontinhos na parede, descobrindo filmes... e que me ensinaram a ver a vida e as pessoas de um modo mais leve e gracioso. Mais do que isso, ensinaram-me a enxergar a vida pelos mais diversos pontos de vista. Ainda que não consiga citar neste papel as tantas pessoas às quais eu gostaria de agradecer, espero poder fazê-lo pessoalmente e sei que cada uma sabe o quão importante é na minha vida.

*“A gente sempre deve sair à rua como quem foge de casa,
Como se estivessem abertos diante de nós todos os caminhos do mundo.
Não importa que os compromissos, as obrigações, estejam ali...
Chegamos de muito longe, de alma aberta e o coração cantando!”*

Mário Quintana

RESUMO

Doenças autoimunes sistêmicas, como a Artrite Reumatóide (AR) e o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), são de etiologia complexa e caracterizam-se por alterações na resposta inflamatória e processos autoimunes comprometidos, no entanto, os mecanismos que as determinam são ainda desconhecidos. É possível que a ativação dos linfócitos, governada por sinais imunoestimulatórios e imunoinibitórios recebidos por seus receptores de superfície, inicie a quebra de tolerância e predisponha o paciente ao desenvolvimento destas manifestações. Uma das moléculas coestimulatórias estudada possui um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), $G>A$, reportado como fator de risco para ambas as doenças. O alelo *A* do SNP PD1.3 do gene *PDCD1* altera o sítio de ligação de um fator de transcrição, localizado em um promotor intrônico, sugerindo um mecanismo que pode contribuir para o desenvolvimento da autoimunidade. Por isso, os objetivos do trabalho foram averiguar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo citado e investigar a associação do mesmo a AR e ao LES, em estudo caso-controle. Para tal, foram coletadas amostras de sangue periférico de indivíduos controle ($n = 128$) e casos, LES ($n = 95$) e AR ($n = 87$) e utilizou-se a técnica PCR-RFLP para identificação da variabilidade. Os genótipos do grupo controle encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ao contrário dos grupos de pacientes. As frequências do alelo *A* encontradas para controles, LES e AR foi de 0,078, 0,095 e 0,115, respectivamente. Para o alelo *G*, as frequências observadas foram de 0,922, 0,905 e 0,885 para controles, LES e AR. Esses dados mostram-se semelhantes aos observados para população europeia não-hispânica. Os estudos de associação não mostraram nenhuma relação estatisticamente significativa entre os alelos ou os genótipos e as doenças estudadas. No entanto, uma associação do alelo *A* do polimorfismo desse SNP a pacientes com AR foi verificada ($OR = 5,118$, $IC\ 95\% = 1,324 - 23,145$, $p = 0,013$). Muitos dos resultados obtidos indicam possíveis associações, não comprovadas estatisticamente por este estudo.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico, *Programmed cell death 1*, polimorfismos.

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1: Sumário dos membros da família CD28 e seus ligantes.</i>	<i>19</i>
<i>FIGURA 2: Representação do gene PDCD1.....</i>	<i>20</i>
<i>FIGURA 3: Via de inibição da sinalização do receptor do antígeno de células T, através da ativação da proteína PD-1.</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 4: A via PD-1-PD-L.</i>	<i>22</i>
<i>FIGURA 5. Foto de Gel de agarose 3% com amostras de PCR-RFLP tratadas com a enzima PstI.....</i>	<i>28</i>
<i>FIGURA 6: Distribuição percentual de frequência de casos e controles por faixa etária.</i>	<i>30</i>
<i>FIGURA 7: Distribuição étnica de pacientes e controles.....</i>	<i>30</i>
<i>FIGURA 8: Distribuição percentual de homens e mulheres nos grupos estudados.....</i>	<i>31</i>
<i>FIGURA 9: Distribuição percentual de pacientes e controles de acordo com o número de filhos.....</i>	<i>35</i>
<i>FIGURA 10: Porcentagens de fumantes e não fumantes distribuídos entre os grupos estudados.....</i>	<i>36</i>

LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1. SNPs encontrados no gene PDCD1.....</i>	<i>23</i>
<i>TABELA 2. Sequência dos iniciadores utilizados na PCR – RFLP.</i>	<i>27</i>
<i>TABELA 3: Representação de frequências de um determinado alelo em pacientes e controles para o cálculo de Odds ratio.....</i>	<i>29</i>
<i>TABELA 4: Frequências genotípicas observadas e esperadas e frequências alélicas em controles para o SNP PD1.3.</i>	<i>32</i>
<i>TABELA 5: Frequências genotípicas observadas e esperadas e frequências alélicas em pacientes com AR para o SNP PD1.3.....</i>	<i>32</i>
<i>TABELA 6: Frequências genotípicas observadas e esperadas e frequências alélicas em pacientes com LES para o SNP PD1.3.</i>	<i>33</i>
<i>TABELA 7: Análise de associação entre pacientes com AR e controles para alelos e genótipos do polimorfismo PD-1.3.....</i>	<i>34</i>
<i>TABELA 8: Análise de associação entre pacientes com LES e controles para alelos e genótipos do polimorfismo PD-1.3.</i>	<i>34</i>
<i>TABELA 9: Análise de associação entre pacientes com AR que possuem ou não fator reumatóide positivo para o alelo A.....</i>	<i>35</i>
<i>TABELA 10: Frequências do alelo A - SNP PD1.3 – nos controles e pacientes de estudos de associação ao LES realizados em diversas populações, incluindo a do presente estudo.....</i>	<i>40</i>

ÍNDICE

RESUMO	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. AUTOIMUNIDADE.....	11
1.1.1. ARTRITE REUMATÓIDE (AR)	12
1.1.2. LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)	15
1.2. PROGRAMMED DEATH -1 (PD-1)	18
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. ASPÉCTOS ÉTICOS	25
3.2. COLETA DE SANGUE E DADOS DOS PACIENTES.....	25
3.3. MÉTODOS LABORATORIAIS	26
3.3.1. SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DO SANGUE.....	26
3.3.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	26
3.3.3. GENOTIPAGEM.....	26
3.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	28
4. RESULTADOS	29
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	29
4.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO PD - 1.3	31
4.3. ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DAS DOENÇAS COM O POLIMORFISMO PD-1.3	33
4.4. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	35
5. DISCUSSÃO	37
5.1. ANÁLISES DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO PD1.3	38
5.2. ANÁLISES DAS FREQUÊNCIAS E ALÉLICAS DO SNP PD1.3	39
5.3. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO ÀS DOENÇAS.....	41
5.4. ANÁLISE DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	43
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS	45
ANEXO 1	53
ANEXO 2	55
ANEXO 3	68
ANEXO 4	71

1. INTRODUÇÃO

A patogenia na maioria das doenças autoimunes conhecidas ainda não foi elucidada. As abordagens dessas doenças foram dominadas pelo paradigma de que, devido a um estímulo antigênico ainda desconhecido, os linfócitos anteriormente tolerantes rompem o estado de tolerância e iniciam uma resposta imunológica (PARSLOW *et al.*, 2004).

A principal característica das doenças autoimunes são as causas multifatoriais, uma base genética complexa aliada a fatores não genéticos, que contribuem em diferentes graus para cada indivíduo afetado (PEARCE e MERRIMAN, 2006). Um dos fatores ambientais que mais tem influência nessas doenças é o cigarro, que pode contribuir para a autoimunidade através de vários mecanismos, como a liberação de metaloproteinases e indução do aumento de apoptose (SHOENFELD, 2008).

Duas doenças autoimunes que têm sido os principais alvos de estudos de variação genética em Reumatologia são a Artrite Reumatóide (AR) e o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Polimorfismos genéticos do genoma humano foram investigados em muitos trabalhos e novas evidências da contribuição genética em doenças reumáticas foram acrescentadas (YAMADA e YAMAMOTO, 2007).

Os principais estudos que demonstram a importância do papel da genética nessas doenças são aqueles feitos com gêmeos e com famílias. Pesquisas empregando associações caso-controles são consideradas mais fáceis e eficientes de serem realizados em comparação aos estudos com famílias, devido à maior dificuldade em coletar materiais biológicos e conseguir informações de parentes dos pacientes (ALARCÓN-RIQUELME, 2002).

Doenças autoimunes sistêmicas, como a AR e o LES, são caracterizadas por alterações na resposta inflamatória e comprometimento da autotolerância (ABBAS, LICHTMAN e SHIV, 2008). Estudos sugerem que uma desregulação na ativação dos linfócitos, governada por sinais imunoestimulatórios e imunoinibitórios recebidos por seus receptores de superfície, inicie a quebra de

tolerância e predisponha o paciente ao desenvolvimento destas manifestações autoimunes (LIN *et al.*, 2004).

1.1. Autoimunidade

A necessidade de prevenir o sistema imune de reagir contra o próprio organismo foi um conceito em imunologia, refletido no termo “*Horror autotoxicus*” cunhado pelo imunologista Paul Ehrlich no século XIX. Aproximadamente 3% da população humana é afetada por uma desordem autoimune e mecanismos autoimunes não conhecidos devem também contribuir para outras doenças comuns. Portanto, a compreensão dos fatores que contribuem para essas doenças é de grande importância para a saúde pública. Essas doenças são fenotipicamente heterogêneas e, através de uma perspectiva clínica, é conveniente classificar a autoimunidade em doenças “sistêmicas” ou “órgão-específicas” (GREGERSEN e BEHRENS, 2006).

Apesar da heterogeneidade fenotípica, a maioria das doenças autoimunes compartilha uma característica: ocorrem com predominância em mulheres, com mais de 80% de prevalência. Para explicar esse fato, muitas hipóteses relacionadas a hormônios, história reprodutiva e a participação do cromossomo X foram formuladas (LLEO *et al.*, 2008). A participação dos hormônios sexuais no sistema imune foi baseada em relatos da participação de estrogênios na maturação dos linfócitos, ativação e síntese de anticorpos e citocinas (MEDINA *et al.*, 2001).

A autoimunidade não é necessariamente um sinal de doença. Os autoanticorpos são frequentemente detectados em indivíduos normais saudáveis. Os Fatores Reumatóides (FR) correspondem a anticorpos contra determinadas imunoglobulinas G (IgG) tipicamente encontrados em pacientes com AR. Tais moléculas acompanham regularmente as respostas imunológicas normais, porém apresentam baixos títulos e curta duração. Entretanto, essas respostas nem sempre são de natureza protetora, podendo estar associadas à destruição tecidual e ao desenvolvimento de doença (PARSLOW *et al.*, 2004).

A tolerância ao próprio não se trata de uma característica herdada, e sim, do resultado de vários mecanismos capazes de diferenciar linfócitos com

potencial de se ligar a componentes próprios e aqueles com especificidade de ligação muito maior para antígenos estranhos (PEARCE e MERRIMAN, 2006).

A tolerância central é induzida nos órgãos linfóides primários (timo e medula óssea) quando os linfócitos imaturos encontram antígenos próprios. Essa interação desencadeia vários resultados possíveis: (1) os linfócitos podem sofrer apoptose (fenômeno conhecido por deleção clonal); (2) muitas células B imaturas não morrem, mas alteram seus receptores e param de reconhecer o antígeno próprio (processo de edição do receptor); e, (3) algumas células T_{CD4+} se diferenciam em células T reguladoras (T_{REG}), as quais migram para a periferia e evitam respostas aos antígenos próprios. A tolerância periférica, por sua vez, ocorre devido à anergia, deleção ou supressão das células T quando linfócitos maduros reconhecem antígenos próprios nos tecidos (ABBAS, LICHTMAN e SHIV, 2008).

A indução de anergia constitui a condição mais conhecida para tornar as células T não funcionais, pois, para sofrerem ativação completa, as células T necessitam de dois sinais. O primeiro deles é fornecido pelo antígeno de ligação ao Receptor de Célula T (TCR). O segundo sinal provém da interação de moléculas co-estimuladoras, expressas na superfície de células T, com as células apresentadoras de antígeno (APCs) (KEIR *et al.*, 2008). Uma vez ocorrido o reconhecimento de antígenos próprios, as células T podem ativar receptores inibidores da família CD28, de forma a não determinar resposta às APCs. Embora muitos receptores inibidores tenham sido descritos, dois possuem papel fisiológico na autotolerância melhor estabelecido, que são CTLA-4 e PD-1 (ABBAS, LICHTMAN e SHIV, 2008).

1.1.1.Artrite Reumatóide (AR)

A AR é uma doença complexa que afeta 0,2 a 2% da população mundial (PROKUNINA *et al.*, 2004b), sendo que as mulheres superam os homens em uma relação três para um. A doença pode ocorrer em todos os grupos étnicos e em todas as partes do mundo (RHEUMATOID ARTHRITIS, 2009).

As manifestações clínicas da AR variam segundo o indivíduo, podendo apresentar diferentes intensidades ao longo do tempo (RHEUMATOID ARTHRITIS, 2009). Ocorre rigidez e dor articular, que geralmente são mais

intensas pela manhã e regridem durante o dia, acompanhadas de sintomas de inflamação das articulações – edema, calor, eritema e hipersensibilização à palpação (PARSLOW *et al.*, 2004).

A AR é simétrica e afeta primeiramente as pequenas articulações, sendo que as grandes são, geralmente, afetadas em um estágio mais avançado da evolução da doença, embora possa predominar o comprometimento de determinadas articulações em alguns pacientes. A coluna cervical pode ser afetada, enquanto a torácica e a lombossacra costumam ser poupadas. Ainda é comum haver inflamação periarticular, tendinite e tenossinovite que resultam em fraqueza dos tendões, ligamentos e estruturas de sustentação. A dor articular resulta em espasmo muscular, limitação do movimento e, nos casos avançados, contrações musculares e anquilose, com deformidade articular permanente (PARSLOW *et al.*, 2004).

Assim como o LES, a AR também é uma doença sistêmica que atinge principalmente as articulações. Porém, outros tecidos e órgãos podem ser comprometidos, como pele, unhas, músculos, rins, coração, pulmão, sistema nervoso, olhos e sangue. A chamada Síndrome de Felty (aumento do baço, dos gânglios linfáticos e queda dos glóbulos brancos em paciente com a forma crônica da AR) também pode ser observada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009). Além disso, pode haver sobreposição de outras doenças como esclerodermia e síndrome de Sjögren (LEVY *et al.*, não datado; SILVA, 2003).

As respostas imunológicas celular e humoral podem contribuir para o desenvolvimento da sinovite. As células TCD4+, os linfócitos B ativados, os plasmócitos e os macrófagos, bem como outros tipos de células inflamatórias, são encontrados na sinóvia inflamada e, nos casos graves, podem estar presentes folículos linfóides bem formados com centros germinativos (ABBAS, LICHTMAN e SHIV, 2008). A membrana sinovial, que normalmente possui uma única camada de células, apresenta proliferação celular, resultando no aumento dessa camada e também na formação de novos vasos sanguíneos (BENJAMINI *et al.*, 2002).

Os mecanismos imunopatológicos dessas células liberam algumas citocinas (das quais TNF- α e a IL-1 estão entre as mais precoces), enzimas

degradativas e mediadores que levam à destruição da integridade da cartilagem. Os condrócitos são expostos ao sistema imune e propagam as lesões tanto servindo como alvo em potencial quanto liberando citocinas e fatores de crescimento. Muitas vezes, há acúmulo do líquido sinovial na articulação, que contém muitos neutrófilos polimorfonucleares. Após repetidos ataques inflamatórios ocorre o depósito de fibrina e a substituição da cartilagem por tecido fibroso, levando a fusão da articulação (anquilose) (BENJAMINI *et al.*, 2002).

Pacientes com AR podem produzir autoanticorpos, da classe IgM, contra a região Fc de IgG, que são chamados de Fator Reumatóide (FR) (LEVINSON, 2008). Com base no nível apresentado por eles é possível diferenciar os doentes que possuem ou não o Fator (FR positivo ou negativo, respectivamente). Pacientes FR positivo mostraram maior destruição das articulações e tiveram um pior prognóstico da doença em relação aos indivíduos que eram negativos para este marcador (PROKUNINA *et al.*, 2004b).

Estudos familiares e com gêmeos têm mostrado uma taxa de recorrência da doença em gêmeos monozigóticos de 12,3% e, 3,5% em dizigóticos. Baseados nesses dados Macgregor *et al.* estimaram uma herdabilidade de aproximadamente 60% para AR (MACGREGOR *et al.*, 2000). Muitos genes estão envolvidos na susceptibilidade de doenças reumáticas e apesar da maioria deles ser de baixa penetrância, não significa que cada polimorfismo associado tenha somente um pequeno papel nos processos patológicos (YAMADA e YAMAMOTO, 2007).

Algumas das principais dificuldades na identificação dos genes envolvidos na susceptibilidade à AR estão relacionadas à heterogeneidade da doença, assim como às diferentes atribuições étnicas (PROKUNINA *et al.*, 2004b). Gregersen *et al.* encontraram a relação de genes do MHC classe II com a susceptibilidade à doença através da formulação da hipótese do epítipo compartilhado (*shared epitope* - SE), uma sequência de aminoácidos compartilhada entre os subtipos de *HLA-DR* (GREGERSEN, SILVER e WINCHESTER, 1987). No entanto, têm-se estimado que MHC corresponde a aproximadamente um terço de todo componente genético de risco para a AR. Muito, mas provavelmente não o total, do risco atribuído ao MHC está associado à variação em *HLA-DRB1*, que possui pelo menos duas classes de alelos de risco: alto e moderado. Em geral, o alelo

*DRB1*0401* apresenta um nível alto de risco, com um risco relativo de aproximadamente 3. Os alelos *DRB1*0101*, **0404* e **0901* exibem um risco moderado, de 1,5 (FERNANDO *et al.*, 2008).

Estudos de rastreamento genômico têm ampliado o número de locos encontrados em associação ao desenvolvimento ou aumento da morbidade da doença. Mais de 10 regiões já foram descritas, além da já conhecida região do MHC. No entanto, nem todos os genes pertencentes a essas regiões foram descobertos e os mecanismos moleculares que explicam a participação de cada um também não foram completamente esclarecidos (INVERNIZZI e GERSHWIN, 2009)

Dentre os genes identificados, o *PTPN22* é o segundo loco mais importante associado à AR, localizado na região 1p13.3 e que codifica uma proteína intracelular sinalizadora. Outras moléculas também têm sido investigadas, como receptores de superfície, fatores de transcrição e citocinas, cujos resultados mostram participação de diversos genes em diferentes populações. Os mais citados em recentes estudos de revisão sobre a doença são *PTPN22*, *PADI4*, *STAT4*, *IL-2*, *IL-21*, *TNFAIP3*, *TRFA1* e *CD40*. (OLIVER *et al.*, 2006; INVERNIZZI e GERSHWIN, 2009).

1.1.2.Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O LES é uma doença autoimune crônica, multissistêmica, remitente e recidivante, que afeta cerca de 9 vezes mais o sexo feminino do que o masculino. Embora possa ocorrer em qualquer idade, a doença é mais frequente entre os 20 e 45 anos, com maior incidência por volta dos 30 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009). É conhecida como protótipo de doença autoimune porque possui múltiplos sintomas clínicos que se sobrepõe aos de outras doenças. Portanto, o conhecimento dos mecanismos que levam a essas manifestações pode contribuir para avanços no desenvolvimento de novos tratamentos para diversas doenças autoimunes (PROKUNINA e ALARCÓN-RIQUELME, 2004).

O nome Lúpus Eritematoso Sistêmico – LES – (“lobo vermelho”, literalmente) provavelmente tem origem em função de um frequente sintoma precoce: a erupção cutânea avermelhada presente na região malar e nariz, que

se assemelha às asas de uma borboleta e à pelagem diferenciada que o lobo apresenta nessa região. Além disso, o termo sistêmico é muito apropriado, uma vez que a doença acomete vários órgãos, causa febre, dor nas articulações e danos ao sistema nervoso central, ao coração e aos rins. As lesões renais são as mais bem compreendidas e correspondem à principal causa de mortalidade no LES (BENJAMINI *et al.*, 2002). Muitos estudos mostram a prevalência de nefrite em pelo menos um a cada três pacientes com LES e estudos do sudeste asiático mostram que 64% a 69,3% dos pacientes apresentam problemas renais comparados a 27% de pacientes analisados na Europa (TIKLY e NAVARRA, 2008).

As manifestações clínicas mais frequentes no LES são as lesões na pele, denominadas lesões em vespertílio. Existem ainda as lesões discóides que são bem delimitadas e mais profundas, deixando a área central com hipotrofia e determinando alteração na cor da pele (mais clara ou escura). Muitas outras lesões cutâneas, principalmente em face, antebraços e região do colo podem aparecer e frequentemente pioram após exposição ao sol. Ocorre também inflamação nas articulações, na pleura, no pericárdio e nos rins (nefrite), que aparece em cerca de 50% dos casos. Esta manifestação deve ser tratada precoce e adequadamente para se evitar a perda da função renal (insuficiência renal). A gravidade deste comprometimento é variável e, quando os exames clínicos e laboratoriais não permitem a adequada avaliação do caso, necessita-se fazer a biópsia renal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009).

Em mais de 50% dos casos pode ocorrer diminuição de glóbulos vermelhos (anemia), glóbulos brancos (leucopenia), dos linfócitos (linfopenia) ou de plaquetas (plaquetopenia). Com uma menor frequência pode-se observar inflamações no cérebro, causando convulsões, alterações do comportamento (psicose) ou do nível de consciência além de quadros de comprometimento de nervos periféricos. Inflamações de pequenos vasos (vasculite), que causam lesões avermelhadas e dolorosas em palma de mãos, planta de pés, no céu da boca ou em membros (braços e pernas) também estão presentes. As queixas de febre (sem sinais ou confirmação de infecção), emagrecimento e fraqueza são comuns quando a doença está ativa. O aumento do volume do fígado, baço e gânglios também pode ocorrer em fase ativa da doença, assim como sintomas oculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009).

A detecção de anticorpos dirigidos contra DNA (principalmente anti-DNA de duplo filamento), histonas, proteínas nucleares e outros componentes do núcleo celular ajudam no diagnóstico de pacientes com LES. O agente de formação desses autoanticorpos é desconhecido na maioria dos indivíduos afetados (LEVINSON, 2008).

A presença desses anticorpos e a redução do complemento sérico constituem as características básicas do LES ativo, que distinguem esta entidade de outras variantes do lúpus. Muitos desses anticorpos são dirigidos contra antígenos não ácido-nucleico que fixam complemento e, dessa forma, causam lesões nos tecidos-alvo. Por exemplo, a anemia hemolítica e a trombocitopenia características do LES são frequentemente causadas por anticorpos antieritrocitário e antiplaqueta (PARSLOW *et al.*, 2004).

Uma forte predisposição genética e fatores ambientais estão envolvidos no desenvolvimento da doença e há, aparentemente, diferenças na prevalência e manifestações da mesma nas diferentes populações (YANG *et al.*, 2009). Dados epidemiológicos do risco entre irmãos, agregação familiar do LES e a taxa de concordância da doença em gêmeos (24% a 69% para gêmeos monozigóticos e 2% a 9% para gêmeos dizigóticos) suportam o fato de que existe um componente genético importante associado ao desenvolvimento do LES (TSAO, 2003; CRISWELL, 2008).

A potencial associação de um componente genético à doença pode ser observada nos estudos sobre a formação de autoanticorpos no LES. Pacientes com epítomos dos antígenos leucocitários humanos *HLA-DR2* têm maior tendência a produzir anticorpos anti-DNA de duplo filamento, enquanto aqueles com *HLA-DR3* produzem anticorpos contra uma proteína de membrana que se liga ao RNA (anti-SS-A e anti-SS-B). Indivíduos que apresentam, *HLA-DR4* e *HLA-DR5*, por sua vez, produzem anticorpos dirigidos contra antígenos extraíveis nucleares (ENA), anti-Sm e anti-RNP (PARSLOW *et al.*, 2004).

Estudos prévios mostram que história familiar de doença autoimune deve ser um fator de risco para LES. Parentes de primeiro grau de pacientes femininos com LES apresentam quatro vezes mais risco de desenvolver doenças

autoimunes que parentes de primeiro grau de mulheres que não possuem esse tipo de doença (TSAO, 2004).

Foram detectadas, em famílias com múltiplos casos de Lúpus Eritematoso Sistêmico, regiões em praticamente todos os cromossomos que sugerem a contribuição de diversos genes para a expressão da doença. Esses genes podem apresentar alelos específicos a determinadas populações ou serem de distribuição mundial. Algumas dessas regiões também foram associadas a outras doenças autoimunes, fato que pode indicar o envolvimento dos mesmos genes em desordens relacionadas. Por mais que essas regiões de ligação tenham sido encontradas em diferentes populações, os genes, as mutações e as vias em que estão envolvidas ainda precisam ser identificadas (PROKUNINA e ALARCÓN-RIQUELME, 2004). Os principais *loci* já identificados são: 1q23, 1q25-31, 2q35-37, 4p16-15.2, 6p11-21, 12q24 e 16q12. Além disso, estudos de associação caso-controle têm encontrado muitos genes que exibem evidências convincentes de associação alélica com LES, incluindo alguns alelos ou haplótipos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*MHC*), deficiência na herança de componentes clássicos do complemento (C1q, C1r, C1s, C4A e C2) e genes que codificam receptores de baixa afinidade para a região Fc da IgG (FCGR2A e FCGR3A). A deficiência hereditária dos primeiros componentes da via clássica do sistema complemento (C1q, C2 e C4) tem sido fortemente associada à susceptibilidade ao LES, o que é um paradoxo, visto que o sistema complemento é tido como um mediador da inflamação (TSAO, 2004).

1.2. Programmed Death -1 (PD-1)

A função e ativação das células T são fortemente reguladas positivamente e negativamente por moléculas co-estimulatórias. A expressão e função anômalas dessas moléculas têm sido associadas com a ativação persistente de células T autorreativas em doenças autoimunes como AR e LES (WAN *et al.*, 2006). Os co-estimuladores dos linfócitos T mais bem conhecidos são os componentes da família de moléculas B7 nas Células Apresentadoras de Antígeno (APCs), que se ligam a membros da família de receptores CD28 (Figura 1) nas células T. As primeiras proteínas dessas famílias a serem descobertas foram CD28 e B7-1 (ABBAS, LICHTMAN e SHIV, 2008).

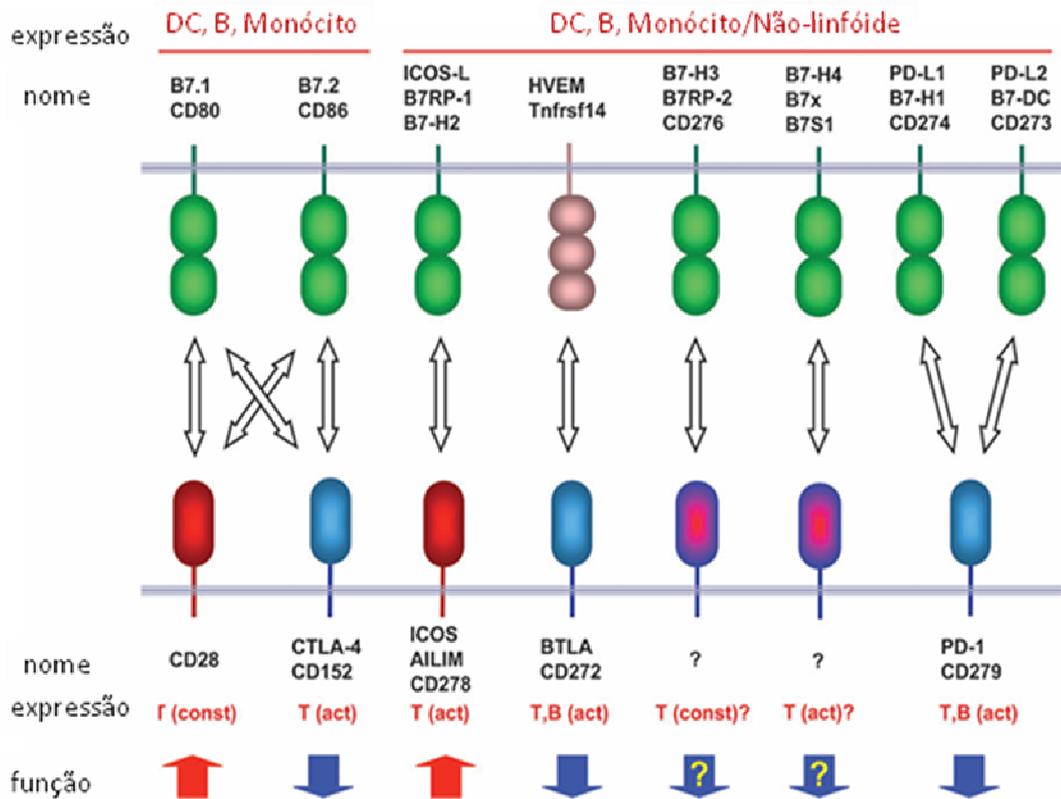


FIGURA 1: Sumário dos membros da família CD28 e seus ligantes. Nomes, padrões de expressão e função são indicados— figura adaptada de OKAZAKI, 2007 (OKAZAKI e HONJO, 2007).

Uma das proteínas da família CD28 é o PD-1 (*Programmed death 1*), um receptor de superfície celular codificado pelo gene *PDCD1* – *Programmed cell death 1* (MIN #600244), pertencente à superfamília das imunoglobulinas, que age como uma molécula inibitória em células T após interagir com seus ligantes PD-L1 e PD-L2 (KRONER *et al.*, 2005).

A proteína PD-1 é transmembrana monomérica do tipo I composta por 288 aminoácidos (aa), podendo ser encontrada tanto em solução quanto na superfície celular. O seu domínio citoplasmático apresenta dois resíduos de tirosina, um imunorreceptor *tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) e um outro imunorreceptor *tyrosine-based switch motif* (ITSM) que é o principal responsável pela ação inibitória da proteína (OKAZAKI e HONJO, 2007). Essa importante função inibitória foi revelada em 1999, pela propensão à autoimunidade observada em camundongos *knockout* para o gene *PDCD1* (*Pdcd1*^{-/-}). O gene que codifica essa proteína está localizado no cromossomo 2 de humanos e consiste em 5 éxons (Figura 2). O éxon 1 codifica uma pequena sequência sinal;

o éxon 2, um domínio Ig. A cauda e o domínio transmembrana são feitos pelo éxon 3 e o éxon 4 codifica uma pequena sequência de 12 aa que marcam o início do domínio citoplasmático. O éxon 5 contém o resíduo intracelular C-terminal e uma longa 3'UTR (*untranslated region*) (KEIR *et al.*, 2008).

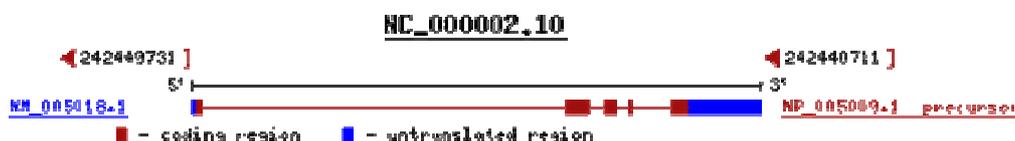


FIGURA 2: Representação do gene *PDCD1*. As regiões em vermelho correspondem às sequências codificantes e em azul são regiões que não serão traduzidas. Fonte: NCBI, 2009.

A via PD-1-PD-L controla a autoimunidade, pois regula ambas indução e manutenção da tolerância periférica. A expressão de PD-1 é induzida pela sinalização de receptor de célula T (TCR) ou B (BCR) em células TCD4+, TCD8+, células Natural Killers, células B e monócitos ativados. No entanto, é também observada em uma variedade de células não hematopoiéticas, incluindo células endoteliais vasculares, células epiteliais, musculares, hepatócitos, células das ilhotas pancreáticas e astrócitos no cérebro e também em locais de privilégio imune, como a placenta e o olho. As moléculas às quais o PD-1 se liga, PD-L1 e o PD-L2, são ambas componentes da família B7. PD-L1 é constitutivamente expressa em APCs e células T e é mais regulada por citocinas pró-inflamatórias; a expressão de PD-L2 é induzida por citocinas. Os dois ligantes diferem no padrão de expressão, sendo a do PD-L2 mais restrita que do PD-L1 (OKAZAKI e HONJO, 2007).

Após ativação inicial da célula T, interações PD-1-PD-L podem limitar a proliferação de células T autorreativas e produção de citocinas, visto que quando estimulado por antígeno, o PD-1 amortece a sinalização do TCR. A ligação do PD-1 na superfície celular leva à fosforilação de tirosinas citoplasmáticas dessa molécula e aumenta a associação SHP-2 com ITSM. O recrutamento de SHP-2 desfosforila a sinalização de TCR e BCR através da via PI3K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) e direciona os sinais através de Akt. PD-1, então, diminui a indução de citocinas como IFN- γ e proteínas de sobrevivência celular, como Bcl-xL (Figura 3). Entretanto, quando a sinalização através de CD28 ocorre ao mesmo tempo que de PD-1 e a ligação TCR, efeitos inibitórios podem

ser superados e a produção de citocinas e sobrevivência das células é aumentada (OKAZAKI e HONJO, 2007; KEIR *et al.*, 2008).

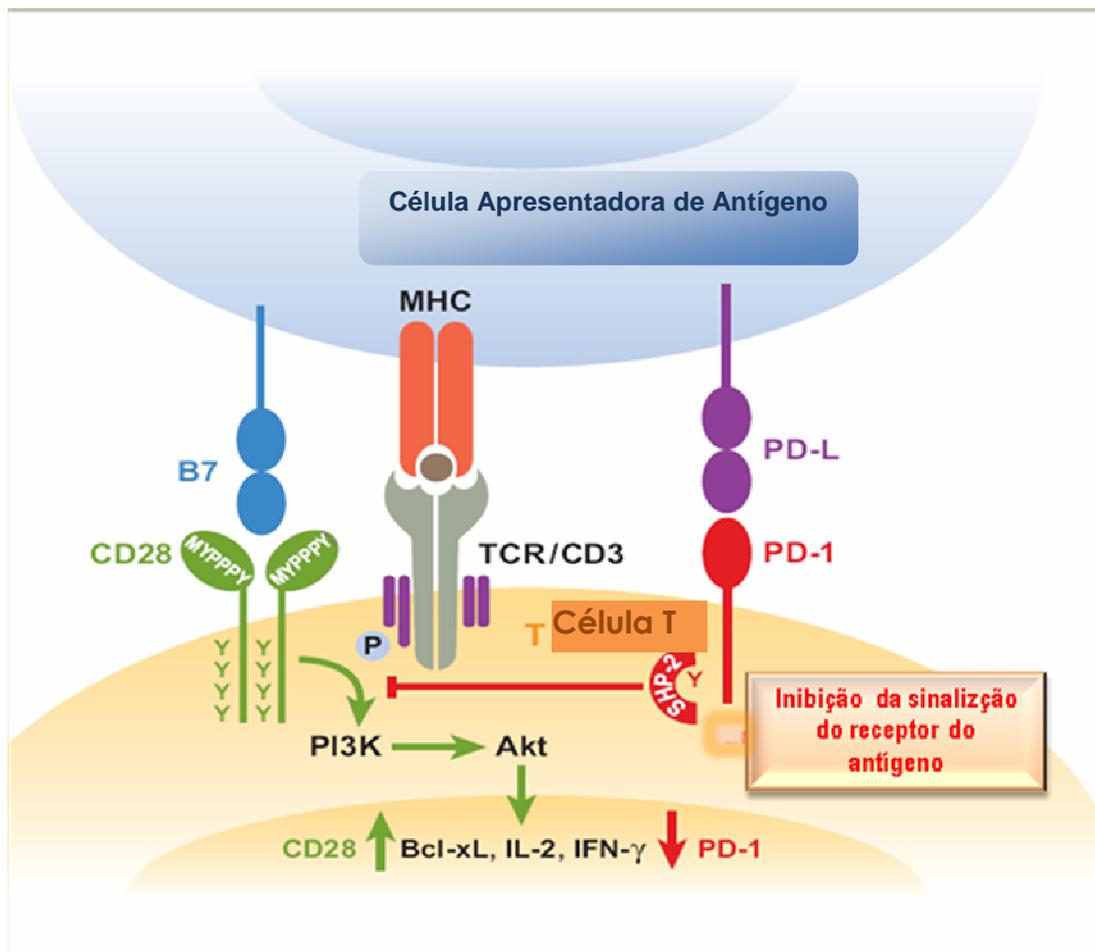


FIGURA 3: Via de inibição da sinalização do receptor de antígeno de células T, através da ativação da proteína PD-1 – figura adaptada de KEIR, 2008 (KEIR *et al.*, 2008).

A quantidade de expressão de PD-1 e o grau de envolvimento entre ela e seus ligantes regula o limiar de ativação de células T e a quantidade de citocinas produzida (SHARPE *et al.*, 2007), regulando, dessa forma, a indução e a manutenção da tolerância periférica. Funções efetoras de células T autorreativas que migram para o tecido alvo (como o pâncreas em diabetes tipo 1) podem ser limitadas pela expressão de PD-L1 nas células do tecido não hematopoiéticas (como células endoteliais vasculares) ou células das ilhotas. PD-L1 parece ter uma função única na manutenção da tolerância no tecido-alvo (Figura 4) (WANG *et al.*, 2007).

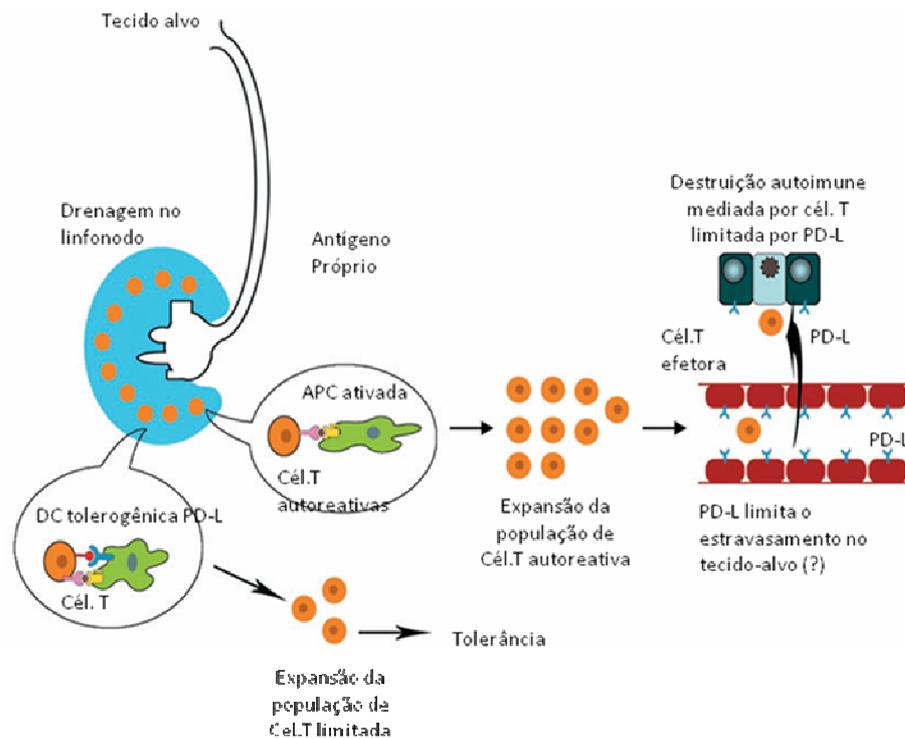


FIGURA 4: A via PD-1-PD-L – figura adaptada de SHARPE *et al.* (2007).

Estudos em camundongos também corroboram para a afirmação do papel regulatório do PD-1. Experimentos com camundongos *knockout* para o gene *PDCD1* mostraram o desenvolvimento de cardiomiopatia autoimune ou uma síndrome semelhante ao lúpus, dependendo da raça. Em uma forma de infecção viral crônica em camundongos, células T específicas para o vírus ficam paralisadas funcionalmente, mas podem ser salvas bloqueando-se o PD-1. Esse resultado sugere que o vírus pode controlar uma via reguladora normal do hospedeiro para evitar o sistema imunológico do mesmo (ABBAS, LICHTMAN e SHIV, 2008).

O locus 2q35-37 (SLEB2) foi recentemente mapeado para a região 2q37.3, onde o gene *PDCD1* está localizado (JOHANSSON *et al.*, 2005) e onde foram encontrados sete SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Tabela 1), que foram localizados no gene como segue: PD-1.1 na região promotora (posição 531 do iniciador), PD-1.2 no íntron 2 (posição 6438), PD-1.3 no íntron 4 (posição 7146), PD-1.4 no íntron 4 (posição 7499), PD-1.9 no éxon 5 (posição 7625, substituição alanina→valina), PD-1.5 no éxon 5 (posição 7785, alanina →alanina) e PD-1.6 na 3'UTR (posição 8738). Foram identificados cinco haplótipos em

famílias nórdicas, pois os SNPs PD-1.1, PD-1.2 e PD-1.9 estão em desequilíbrio de ligação, assim como PD-1.4 e PD-1.5 (PROKUNINA *et al.*, 2002).

TABELA 1. SNPs encontrados no gene *PDCD1*. Alelos dos sete SNPs em *PDCD1* indicam cinco diferentes haplótipos em múltiplos casos de famílias Nórdicas. Números e frequências de todos os haplótipos em cromossomos transmitidos (T) para indivíduos afetados com LES e o grupo de cromossomos não transmitidos (NT) para indivíduos afetados são mostrados $\chi^2 = 15,1$, d.f. = 4, $P = 0,005$. O haplótipo número 1 (mostrado em negrito) contém o alelo PD-1.3A – adaptado de PROKUNINA *et al.*, 2002.

	SNP							T	NT
	PD-1.1	PD-1.2	PD-1.3	PD-1.4	PD-1.9	PD-1.5	PD-1.6	n= 64	n= 64
1	A	A	A	G	C	C	A	16(0,25)	3(0,05)
2	A	A	G	G	C	C	A	23(0,36)	31(0,48)
3	A	A	G	A	C	T	A	18(0,28)	17(0,27)
4	A	A	G	A	C	T	G	4(0,06)	12(0,19)
5	G	G	G	G	T	C	G	3(0,05)	1(0,02)

Dentre esses SNPs, o PD-1.3G/A foi associado ao desenvolvimento de LES em escandinavos e mexicanos. Nesse estudo, foi proposto que o alelo A desse SNP altera o sítio de ligação de um fator de transcrição, o RUNX1 (ou AML1), localizado em um promotor intrônico, sugerindo um mecanismo que pode contribuir para o desenvolvimento da doença (PROKUNINA *et al.*, 2002). Posteriormente, o mesmo SNP foi relacionado à diabetes mellitus tipo 1 (NIELSEN *et al.*, 2003) e à AR, em um estudo do norte europeu, no qual, a associação do SNP à AR foi, especificamente, ao grupo de pacientes soronegativos para FR e o “epítipo compartilhado” (PROKUNINA *et al.*, 2004b).

O promotor do gene *PDCD1* tem níveis muito altos de GC (de 50 a 75%), propiciando a formações de ilhas CpG, um sítio potencial de metilação. O alelo A da mutação do promotor transforma esse sítio potencial de CpG para CpA, que é circundado por muitos outros potenciais sítios de metilação. Esse mecanismo é um meio de regular a atividade do gene e mudanças nele podem condicionar o estágio de desenvolvimento da expressão do *PDCD1* (PROKUNINA e ALARCÓN-RIQUELME, 2003).

O SNP intrônico foi associado ao LES, especialmente em escandinavos, com forte ligação aos pacientes com nefrite. Há também uma associação com AR em subgrupos de pacientes negativos para o fator reumatóide e “epítipo

compartilhado” (PROKUNINA *et al.*, 2002; PROKUNINA *et al.*, 2004b). Entretanto, em algumas populações asiáticas essa região não apresenta polimorfismo, ressaltando a heterogeneidade genética que existe entre os povos (KONG *et al.*, 2005; IWAMOTO *et al.*, 2007).

Com base nos argumentos expostos, percebe-se a importância de se reproduzir os estudos de associação desse polimorfismo em diferentes populações e, dessa forma, verificar a ligação do alelo de risco às doenças. Além disso, a utilização de SNPs como marcadores dessas doenças podem facilitar seu diagnóstico e prognóstico.

2.OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral

Verificar a existência de uma associação entre o polimorfismo PD1.3 do gene *PDCD1* e as doenças autoimunes Artrite Reumatóide e Lúpus Eritematoso Sistêmico no estado de Santa Catarina.

2.2.Objetivos Específicos

- Acrescentar as amostras dos novos indivíduos às amostras já existentes no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), CCB - UFSC, para constituir um banco de dados de Artrite Reumatóide e Lúpus Eritematoso Sistêmico com informações epidemiológicas e dados clínicos sobre os pacientes e um banco de dados epidemiológicos de indivíduos controles;
- Otimizar os protocolos utilizados nas técnicas de genotipagem do gene *PDCD1*;
- Identificar as frequências alélicas e genótípicas do SNP 1.3 do gene *PDCD1* em pacientes e controles;
- Testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg das amostras;
- Verificar se há associação entre os genótipos, alelos, dados clínicos e epidemiológicos levantados e as doenças estudadas;
- Comparar os resultados encontrados neste estudo com aqueles de outras populações descritas na literatura.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.Aspectos Éticos

O presente estudo está inserido em um projeto intitulado: *GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina*, submetido e aprovado pelo comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), no parecer de número 172/06, de 26/06/2006. Este projeto foi aprovado no edital universal 003/2006 da FAPESC, estando em vigência até dezembro de 2009.

3.2.Coleta de Sangue e Dados dos Pacientes

As amostras foram coletadas no Hospital Universitário (HU), vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os pacientes diagnosticados com Artrite Reumatóide (AR) ou Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) pela equipe de Reumatologia do hospital, de acordo com os critérios da Comunidade Americana de Reumatologia (*American College of Rheumatology – ACR*), declararam sua participação através da assinatura de um termo de consentimento informado (Anexo 1). A coleta das informações foi realizada durante uma entrevista, através de um questionário de dados epidemiológicos e familiares, disponível no anexo 2. Os dados clínicos dos pacientes com AR foram complementados a partir de informações obtidas dos prontuários. Além disso, uma amostra de sangue periférico de 10ml foi coletada pelos enfermeiros do HU em tubo Vacutainer® com anticoagulante EDTA. A separação dos componentes do sangue, extração do DNA e estabelecimento dos genótipos foram realizados no LAPOGE.

O grupo controle é composto por indivíduos saudáveis e sem histórico familiar de pessoas com doenças autoimunes, que ratificaram sua participação nessa pesquisa, através da assinatura do termo de consentimento informado (Anexo 3). Os dados pessoais e a amostra de sangue foram obtidas da mesma forma que os dos pacientes, sendo que o questionário utilizado nesse caso encontra-se no anexo 4. Esse grupo de pessoas pertencem ainda, a um projeto de pesquisa e extensão realizado paralelamente pela equipe do LAPOGE.

Das amostras analisadas, 63 indivíduos diagnosticados para LES e 75 indivíduos controles já haviam sido genotipadas para o gene *PDCD1* em um trabalho realizado anteriormente no Laboratório (BACK, 2007).

3.3.Métodos Laboratoriais

3.3.1.Separação dos Componentes do Sangue

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500g durante 20 min. Os componentes são separados em plasma, leucócitos e hemácias e estocados a -20°C. O DNA genômico foi extraído dos leucócitos.

3.3.2.Extração e Quantificação do DNA

Para extrair o DNA genômico das amostras, utilizou-se a técnica de Fenol-clorofórmio, de acordo com Sambrook e Russel (2001). Esse material foi armazenado a -20°C e faz parte do banco de dados do Laboratório, sendo também utilizado em outros projetos.

Após a extração, uma alíquota do produto foi quantificada em espectrofotômetro através da leitura da absorbância a 260 nm e 280 nm. Posteriormente, as amostras foram diluídas para a concentração final de 20 µg/ml, padrão do laboratório.

3.3.3.Genotipagem

A genotipagem foi realizada através da amplificação da região do SNP *PDCD1 1.3* pela reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase chain reaction*) e posterior detecção do polimorfismo pelo tamanho do fragmento com o uso de enzima de restrição (RFLP – *Restriction fragment lenght polimorfism*).

Com base no protocolo realizado por Back (2007) para a reação em cadeia da polimerase, foi utilizada uma solução com 2,5 µl de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM - pH 8,4 -, KCl 500 mM); 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM); 0,4 µl de dNTP na concentração de 10 mM; 0,1 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (50 µM; Tabela 2); 0,1µl de BSA (10 mg/ml); 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl) e 15,3 µl de água ultra-pura. Por fim, adiciona-se a 5,0 µl de DNA (20 µg/ml). No

termociclador, os ciclos de amplificação ocorreram de acordo com um programa específico para *PDCD1* (BACK, 2007):

- 1º passo: 95°C por 10 min;
- 2º passo: 94°C por 15 s (desnaturação);
- 3º passo: 60°C por 30 s (pareamento dos iniciadores);
- 4º passo: 72°C por 15 s (extensão da cadeia);
- 5º passo: repetição do 2º ao 4º passos por 33 vezes;
- 6º passo: 72°C por 2 min (extensão final).

TABELA 2. Sequência dos iniciadores utilizados na PCR – RFLP.

<i>PDCD1</i> +7146	Iniciadores 5' → 3'	
PD1.3F	CCC CAG GCA GCA ACC TCA AT	SHANGHERA
PD1.3R	GAC CGC AGG CAG GCA CAT AT	<i>et al.</i> , 2004.

O produto da PCR (3,0 µl) foi digerido pela enzima *Pst* I, à 37°C por duas horas. A mistura de reação para RFLP continha 1,5 µl de tampão (NEB 3), 0,2 µl de BSA, 0,3 µl da endonuclease de restrição (6U) e 4,0 µl de água miliQ. A enzima reconhece uma sequência específica, 5'-G/ACGTC-3', que corresponde ao seu sítio de restrição. Quando ocorre uma substituição de um nucleotídeo G para A na posição 7146 do gene *PDCD1*, o polimorfismo gera a sequência de reconhecimento da enzima. Dessa forma, toda vez que a enzima reconhece o sítio de restrição, o fragmento de DNA de 180 pb é cortado em um de 150 pb e outro de 30 pb (Figura 5).

Para a verificação dos resultados, o produto da digestão foi corado com solução GelRed® e submetido à eletroforese em um gel de agarose 3%. O genótipo foi classificado de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados (GG - 180 pb; AG - 180 pb, 150 pb e 30 pb; AA - 150 pb e 30 pb), visualizados com o auxílio de um fotodocumentador que registra as imagens e possibilita uma análise posterior (Figura 5).

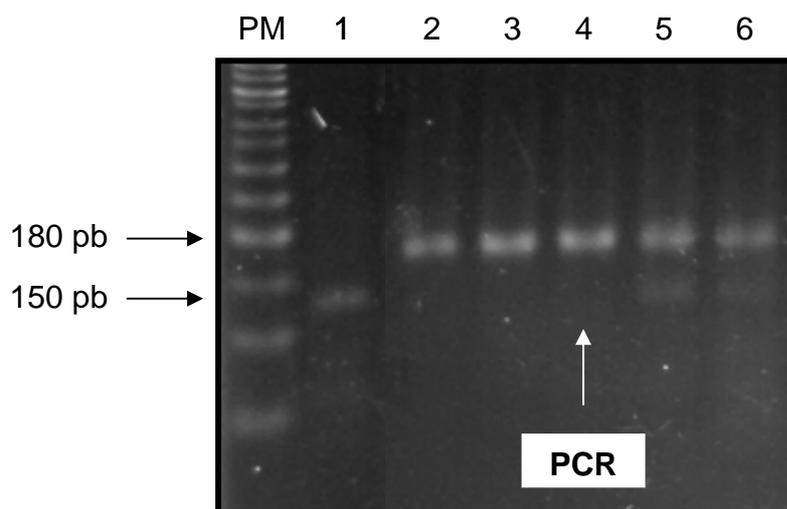


FIGURA 5. Foto de Gel de agarose 3% com amostras de PCR-RFLP tratadas com a enzima *Pst*I. Peso molecular (PM) de 50 pb (1ª coluna) é seguido pela amostra 1, genotipada como AA (2ª coluna). As amostras 2 e 3 foram consideradas como GG e as amostras 5 e 6, GG. Na amostra 4, foi utilizada uma amostra de PCR sem digestão, como controle.

3.3.4. Análise Estatística dos Resultados

A verificação do equilíbrio da distribuição dos genótipos em cada grupo de estudo foi feita através do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para determinar a associação do polimorfismo analisado e as doenças estudadas, o cálculo do *Odds Ratio* (OR), segundo WOOF (1955), permitiu a observação de quantas vezes o caráter em questão (AR ou LES) foi mais frequente nos indivíduos que possuem o polimorfismo estudado em relação àqueles que não o possuem. O cálculo foi feito com base na tabela 3 utilizando o programa HDS EpiMax Calculator.

O valor de *p* igual a 0,05 foi adotado como limite de significância para todos os testes realizados.

O valor de OR é muito próximo ao do risco relativo, que exprime quantas vezes o caráter em estudo é mais frequente entre os portadores de um determinado fator (por exemplo, um alelo específico) do que entre aqueles que não possuem o mesmo fator. O valor de OR é obtido a partir da construção de uma tabela 2x2 na qual são considerados os pacientes com o fator (casa A), os pacientes sem o fator (casa C), os controles com o fator (casa B) e os controles sem o fator (casa D). O valor de OR resulta de efetuar a operação (A.D)/(B.C).

Caso o valor de uma das casas seja zero, usa-se a modificação de Haldane, cuja fórmula é: $OR = \frac{(A+0,5).(D+0,5)}{(B+0,5).(C+0,5)}$ (Tabela 3).

TABELA 3: Representação de frequências de um determinado alelo em pacientes e controles para o cálculo de Odds ratio.

	Pacientes	Controles
Presença do alelo	A	B
Ausência do alelo	C	D

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

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da Amostra

Foram analisados 310 indivíduos sem qualquer grau de parentesco – sendo 87 pacientes com Artrite Reumatóide, 95 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e 128 indivíduos saudáveis pertencentes ao grupo controle. Para algumas análises o número amostral sofre modificações devido a falta de alguns dados nos questionários dos pacientes. Todas as pessoas residem em Santa Catarina e a maioria é natural do estado (73,55%). A faixa etária desses indivíduos varia de 15 a 84 anos, sendo que a média foi de 54,42 anos para pacientes com AR; 37,35 anos para LES e 47,00 anos para o grupo controle (Figura 6).

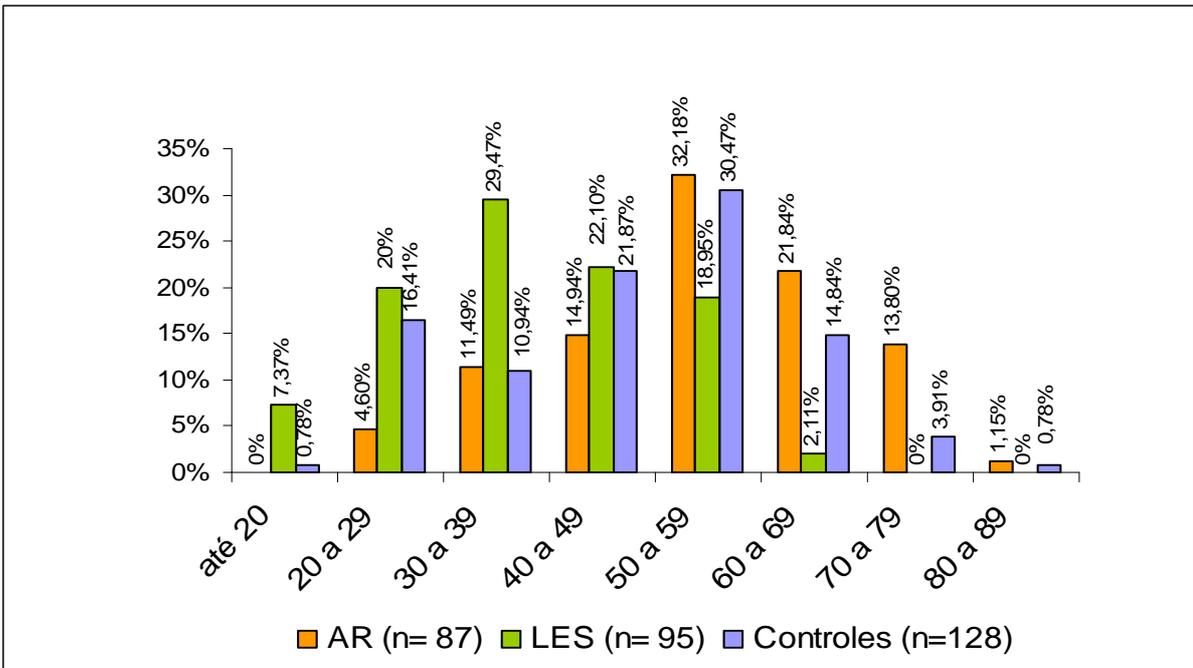


FIGURA 6: Distribuição percentual de frequência de casos e controles por faixa etária.

A amostra possui uma predominância de eurodescendentes tanto em pacientes como em controles. A etnia de cada um foi definida pelas características morfológicas dos indivíduos e dados de ancestralidade e migração relatados pelos pacientes. A proporção de indigenodescendentes é menor nos três grupos estudados. O chi-quadrado de homogeneidade permite observar que as amostras diferem estatisticamente entre si quanto à distribuição étnica ($\chi^2_{(4)} = 9,2725$, $p = 0,0546$) (Figura 7).

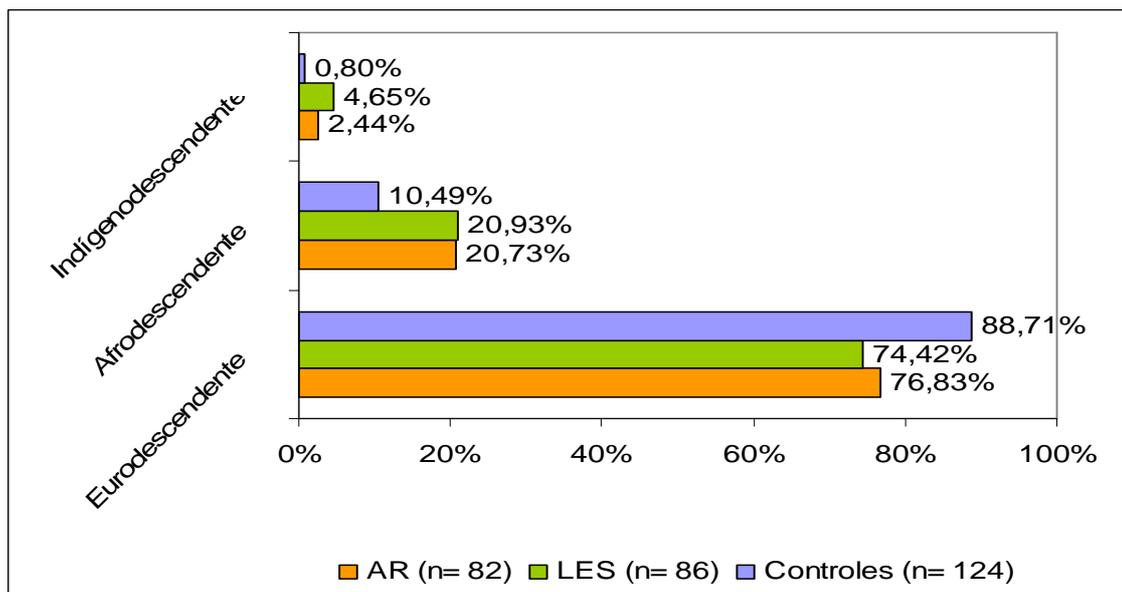


FIGURA 7: Distribuição étnica de pacientes e controles.

As frequências de homens e mulheres diferem em todos os grupos analisados (Figura 8). O grupo de pacientes com AR apresenta um percentual de indivíduos do sexo feminino de 86,21%, valor menor em relação aos outros grupos, 96,84% para LES e 96,09% para controles. O chi-quadrado de homogeneidade permite observar que as amostras de AR diferem estatisticamente dos controles ($\chi^2_{(1)} = 6,9532$, $p = 0,0084$) e dos pacientes com LES ($\chi^2_{(1)} = 6,7067$, $p = 0,0137$). Os pacientes com LES, por sua vez, não difere do grupo controle ($\chi^2_{(1)} = 0,0848$, $p = 0,7709$).

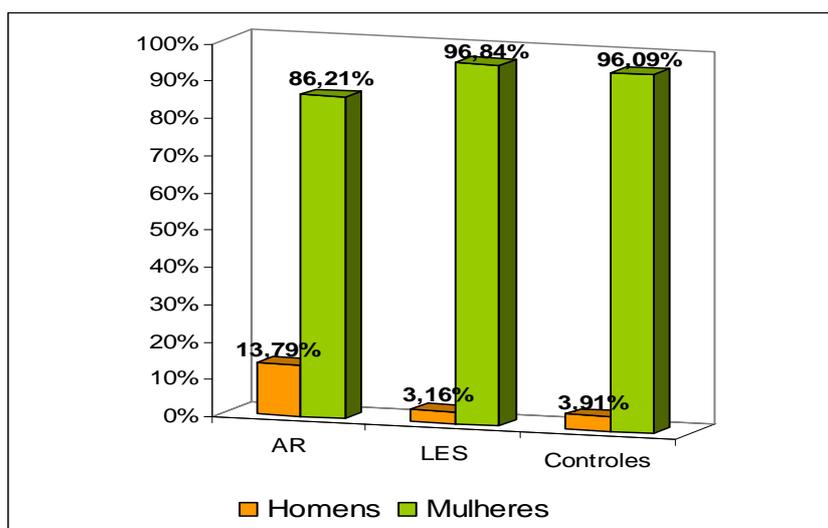


FIGURA 8: Distribuição percentual de homens e mulheres nos grupos estudados.

4.2. Frequências Alélicas e Genóticas do Polimorfismo PD - 1.3

Dentre os dados coletados, foram genotipados 128 indivíduos controles e 95 pacientes com LES, sendo que 75 indivíduos controles e 63 indivíduos diagnosticados para LES já haviam sido genotipados para o SNP PD1.3 em um trabalho realizado anteriormente no Laboratório (BACK, 2007) e também foram genotipados 87 pacientes com Artrite Reumatóide. As frequências genóticas e alélicas podem ser observadas nas tabelas 4, 5 e 6.

TABELA 4: Frequências genotípicas observadas e esperadas e frequências alélicas em controles para o SNP PD1.3.

<i>PDCD1</i>	Genótipos Observados (n=128)	Genótipos Esperados (n=128)
*G*G	110	108,79
*G*A	16	18,43
*A*A	2	0,78
	$\chi^2_{(1)} = 2,242$	$p = 0,1343$
Frequências Alélicas		
	<i>PDCD1</i> *G	0,9219
	<i>PDCD1</i> *A	0,0781

TABELA 5: Frequências genotípicas observadas e esperadas e frequências alélicas em pacientes com AR para o SNP PD1.3.

<i>PDCD1</i>	Genótipos Observados (n= 87)	Genótipos Esperados (n= 87)
*G*G	71	68,16
*G*A	12	17,69
*A*A	4	1,15
	$\chi^2_{(1)} = 9,0115$	$p = 0,0027$
Frequências Alélicas		
	<i>PDCD1</i> *G	0,8851
	<i>PDCD1</i> *A	0,1149

TABELA 6: Frequências genótípicas observadas e esperadas e frequências alélicas em pacientes com LES para o SNP PD1.3.

<i>PDCD1</i>	Genótipos Observados (n= 95)	Genótipos Esperados (n= 95)
*G*G	80	77,86
*G*A	12	16,29
*A*A	3	0,85
	$\chi^2_{(1)} = 6,6268$	$p = 0,01$
Frequências Alélicas		
	<i>PDCD1</i> *G	0,9053
	<i>PDCD1</i> *A	0,0947

A distribuição dos genótipos encontrada no grupo controle encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2_{(1)} = 2,242$, $p = 0,1343$). No entanto, a distribuição observada nos pacientes, tanto de LES quanto de AR, não está dentro do equilíbrio ($\chi^2_{(1)} = 6,6268$, $p = 0,01$ para LES e $\chi^2_{(1)} = 9,0115$, $p = 0,0027$ para AR).

4.3. Estudo de associação das doenças com o polimorfismo PD-1.3

Para o cálculo de *Odds Ratio* (OR), foi considerado o alelo A como risco de desenvolver AR e o valor obtido foi $OR = 1,916$. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada. A análise comparativa de genótipos foi feita considerando-se o grupo de genótipos AA+GA como de risco e também, os genótipos AA ou GA. Sendo o valor de OR mais alto para o genótipo AA ($OR = 3,036$). Ainda assim, não houve valores estatisticamente significativos para nenhuma das associações propostas (Tabela 7).

TABELA 7: Análise de associação entre pacientes com AR e controles para alelos e genótipos do polimorfismo PD-1.3.

	OR	IC 95%	p
ALELOS			
A vs. G	1,916	0,916 - 4,022	0,089
GENÓTIPOS			
AA + GA	1,377	0,620 - 3,055	0,507
AA	3,036	0,465 - 24,411	0,366
GA	1,120	0,466 - 2,675	0,945

OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança; p = probabilidade.

Os pacientes com LES tiveram o mesmo alelo e os mesmos genótipos analisados como fator de risco que os pacientes com AR. Ao considerar o alelo A ou o genótipo AA como fator de risco, obteve-se um valor de OR = 1,544 e OR = 2,054 respectivamente, mas estatisticamente não significativo ($p = 0,299$ e $p = 0,735$ respectivamente). Quando os outros genótipos ou grupos foram considerados de risco (AA+AG e GA), os valores de OR obtidos foram muito próximos de 1 (OR = 1,146 e OR = 1,012 respectivamente), assim como o valor de p ($p = 0,867$ e $p = 1,000$ respectivamente) (Tabela 8).

TABELA 8: Análise de associação entre pacientes com LES e controles para alelos e genótipos do polimorfismo PD-1.3.

	OR	IC 95%	p
ALELOS			
A vs. G	1,544	0,727 - 3,287	0,299
GENÓTIPOS			
AA+GA	1,146	0,512 - 2,559	0,867
AA	2,054	0,273 - 17,976	0,735
GA	1,012	0,423 - 2,408	1,000

OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança; p = probabilidade.

A relação entre a presença do alelo A e pacientes com AR que possuíam FR positivo também foi analisada através do cálculo de Odds ratio. Pacientes com FR positivo apresentaram maior frequência do alelo A (OR = 5,118, $p = 0,013$)

que pacientes soronegativos. O que indica uma associação estatisticamente significativa entre esses dois fatores (Tabela 9).

TABELA 9: Análise de associação entre pacientes com AR que possuem ou não fator reumatóide positivo para o alelo A.

	OR	IC 95%	p
ALELOS			
A vs. G	5,118	1,324 – 23,145	0,013

OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança; p = probabilidade.

4.4. Dados Epidemiológicos

A maioria das mulheres pertencentes aos três grupos tinham filhos. Em todos os grupos, mais de 70% das mulheres já havia engravidado (Figura 9), sendo que 60,56% das mulheres com AR tinham mais de 2 filhos e somente 7,04% eram nulíparas. Diferentemente das mulheres com AR, 20,00% das pacientes com LES e 20,54% das mulheres do grupo controle nunca engravidaram.

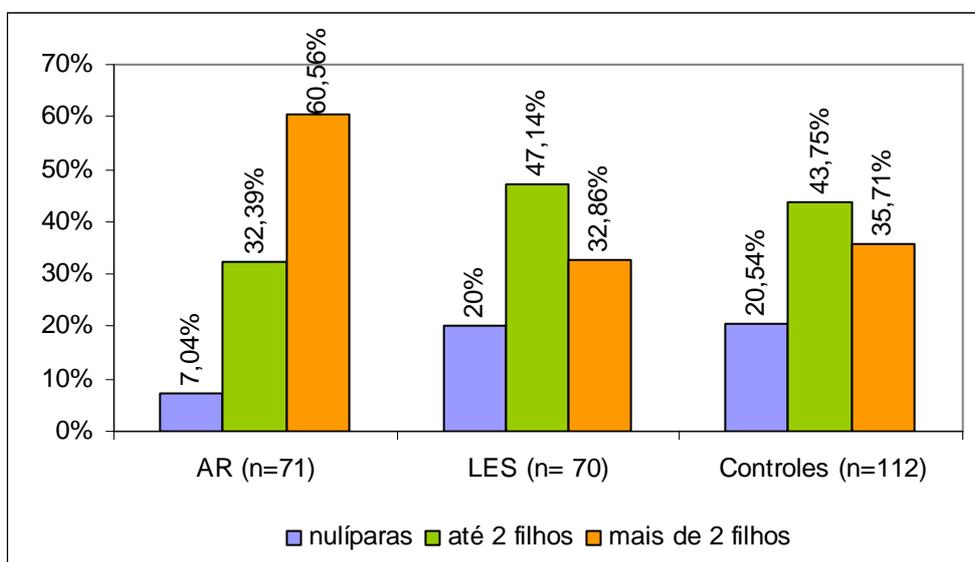


FIGURA 9: Distribuição percentual de pacientes e controles de acordo com o número de filhos.

O número de mulheres, com AR, que fazem ou já fizeram uso de anticoncepcional foi de 30 em um total de 40 que já fizeram ou fazem tratamento hormonal (75%). Trinta mulheres não fazem e nunca fizeram nenhum tipo de

tratamento hormonal (52,6%). Das pacientes com LES, 60% já fizeram ou fazem algum tratamento hormonal e, dessas, 94,6% fizeram uso do anticoncepcional. Ao relacionar esses dados com os alelos e genótipos do polimorfismo estudado, não foi encontrada associação.

Com base na declaração dos pacientes e dos controles sobre o fato de fumar ou já terem fumado, os indivíduos foram divididos em duas classes: fumantes e não fumantes (Figura 10). Tanto os pacientes quanto os controles em sua maioria são não fumantes. Levando em consideração o hábito de fumar, não foi encontrada diferença significativa entre controles e pacientes com AR ($OR=1,650$, $IC\ 95\% = 0,876 - 3,110$, $p = 0,130$) e nem entre controles e pacientes com LES ($OR = 1,711$, $IC\ 95\% = 0,894 - 3,277$, $p = 0,111$).

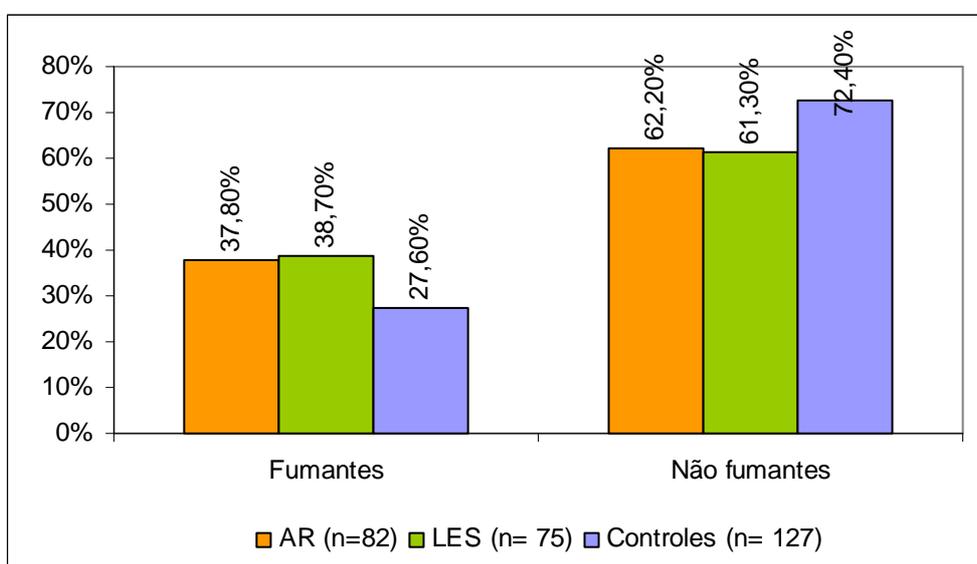


FIGURA 10: Porcentagens de fumantes e não fumantes distribuídos entre os grupos estudados.

Os pacientes também foram questionados quanto ao consumo de bebida alcoólica. Independentemente da quantidade ingerida, 86,08% dos indivíduos com AR ($n= 79$) disseram não consumir nenhum tipo de álcool, assim como 85,92% dos pacientes de LES ($n= 71$). Em contrapartida, 13,92% e 14,08% dos pacientes de AR e LES, respectivamente, afirmam que consomem. Não foi encontrada associação significativa entre os alelos ou genótipos e o consumo de bebida alcoólica.

As articulações que apresentavam inchaço ou dor nos dez dias antecedentes à entrevista foram relatadas pelos pacientes, que foram divididos

em três grupos: pacientes com dor nas mãos, pés, punhos, tornozelos, joelhos e cotovelos, aqueles com dor nos ombros, pescoço, quadril e coluna e aqueles que não se queixavam de dor em nenhuma articulação. O primeiro grupo teve participação de 36% dos pacientes; o segundo, 44% e 20% dos pacientes não relataram manifestações articulares recentemente. A hipótese de associação entre a gravidade das articulações e os alelos estudados se mostrou negativa.

Das manifestações que acometem os pacientes com LES duas foram analisadas quanto à possível associação ao polimorfismo: artrite e fotossensibilidade. Mas nenhuma delas apresentou associação significativa. Em relação à artrite, 49,5% dos pacientes apresentavam a manifestação: 40,0% queixavam-se de fotossensibilidade; 30,5% diziam ter algum acometimento renal e 14,8% possuíam fenômeno de Raynaud.

5. DISCUSSÃO

A prevalência de eurodescendentes na amostra pode ser explicada pela história do Brasil e o modo como ele foi sendo povoado ao longo do tempo. A mistura de povos indígenas, europeus, africanos e asiáticos proporcionaram a formação de uma população heterogênea no país. Entretanto, na região Sul, a colonização ocorreu com prevalência de europeus, principalmente portugueses, alemães, italianos e poloneses, formando uma população composta em sua maioria de eurodescendentes. A figura 7 mostra que mais de 80% dos indivíduos controle analisados são eurodescendentes (88,7%), seguidos dos afrodescendentes (10,5%) e em proporção muito menor, os indígenas (0,8%). Esses dados são semelhantes aqueles encontrados em uma amostra pertencente a um estudo realizado no Hemocentro de Santa Catarina (HEMOSC), no qual, havia uma taxa de 91,2% de eurodescendentes e 8,8% de afrodescendentes (BARBETA *et al.*, 2002). No entanto, há maior proporção de afrodescendentes no grupo de pacientes com LES (20,9%) e com AR (20,7%), observado também em outro estudo onde o LES, por exemplo, mostra-se mais frequente em mulheres norte americanas afrodescendentes (KOTZIN, 1996).

Outra característica que não apresenta uniformidade entre os grupos é a idade. As doenças autoimunes estudadas não atingem pessoas da mesma faixa etária. A média de idade de indivíduos acometidos pela AR encontrada na

população de Santa Catarina é de 54,4 anos, um pouco menor que a observada na população norte americana, 66,8 anos (HELMICK *et al.* 2008). Já o LES possui maior incidência em mulheres em idade reprodutiva (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009), sendo 37,35 anos a média de idade observada nesse estudo. A figura 6 mostra as classes de idade nas quais os grupos foram divididos. A distribuição do grupo controle assemelha-se à da AR, mas, percebe-se que a curva dos pacientes com LES desloca-se para a esquerda, sendo esses mais jovens.

Assim como a maioria das doenças autoimunes, LES e AR possuem maior incidência em indivíduos do sexo feminino (LLEO *et al.*, 2008). Sugere-se que essa prevalência esteja relacionada à participação de hormônios sexuais no desenvolvimento das doenças. Diferentes níveis hormonais têm sido encontrados em mulheres, mas não em homens com LES (AHMED e KARPUZOGLU-SAHIN, 2005), cuja relação mulher-homem é relativamente alta em relação aos casos de AR (9:1 em LES e 2,5:1 em AR) (ARTHRITIS FOUNDATION, 2008; BORBA *et al.*, 2008). A mesma relação é observada nos resultados do presente estudo (Tabela 8).

5.1. Análises das frequências genóticas do polimorfismo PD1.3

As frequências genóticas do grupo controle encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, como se pode observar na tabela 5. Todavia, aquelas observadas nos grupos de pacientes não estão dentro do equilíbrio (Tabelas 6 e 7). Braun-Prado e Petzl-Erler (2007), em um estudo com pacientes acometidos por pênfigo foliáceo, encontraram frequências distribuídas dentro do equilíbrio para esse SNP. Por conseguinte, esse resultado pode estar indicando uma associação às doenças ou, o desequilíbrio entre as frequências pode ser devido ao número amostral utilizado.

Em um estudo realizado no Reino Unido a frequência do genótipo AA é maior nos controles que o mostrado pelo presente estudo. O valor encontrado foi de 1,5 (SUTHERLAND *et al.*, 2007), enquanto em Santa Catarina, a frequência de AA foi 0,2. No Brasil, no Mato Grosso do Sul e Paraná, a frequência desse genótipo também é maior que a encontrada na região Sul (1,0) (BRAUN-PRADO e PETZEL-ERLER, 2007).

5.2. Análises das frequências e alélicas do SNP PD1.3

A associação do alelo A do polimorfismo PD 1.3 do gene *PDCD1* tem sido cada vez mais estudada, principalmente após um trabalho que mostrou associação do SNP com LES em uma população do norte da Europa. Além do LES e da AR (PROKUNINA *et al.*, 2002, 2004b) a participação desse polimorfismo foi estudada em outras doenças autoimunes como diabetes mellitus tipo I (NIELSEN *et al.*, 2003), doença de Graves e doença de Addison (SUTHERLAND *et al.*, 2007). Entretanto, nenhuma associação foi encontrada nos dois últimos casos.

Na grande maioria dos países Europeus estudados, a frequência do alelo A é maior em pacientes que em controles (Tabela 10). O mesmo foi observado na população estudada, onde a frequência do alelo A tanto nos pacientes com LES quanto nos pacientes com AR foi maior que aquela encontrada no grupo controle. A frequência do alelo A nos pacientes com AR é ainda maior que aquela observada na população europeia, o que pode ser em decorrência do número amostral relativamente baixo. Na China, um estudo relacionado à AR (KONG *et al.*, 2005) não encontrou a variante A na população, o que também foi observado no Japão num estudo de mesmo intuito (IWAMOTO *et al.*, 2007). Na Dinamarca, a frequência do alelo foi maior em pacientes (diabetes mellitus tipo 1) que em controles e a frequência do alelo nos controles (6,8), é semelhante àquela encontrada nesse estudo (7,8) (NIELSEN *et al.*, 2003).

No entanto, em estudos de associação ao LES, grande parte da Espanha e uma amostra coletada em Roma mostram uma inversão dos padrões, apresentando uma prevalência do alelo G entre os pacientes (Tabela 10). A heterogeneidade genética das populações pode ser a maior causa dessa divergência e a análise de haplótipos das populações da Espanha e da Suécia para os SNPs do gene *PDCD1* mostrou que há diferença entre as duas populações, $p = 0,04$ (FERREIROS-VIDAL *et al.*, 2004). Ioannidis *et al.* (2001) apresentaram uma meta-análise que aborda diferentes estudos de associação genética e, conseqüentemente em populações diversas. Esses autores mostraram que a heterogeneidade entre os resultados desse tipo de investigação é normal e que geralmente subseqüentes trabalhos referentes ao mesmo tópico divergem do inicial. Dados dessa natureza reforçam a necessidade de se estudar

a associação desses alelos em diferentes populações e validar a probabilidade de risco em relação à autoimunidade.

TABELA 10: Frequências do alelo A - SNP PD1.3 – nos controles e pacientes de estudos de associação ao LES realizados em diversas populações, incluindo a do presente estudo.

População	Alelo A (%)		OR (IC 95%)	Publicação
	Controles	Pacientes		
Alemanha	(11,0)	(15,0)	1,43 (0,8–2,6)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2007
República Checa	(5,5)	(9,4)	1,78 (0,8–3,8)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2007
Hungria	(11,2)	(15,4)	1,44 (0,8–2,6)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2007
Milão	(10,7)	(12,2)	1,16 (0,7–1,9)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2007
Roma	(14,6)	(9,9)	0,64 (0,3–1,2)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2007
Nápoles	(11,3)	(13,0)	1,16 (0,7–2,0)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2007
Grécia	(10,6)	(12,7)	1,22 (0,8–1,8)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2007
Dinamarca	(6,8)	(11,6)	1,80 (0,96–3,4)	NIELSEN <i>et al.</i> , 2004
Sul da Suécia	nc			PROKUNINA <i>et al.</i> , 2002
Norte da Suécia	(5,5)	(7,3)	1,35 (0,9–2,0)	JOHANSSON <i>et al.</i> , 2005
Finlândia	NS (6,0)	NS (3,0)	0,46	SIGURDSSON <i>et al.</i> , 2005,
ES - Santiago	(11,5)	(7,3)	0,60 (0,3–1,2)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2004
ES - Madri	(12,5)	(6,1)	0,46 (0,2–0,9)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2004
ES - Sevilha	(15,0)	(10,2)	0,64 (0,4–1,1)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2004
ES - Granada	(10,2)	(9,3)	0,90 (0,4–2,0)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2004
ES - Barcelona	(14,0)	(15,4)	1,12 (0,6–1,9)	FERREIROS-VIDAL <i>et al.</i> , 2004
BR – Santa Catarina	(7,8)	(9,4)	1,544 (0,7 – 3,3)	Presente estudo

OR = Odds ratio; IC = intervalo de confiança; p = probabilidade; nc = não consta;

NS = não significativo

5.3. Análise de associação do polimorfismo às doenças

A associação do SNP ao LES já havia sido estabelecida por Prokunina *et al.* (2002) e apontava o alelo *A* como sendo fator de risco de desenvolvimento da doença. A inversão encontrada na Espanha, onde o alelo *G* foi apontado como fator de risco, colocou em dúvida a associação do SNP à doença. Por esse motivo Suarez-Gestal *et al.* (2008) realizaram um estudo para comparar a ligação do fator de transcrição RUNX1 ao polimorfismo em questão e os resultados não mostraram diferença entre a interação do fator de transcrição ao seu sítio quanto ao alelo *A* ou *G*. Posteriormente, Liu *et al.*, através de uma meta-análise da população Européia, corroborou com ambos os estudos (PROKUNINA *et al.*, 2002; SUAREZ-GESTAL *et al.*, 2008), mostrando que o alelo *A* do SNP PD1.3 apresenta associação ao LES em europeus-não hispânicos, enquanto para os Espanhóis, o alelo de risco é o *G*. Além da heterogeneidade genética da população, outra questão levantada é a participação de fatores ambientais que poderiam estar influenciando essas populações, já que o LES é uma doença complexa possuindo uma rede de interações entre genes e ambiente ainda pouco estabelecida (LIU *et al.*, 2009).

Existem poucos estudos de associação entre o SNP PD1.3 e a Artrite Reumatóide (PROKUNINA *et al.*, 2004b; KONG *et al.*, 2005; IWAMOTO *et al.*, 2007) . Somente na Europa foi encontrada associação do alelo a pacientes com FR e epítipo compartilhado (SE) negativos (*shared epitope*) (PROKUNINA *et al.*, 2004b). KONG *et al.* (2005) e IWAMOTO *et al.* (2007) mostram que populações asiáticas não são polimórficas na posição +7146 (*G/A*) do íntron 4 do gene *PDCD1*.

O valor de *Odds ratio* encontrado para AR, sugere uma associação do alelo *A* à doença, ainda que não esteja dentro de um valor estatisticamente significativo ($OR = 1,916$, $p = 0,089$), pois o reduzido tamanho da amostra e a falta de ferramentas estatísticas que analisem tal universo amostral impedem a confirmação dos resultados.

Ainda que o estudo realizado por PROKUNINA *et al.* (2004b) tenha revelado uma associação do alelo a pacientes FR e SE negativos, o presente estudo mostra que pacientes com fator reumatóide positivo apresentam uma

maior frequência do alelo A ($OR = 5,118$, $p = 0,013$) em relação a pacientes com FR negativo. No entanto, o intervalo de confiança estabelecido (95%) se mostra elevado (IC, 95% = 1,324 – 23,145).

O fator reumatóide foi a pista para a categorização da AR como uma doença autoimune. A descoberta foi classificada como um anticorpo que se liga à porção Fc dos anticorpos, logo, um autoanticorpo (FRANKLIN et al., 1957 *apud* FIRESTEIN, 2003). Sendo o PD-1 uma molécula co-estimulatória responsável por respostas inibitórias de células T (SHARPE *et al.*, 2007), seria possível que a redução da produção dessas proteínas desencadeassem uma menor inibição dessas células, podendo provocar maior ativação das mesmas e, por consequência, aumentar a ativação de células B, que poderiam produzir mais autoanticorpos. Não obstante, é importante lembrar que aproximadamente 80% dos pacientes são soropositivos para o fator reumatóide, podendo os dados apresentar um desvio em decorrência do número de indivíduos utilizados nas amostras.

Os genótipos analisados não apresentaram nenhum valor de *Odds Ratio* estatisticamente significativo quando analisado o risco de se desenvolver AR ou LES. Não obstante, o desvio do genótipo AA se mostrou maior que os demais, tanto na amostra de pacientes com LES (Tabela 7), quanto na de AR (Tabela 6), o que não foi observado nos controles. Isso fez com que esse genótipo apresentasse um *OR* mais elevado em relação aos outros. O mesmo desvio foi observado em um estudo com pacientes acometidos por diabetes mellitus. Nielsen *et al.* mostraram que a doença estava associada não somente ao alelo A, mas também ao genótipo AA (NIELSEN *et al.*, 2003). É necessário um aumento da amostra para verificar se esses resultados continuam dentro de um intervalo estatisticamente não significativo ($p > 0,05$).

Tendo em vista o resultado do teste chi-quadrado de homogeneidade para as amostras de pacientes, os dois grupos foram analisados também como um só, o de pacientes com doenças autoimunes. Com o aumento do tamanho amostral, o valor de *OR* apresentou-se próximo à significância ($OR = 1,823$, $p = 0,051$, IC 95% = 0,997 - 3,353). Esses dados, em concordância com os já apresentados, fornecem subsídios para que mais estudos sejam feitos no sentido

de aumentar o tamanho dessas amostras para uma análise mais ampla da população em questão.

5.4. Análise dos dados Epidemiológicos

À parte o fator reumatóide, já discutido nesse trabalho, nenhum dado clínico apresentou associação estatisticamente significativa ao polimorfismo estudado, entretanto, alguns pontos podem ser ainda discutidos.

Muitos trabalhos relacionam o hábito de fumar à predisposição ou agravamento de doenças autoimunes (COSTENBADER e KARLSON, 2006). O cigarro possui centenas de substâncias tóxicas que prejudicam uma série de funções no organismo. A influência desse hábito no desenvolvimento e aumento da gravidade do LES tem sido reportado em diversos estudos (GHAUSSY *et al.*, 2001; COSTENBADER e KARLSON, 2005; MAJKA e HOLERS, 2006;). Além disso, algumas manifestações do LES também foram relacionadas ao tabagismo, principalmente as lesões cutâneas (TURCHIN *et al.*, 2009). Não só ao LES, mas também à AR está constatada a influência do ato de fumar no desenvolvimento da doença e no seu mau prognóstico (STOLT *et al.*, 2003). Os dados mostrados no presente estudo não mostram associação do tabagismo às doenças, possivelmente, em decorrência do tamanho da amostra.

Ainda relacionado a fatores de risco ambientais, inúmeros estudos também trazem casos de associação da AR e do LES ao consumo de álcool. Todavia, muitos alegam associação negativa ou até mesmo proteção à doença quando há consumo moderado da bebida (HARDY *et al.*, 1998; GHAUSSY *et al.*, 2001; WANG, 2008). Novamente, não foi encontrada associação entre o consumo de álcool e as doenças estudadas.

A relação entre outras manifestações não analisadas, porém comuns ao LES, como a nefrite, devem ser posteriormente analisadas, visto que já foram reportadas em outros trabalhos de associação ao polimorfismo PD1.3 do gene *PDCD1* (BACK, 2007; PROKUNINA *et al.*, 2004a).

6. CONCLUSÕES

- As frequências genotípicas dos pacientes não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ao contrário das frequências observadas nos controles;
- Nenhum genótipo mostrou-se associado ao LES, nem à AR neste estudo da população de Santa Catarina;
- A frequência do alelo *A* foi maior nos pacientes (AR= 0,115; LES = 0,095) que no grupo controle (controles= 0,078);
- Nenhuma associação das doenças com o alelo variante do SNP PD1.3 foi encontrada;
- Os valores encontrados para a associação de pacientes acometidos pela AR com o alelo *A* do gene *PDCD1* (PD1.3) e fator reumatóide positivo mostraram-se estatisticamente significativos, apesar de possuírem um intervalo de confiança relativamente grande.
- Os dados epidemiológicos levantados permitiram a construção de um banco de dados dos pacientes com AR e LES e, com isso uma maior caracterização dos mesmos no Estado. Todavia, não apresentaram nenhum valor significativo de associação às doenças ou aos alelos estudados no presente trabalho.
- Este trabalho proporcionou um aumento do tamanho amostral existente no LAPOGE.

7. REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., SHIV, P. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, 564 p.
2. AHMED, S. A., KARPUZOGLU-SAHIN, E. **Molecular Autoimmunity**: In commemoration of the 100th anniversary of the first description of human autoimmune disease. Editado por Moncef Zouali, 1 ed. New York: Springer Science e Business Media, Inc., 2005. 181 p.
3. ALARCÓN-RIQUELME, M. E. Family Studies in Systemic Lupus Erythematosus. **Rheumatology**, v. 42, p. 364:366, 2002.
4. ARTHRITIS FOUNDATION. News from the Arthritis Foundation, Rheumatoid Arthritis Fact Sheet. Disponível em: <www.arthritis.org>. Acesso novembro 2009.
5. BACK, L. K. C. **Lúpus Eritematoso Sistêmico**: Pesquisa de Marcadores Moleculares de Susceptibilidade e Prognóstico. Florianópolis, 2007. 113f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
6. BARBETA, L. P. *et al.* Polimorfismos dos sistemas sanguíneos ALB, TF, HP, ABO e RH, numa amostra de doadores de sangue de Florianópolis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 48, CD-ROM, 2002.
7. BENJAMINI, E., COICO, R., SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 288 p.
8. BORBA, E. F. *et al.* Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 4, p.196-207, 2008.
9. BRAUN-PRADO, K., PETZL-ERLER, M. L. Programmed death cell 1 gene (*PDCD1*) polymorfism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 314-321, 2007.

10. COSTENBADER K. H., KARLSON, E. W. Cigarette smoking and systemic lupus erythematosus: a smoking gun? **Autoimmunity**, v. 38, n. 7, p. 541-7, novembro 2005.
11. COSTENBADER, K. H., KARLSON, E. W. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? **Lupus**, v. 15, n. 11, p. 737-45, 2006.
12. CRISWELL, L. A. The Genetic Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 66, n. 3, p. 176-183, 2008.
13. FERNANDO, M. M. A., *et al.* Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled. **PLOS Genetics**, v. 4, n. 4, abril 2008.
14. FERREIROS-VIDAL, I., *et al.* Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. **Arthritis Rheum**, v. 50, p. 2590-2597, 2004.
15. FERREIROS-VIDAL, I., *et al.* Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. **Genes and Immunity**, v. 8, p. 138-146, 2007.
16. FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356-361, maio 2003.
17. GHAUSSY N. O., SIBBITT W. L. Jr., QUALLS C. R. Cigarette smoking, alcohol consumption, and the risk of systemic lupus erythematosus: a case-control study. **The Journal of Rheumatology**. v. 28, n. 11, p. 2449-53, novembro 2001.
18. GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune disease - disorders of immune homeostasis. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 917-928, dezembro 2006.
19. GREGERSEN, P. K.; SILVER J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis - An Approach to Understanding The Molecular Genetics of

- Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 30, n. 11, p.1205-1213, novembro 1987.
20. HARDY C. J. Smoking history, alcohol consumption, and systemic lupus erythematosus: a case-control study. **Annals of Rheumatic Disease**. v. 57, n. 8, p. 451-5, agosto 1998.
21. HDS (Health Decision Strategies) EpiMax Calculator. Disponível em: <<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>>. Acesso novembro de 2009.
22. HELMICK, C., *et al.* Estimates of Prevalence os Arthritis and Orher Rheumatic conditiond in the United States. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 1, p. 15-25, 2008.
23. INVERNIZZI, P., GERSHWIN, M. E. The genetics of human autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 33, p. 290-299, agosto 2009.
24. IOANNIDIS, J. P. A., *et al.* Replication validity of genetic association studies. **Nature Publishing Group**, v. 29, p. 306-309, novembro 2001.
25. IWAMOTO, T., *et al.* Failure to confirm association between *PDCD1* polymorphisms and rheumatoid arthritis in a Japanese population. **Journal of Human Genetics**, v. 52, n. 6, p. 557-560, abril 2007.
26. JOHANSSON, M., *et al.* Association of a *PDCD1* Polymorphism with Renal Manifestations in Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis e Rheumatism**, v. 52, n. 6, p. 1665-1669, junho 2005.
27. KEIR, M. E., *et al.* PD-1 and its ligands in Tolerance and Immunity. **The Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 677-704, janeiro 2008.
28. KONG E. K., *et al.* A new haplotype of *PDCD1* is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 4., p. 1058-62., 2005.
29. KOTZIN, B. L. Systemic Lupus Erythematosus. **Cell**, v. 85, p.303-306, 1996.

30. KRONER, A., *et al.* A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 58, p. 50-57, 2005.
31. LLEO, A., *et al.* Is autoimmunity a matter of sex? **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 626-630, julho 2008.
32. LEVINSON, W. **Review of Medical Microbiology & Immunology**. 10 ed. USA: The McGraw-Hill Companies, 2008.
33. LEVY, R. A., *et al.* **Atlas Ilustrado Reumatologia**. Fascículo 4 - Artrite Reumatóide, p. 1-20, não datado.
34. LIN, S., *et al.* Association of a Programmed Death 1 Gene Polymorphism With the Development of Rheumatoid Arthritis, but Not Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 3, p. 770-775, março 2004.
35. LIU, J. L., *et al.* Association between the PD1.3A/G polymorphism of the *PDCD1* gene and systemic lupus erythematosus in European populations: a meta-analysis. **JEADV - Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, p. 425-432, 2009.
36. MACGREGOR A. J., *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 1, p. 30-37, 2000.
37. MAJKA, D. S., HOLERS, V. M. Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Annals of Rheumatic Disease**, v. 65, p. 561-563, 2006.
38. MEDINA, K. L., *et al.* Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. **Nature Immunology**, v. 2, p. 718–24, 2001.
39. NCBI – NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em maio de 2009.
40. NIELSEN, C., *et al.* Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. **Tissue Antigens**; v. 62, p. 492-497, julho 2003.

41. NIELSEN, C., *et al.* A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 13, p. 510-516, julho 2004.
42. OKAZAKI, T., HONJO, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. **International Immunology**, v. 19, n 7, p. 813-824, julho 2007.
43. OLIVER, J. E., WORTHINGTON, J., SILMAN, A. J. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v.18, p. 141-146, 2006.
44. PARSLOW, T. G., *et al.* **Imunologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 689 p.
45. PEARCE, S. H. S.; MERRIMAN, T. R. Genetic progress toward the molecular basis of autoimmunity. **Trends in Molecular Medicine**, v.2, n.2, p. 90-97, fevereiro 2006.
46. PROKUNINA, L.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. Finding genes for SLE: complex interactions and complex populations. **Journal of Autoimmunity**, v. 21, p. 117-120, 2003.
47. PROKUNINA, L.; ALARCÓN-RIQUELME, M. E. The genetic basis of lupus erythematosus-knowledge of today and thoughts for tomorrow. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 1, p. 143-148, fevereiro 2004.
48. PROKUNINA, L., *et al.*, A regulatory polymorphism in *PDCD1* is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. **Nature Genetics**, v. 32, n. 12, p. 666-669, outubro 2002.
49. PROKUNINA, L., *et al.* The systemic lupus erythematosus-associated *PDCD1* polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 1, p. 327-333, janeiro 2004a.
50. PROKUNINA, L., *et al.* Association of the PD1.3A Allele of the *PDCD1* Gene in Patients With Rheumatoid Arthritis Negative for Rheumatoid Factor and the Shared Epitope. **Arthritis & Rheumatism**, v.50, n. 6, p. 1770-1773, junho 2004b.

51. RHEUMATOID ARTHRITIS. Produzida pela Arthritis Foundation 2000. Tradução para o português autorizada pela Dra. Rejane Leal Araújo. Sociedade Brasileira de Reumatologia. Disponível em www.reumatologia.com.br. Acesso em maio de 2009.
52. SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3 ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
53. SHANGHERA, D. K., *et al.* Role of an intronic polymorfism in the *PDCD1* gene with the risk of sporadic systemic pulus erythematosus and the ocurrence of antiphospholipid antibodies. **Human Genetics**, v. 115, p.393-398, 2004.
54. SHARPE, A. H., *et al.* The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nature Immunology**, v. 8, n. 3, p. 239-245, março 2007.
55. SHOENFELD, Y. The Mosaic of Autoimmunity: Hormonal and Environmental Factors Involved in Autoimmune Diseases. **The Israel Medical Association Journal**, v. 10, p. 8-12, janeiro 2008.
56. SIGURDSSON, S., *et al.* Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. **American Journal of Human Genetics**, v. 76, p. 528-537, 2005.
57. SILVA, R. G. Como diagnosticar e tratar: Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira Médica**, v. 60, n. 8, p. 554-576, agosto de 2003.
58. SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Disponível em: www.reumatologia.com.br . Acesso em maio de 2009.
59. STOLT P., *et al.* Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. **Annals of Rheumatic Disease**. v. 62, n. 9, p. 835-41, 2003.
60. SUAREZ-GESTAL, M., *et al.* Analysis of the functional relevance of a putative regulatory SNP of *PDCD1*, PD1.3, associated with systemic lupus erytematosus. **Genes and Immunity**, v. 9, 309-315, 2008.

61. SUTHERLAND, A., *et al.* Genomic Polymorphism at the Interferon-Induced Helicase (IFIH1) Locus Contributes to Graves' Disease Susceptibility. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 8, p. 3338-3341, 2007.
62. TIKLY, M., NAVARRA, S. V. Lupus in the developing world - is it any different? **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 4, p. 643-655, 2008.
63. TURCHIN, I., *et al.* Cigarette Smoking and Cutaneous Damage in Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, Disponível em <doi:10.3899/jrheum.090403>, novembro 2009.
64. TSAO, B. P. The genetics of human systemic lupus erythematosus. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 11, p. 595-602, novembro 2003.
65. TSAO, B. P. Update on human systemic lupus erythematosus genetics. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 16, p. 513-521, 2004.
66. WAN, B., *et al.* Aberrant Regulation of Synovial T Cell Activation by Soluble Costimulatory Molecules in Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 8844-8850, 2006.
67. WANG, J. Moderate alcohol drinking might be protective for systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Rheumatology**. v. 27, n., 12 p.1557-63, dezembro 2008.
68. WANG, S., *et al.* Polymorphisms of Genes for Programmed Cell Death 1 Ligands in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, p. 563-567, junho 2007.
69. WOOF, B. On estimating the relation between blood groups and disease. **Annals of Human Genetics**, v.29, p.251-253, 1955.
70. YAMADA, R., YAMAMOTO, K. Mechanisms of Disease: genetics of rheumatoid arthritis - ethnic differences in disease-associated genes. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 3, n. 11, p. 644-650, julho 2007.

71. YANG, W., et al. ITGAM is associated with disease susceptibility and renal nephritis of systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese and Thai. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 11, p. 2063-2070, março 2009.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM APOIO

DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações aos participantes,

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

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

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

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

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

Florianópolis,

Assinatura: _____

RG: _____

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA/CCB

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA/CCS

Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Artrite Reumatóide

NOME: _____ PRONTuário/HU: _____

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

Procedência: _____ Natural de: _____

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

Telefone: _____

DATA: ___/___/___ AR: _____

Médico: _____

Responsável: _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____

CIDADE onde nasceu: _____ Profissão: _____

DESCENDência: Materna _____ Paterna _____

NOME da mãe: _____

CIDADE onde nasceu: _____ Profissão: _____

DESCENDência: Materna _____ Paterna _____

Tempo de doença diagnosticada: _____

Histórico Familiar: AR: ()S ()N Parentesco: _____

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

Manifestações Iniciais: () Febre () Rigidez Matinal
() Derrame Articular () Dor Articular

Articulações Acometidas:

() Ombro () Cotovelo () Punho () MCF
() IFPM () Quadril () Joelho () Tornozelo
() MTF () IFPP Total: _____ articulações

Manifestações Extra-articulares:

() Pleurite () Pericardite
() Vasculite Reumatóide () Nódulos Reumatóides
() Acometimento Ocular () Acometimento Pulmonar
() Acometimento Renal () Amiloidose
() Sjögren Secundário
() Outras Quais? _____

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

Observações: Osteoporose? Diabetes? Depressão? _____

Sintomatologia Recente: () Febre () Rigidez Matinal
(Nos últimos 10 dias) () Derrame Articular () Dor Articular

Articulações Acometidas:

() Ombro () Cotovelo () Punho () MCF
() IFPM () Quadril () Joelho () Tornozelo
() MTF () IFPP Total: _____ articulações

Manifestações Extra-articulares:

- () Pleurite () Pericardite
() Vasculite Reumatóide () Nódulos Reumatóides
() Acometimento Ocular () Acometimento Pulmonar
() Acometimento Renal () Amiloidose
() Sjögren Secundário
() Outras Quais? _____
-

- Envolvimento Cardiovascular:** () HAS () Doença Coronariana
() Angina () IAM Prévio
() Revascularização do Miocárdio
() Cateterismo Prévio

Envolvimento Neurológico: () AVC () AIT () Ateroma em Carótidas

Dislipidemia: () Hipercolesterolemia () Hipertrigliceridemia

Hist. Familiar de Doença Cardiovascular: () S () N Parentesco: _____

DAS 28 =

Health Assesment Questionnaire (HAQ)

Você é capaz de:	Nível de Dificuldade			
	Sem qualquer	Com alguma	Com muita	Incapaz de fazer
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões do sapato e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos?	0	1	2	3
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braço?	0	1	2	3
4. Deitar-se e levantar-se da cama?	0	1	2	3
5. Cortar um pedaço de carne?	0	1	2	3
6. Levar à boca um copo ou uma xícara cheia de café ou água?	0	1	2	3
7. Abrir um saco de leite comum?	0	1	2	3

8. Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9. Subir 5 degraus?	0	1	2	3
10. Lavar e secar seu corpo após o banho?	0	1	2	3
11. Tomar banho de chuveiro?	0	1	2	3
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 kg que está posicionado pouco acima de sua cabeça?	0	1	2	3
14. Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15. Segurar-se em pé no ônibus ou no metrô?	0	1	2	3
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido abertos previamente?	0	1	2	3
17. Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18. Fazer compras nas redondezas onde mora?	0	1	2	3
19. Entrar e sair de um ônibus?	0	1	2	3
20. Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	0	1	2	3

Escore dos Componentes:

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

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

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

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

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: _____

<p>Média Aritmética dos Escore dos Componentes = _____</p>
--

<p>Escore do HAQ: _____</p>

.....
Tratamento Atual: CORTICosteróides: ()S ()N Qual?_____

Dose?_____Frequência?_____

METOtrexato: ()S ()N Dose?_____ Frequência?_____

SULFASSALazina: ()S ()N Dose?_____ Frequência?_____

ANTIMALárico: ()S ()N Qual?_____

Dose?_____ Frequência?_____

CICLOFosfamida: ()S ()N Dose?_____ Frequência?_____

INFLIXImab: ()S ()N Ampolas?_____ Frequência?_____

ETANERcept: ()S ()N Ampolas?_____ Frequência?_____

AINE: ()S ()N Qual?_____

Dose?_____ Frequência?_____

ANALGésicos: ()S ()N Qual?_____

Dose? _____ Frequência?_____

Outros: ()S ()N Quais?_____

Dose? _____ Frequência?_____

Idade da MENARCA: _____anos **MENOPAUSA:** ()S ()N Idade:_____anos

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

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

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

Quais?_____

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

Qtde?_____ Frequência?_____

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

Se fumava, qual a duração?_____

Quando parou?_____

Drogas Ilícitas: ()S ()N Qual?_____

Por quanto tempo?_____



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO

Informações aos participantes,

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

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

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

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

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

Florianópolis,

Assinatura: _____

RG: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA/CCB

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA/CCS

Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico

NOME: _____ PRONTUÁRIO/HU: _____

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

PROCedência: _____ NATural de: _____

ESTado CIVil: ()S ()C ()D ()V OCUPação: _____

TELEfone: _____

Data: _____ LUP _____

Médico: _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____

CIDADE onde nasceu: _____ Profissão: _____

DESCEndência: Materna _____ Paterna _____

NOME da mãe: _____

CIDADE onde nasceu: _____ Profissão: _____

DESCEndência: Materna _____ Paterna _____

TEMPO de doença diagnosticada: _____

HISTÓria FAMiliar: Lúpus: ()S ()N Parentesco: _____

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

() Distúrbio Hematológico () Hipertensão Arterial

() Vasculite

() Outras? Quais? _____

Tratamento Atual: CORTICosteróides: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

AZATioprina: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

ANTIMALárico: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

METOtrexato: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

CICLOSPorina: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

CICLOFosfamida: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

AINE: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

ANALGésicos: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

Outros: ()S ()N Quais? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

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

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

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

Duração: _____ Parou há quanto tempo? _____

Tratamento MEDICAMENTOSO Antes do Diagnóstico: ()S ()N Quais? _____

História de Uso de DROGAS:

Álcool: ()S ()N Tipo? _____ Qtde? _____ Freqüência? _____

Cigarro: ()S ()N Cigarros/dia: _____ Se fumava, qual a duração? _____ Quando parou? _____

Drogas Ilícitas: ()S ()N Qual? _____ Por quanto tempo? _____

SLEDAI

(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)

Modificação SELENA

Avaliação Global do Médico _____

0 1 2 3

Nula Leve Média Severa

Score SLEDAI

Marque se o descriptor estiver presente no momento da visita ou nos 10 dias anteriores.

Pe s	Pres .	Descriptor	Definição
8	()	Convulsão	Início recente. Excluir causa metabólica, infecciosa ou farmacológica.
8	()	Psicose	Alterações na habilidade de exercer atividades normais devido a distúrbio severo na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico, conteúdo pobre de pensamentos. Excluir uremia e causas farmacológicas.
8	()	Síndrome Cerebral Orgânica	Função mental alterada com diminuição da orientação, memória ou outras funções inteligentes, com início abrupto e características clínicas flutuantes. Inclui redução da consciência com capacidade reduzida de concentração e incapacidade de manter-se atento ao ambiente, mais pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, fala incoerente, insônia ou sonolência diurna, ou atividade psicomotora aumentada ou diminuída. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou farmacológicas.
8	()	Distúrbio Visual	Alterações retinianas do lupus.. Inclui corpos citóides, hemorragias retinianas, hemorragia ou exsudato na coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção ou causas farmacológicas.
8	()	Distúrbio em Nervo Craniano	Início recente de neuropatia sensorial ou motora envolvendo nervos cranianos.
8	()	Cefaléia do Lupus	Cefaléia severa e persistente: pode ser migranosa, mas deve ser não-responsiva a analgesia narcótica.
8	()	AVC	Início recente de AVC. Excluir aterosclerose
8	()	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos moles nos dedos, infarto periungueal, hemorragia em cunha, ou biópsia ou

			angiograma provando vasculite.
4	()	Artrite	Mais do que 2 articulações com dor e sinais de inflamação (i.e. edema, derrame articular ou sensibilidade)
4	()	Miosite	Fraqueza ou dor muscular proximais, associada com CPK/aldolas elevada ou mudanças no eletromiograma ou biópsia mostrando miosite.
4	()	Cilindros Urinários	Cilindros de hemácias ou heme-granulares.
4	()	Hematuria	>5 hemácias/campo. Excluir cálculo, infecção ou outra causa.
4	()	Proteinúria	>0,5 g/24 h. Início recente ou aumento recente de mais que 0,5 g/24 h.
4	()	Piúria	>5 leucócitos/campo. Excluir infecção.
2	()	Rash Novo	Início recente ou recorrência de <i>rash</i> do tipo inflamatório.
2	()	Alopécia	Início recente ou recorrência de perda de cabelo anormal, em placas ou difusa.
2	()	Úlceras em Mucosas	Início recente ou recorrência de ulcerações nasais ou orais.
2	()	Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural ou derrame, ou espessamento pleural.
2	()	Pericardite	Dor de origem pericárdica ou pelo menos 1 dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrocardiográfica.
2	()	Complemento Baixo	Diminuição no CH50, C3 ou C4 abaixo do limite inferior do laboratório.
2	()	Agregação de DNA Aumentada	>25% por ensaio Farr or acima da variação normal para o laboratório
1	()	Febre	>38°C. Excluir causas infecciosas.
1	()	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas/mm ³ .
1	()	Leucopenia	<3000 leucócitos/mm ³ . Excluir causas farmacológicas

_____ Score Total (soma dos pesos)

Crise Leve ou Moderada ()	Severa ()
() Mudança no SLEDAI >3 pontos	() Mudança no SLEDAI >12 pontos
() Úlceras nasofaríngeas Pleurite Pericardite Artrite Febre (LES) Lupus bolhoso, vasculite cutânea, profunda, fotossensível e discóide recente/pior	() SNC-LES recente ou pior Vasculite (????) Nefrite Miosite Pk<60.000 Hb<7% ou diminuição na HB>3% Precisando de prednisona em dobro
() Aumento na prednisona, mas não para mais que 0,5 mg/kg/dia	() Prednisona>0,5 mg/kg/dia
() Adicionado AINE ou Plaquenil	() Necessidade de Azatioprina, Metotrexato ou Hospitalização pelo LES
() Aumento na PGA maior ou igual a 1 mas não maior que 2,5	() Aumento no PGA para mais de 2,5



ANEXO 3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



1.1.1. DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

2.1.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

2.1. Projetos de Pesquisa:

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

e

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

2.3.

2.4. **Informações:**

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

Procedimentos:

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

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

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

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

Riscos:

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

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios

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

Assinaturas:

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

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

Florianópolis,

Assinatura: _____

RG: _____

ANEXO 4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA – BEG

LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

2.6. QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE

IDENTIFICAÇÃO

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

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____ Cidade: _____

Telefone Residencial: _____ Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

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

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não

Escolaridade: () analfabeto () 1º grau incompleto

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

() 2º grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência: Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente () Asiático descendente

() Indígena descendente

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

Observação: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência do pai:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência da mãe:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

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

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

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

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

() Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

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

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

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

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

Tipo: _____

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

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

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

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

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

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

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

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

Nome:

Identificação:

3.1.1. Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª estação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

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

TRAT. HORMONAL:

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

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

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

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

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações: _____

4.1.1. Histórico Médico

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

Tipo: _____

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

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

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

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

() Outros _____

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

Grau de Parentesco e tipo: _____

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

Local: _____

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

Qual? _____

Tempo de diagnóstico: _____

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

Grau de Parentesco e tipo: _____

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

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: () Sim () Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: () Sim () Não

OSTEOPOROSE: () Sim () Não

DOENÇA REUMÁTICA: () Sim () Não

DIABETES: () Sim () Não

ASMA: () Sim () Não

HIV: () Sim () Não () Nunca fez exame

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

DENGUE: () Sim () Não

TUBERCULOSE: () Sim () Não

DISTÚRBIO RENAL: () Sim () Não

DISTÚRBIO PULMONAR: () Sim () Não

DISTÚRBIO HEPÁTICO: () Sim () Não

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

Grau de parentesco: _____

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

Grau de parentesco: _____

OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

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

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