

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA
E GENÉTICA**

Maria Luiza Guimarães de Oliveira

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO *PTPN22* C1858T POR *HIGH
RESOLUTION MELTING* EM PACIENTES COM ARTRITE
REUMATOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina, apresentado como requisito
para o cumprimento da disciplina
BIO7016.

Orientadora: Prof.^aDr.^aÍlida Rainha de
Souza

Coorientadora: MSc. Lia Kubelka de
Carlos Back

Florianópolis
2013

Maria Luiza Guimarões de Oliveira

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO *PTPN22* C1858T POR
HIGH RESOLUTION MELTING EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE**

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

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2013.

Prof.^a Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:



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



MSc. Lia Kubelka de Carlos Back,
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

"ad hoc" Marcelo Rizzatti Luizon

Dr. Marcelo Rizzatti Luizon
University of California



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



MSc. Ticiane Della Justina Farias
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para realização deste trabalho, meu imenso carinho e gratidão.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela infraestrutura e formação em Ciências Biológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo suporte financeiro.

À Coordenação do Centro de Ciências Biológicas (CCB) pelo apoio.

Ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) pelo suporte e estrutura para realização deste trabalho.

À minha orientadora, prof^a Dr^a Ilíada Rainha de Souza, pela oportunidade de integrar a equipe do LAPOGE e por todos os ensinamentos que me foram transmitidos, sempre com muita dedicação, atenção e paciência.

Ao Laboratório de Diagnóstico Molecular e Medicina Genômica (BIOGENETIKA), que forneceu a estrutura e suporte para realização deste trabalho. Pela oportunidade de estágio e de convívio e aprendizado com três pessoas muito especiais, exemplos de profissionais para mim:

À minha coorientadora, MSc. Lia Kubelka de Carlos Back, que entre uma xícara de chá e muito carinho me recebeu no laboratório. Agradeço imensamente pela oportunidade e confiança depositada. Pelo incentivo, pelo exemplo de pessoa que é para mim, pela idealização desse trabalho e por todos os esforços que despendeu para que pudesse ser realizado.

À querida MSc. Aline Fernanda Rodrigues Sereia por toda ajuda, instrução e incentivo, essenciais para realização deste trabalho. Exemplo de superação e inspiração a quem sou muito grata e com quem aprendo muito, a cada minuto. Agradeço imensamente toda sua dedicação e carinho.

À Patrícia Amorim da Cunha, Pati, pela amizade, parceria no laboratório, nos estudos e por todas as muitas conversas. Agradeço pela

ajuda, paciência e por compartilhar comigo sua experiência. Tenho grande admiração pelo exemplo de dedicação a tudo que faz!

Aos integrantes do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e Laboratório de Virologia Aplicada (LVAPLI) pela disponibilidade à utilização dos equipamentos.

Aos médicos da equipe de Reumatologia do Hospital Universitário (HU): Dr. Ivanio Pereira, Dr^a Adriana Zimmermann e Dr^a Sônia Fialho, pela parceria e apoio fornecido ao projeto de Autoimunidade.

Aos voluntários que gentilmente doaram uma parte de seu tempo e história. Agradeço imensamente a cada um. Sem vocês este trabalho não poderia ter sido realizado.

Ao Programa de Educação Tutorial (PET) do Ministério da Educação por todas as oportunidades concedidas. Em especial à tutora, Dr^a Tânia Tarabini Castellani, pelo incentivo e a todo grupo do PET-Biologia pelos intensos e produtivos anos de aprendizado.

Aos mestres que contribuíram para minha formação, em especial ao professor Dr. Paulo Roberto Petersen Hofmann.

Aos membros da banca examinadora, que gentilmente aceitou participar e contribuir com este trabalho: Dr. Marcelo Rizzatti Luizon, Dr^a Yara Costa Netto Muniz e MSc. Ticiania Della Justina Farias.

Ao grupo do LAPOGE, aos mais antigos e aos nem tanto, pelo convívio, auxílio nas coletas e preparação das amostras. Em especial à Tici por toda a parceria e companhia nos cafés, à Yara, pela disposição em ajudar no que fosse necessário e à Larissa, pelo auxílio nos géis.

À minha família. A meus pais, por todo amor e por sempre apoiarem as minhas decisões. Aos meus irmãos, Edgar e Osmar, pelo apoio e por serem tão amados para mim. À minha querida avó, ao meu padrinho, madrinha, tia Lourdes (*in memoriam*) e aos meus queridos primos. Aos preciosos amigos. Obrigada por tudo, vocês são muito importantes para mim!

A Deus!

“Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão, poderá morrer de saudades, mas não estará só”.

Amir Klink

RESUMO

Introdução: A utilização do polimorfismo *PTPN22* C1858T (rs2476601) como marcador da Artrite Reumatoide (AR) tem sido investigada em diversas populações e até o momento não havia sido verificada na população brasileira. Dentre as técnicas descritas para identificação de SNPs, o *High Resolution Melting* (HRM) se destaca como um dos métodos mais adequados para uso no diagnóstico molecular de doenças.

Objetivos: Verificar a associação do polimorfismo *PTPN22* C1858T à AR através de um estudo caso-controle e padronizar a técnica de HRM para detecção deste SNP.

Metodologia: O SNP *PTPN22* C1858T foi genotipado por HRM em 100 pacientes com AR e em 100 indivíduos controles. Os resultados obtidos foram confirmados por PCR-RFLP. Análises do estudo caso-controle foram calculadas por regressão logística binária no programa SPSS v.12.0; $p \leq 0,05$, IC95%.

Resultados: A técnica de HRM foi padronizada e permitiu a identificação do polimorfismo estudado. A frequência do alelo de risco (1858T) foi de 0,090 em casos e 0,045 em controles. As populações estavam em Equilíbrio de Hardy Weinberg. Não foi encontrada associação entre o alelo 1858T e a predisposição à AR (OR = 2,120; IC95% 0,919 - 4,890; $p = 0,078$) ou entre este e os demais fatores analisados (tabagismo e fatores hormonais).

Conclusões: As condições experimentais determinadas neste estudo permitiram a detecção do SNP *PTPN22* C1858T pela técnica de HRM e a análise da associação deste polimorfismo à população brasileira com AR. Não foi encontrada associação entre 1858T e a susceptibilidade à AR, porém, em função de sua importância na doença e da baixa frequência do alelo de risco verificada novos estudos são necessários na população brasileira com AR.

Palavras-chave: *PTPN22* C1858T, *High Resolution Melting*, artrite reumatoide.

ABSTRACT

Introduction: The use of the polymorphism *PTPN22* C1858T (rs2476601) like a Rheumatoid Arthritis (RA) marker has been investigated in many populations and until now it has not been analyzed in Brazilian population. Among the technologies described for SNPs identification the *High Resolution Melting* (HRM) is one the most suitable methods for use in disease molecular diagnosis.

Objectives: To verify the association of the *PTPN22* C1858T polymorphism with RA in a case-control study and to standardize the HRM technique for the detection this SNP

Methodology: The SNP *PTPN22* C1858T was genotyped by HRM in 100 RA patients and in 100 healthy individuals. The genotypes were confirmed by PCR-RFLP. Study case-control analyses were calculated by logistic regression in the software SPSS v.12.0; $p \leq 0,05$, CI 95%.

Results: The HRM technique has been standardized and enabled the identification of polymorphism studied. The risk allele (1858T) frequency was 0,090 in cases and 0,045 in controls. The populations were in Hardy Weinberg Equilibrium. No association was found between the 1858T allele and the susceptibility to RA (OR = 2,120; CI95% 0,919 - 4,890; $p = 0,078$) or between this and the others analyzed factors (smoking and hormonal factors).

Conclusions: The experimental conditions determined in this study enabled the SNP *PTPN22* C1858T detection by HRM technique and the association analysis this polymorphism in RA Brazilian population. No association was found between the 1858T allele and the RA susceptibility, however due to their importance in disease and the low frequency of the risk allele verified further studies are need in the RA Brazilian population.

Keywords: *PTPN22* C1858T, *High Resolution Melting*, rheumatoid arthritis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de uma articulação sinovial típica	29
Figura 2 - Características da inflamação articular na AR.....	30
Figura 3 - Genes de susceptibilidade para AR	36
Figura 4 - Representação da região do cromossomo 1 no braço p onde está localizado o gene <i>PTPN22</i>	37
Figura 5 - Inibição da ativação do TCR pelo Complexo Lyp/Csk	38
Figura 6 - Estrutura de duas isoformas transcritas do gene <i>PTPN22</i> com indicação de sete posições de SNPs	39
Figura 7 - Haplótipos preditos do gene <i>PTPN22</i> e associação com AR 40	
Figura 8 - Curva de dissociação do DNA.....	43
Figura 9 - Genotipagem por HRM	43
Figura 10 - Foto de eletroforese em gel de agarose 2,5% mostrando fragmentos de DNA que contém o SNP C1858T do gene <i>PTPN22</i>	56
Figura 11 - Diferenciação dos genótipos através do “Gráfico de Curvas de Dissociação Alinhadas”	59
Figura 12 - Diferenciação dos genótipos através do "Gráfico de Diferenças "	60
Figura 13 - Gráficos de amplificação gerados para as reações de PCR em Tempo Real com diferentes concentrações de primers. 61	
Figura 14 - Gráficos das análises por HRM gerados a partir de reações de PCR em Tempo Real com diferentes concentrações de primers.....	62
Figura 15 - Gráficos de amplificação gerados para as reações de PCR em Tempo Real com diferentes concentrações de MgCl ₂ . . 63	
Figura 16 - Gráficos das Análises por HRM gerados a partir das reações de PCR em Tempo Real com diferentes concentrações de MgCl ₂	64
Figura 17 - Gráficos de amplificação gerados para as reações de PCR em Tempo Real com diferentes programas de ciclagem. ... 65	
Figura 18 - Comparação dos Gráficos de amplificação da PCR em Tempo Real gerados a partir de reações com amostras obtidas por diferentes métodos de extração.....	66
Figura 19 - Comparação dos “Gráficos de Curvas de Dissociação Alinhadas” gerados a partir de reações com amostras obtidas por diferentes métodos de extração.	67

Figura 20 - Gráficos das análises por HRM gerados a partir de reações realizadas com amostras extraídas pela técnica de <i>Salting-out</i> e purificadas com Água ultrapura.	68
Figura 21 - Comparação dos gráficos de amplificação da PCR em Tempo Real gerados a partir de reações com amostras de DNA obtidas por <i>salting-out</i> antes e após ressuspensão em TE.....	70
Figura 22 - Gráficos das análises por HRM gerados a partir da reação otimizada de PCR em Tempo Real realizada com amostras de DNA purificadas.....	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição étnica das amostras de casos e controles	73
Gráfico 2 - Distribuição das frequências dos sexos feminino e masculino em casos e controles	74
Gráfico 3 - Distribuição das frequências de casos e controles por faixa etária	74
Gráfico 4 - Manifestações extra-articulares apresentadas pelos pacientes com AR	77
Gráfico 5 - Comorbidades associadas à AR	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de classificação da Artrite Reumatoide segundo ACR 2010.....	32
Tabela 2 - Ocorrência e Tm dos SNPs no genoma humano.....	44
Tabela 3- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a genotipagem por HRM do SNP C1858T (rs2476601) do gene <i>PTPN22</i>	53
Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR-RFLP para genotipagem do SNP (rs2476601) do gene <i>PTPN22</i>	54
Tabela 5 - Reagentes utilizados na PCR-RFLP do SNP C1858T	55
Tabela 6 - Programa de Ciclagem da PCR-RFLP do SNP C1858T.....	55
Tabela 7 - Modelos de análise de associação para o SNP C1858T.....	58
Tabela 8 - Comparação da genotipagem do SNP C1858T por HRM e PCR-RFLP.....	72
Tabela 9 - Teste de homogeneidade da ascendência entre casos e controles	73
Tabela 10 - Categorização epidemiológica do grupo de casos (pacientes) e controles, quanto a tabagismo, idade da menarca e uso de anticoncepcional.....	75
Tabela 11 - Frequências alélicas e genotípicas do SNP C1858T	75
Tabela 12 - Frequências genotípicas observadas e esperadas para o SNP <i>PTPN22</i> C1858T em casos (AR) e controles (CONT).....	76
Tabela 13 - Análise da associação do SNP C1858T à AR no presente estudo.....	76
Tabela 14 - Caracterização dos pacientes com AR	77
Tabela 15 - Avaliação do tabagismo e de indicativos de pior prognóstico nos grupos de pacientes FR+ e FR-.....	78
Tabela 16 - Análise da associação do SNP C1858T ao grupo FR+	79
Tabela 17 - Análise da associação do SNP C1858T e de fatores indicativos de pior prognóstico ao grupo FR+	79
Tabela 18 - Frequências alélicas do SNP C1858T do gene <i>PTPN22</i> em casos (AR) e controles (CONT) de diversos estudos	86
Tabela 19 - Frequências alélicas do SNP C1858T do gene <i>PTPN22</i> na população brasileira de casos e controles	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPA	Anticorpos anti-proteína citrulinada, do inglês <i>Anti-Citrullinated Protein Antibodies</i>
ACR	Colégio Americano de Reumatologia, do inglês <i>American College of Rheumatology</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno, do inglês <i>Antigen-presenting Cell</i>
Anti-CCP	Do inglês <i>anti-cyclic citrullinated peptide antibody</i>
AR	Artrite reumatoide
BCR	Receptor de célula B, do inglês <i>B-cell receptor</i>
CD	Grupo de diferenciação das células do sistema imune, do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CRP	Proteína C-reativa, do inglês <i>C-reactive protein</i>
Csk1	Do inglês c- <i>Src</i> -cinase1
Ct	Do inglês <i>threshold cycle</i>
CTLA-4	Do inglês <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DAS 28	Índice de atividade da doença, do inglês <i>Disease Activity Score in 28 Joints</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado, do inglês <i>Deoxynucleoside Triphosphates</i>
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weimberg
Fc	Receptor Fc
FR	Fator Reumatoide
GWAS	Estudo de associação por varredura do genoma, do inglês <i>Genome Wide Association Studies</i>
HLA	Antígenos leucocitários humanos, do inglês <i>Human Leukocyte Antigens</i>
<i>HLA-DRB1</i>	Gene <i>HLA-DR</i> região β hipervariável 1
HRM	Do inglês <i>High Resolution Melting</i>
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
Ig	Imunoglobulina
IGFBP1	Do inglês <i>Insuline-like Growth Factor Binding Protein1</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea

INF- γ	Interferon- γ
IRF5	Do inglês <i>Interferon Regulatory Factor 5</i>
ITAM	Do inglês <i>Immunotyrosine-based activatory motif</i>
ITIM	Do inglês <i>Immunotyrosine-based inhibitory motif</i>
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
Lck	Do inglês <i>Lymphocyte specific protein tyrosine kinase</i>
Lyp	Do inglês <i>lymphoid tyrosine phosphatase</i>
MEA	Manifestação extra-articular
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polimorphism</i>)
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase, do inglês <i>protein tyrosine phosphatase</i>
<i>PTPN22</i>	Do ingles <i>Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 22</i>
PTK	Proteína Tirosina Cinase, do inglês <i>protein tyrosine kinase</i>
R	Aminoácido Arginina
Rn	Do inglês <i>normalized reporter</i>
RNA _m	Ácido ribonucleico, do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
Rpm	Rotações por minuto
RPS12P4	Do inglês <i>ribosomal protein S12 pseudogene 4</i>
SE	Epítopo compartilhado, do inglês <i>Shared Epitope</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Taq	Do inglês <i>Thermophilus sp</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de célula T, do inglês <i>T-Cell Receptor</i>
Th	Célula T auxiliar, do inglês <i>T Helper cells</i>
T _m	Do inglês <i>melting temperature</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α , do inglês <i>Tumor Necrosis</i>

	<i>Factor-α</i>
<i>TRAF1-C5</i>	Do inglês <i>TNF-receptor-associated factor 1, complement component factor 5</i>
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
Treg	Células T reguladoras, do inglês <i>T Regulatory cells</i>
VHS	Velocidade de hemossedimentação
W	Aminoácido Triptofano
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	AUTOIMUNIDADE E REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO	25
1.2	ARTRITE REUMATOIDE.....	26
1.2.1	Imunopatogênese	27
1.2.2	Fisiopatologia	29
1.2.3	Critérios de Diagnóstico	31
1.2.4	Etiologia e Fatores Ambientais Relacionados	33
1.2.5	Fatores Genéticos de Susceptibilidade	35
1.2.5.1	Gene <i>PTPN22</i> e SNP C1858T.....	37
1.3	ANÁLISE MOLECULAR DO SNP <i>PTPN22</i> C1858T	41
1.3.1	PCR em Tempo-Real e HRM	41
1.3.2	PCR-RFLP	44
2	JUSTIFICATIVA	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	COLETA DO MATERIAL E COMPOSIÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL.....	51
4.2	PROCESSAMENTO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	52
4.3	AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DO SNP <i>PTPN22</i> C1858T.....	52
4.3.1	Genotipagem por HRM	52
4.3.2	Genotipagem por PCR-RFLP	54
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5	RESULTADOS	59
5.1	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HRM PARA DETECÇÃO DO SNP <i>PTPN22</i> C1858T.....	60
5.1.1	Otimização da PCR em Tempo Real	60
5.1.2	Genotipagem por HRM após Otimização da PCR em Tempo Real	66
5.1.3	Purificação das amostras de DNA extraídas por <i>Salting-out</i>	67
5.1.4	Genotipagem por HRM após etapa de purificação das amostras de DNA	71

5.1.5	Confirmação da genotipagem por HRM pelo método de PCR-RFLP.....	72
5.2	ESTUDO CASO-CONTROLE.....	73
5.2.1	Caracterização da amostra populacional.....	73
5.2.2	SNP <i>PTPN22</i> C1858T	75
5.2.3	Caracterização dos pacientes com Artrite Reumatoide	76
5.2.4	SNP <i>PTPN22</i> C1858T e Prognóstico da AR.....	78
6	DISCUSSÃO	81
6.1	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HRM PARA DETECÇÃO DO SNP <i>PTPN22</i> C1858T	81
6.2	ESTUDO CASO-CONTROLE.....	84
6.2.1	<i>PTPN22</i> C1858T e a susceptibilidade à AR	85
6.2.2	Identificação da frequência alélica de 1858T.....	86
6.2.3	Caracterização do grupo de pacientes com AR.....	88
6.2.4	SNP <i>PTPN22</i> C1858T e Prognóstico da AR.....	90
7	CONCLUSÕES	93
8	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO A	115
	ANEXO B	116
	ANEXO C	117
	ANEXO D	121
	ANEXO E	123
	ANEXO F.....	124

1. INTRODUÇÃO

1.1 AUTOIMUNIDADE E REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO

O conceito inicial de autoimunidade deriva do termo “*horror autotoxicus*”, empregado por Paul Erlich como referência à necessidade de prevenir o sistema imune de reagir contra o próprio organismo (CHO; GREGERSEN, 2011; SILVERSTEIN, 2005).

Reações autoimunes ocorrem com frequência em indivíduos sadios sem, no entanto, causar doença. Porém, em alguns casos, pode haver uma desregulação nos mecanismos que mantêm essas respostas sob controle, permitindo o desenvolvimento da autoimunidade. Assim, as doenças autoimunes podem ser caracterizadas pela perda da tolerância aos constituintes do próprio organismo (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012; FAIRWEATHER, 2007; VAZ; PORDEUS, 2005).

A imunidade adaptativa possui uma importante função no desenvolvimento e manutenção das doenças autoimunes. Ela pode ser caracterizada pelo reconhecimento altamente específico do antígeno que é realizado através dos receptores dos linfócitos T (TCR) e B (BCR) (DORIA et al., 2012). Durante o processo de geração desses receptores são produzidos linfócitos capazes de reconhecer antígenos próprios. O controle da reatividade desses linfócitos é mantido através de mecanismos de tolerância (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

A tolerância aos constituintes próprios é definida como um estado de baixa responsividade e pode ser didaticamente dividida em tolerância central e induzida. A tolerância central ocorre nos órgãos linfoides primários (timo e medula óssea), enquanto a tolerância induzida acontece nos órgãos linfoides periféricos (baço, linfonodos e tecidos linfoides associados a mucosas; LEGUERN, 2011; FAIRWEATHER, 2007).

Muitas doenças autoimunes podem ser atribuídas a alterações genéticas nos mecanismos de tolerância central (GREGERSEN; BEHRENS, 2006). O desenvolvimento de linfócitos funcionais depende de eventos de seleção que ocorrem durante o processo de tolerância no timo e na medula óssea (STRITESKY; JAMESON; HOGQUIST, 2012).

A seleção contra a autorreatividade em linfócitos T em desenvolvimento ocorre no timo. Nesse processo antígenos próprios,

localizados sob o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de moléculas endógenas, são apresentados aos receptores dos linfócitos T (TCR). Linfócitos cujo TCR não reconhece o MHC e peptídeos próprios morrem por apoptose (Seleção Positiva). Linfócitos que manifestam reatividade excessiva a antígenos próprios são eliminados por apoptose durante o processo de Seleção Negativa. Aqueles linfócitos que reconhecem os peptídeos próprios com afinidade moderada migram para os órgãos linfoides periféricos, onde serão então ativados. Ainda no timo, alguns linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em células T regulatórias (T_{reg}) e migram para a periferia, onde controlam linfócitos T autorreativos que tenham escapado à Seleção Negativa (NOTLEY; EHRENSTEIN, 2010; SAKAGUCHI; SAKAGUCHI, 2005).

Um processo de seleção análogo ocorre na medula óssea, onde receptores de linfócitos B imaturos (pré-BCRs) são apresentados a antígenos próprios por células apresentadoras de antígeno (APCs). Aqueles pré-BCRs que reconhecem com alta afinidade o antígeno próprio apresentado podem entrar em apoptose (deleção) ou ter sua especificidade alterada (edição do receptor; BOEHMER; MELCHERS, 2009; MEFFRE; WARDEMANN, 2008).

Mecanismos de tolerância periféricos também contribuem para manter a resposta dos linfócitos T e B sob controle. Na periferia, linfócitos autorreativos que reconhecem antígenos que não tenham sido expressos nos órgãos linfoides primários são removidos (por deleção ou inativação, também conhecida como anergia). Aqueles linfócitos que respondem com afinidade moderada são mantidos nos tecidos periféricos (BOEHMER; MELCHERS, 2009; MEFFRE; WARDEMANN, 2008; LEIPE et al., 2005).

1.2 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, sistêmica e inflamatória crônica que acomete predominantemente as articulações sinoviais e pode levar à destruição óssea e cartilaginosa (McINNES; SCHETT, 2011; KLARESKOG; CATRINA; PAGET, 2009).

Durante um longo período as manifestações da AR foram diagnosticadas como sintomas de “gota”. Somente em 1800 o médico francês Augustin Jacob Landré-Beauvais hipotetizou que essas complicações seriam decorrentes de outra doença reumatológica, que em 1859 foi denominada como “artrite reumatoide” por Alfred Garrod (GARROD; STOREY, 2001; UHLIG, 2011).

A AR afeta cerca de 0,5- 1,0% da população mundial, sendo uma das condições reumatológicas mais frequentes na clínica médica (JACOB; JACOB, 2012). A doença acomete todos os grupos étnicos; contudo, sua prevalência varia entre as populações (DELGADO-VEGA; JUAN-MANUEL, 2007). A prevalência da AR é excepcionalmente alta em algumas populações nativo-americanas – Pima e Chippuwa Indians (Del PUENTE et al., 1989; HARVEY et al., 1981). Maiores taxas são vistas no norte da Europa e em países Norte Americanos, enquanto que no sul Europeu e em países em desenvolvimento a prevalência da doença é menor (ALAMANOS; VOULGARI; DROSOS, 2006; ALAMANOS; DROSOS, 2005).

A idade média de manifestação da AR é de 50 anos, porém, a doença pode se manifestar em qualquer faixa etária (TÓBON; YOUINOU; SARAUX, 2010; ALAMANOS; DROSOS, 2005). A AR é de duas a três vezes mais frequente em mulheres que em homens. Para explicar essa maior prevalência no sexo feminino hipóteses relacionadas à participação de hormônios sexuais, inativação do cromossomo X, histórico reprodutivo e microquimerismo foram formuladas (OLIVER; SILMAN, 2009). Entretanto, ainda que diversas explicações tenham sido propostas para explicar as diferenças de gênero observadas em muitas doenças autoimunes, nenhum consenso foi obtido (POLLARD, 2012). Acima dos 75 anos a AR passa a ser mais prevalente em homens que em mulheres (TÓBON; YOUINOU; SARAUX, 2010; SYMMONS, 2002).

Em relação à população geral, a taxa de mortalidade é duas vezes maior e a expectativa de vida é reduzida. Os pacientes com AR vivem de 3 a 10 anos menos que a média populacional. Além disso, possuem um risco mais elevado de desenvolver um grande número de comorbidades associadas, como: hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e osteoporose (GULLICK; SCOTT, 2011; PRETE, et al, 2011).

1.2.1 Imunopatogênese

Fatores relacionados à imunidade adaptativa parecem desempenhar uma função chave na patogênese da AR, importância evidenciada pela presença de autoanticorpos e associação à doença de inúmeros genes envolvidos com o sistema imune adaptativo, como HLA-DR, *PTPN22* (McINNES; SCHETT, 2011).

Mecanismos celulares e humorais estão presentes e incluem a secreção de citocinas por diversos tipos celulares. As células localizadas na articulação inflamada são responsáveis pela liberação de diversas citocinas, como: IL1, IL6, IL13, IL15, IL17, IL18, IL22, IL33 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; McINNES; SCHETT, 2011).

Citocinas são implicadas em muitos dos processos relacionados à patogênese da AR. Elas regulam a diferenciação dos linfócitos T entre as populações T *helper*1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2). De acordo com o padrão de citocinas produzido, a AR foi considerada por muitos anos uma doença dominada por linfócitos Th1. A resposta Th1 promove a ativação de macrófagos e neutrófilos. Os produtos liberados por essas células, como espécies reativas de oxigênio (ROS), podem provocar a lesão tecidual que é verificada na AR (BOISSIER, 2011; McINNES; SCHETT, 2011).

No entanto, a observação de que níveis elevados de IL17 estão presentes no líquido sinovial de pacientes com AR destacaram o envolvimento de um novo subtipo linfocitário na patogênese da doença – os linfócitos Th17, os quais são caracterizados pela secreção de IL17 (SCHEINECKER; SMOLEN, 2010; KOTAKE et al., 1999). Acredita-se que IL17 atue como um efector central no desenvolvimento da doença. O desequilíbrio entre a concentração de IL17 e de linfócitos T_{reg} bloqueia a atividade destes últimos e ativa a produção de TNF- α . Essa situação levaria a um quadro inflamatório persistente, evidenciando o papel de IL17 na progressão da AR (SCHETT; GRAVALLESE, 2012; AFZALI; LOMBARDI; LORD, 2007).

A imunidade humoral é parte da doença. Linfócitos B possuem diversas funções no desenvolvimento e manutenção da AR, incluindo a ativação de linfócitos T, secreção de citocinas e produção de autoanticorpos (MANDIK-NAYAK, et al., 2008). Pacientes submetidos à terapia com *rituximab* (um depletor de linfócitos B que expresse a molécula de superfície CD20) apresentam aparentes benefícios clínicos. Os processos patogênicos sobre os quais o medicamento atua não são conhecidos, mas a melhora observada nos pacientes após o tratamento destaca a importância da imunidade humoral na AR (ANDERSSON; LI; BRENNAN, 2008; MANDIK-NAYAK, et. al., 2008; EDWARDS et al., 2004).

Apesar de todos os avanços obtidos no tratamento da doença os fatores que desencadeiam a perda de tolerância e direcionam o processo inflamatório para as articulações não estão esclarecidos (McINNES; SCHETT, 2011).

1.2.2 Fisiopatologia

A AR acomete inicialmente as articulações sinoviais. A articulação é a região de contato entre dois ossos, entre cartilagem e osso ou entre dentes e ossos. As articulações sinoviais são caracterizadas pela presença da cavidade articular, um espaço localizado entre os ossos articulares (Figura 1).

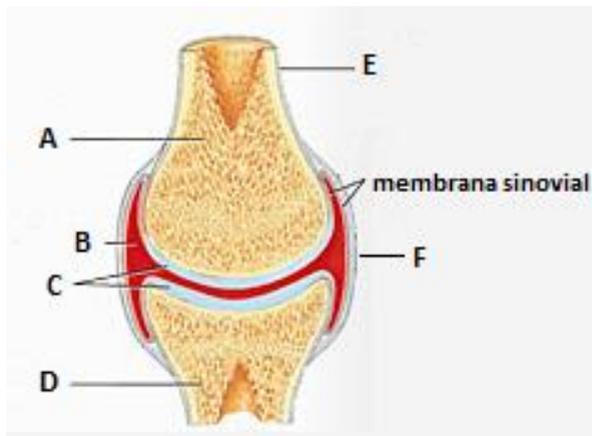


Figura 1: Estrutura de uma articulação sinovial típica. Em A: osso articulante. B: cavidade articular preenchida pela sinóvia (ou líquido sinovial). C: cartilagem articular. D: osso articulante. E: periósteo. F: cápsula articular, composta pela membrana sinovial e cartilagem articular. Fonte: Adaptado de Tortora, 6ª Ed, 2008.

O processo inflamatório observado na AR afeta primariamente a membrana sinovial e, uma vez estabelecido, permite que mecanismos de amplificação da resposta imune- como secreção de citocinas por linfócitos T auxiliares - contribuam para manutenção da sinovite (inflamação da sinóvia; STRAND; KIMBERLY; ISAACS, 2007).

A inflamação persistente promove alterações na estrutura da membrana sinovial. Enquanto que na articulação normal a membrana sinovial possui uma única camada de células, na AR essa membrana apresenta várias camadas celulares. Na interface entre a cartilagem e o osso verifica-se intensa atividade do tecido sinovial, que se torna bastante invasivo e passa a ser chamado “*pannus*” (CULSHAW; McInnes; LIEW, 2011; TAYLOR; MEHTA; TULL, 2009). Ocorre

ainda intensa angiogênese e infiltração por diversos subtipos de leucócitos (Figura 2).

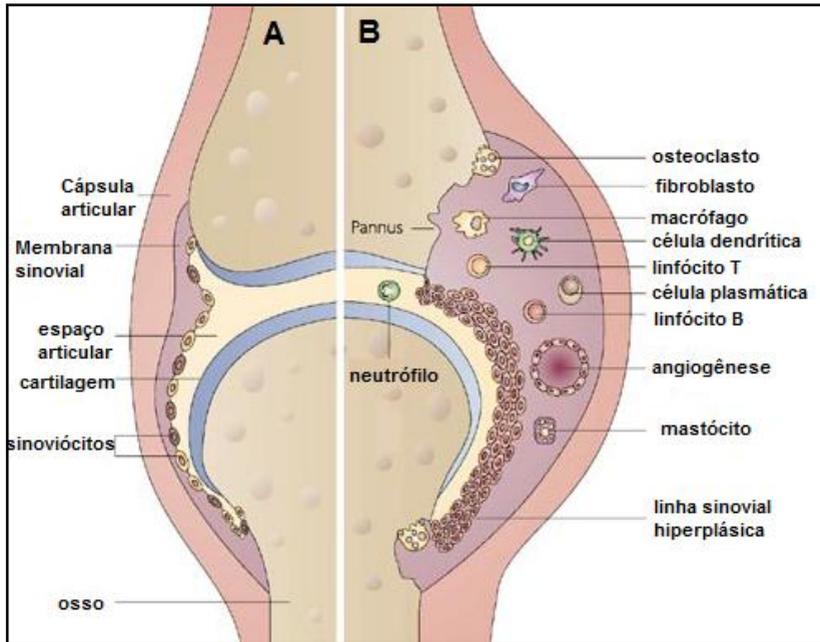


Figura 2: Características da inflamação articular na AR (A) Articulação normal. (B) Na AR. A membrana sinovial torna-se hiperplásica e infiltrada por células inflamatórias. Adaptado de: STRAND; KIMBERLY; ISAACS, 2007.

Em alguns pacientes a membrana sinovial adquire características de um órgão linfoide secundário, com formação de centros germinativos responsáveis pela maturação de afinidade, mudança de classe e formação de células plasmáticas e linfócitos B de memória (KORB-PAP et al., 2012).

Depois de repetidos ataques inflamatórios pode haver deposição de fibrina e substituição da cartilagem por tecido fibroso, o que leva à fusão articular (anquilose, BENJAMINI et al., 2002).

Além do processo inflamatório que ocorre nas articulações, diversos outros órgãos podem ser acometidos, como pulmão, coração e olhos. Manifestações extra-articulares são verificadas em até 40% dos pacientes e estão associadas a uma doença mais severa (MYASOEDOVA et al., 2011; PRETE et al., 2011; TURESSON et al., 2007). Dentre as manifestações extra-articulares mais comuns destaca-

se a presença dos nódulos reumatoides, que estão presentes em cerca de 30% dos pacientes e são associados com pior prognóstico e Síndrome de Sjögren, que se manifesta por secura nos olhos e na boca (PRETE et al., 2011; JEFFERY, 2010).

1.2.3 Critérios de Diagnóstico

Em 1987, o *American College of Rheumatology* (ACR) definiu os critérios para o diagnóstico da AR. Entretanto, havia dificuldade em diferenciar a AR de outras doenças reumatológicas e em diagnosticar a doença nos estágios iniciais. Para contornar essas limitações, novos critérios foram estabelecidos pelo ACR em 2010 (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios de Classificação da Artrite Reumatoide segundo ACR 2010

Critério	Pontuação*
Articulações[§]	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (grandes articulações excluídas)	2
4-10 pequenas articulações (grandes articulações excluídas)	3
>10 articulações (pelo menos 1 pequena articulação)	5
Sorologia	
FR e anti-CCP negativos	0
Baixo valor de FR ou de anti-CCP (≤ 3 vezes acima do limite normal)	2
Alto valor de FR ou de anti-CCP (> 3 vezes acima do limite normal)	3
Duração dos Sintomas	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1
Reagentes de Fase Aguda	
Níveis normais de proteína C-reativa e coeficiente de hemossedimentação	0
Níveis anormais de proteína de C-reativa e coeficiente de hemossedimentação	1

Adaptado de: ALETAHA et al., 2010.

* uma pontuação ≥ 6 indica diagnóstico de AR

§ definição de pequenas articulações: metacarpofalangeal, interfalangeal proximal, 2º ao 5º metatarsofalangeal e articulações interproximais do polegar e pulsos. Definição de grandes articulações: ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos.

O diagnóstico da AR é clínico e combina o histórico de dor e rigidez articular do paciente, o exame físico da sinovite e as medidas laboratoriais, que incluem: (1) radiografias; (2) marcadores de atividade inflamatória: velocidade de hemossedimentação (VHS) e medida da proteína C-reativa (CRP) e (3) dosagem dos níveis de autoanticorpos: fator reumatoide (FR) e *anti-citrullinated peptide/protein antibodies* (ACPAs; (FARHEEN; AGARWAL, 2011).

Testes laboratoriais como VHS e quantificação dos níveis de CRP são utilizados no monitoramento da resposta ao tratamento medicamentoso e na avaliação da atividade da doença através de sua inclusão no cálculo do *Disease Activity Score in 28 joints* (DAS28). A VHS é uma medida indireta da elevação na concentração de proteínas plasmáticas de fase aguda. A CRP é uma das proteínas de fase aguda

que se encontram aumentadas durante a inflamação (FARHEEN; AGARWAL, 2011).

Os pacientes com AR são classificados de acordo com a positividade ao exame de FR e *anti-cyclic citrullinated peptide antibody* (anti-CCP). Essa classificação é importante, pois auxilia na determinação do prognóstico de cada grupo. Manifestações clínicas e a influência dos fatores genéticos e ambientais também variam entre estes grupos (PADYUKOV et al., 2011; KLARESKOG; CATRINA; PAGET, 2009).

O FR é um autoanticorpo (IgM, IgG ou IgA) dirigido contra a porção Fc de IgG, encontrado em cerca de 80% dos pacientes com AR. No entanto, não é considerado um marcador da AR, uma vez que pode ser verificado em outras doenças e em indivíduos saudáveis (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010; WEGNER et al., 2009).

ACPAs são autoanticorpos dirigidos contra proteínas citrulinadas. A citrulinização ocorre após a síntese proteica e consiste na conversão do aminoácido Arginina em Citrulina. O aminoácido citrulina não é codificado diretamente pelo DNA; ele é introduzido na proteína apenas em situações específicas, como na queratinização epitelial, apoptose e inflamação (FARHEEN; AGARWAL, 2011; VAN VENROOIJ; VAN BEERS; PRUIJN, 2011; PRUIJN; WIJK; VAN VENROOIJ, 2010; WEGNER et al., 2009). Pacientes com AR geralmente apresentam anticorpos contra proteínas contendo citrulina. Esses anticorpos podem ser medidos e utilizados no diagnóstico (especificidade = 95-98%). Podem ainda ser utilizados para prever a doença em pacientes assintomáticos e com artrite indiferenciada, sendo encontrados no soro de pacientes muitos anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos (PRUIJN; WIJK; VAN VENROOIJ, 2010). ACPAs preveem ainda o desenvolvimento de uma doença mais erosiva, com maior presença de manifestações extra-articulares (RUYSSSEN-WITRAND et al., 2012; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

1.2.4 Etiologia e Fatores Ambientais Relacionados

A etiologia da AR é complexa e desconhecida (WEGNER et al., 2009). Na tentativa de identificar os agentes causais da doença diversos modelos de patogênese foram propostos:

- O primeiro sugere que a fumaça do cigarro poderia promover a citrulinização de proteínas em indivíduos que possuem uma constituição genética favorável, desencadeando diversas reações imunes que

culminariam no desenvolvimento da AR (KLARESKOG et al., 2011). O tabagismo dobra o risco de desenvolvimento da doença em indivíduos que utilizam acima de 40 maços por ano. Este risco permanece elevado até 20 anos após a interrupção do uso contínuo de cigarro (TÓBON; YOUINOU; SARAUX, 2010; LIAO; ALFREDSSON; KARLSON, 2009). O tabagismo é associado ainda com a produção de FR e ACPA (TÓBON; YOUINOU; SARAUX, 2010).

- O segundo sugere que a bactéria associada à periodontite, *Porphyromonas gingivalis*, possa estar envolvida na patogênese da AR. *P. gingivalis* é capaz de realizar a citrulinização de proteínas através de uma enzima própria, que apresenta um mecanismo de citrulinização distinto ao das enzimas humanas (RUTGER PERSSON, 2012). Essa distinção poderia resultar em mimetismo molecular, causando autoimunidade (WEGNER et al., 2009).

Muitos estudos analisaram a relação dos fatores epidemiológicos com a AR; no entanto, os resultados obtidos tem sido contraditórios. Isso pode ser devido a fatores como; variabilidade no desenho dos estudos, gerando dados que dificultam a comparação e a necessidade de maior avaliação do papel exercido pelos fatores epidemiológicos em cada grupo de pacientes (ACPA-positivo e ACPA-negativos; LAHIRI, 2012). Dentre os fatores ambientais que têm sido investigados destacam-se:

- Tabagismo: consumo ≥ 40 maços por ano dobra o risco à AR e está associado com o desenvolvimento dos autoanticorpos FR e ACPA (TÓBON; YOUINOU; SARAUX, 2010; LIAO; ALFREDSSON; KARLSON, 2009).

- Nível de escolaridade: um maior nível de escolaridade foi associado à proteção ao desenvolvimento da AR FR-positivo (PEDERSEN et al., 2006).

- Índice de Massa Corpórea (IMC): um IMC ≥ 30 kg/m² foi associado à proteção à AR ACPA-positivo e a um menor dano articular (BAKER et al., 2011; VAN DER HELM-VAN MIL et al., 2008; HERNANDEZ-AVILA et al., 1990).

- Amamentação: verificou-se que amamentar por período superior a 12 meses fornece proteção ao desenvolvimento futuro de AR (PIKWER et al., 2009; OLIVER; SILMAN, 2009).

- Idade da menarca: mulheres com menarca precoce (até 15 anos) estão em menor risco de desenvolver AR (PEDERSEN et al., 2006).

- Contraceptivos orais: o uso de contraceptivos orais não foi associado à AR (LIAO; ALFREDSSON; KARLSON, 2009; PIKWER et al., 2009).
- Terapia de Reposição Hormonal (TRH): não foram encontradas evidências de associação da TRH com a AR (DORAN et al., 2004; MERLINO et al., 2003; HERNANDEZ-AVILA et al., 1990).
- Álcool: o consumo regular de álcool foi associado a menores níveis de CRP e à proteção ao desenvolvimento de AR ACPA-positivo e de danos radiográficos (HOOVESTOL; MIKULS, 2011; PEDERSEN et al., 2006).

1.2.5 Fatores Genéticos de Susceptibilidade

A AR é uma doença multifatorial, resultado de complexas relações entre fatores ambientais e efeitos genéticos (SCOTT et al., 2011).

Estudos com gêmeos permitem que seja estimado o grau de contribuição da genética e dos fatores ambientais a uma determinada doença. A partir de estudos com pares de gêmeos monozigóticos e dizigóticos MacGregor e colaboradores (2000) estimaram que os fatores genéticos contribuem com aproximadamente 60% do risco à AR. Cerca de um terço desse risco genético é atribuído a genes do complexo MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*), também conhecido como HLA (do inglês *Human Leukocyte Antigen*; KURKÓ et al., 2013).

O complexo MHC está localizado no cromossomo 6 (6p 21.3). Compreende uma área de 3,6 Mb, com cerca de 200 genes e que é dividida em três sub-regiões (classes I, II e III). Esta é uma das regiões mais bem estudadas do genoma humano e os antígenos codificados por esses genes possuem grande importância na resposta imune (BOWES; BARTON, 2008).

A maior parte da associação ao MHC é atribuída a variações do gene HLA-DRB1, o qual codifica a cadeia β das moléculas de HLA-DR (RAYCHAUDHURI et al., 2012). As moléculas de HLA-DR são heterodímeros constituídos de uma cadeia alfa (DRA) e uma cadeia beta (DRB) e ficam localizadas na membrana das células apresentadoras de antígeno, onde atuam na apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T (BAX et al., 2011).

Os alelos do gene HLA-DRB1 mais frequentemente associados à AR são *0101, *0401, *0404, *0405, *0408, *0901 e *1001 (ALVAREZ, et al, 2008).

Muitos dos alelos HLA-DRB1 que conferem susceptibilidade à doença codificam um motivo compartilhado de cinco aminoácidos, localizados na região de HLA-DRB1 relacionada à apresentação de antígenos. Essa sequência de aminoácidos, denominada “epítipo compartilhado” (HLA-SE, do inglês HLA-*Shared Epitope*), foi associada à AR em diferentes populações no grupo ACPA-positivo, tendo sido demonstrado que peptídeos citrulinados podem se ligar com maior afinidade a moléculas contendo o epítipo compartilhado (BAX et al., 2011; HILL et al., 2003).

Contudo, a associação ao HLA por si só não explica a contribuição genética à AR. No intuito de identificar essa hereditariedade não esclarecida diversos estudos foram realizados e como resultado mais de 35 *loci* genéticos não-HLA de susceptibilidade para a doença foram identificados (Figura 3; GREGERSEN, 2010).

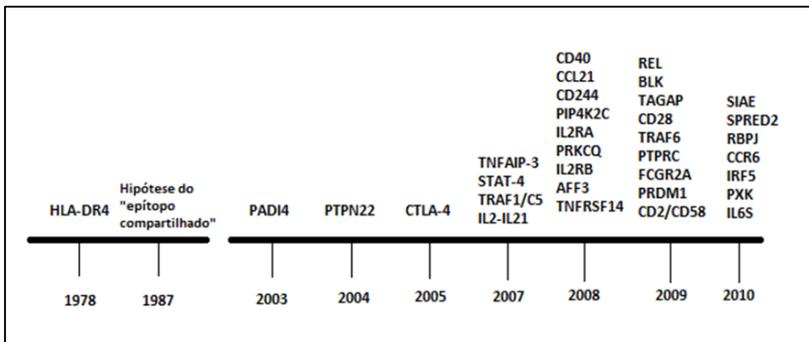


Figura 3: Genes de susceptibilidade para AR. Adaptado de GREGERSEN, 2010.

A contribuição genética à doença varia entre os pacientes com AR, anti-CCP-positivos e anti-CCP-negativos. Todo o efeito observado acima é válido para pacientes anti-CCP - positivos. Para os pacientes anti-CCP - negativos a força da contribuição genética é menor, variando em torno de 30-50% (de VRIES, 2011). Alguns genes foram associados principalmente a pacientes anti-CCP-positivos, porém não associados ao grupo anti-CCP-negativo: *PTPN22*, *TRAF1-C5*, *CTLA-4*, além do HLA-SE (VAN DER HELM-VAN MIL; TOES; HUIZINGA, 2010).

Pouco tem sido realizado no intuito de identificar a base genética de predisposição à AR no grupo anti-CCP-negativo (SCOTT et al., 2011). Até o presente, apenas um estudo GWAS (do inglês *Genome-Wide Association Studies*) investigando essa possível diferenciação foi publicado. Entre os *loci* sugeridos como associados ao grupo anti-CCP-negativo estão: *RPS12P4*, *IGFBP1*, *IRF5* (PADYUKOV et al., 2011).

1.2.5.1 Gene *PTPN22* e SNP C1858T

O gene *PTPN22* está localizado no cromossomo 1p13.3-13.1 (Figura 4) e codifica a proteína tirosina fosfatase (PTP) conhecida como *lymphoid tyrosine phosphatase* (Lyp). Lyp é uma proteína localizada principalmente no citoplasma e consiste de um domínio N-terminal fosfatase e uma longa região C-terminal, que contém diversos motivos ricos em prolina (P1-P4, COHEN et al. 1999). Lyp existe em três formas (geradas por processamento alternativo) denominadas Lyp1-3, sendo Lyp1 a mais abundante e bem estudada das 3 isoformas (WANG et al., 2010).



Figura 4: Representação da região do cromossomo 1 no braço p (linha contínua) onde está localizado o gene *PTPN22* (posição da seta vermelha) e genes próximos (posições das setas mais claras). Fonte: NCBI, 2013.

A proteína Lyp é expressa exclusivamente em células hematopoiéticas e exerce importante função na manutenção da homeostasia imune. Essa enzima é um potente modulador da sinalização em linfócitos T e B (RHEE; VEILLETTE, 2012; BURN et al., 2011; VANG, et. al, 2008).

Lyp regula negativamente a cinase Lck. Lck atua adicionando fosfato aos resíduos de tirosina contidos nos motivos de ativação de *imuno receptores tyrosine-based activation motif* (ITAMs) das proteínas associadas ao TCR. A fosforilação das tirosinas desses ITAMs dá início à transdução de sinal que culmina com a ativação dos linfócitos T (BURN et al., 2011).

Lck é um membro da família de proteínas tirosinas cinases (PTKs) citoplasmáticas- Src. Todos os membros da família Src possuem como característica quatro domínios SH (SH1-SH4). As proteínas do

tipo Src são fosforiladas por outra família de PTKs, cujo membro mais conhecido é a c-Src-cinase1 (Csk-1; BURN et al., 2011).

Csk é um potente supressor da ativação dos linfócitos T. Essa proteína adiciona fosfato às PTKs da família Src (como Lck). Isso desativa parcialmente a proteína Lck, que fica então impossibilitada de desencadear a transdução de sinal que leva à ativação dos linfócitos T (BURN et al., 2011).

A proteína codificada pelo gene *PTPN22* (Lyp) atua em conjunto com Csk, formando um complexo com essa proteína. O complexo Lyp/Csk inibe a sinalização do TCR (Figura 5). Essa interação entre Lyp e Csk ocorre justamente na região de Lyp onde está localizado o polimorfismo C1858T (RIECK et al., 2007).

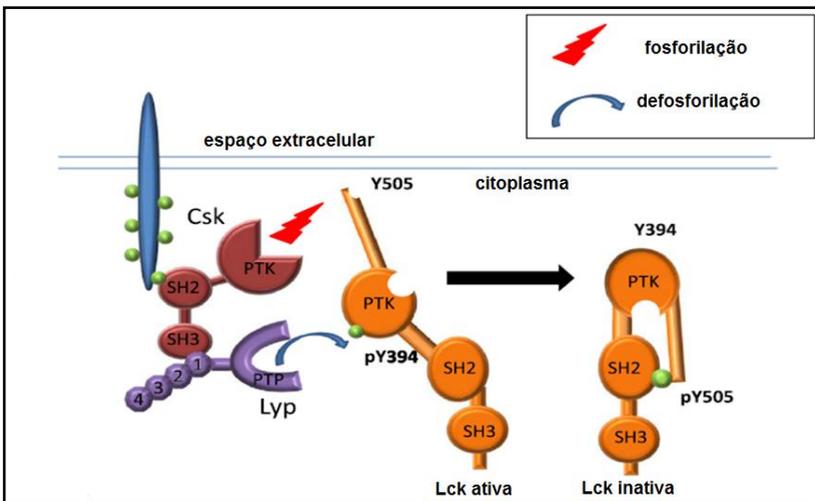


Figura 5: Inibição da ativação do TCR pelo Complexo Lyp/Csk. Lyp (em roxo) e Csk (em vinho) inativam Lck (em laranja). A interação Lyp/Csk é mediada através do primeiro domínio proliprolina (P1) em Lyp e o domínio SH3 de Csk. Csk fosforila Lck na posição Y505 criando um sítio de ligação para SH2, o que resulta em uma dobra interna e na desativação parcial de Lck. Para que Lck seja completamente inativada Lyp deve desfosforilar o resíduo ativatório Y394 no domínio para cinase de Lck. Fonte: Adaptado de BURN et al., 2011.

Numerosos *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) são descritos no gene *PTPN22*. Alguns deles são indicados na Figura 6. Destes, o SNP C1858T (rs2476601) é o mais associado à AR (PRADHAN; BORSE; GHOSH, 2010).

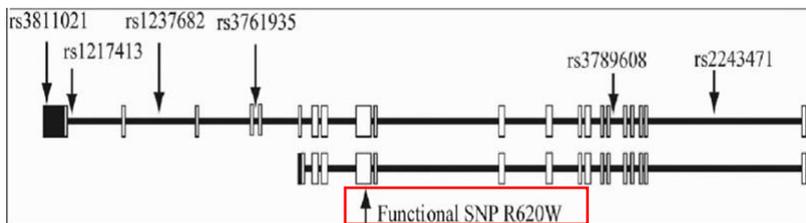


Figura 6: Estrutura de duas isoformas transcritas do gene *PTPN22* com indicação de sete posições de SNPs (indicadas pelas setas) localizadas em éxons (barras verticais) e íntrons (linhas horizontais). As duas isoformas dependem do tipo de processamento que o RNAm imaturo sofre. Destaque para o SNP (rs2476601), indicado como R620W. Adaptado de: PRADHAN; BORSE; GHOSH, 2010.

O SNP C1858T (rs2476601) do gene regulador da resposta imune - *PTPN22* (do inglês *protein tyrosine phosphatase non-receptor 22*) - é o *locus* não-HLA de maior influência na susceptibilidade à AR (KURKÓ et al., 2013).

A transição de uma citosina para uma timina na posição nucleotídica 1858 (C1858T) da região codificadora do gene *PTPN22* resulta na substituição de um aminoácido Arginina (R/CGG) para um aminoácido Triptofano (W/TGG) no códon 620 (R620W) do éxon 14 (BOTTINI et al., 2004). O SNP C1858T (rs2476601) tem sido associado a diversas doenças autoimunes que possuem como característica a produção de autoanticorpos, tais como: artrite reumatoide, diabetes tipo I, lúpus eritematoso sistêmico, *miastenia gravis* e doença autoimune da tireoide, sugerindo que este polimorfismo esteja envolvido em mecanismos de regulação compartilhados por diversas condições autoimunes (BEHRENS, 2011).

Estudos de associação genética têm confirmado a associação do SNP C1858T à AR em diversas populações. No entanto, a frequência do alelo de risco 1858T varia conforme o grupo populacional, 0- 0,117 (dbSNP; disponível em <://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Nas populações europeias observa-se um gradiente geográfico de frequência, com a frequência do alelo variante 1858T diminuindo do Norte para o Sul da Europa. Em populações africanas e asiáticas a frequência do alelo variante é irrisória (GREGERSEN et al., 2006). Até o presente, a determinação das frequências alélicas do SNP C1858T no grupo com artrite reumatoide e a análise da possível associação deste polimorfismo à doença não foram realizados na população brasileira.

O SNP C1858T apresenta um acentuado efeito de dose. A homoziguidade para o alelo de risco (1858T) aumenta dramaticamente a susceptibilidade à AR FR positivo. Os indivíduos que possuem o genótipo TT possuem um risco cerca de três vezes maior de desenvolver AR FR-positivo em comparação àqueles com genótipo CT (LEE et al., 2005).

Dez haplótipos comuns (frequência $\geq 1\%$) listados na Figura 7 foram identificados por Carlton et al (2005) através da genotipagem de 37 SNPs localizados na região do gene *PTPN22*. O haplótipo 2 foi fortemente associado à AR e é o único que possui o alelo 1858T (Figura 7). A importância do alelo 1858T é reforçada pelo fato de não haver uma associação do *PTPN22* nas populações asiáticas, as quais raramente carregam a variante 1858T (GREGERSEN; OLSSON, 2009).

Figura 7: Haplótipos preditos do gene *PTPN22* e associação com AR. Adaptado de Carlton et al., 2005.

		SNP																																				
HAPLOTYPE	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
1	C	A	A	G	C	T	G	G	T	C	G	A	G	G	T	T	G	C	A	A	A	C	G	A	T	G	T	T	T	A	G	C	C	T	C	T	A	
2	C	A	A	G	C	T	G	G	T	C	G	A	G	G	T	T	G	C	A	A	A	C	G	A	T	G	T	T	T	A	G	C	C	T	C	T	A	
3	C	A	A	G	C	T	G	G	T	C	G	A	G	G	T	T	G	C	A	A	A	C	G	A	T	G	T	T	T	A	G	C	C	T	C	T	A	
4	C	A	A	G	C	T	G	G	T	C	G	A	G	A	C	T	G	C	A	A	A	C	G	A	T	G	T	T	T	A	G	C	C	T	C	T	A	
5	C	A	A	G	C	C	G	A	T	C	A	A	G	G	C	G	A	A	A	A	C	G	C	G	A	C	A	C	T	C	G	A	T	C	T	C	A	
6	T	A	G	C	C	G	T	T	A	G	G	G	G	C	G	G	C	A	A	A	A	C	G	A	C	A	C	T	C	G	A	T	T	T	C	A		
7	T	A	G	C	C	G	T	T	A	G	G	G	C	G	G	G	C	A	A	A	A	C	G	A	C	A	C	T	C	G	A	T	T	T	C	A		
8	T	A	G	C	C	G	T	T	A	G	G	G	C	G	G	C	A	A	A	A	C	G	A	C	A	C	T	C	G	A	T	T	T	C	A			
9	T	A	G	C	C	G	T	T	A	G	A	G	C	G	G	C	A	A	A	A	C	G	A	C	A	C	T	C	G	A	T	T	T	C	A			
10	T	A	G	C	G	T	T	A	G	G	G	C	G	G	C	A	A	A	A	C	G	A	C	A	C	T	C	G	A	T	T	T	C	A				

Nota: em destaque o SNP 22 (C1858T). Percebe-se que apenas o haplótipo 2 apresenta a variante de risco (1858T).

O significado biológico da proteína variante (620W) é incerto (RHEE; VEILLETTE, 2012). A maioria dos estudos com células humanas aponta que proteínas contendo a variante 620W ocasionam uma menor indução das respostas por linfócitos T. Estudos com linfócitos B humanos indicam que indivíduos com a variação 620W possuem mais linfócitos autoreativos que aqueles que não apresentam a variação (RIECK et al., 2007). Esses resultados sugerem que 620W representa uma variante de ganho de função. Assim, quando 620W está presente ocorre uma maior inibição da sinalização do TCR e BCR. Esse aumento no limiar de sinalização pode então interferir no processo de seleção negativa, ao permitir o escape de linfócitos autorreativos do timo e afetar o funcionamento das células T regulatórias (VANG et al., 2005).

Em compensação, experimentos realizados com camundongos *knock-in* e *knock-out* mostraram que a presença da variante promove menor expressão da proteína Lyp e menor ligação à Csk em comparação com a proteína selvagem. Esses resultados suportam que no modelo murino a variante 619W (correspondente da variante 620W) represente uma variante de perda de função. A perda de função da proteína 620W faz com que a sinalização do TCR não seja suficientemente inibida, gerando a hiperativação dos linfócitos T (ZHANG et al., 2011; ZIKHERMAN et al., 2009; HASEGAWA et al., 2004).

1.3 ANÁLISE MOLECULAR DO SNP *PTPN22* C1858T

Metodologias para genotipagem de pequenas variações genéticas, como o SNP C1858T, podem ser divididas em dois grupos:

- Métodos de tubo aberto: requer que os produtos sejam inicialmente preparados e então utilizados como moldes em uma segunda reação, tal como ocorre na técnica de PCR-RFLP.
- Métodos de tubo fechado: os componentes da reação são inseridos em um sistema que não requer manipulação adicional dos produtos da reação de PCR, como ocorre na técnica de PCR em Tempo Real. Esses métodos geralmente empregam fluorescência e oferecem muitas vantagens em relação aos métodos de tubo aberto (GIBSON, 2006).

1.3.1 PCR em Tempo Real e *High Resolution Melting*

A técnica de PCR em Tempo Real é uma adaptação do método revolucionário de PCR desenvolvido por Kary Mullis, que permite a amplificação exponencial de fragmentos específicos de DNA (VALASEK; REPA, 2005).

Na PCR em Tempo Real a quantidade de produto formado é monitorada ao longo do tempo através da variação observada na fluorescência. Fluoróforos são adicionados à reação e se ligam ao fragmento amplificado, gerando um sinal de fluorescência que reflete a quantidade de produto formado (KUBISTA et al., 2006).

Muitas estratégias estão disponíveis, como a utilização de sondas ou a detecção não-específica por corantes de DNA. Este corante deve ser estável sob as condições da PCR e não inibir a reação de amplificação. Corantes de DNA são fluoróforos que, ao se intercalarem

ao DNA dupla-fita (dsDNA) formado, promovem um aumento na fluorescência emitida (GIBSON, 2006).

O método de PCR em Tempo Real permite ainda que a temperatura na qual o produto se dissocia – Temperatura de *melting* (T_m) - seja utilizada para detecção de variações na sequência. Essa propriedade possibilitou o desenvolvimento da análise molecular por HRM (*High Resolution Melting*).

Dentre os métodos disponíveis para rastreamento de mutações a técnica de HRM é a que possui o melhor custo-benefício. A habilidade da técnica em detectar mutações a um baixo custo tem implicações para estudos de rastreamento de populações em larga escala, contribuindo para o entendimento da prevalência de mutações conhecidas e a descoberta de novas mutações (TAKANO et al., 2008).

A técnica de HRM não requer processamento pós-PCR, diminuindo a possibilidade de contaminação e o tempo requerido para conclusão do experimento. A técnica pode ser utilizada para genotipagem de SNPs, pequenas deleções e inserções, análises de identidade de sequências (*sequence matching*) e rastreamento de novas mutações (REED; KENT; WITTWER). Além disso, por se tratar de um método não-destrutivo, o produto de PCR pode ser prontamente utilizado para o sequenciamento das amostras, se necessário (REED; WITTWER, 2004).

O HRM é uma técnica cuja análise é baseada nas diferenças termodinâmicas apresentadas pelos fragmentos de DNA quando este é desnaturado. O *melting* ou desnaturação ocorre quando o DNA de dupla-fita se dissocia em DNA simples-fita (REED; KENT; WITTWER, 2007).

Um fluoróforo capaz de se intercalar ao DNA de dupla-fita é adicionado antes da reação de PCR, permitindo que a fluorescência emitida por essa ligação seja monitorada ao longo do tempo (Figura 8).

A análise por HRM é baseada nas diferenças observadas entre os valores de T_m e de formato da curva de dissociação das amostras (Figura 9). Amostras homocigotas são identificadas pela mudança na T_m, enquanto que os heterocigotos são identificados de acordo com o formato da curva de dissociação (WITTWER et al., 2003). Para qualquer amostra heterocigota, a curva de dissociação resultante é uma combinação de dois *homoduplex* e dois *heteroduplex*, que são formados quando as amostras são resfriadas (HERRMANN et al., 2007).

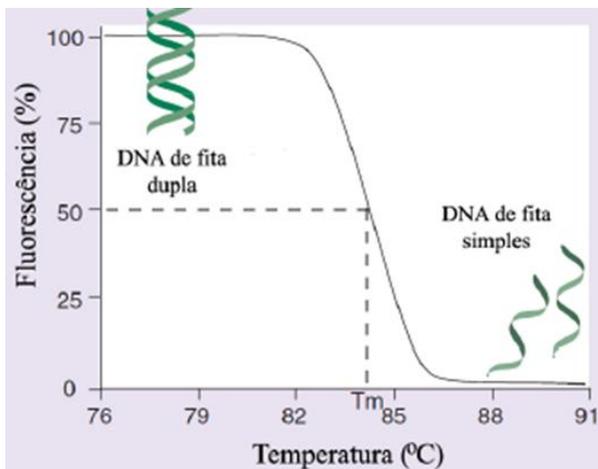


Figura 8: Curva de dissociação do DNA. A fluorescência emitida pela dissociação do DNA permite que seja gerada uma curva de dissociação. A taxa de fluorescência diminui à medida que a temperatura aumenta e o DNA se dissocia em fita simples. A temperatura de dissociação (T_m) é convencionalmente definida como a temperatura em que 50% do DNA está no formato de fita simples. Adaptado de REED; KENT; WITTEWER, 2007.

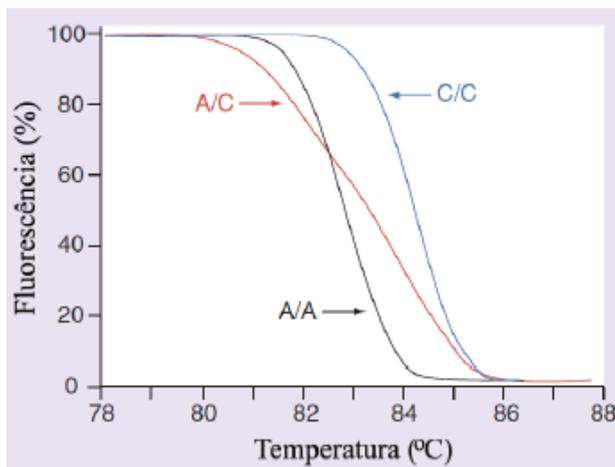


Figura 9: Genotipagem por HRM. Três genótipos diferentes podem ser observados através da análise da curva de dissociação. As amostras homozigotas, representadas em preto (A/A) e em azul (C/C) podem ser diferenciadas com base em suas T_m e a amostra heterozigota (A/C) representada em vermelho pode ser identificada pela diferença no formato da curva de dissociação. Adaptado de REED; KENT; WITTEWER, 2007.

O perfil de dissociação de um produto de PCR depende do seu conteúdo em CG, comprimento do fragmento, sequência de nucleotídeos e heterozigosidade. A posição da variante no produto de PCR não interfere na acurácia do método (REED; KENT; WITTEWER, 2007). Enquanto que uma substituição de G ou C para A ou T reduz a T_m , uma substituição de A ou T para C ou G aumenta a T_m . As variações de único nucleotídeo no genoma humano podem ser classificadas em diferentes classes, que apresentam diferenças na T_m (Tabela 2, LIEW et al., 2004).

Tabela 2: Ocorrência e T_m dos SNPs no genoma humano (adaptado de *Applied Biosystems*, 2009).

Classe de SNP	Mudança de base	Mudança típica da T_m	Ocorrência no genoma humano
1	C/T e G/A	grande (em torno de 1°C)	64%
2	C/A e G/T	grande (em torno de 1°C)	20%
3	C/G	pequena (0,2 - 0,5°C)	9%
4	A/T	pequena (0,2 - 0,5°C)	7%

As diferenças entre os genótipos são maiores para fragmentos de pequeno tamanho (80-100pb). Isso ocorre porque estes se dissociam em uma única transição de dissociação, enquanto que produtos maiores (100-800pb) apresentam múltiplos domínios de dissociação. No entanto, não existe um limite do tamanho de fragmento a ser genotipado, uma vez que a dissociação de um domínio pode ser independente da dissociação dos demais, permitindo que um domínio invariante seja utilizado como controle interno para o ajuste do aparelho e genotipagem de fragmentos maiores (REED; KENT; WITTEWER, 2007; WITTEWER et al., 2003).

1.3.2 PCR-RFLP

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*) e posterior método de identificação do polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos gerados com o uso de

enzima de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polimorphism*) (PCR-RFLP) é um método clássico que se baseia na clivagem do DNA por endonucleases. Um ensaio de PCR-RFLP pode ser desenhado de modo que a presença do polimorfismo altere o sítio de restrição para a enzima, permitindo a geração de fragmentos de tamanhos diferentes. A detecção dos diferentes genótipos é então realizada através da visualização do comprimento dos fragmentos gerados em suporte de gel. Esse processo, apesar de altamente sensível e específico, demanda tempo e está relativamente propenso a erros e contaminação (PAIVA-CAVALCANTI; SILVA; GOMES, 2010; ZHANG et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A AR é uma doença degenerativa; assim, quanto antes é realizado o diagnóstico e iniciado o tratamento, menores são os danos causados ao paciente. O processo de destruição articular é responsável pelo afastamento do mercado de trabalho de pessoas em idade economicamente ativa, gerando significativos impactos econômicos e sociais. Em torno de 37% dos pacientes tornam-se inativos dois anos após o diagnóstico da AR (FERRAZ; VIEIRA, 2009; EBERHARDT; LARSSON; NIVED, 1993).

O diagnóstico precoce é essencial para evitar a destruição articular e permite que o curso da doença seja alterado durante a fase de janela terapêutica (DA MOTA et al., 2012). No entanto, existe uma grande dificuldade nesta identificação devido à heterogeneidade de sintomas, que, além de variáveis, podem ser comuns a outras doenças. Em média, os pacientes são diagnosticados dois anos após o início dos sintomas clínicos (ROBINSON; TAYLOR, 2011; CHAN et al., 1994).

Marcadores genéticos de susceptibilidade podem auxiliar em um diagnóstico rápido e preciso. O diagnóstico molecular de doenças tem sido cada vez mais utilizado na prática médica, porém alguns dos exames possuem um valor elevado, dificultando o acesso a essas tecnologias. Dentre as técnicas de biologia molecular disponíveis, a Análise por *High Resolution Melting* (HRM) se apresenta como uma das alternativas mais versáteis e de melhor custo benefício para uso em laboratórios de diagnóstico molecular.

A utilização do SNP C1858T do gene regulador da resposta imune - *PTPN22* – como possível marcador da doença tem sido investigada em diversas populações e até o momento esta associação não foi avaliada na população brasileira com AR.

Considerando o envolvimento do *PTPN22* C1858T na regulação da resposta imune e sua associação com a AR em diversas populações torna-se de grande importância a implementação de um método molecular de identificação desse polimorfismo de fácil implementação e bom custo benefício como o HRM.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo padronizar a técnica de *High Resolution Melting* para genotipagem do polimorfismo C1858T (rs2476601) do gene *PTPN22* e investigar sua associação com a Artrite Reumatoide através de um estudo caso-controle em uma amostra de pacientes do estado de Santa Catarina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de *High Resolution Melting* para genotipagem do polimorfismo C1858T;
- Verificar a existência de associação entre os genótipos e o risco de desenvolvimento de AR;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo C1858T no grupo de pacientes e de controles;
- Investigar a relação de fatores ambientais com o risco de desenvolvimento de Artrite Reumatoide;
- Investigar a relação entre os genótipos e dados sorológicos com a severidade da doença;
- Atualizar o banco de dados existente no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) com informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes com Artrite Reumatoide.

4. METODOLOGIA

4.1 COLETA DOS DADOS E COMPOSIÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL

O trabalho desenvolvido faz parte de um projeto maior em vigência no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) intitulado “Genética da Autoimunidade: Polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, submetido sob inscrição 172/06 ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), sendo aceito em 26/06/2006 e prorrogado até 2013.

A coleta do material biológico foi realizada no Hospital Universitário (HU), vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os participantes foram esclarecidos a respeito da pesquisa realizada (Anexos A e D) e da manutenção do sigilo de suas informações pessoais e assinaram um termo de consentimento (Anexos B e E) antes do preenchimento dos questionários e da coleta do seu material biológico.

Cada participante respondeu a um questionário, de onde foram obtidos os dados familiares e epidemiológicos (Anexos C e F) e doou uma amostra de material biológico que consistiu de 10 ml de sangue periférico, mantido em tubo Vacutainer® com anticoagulante EDTA. Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir do prontuário médico.

O grupo de pacientes foi composto por 100 indivíduos, que foram diagnosticados com Artrite Reumatoide e encaminhados pela equipe de Reumatologia do HU-UFSC.

O grupo controle foi constituído por 100 indivíduos não portadores de qualquer doença autoimune, selecionados através de projeto desenvolvido paralelamente pela equipe do LAPOGE. A inclusão de indivíduos com autoimunidade poderia interferir nas análises, uma vez que diversos *loci* de predisposição à autoimunidade são compartilhados por diferentes doenças autoimunes.

No presente estudo, a cor da pele foi utilizada em conjunto com gênero e idade como um dos critérios de classificação entre as amostras de casos e controles. Ainda que o critério cor da pele tenha se mostrado inadequado em representar a heterogeneidade da população brasileira, o resultado do estudo realizado por Pena et al. (2011) está de acordo com

os dados do IBGE ao demonstrar que a contribuição europeia predomina na população do estado de Santa Catarina.

Os indivíduos foram inicialmente pareados por idade, sexo e cor da pele. À medida que foram sendo realizadas as genotipagens muitas amostras foram perdidas e o pareamento entre estas foi prejudicado. Testes de homogeneidade foram realizados como forma de confirmar se as amostras de casos e controles continuavam homogêneas com relação aos critérios de pareamento estabelecidos.

4.2 PROCESSAMENTO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após coleta o material foi encaminhado ao LAPOGE, onde foi centrifugado durante 20min a 3000 rotações por minuto (rpm) para separação de seus constituintes em centrífuga *Excelsa II* modelo206BL. Os constituintes das amostras foram armazenados a -20°C .

A extração do DNA genômico foi realizada a partir da camada de leucócitos pela técnica de *Salting-out*, adaptada de Miller et al. (1988).

Uma alíquota do DNA extraído foi quantificada em espectrofotômetro a partir da leitura de absorbância a 260nm (medida da concentração de DNA) e 280nm (medida da concentração de proteína, GERALD, 2005; SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Após quantificação, as amostras foram catalogadas e incluídas no banco de DNA existente no LAPOGE. As amostras foram diluídas a concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$, padrão do laboratório.

4.3 AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DO SNP *PTPN22* C1858T

4.3.1 Genotipagem por HRM

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na genotipagem por HRM foram desenhados para amplificar uma pequena região em torno do SNP, utilizando o programa *Primer Express*® 3.0 Software (ROZEN; SKALETSKY, 2000). O fragmento desenhado foi de 81pb (Tabela 3).

A sequência FASTA utilizada para o desenho dos *primers* foi obtida na página do dbSNP (disponível em: < ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). A especificidade do conjunto de *primers* desenhado foi verificada

através da ferramenta *PRIMER BLAST* (disponível em: <nbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e a previsão da temperatura de *melting* das curvas de dissociação foi obtida através do aplicativo uMelt (disponível em: <dna.utah.edu/>). A amplificação foi realizada no Sistema StepOne™ Real-Time PCR utilizando o Melt Doctor™ HRM Master Mix (*Life Technologies*).

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados para a genotipagem por HRM do SNP C1858T (rs2476601) do gene *PTPN22*

Gene	Sequência dos iniciadores	Temperatura de Dissociação (T _m)
<i>PTPN22</i> (rs2476601)	F5'CCAGCTTCCTCAACCACAATAAA3'	59°C
	R5'TGCTCCAAGGATAGATGATGAAATC3'	59°C

* F: *forward primer*; R: *reverse primer*.

Os protocolos utilizados para identificação do SNP se basearam inicialmente nas indicações do fabricante:

- Mix de PCR: 1,2 µl (3 mM) de cada *primer*, 10,0 µl de *Melt Doctor*™ HRM Master Mix, 6,6 µl de água ultra-pura e 1,0 µl de DNA molde (20ng/µl) em um volume final de 20,0 µl;

- Programa de PCR: pré-desnaturação de 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C (desnaturação), 10 segundos a 56 °C (anelamento) e 4 segundos a 72 °C (extensão).

- Dados de HRM: obtidos por variação da temperatura de 40 a 95°C a uma taxa de 25 aquisições a cada 1°C.

Foi realizada a padronização do ensaio de HRM, sendo obtido ao final do processo o seguinte protocolo de genotipagem:

- Mix de PCR: 2,0 µl (5 mM) de cada *primer*, 10,0 µl de *Melt Doctor*™ HRM Master Mix, 4,0 µl de água ultra-pura e 2,0 µl de DNA molde (20ng/µl) em um volume final de 20,0 µl;

- Programa de PCR: pré-desnaturação de 10 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 10 segundos a 95 °C (desnaturação), 10 segundos a 56 °C (anelamento) e 4 segundos a 72 °C (extensão).

- Dados de HRM: obtidos por variação da temperatura de 40 a 95°C a uma taxa de 25 aquisições a cada 1°C.

A análise dos dados de HRM foi realizada através do *Software High Resolution Melt Software v 3.0.1*. Todas as análises realizadas por HRM utilizaram amostras controle, representando cada um dos genótipos: CC, CT e TT. As curvas geradas por essas amostras controle foram utilizadas pelo *software* para estabelecer um padrão de curva para cada genótipo.

A genotipagem das amostras foi realizada através do Gráfico de Curvas de Dissociação Alinhadas. O Gráfico de Diferenças permite uma maior diferenciação entre as curvas de cada genótipo. Neste formato de gráfico, um dos genótipos é estabelecido como referência e as curvas dos demais genótipos são construídas através de comparação.

Todas as amostras foram genotipadas em duplicata, de modo a permitir uma melhor definição da variação observada em cada agrupamento.

Os resultados das análises por HRM foram considerados válidos somente quando todos os parâmetros indicados a seguir fossem satisfeitos:

- As duplicatas amplificassem na PCR;
- As duplicatas não apresentassem desvios maiores que 0,05 entre si;
- Os genótipos atribuídos pelo *software* às duplicatas fossem concordantes;
- As duplicatas apresentassem um mesmo padrão de curvas.

4.3.2 Genotipagem por PCR-RFLP

A técnica de PCR-RFLP foi utilizada para confirmação dos resultados de HRM. Trinta e sete das duzentas amostras (18,5%) que compõem o grupo amostral foram selecionadas aleatoriamente e genotipadas por PCR-RFLP. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR amplificam um fragmento de 326 pb (pares de base) e são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR-RFLP para genotipagem do SNP (rs2476601) do gene *PTPN22*.

Gene	Sequência dos iniciadores	Sequência de Clivagem <i>RsaI</i>
<i>PTPN22</i> (rs2476601)	F 5' TGCCATCCCACACTTAT 3' R 5' ACCTCCTGGGTTTGTACCTTA 3'	5' - GT▼AC- 3' 3' - CA▲TG- 5'

* F: *forward primer*; R: *reverse primer*. Fonte: WAGENLEITER et al., 2005.

O protocolo utilizado na PCR está descrito na Tabela 5 e o Programa de Ciclagem na Tabela 6.

Tabela 5: Reagentes utilizados na PCR-RFLP do SNP C1858T. Adaptado de: WAGENLEITER et al., 2005.

Protocolo para PCR	Volume para 1 amostra
<i>Primer F</i> (15pmol/μl)	0,1μl
<i>Primer R</i> (15pmol/μl)	0,1μl
Tampão PCR (10x)	2,5μl
MgCl ₂ (50mM)	1,0 μl
dNTP (10mM)	0,5 μl
Taq DNA Polimerase (5U/μl)	0,2μl
Água ultrapura	19,6μl
DNA (20ηg/μl)	1,0μl
Volume Total	25,0 μl

Tabela 6: Programa de Ciclagem da PCR-RFLP do SNP C1858T. Adaptado de: WAGENLEITER et al., 2005.

Programa de Ciclagem SNP C1858T		
Ciclos	Etapa	Temperatura e Tempo de Duração
1	Pré-desnaturação	95 °C 15 min
	Desnaturação	94 °C 1 min
35	Anelamento	55 °C 1 min
	Extensão	72 °C 1 min
1	Extensão	72 °C 10 min

O produto de PCR (8,0 μl) foi digerido por 0,5 μl da enzima *RsaI* (2,5U, *New England Biolabs, Inc.*) junto a 5,0 μl de água ultrapura e 1,5 μl do tampão da enzima (NEB1), a 37°C por toda a noite (*overnight*) em banho-maria.

Os oligonucleotídeos iniciadores amplificaram um produto de 326pb, que apresenta dois sítios de restrição para *RsaI*, permitindo a diferenciação de 1858C (228pb) e 1858T (272pb, WAGENLEITER et al., 2005).

O produto da digestão, previamente corado com Gel RedTM, foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2,5%. Posteriormente este foi visualizado em fotodocumentador DNR *Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro* através do software *GelCapture*TM. Os genótipos foram identificados de acordo com o tamanho do fragmento gerado (Figura 10).

O genótipo (C/C) apresenta os fragmentos de 228, 44 e 54pb após a clivagem pela enzima *RsaI*, enquanto que o homocigoto variante (T/T)

produz os fragmentos de 272 e 54pb. O genótipo heterozigoto (C/T) corresponde às bandas de 272, 228, 54 e 44pb.

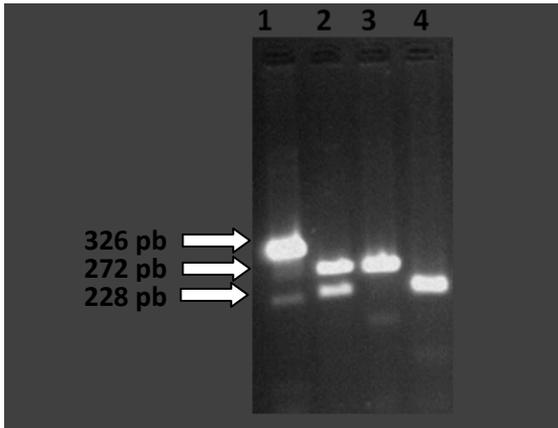


Figura 10: Foto de eletroforese em gel de agarose 2,5% mostrando fragmentos de DNA que contém o SNP C1858T do gene *PTPN22*. Raia 1: fragmento de PCR de 326pb. Raia 2: Genótipo CT - heterozigoto (fragmentos de 272, 228, 54 e 44pb). Raia 3: Genótipo TT – variante (fragmentos de 272 e 54 pb). Raia 4: Genótipo CC –(fragmentos de 228, 54 e 44pb). Os fragmentos de 54 e 44pb não são visíveis.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e as frequências alélicas e genótípicas nos grupos de pacientes e controles foram calculadas através de do programa GENEPOP v.4.0.10 (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

A associação dos genótipos, dados clínicos e epidemiológicos com a susceptibilidade à doença foi verificada através do teste *Odds Ratio* (OR), segundo Woolf (1955), adotando-se intervalo de confiança (IC) de 95% e estabelecendo o limite de significância a $p = 0,05$. O valor de OR permitiu verificar quantas vezes o caráter em questão foi mais frequente no grupo de indivíduos expostos ao fator de risco, comparativamente ao risco em indivíduos não expostos a este fator (RUMEL, 1986).

A OR foi calculada por regressão logística binária através do programa SPSS v.12.0. O programa SPSS v.12.0 também foi utilizado para o cálculo do teste *t* de Student.

As análises de OR relacionadas à susceptibilidade à AR foram realizadas para:

- Presença do alelo de risco através de três modelos de análise (Tabela 7);

Dos fatores epidemiológicos relacionados à AR foram analisados apenas o tabagismo e aqueles relacionados a dados hormonais, em função da disponibilidade das informações disponíveis e que permitissem a comparação entre casos e controles:

- Tabagismo (inclui fumantes e ex-fumantes (≥ 10 maços/ano) até 20 anos atrás) e presença do alelo de risco através de três modelos de análise (Tabela 7).

- Tabagismo (inclui fumantes e ex-fumantes (≥ 10 maços/ano) até 20 anos atrás);

- Fatores hormonais (inclui mulheres que realizaram uso contínuo de anticoncepcional nos últimos 10 anos e com menarca precoce (≤ 15 anos));

Outras análises de OR foram realizadas apenas com os pacientes, para verificar a associação das seguintes características ao grupo FR+:

- Presença do alelo de risco através de três modelos de análise (Tabela 7);

- Tabagismo (inclui fumantes e ex-fumantes (≥ 10 maços/ano) até 20 anos atrás (TÓBON; YOUINOU; SARAUX, 2010; LIAO; ALFREDSSON; KARLSON, 2009) e presença do alelo de risco através do modelo Aditivo;

- Tabagismo (inclui fumantes e ex-fumantes (≥ 10 maços/ano) até 20 anos atrás);

De acordo com a hipótese de que o grupo de pacientes FR+ apresenta uma doença mais agressiva fatores indicativos de pior prognóstico, nesse caso: presença de Manifestações Extra-Articulares (MEAs) e de erosões ósseas foram analisados em relação ao grupo de pacientes FR+:

- Presença de Manifestações Extra-Articulares (MEA);

Não existe consenso na forma de distinguir entre as apresentações clínicas da AR. Conforme classificação sugerida por Prete (2011), estas manifestações foram agrupadas em: MEA e Comorbidades Associadas.

Foram consideradas como MEA:

- Síndrome de Sjögren;
- Vasculite reumatoide;
- Nódulos reumatoides;
- Acometimento cardíaco;

- Acometimento pulmonar;
- Acometimento ocular;
- Acometimento renal.

Foram consideradas como Comorbidades Associadas:

- Hipertensão Arterial Sistêmica;
- Dislipidemia;
- Osteoporose;
- Depressão.

- Presença de Erosão óssea;

- Presença de MEA e do alelo de risco através do modelo

Aditivo;

- Presença de Erosão óssea e do alelo de risco através do modelo

Aditivo;

As análises dos dados clínicos foram realizadas apenas no modelo Aditivo, pois se observou através do parâmetro *Nagelkerke R Square* que este foi o modelo que explicou maior parcela dos eventos relacionados à doença. Essa observação é corroborada por Klareskog (2011), que indica este modelo como sendo o mais adequado para identificação de interações biológicas.

Tabela 7: Modelos de análise de associação para o SNP *PTPN22* C1858T.

Modelo	Risco 1	Não risco 0
Dominante	CT + TT	CC
Comparação de heterozigoto	CT	CC

Modelo	Risco 2	Risco 1	Não Risco 0
Aditivo	TT	CT	CC

5. RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HRM PARA DETECÇÃO DO SNP *PTPN22* C1858T

A reação inicial de PCR em Tempo Real seguida da análise por HRM foi realizada utilizando o protocolo sugerido pelo fabricante e amostras de DNA referência (*Cycle Threshold* - $Ct \leq 27$) extraídas no Laboratório Biogenetika - Diagnóstico Molecular e Medicina Genômica, onde foram realizados os experimentos de HRM.

Como pode ser visualizado na Figura 11, o *software* diferenciou o genótipo da amostra desconhecida e os gráficos de análise permitiram a visualização dos três genótipos (CC, CT e TT). Porém, foi pouco perceptível a diferenciação entre o homozigoto variante (TT) e o heterozigoto (CT).

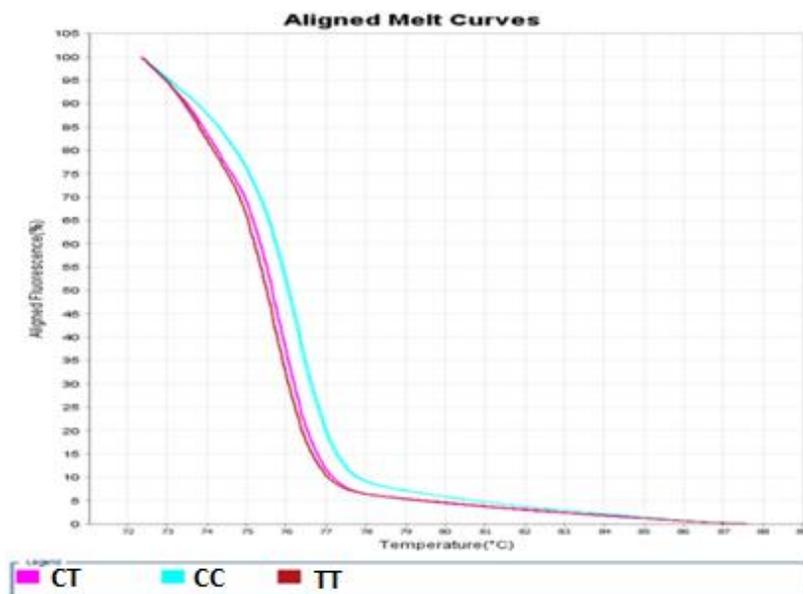


Figura 11: Diferenciação dos genótipos através do “Gráfico de Curvas de Dissociação Alinhadas”. Os genótipos homozigotos (curvas em azul e vermelho) podem ser distinguidos um do outro através da diferença na temperatura de dissociação. O genótipo heterozigoto (curva em verde) pode ser distinguido dos demais por apresentar um formato diferenciado da curva de dissociação.

No gráfico da Figura 12 foi possível visualizar mais facilmente a existência de três genótipos distintos.

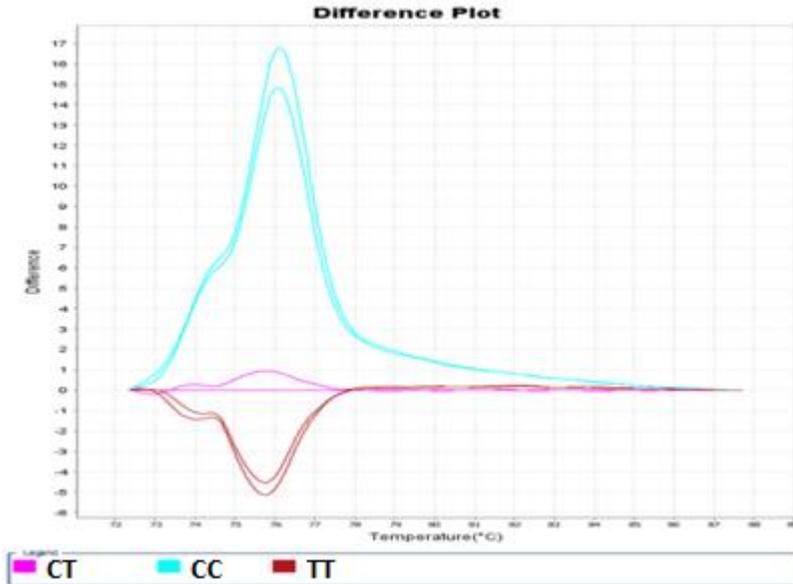


Figura 12: Diferenciação dos genótipos através do “Gráfico de Diferenças”. O formato de visualização desse gráfico amplifica a diferença entre os genótipos e permite que um deles seja escolhido como referência zero. Nesse caso, o genótipo utilizado como referência foi o heterozigoto.

Com o objetivo de melhorar a análise por HRM seguiu-se com a etapa de otimização da reação de PCR em Tempo Real.

5.1.1 Otimização da PCR em Tempo Real

a) Concentração de primers

Foram testadas diferentes concentrações dos primers (*Forward* e *Reverse*), variando para mais e para menos da concentração inicialmente testada (de $0,3\mu\text{M}$) e que foi indicada pelo fabricante. Foi verificado o comportamento das curvas de amplificação nas concentrações de $0,2\mu\text{M}$ ($1,0\mu\text{l}$), $0,4\mu\text{M}$ ($1,5\mu\text{l}$) e $0,5\mu\text{M}$ ($2,0\mu\text{l}$), Figura 13.

Foi verificado (Figuras 13 e 14) que a concentração de *primers* que melhor se adequou tanto em relação à amplificação por PCR em Tempo Real como para as análises por HRM foi a de 0,5 μM (2,0 μl).

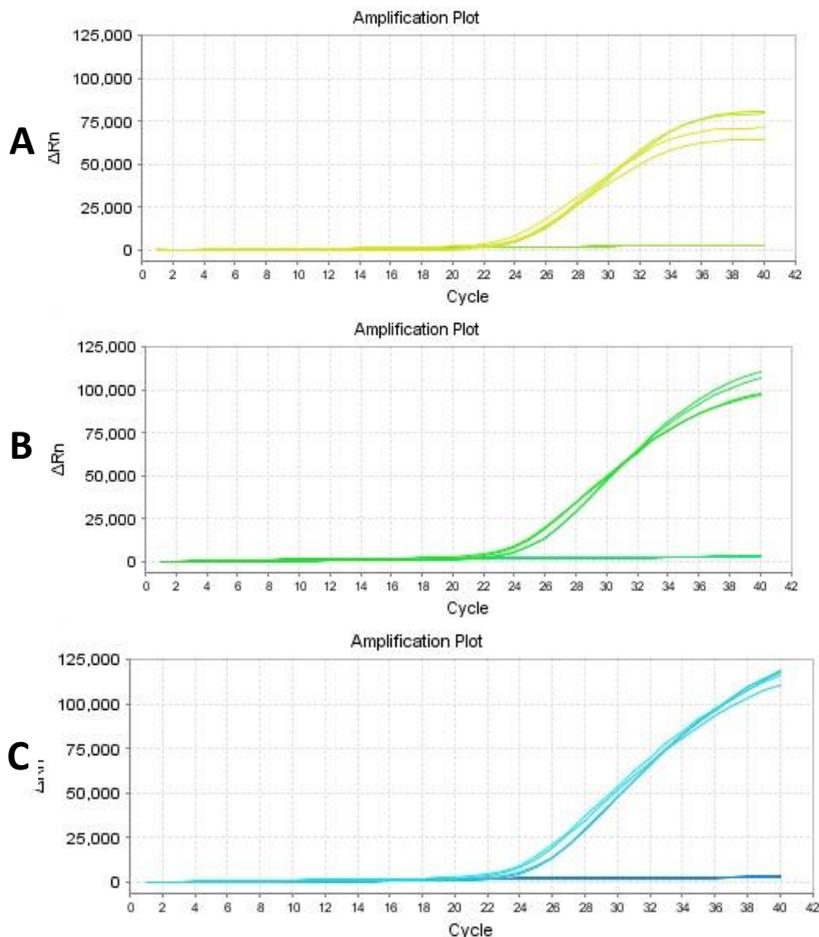


Figura 13: Gráficos de Amplificação gerados para as reações de PCR em Tempo Real com diferentes concentrações de *primers*. A: 0,2 μM . B: 0,4 μM . C: 0,5 μM . A concentração mais adequada foi a de 0,5 μM , o que pode ser visualizado através da maior quantidade de produto formado e ângulo mais inclinado da curva de amplificação.

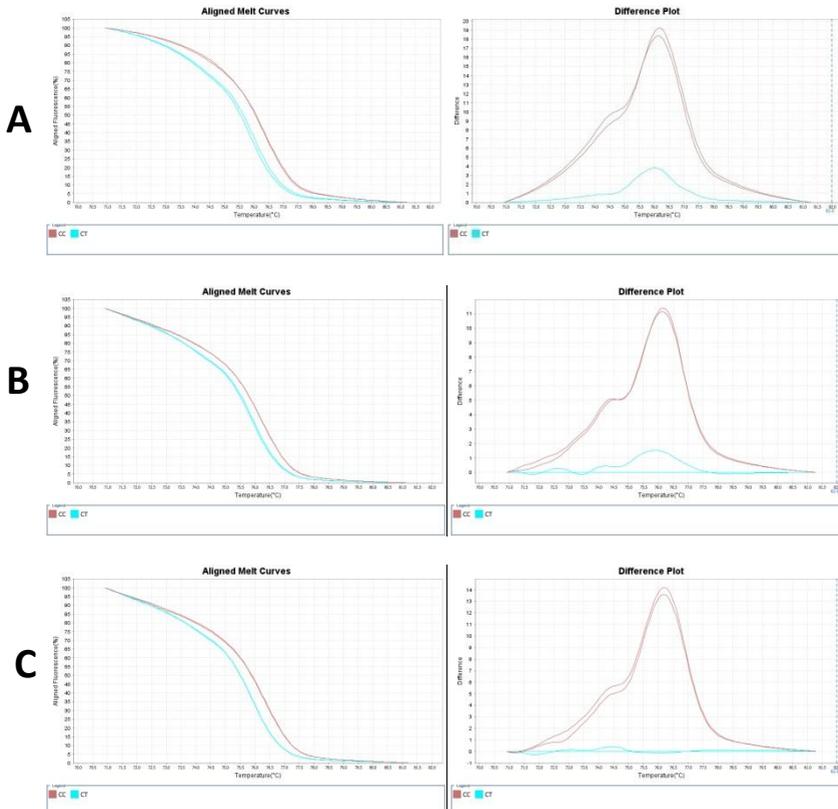


Figura 14: Gráficos das análises por HRM gerados a partir de reações de PCR em Tempo Real com diferentes concentrações de *primers*: A: 0,2 μM . B: 0,4 μM . C: 0,5 μM .

b) Concentração de MgCl_2

Foram utilizadas diferentes concentrações de MgCl_2 : 1, 2, 3 e 4 mM. Os gráficos de amplificação gerados para as reações com diferentes concentrações de MgCl_2 permitiu observar que, em relação ao protocolo inicial (que não utilizava MgCl_2 adicional ao do *Melt Doctor Master Mix*), não houve melhora na amplificação por PCR em Tempo Real (Figura 15). O mesmo foi observado durante a análise por HRM (Figura 16).

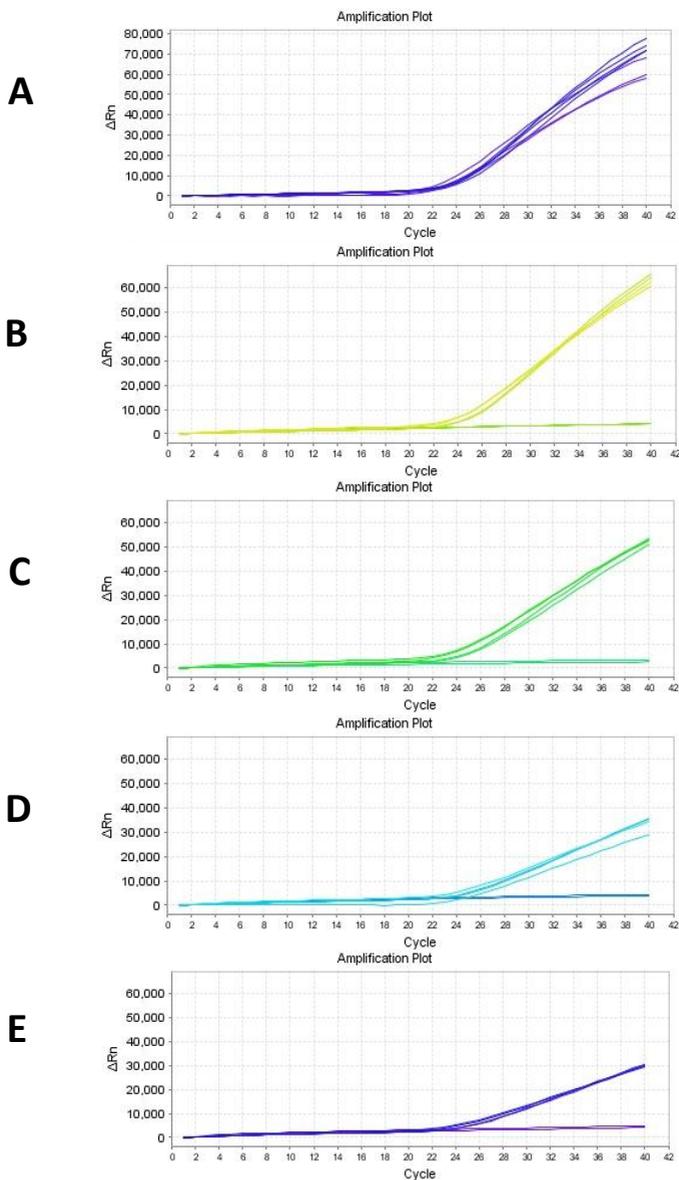


Figura 15: Gráficos de amplificação gerados para as reações de PCR em Tempo Real com diferentes concentrações de $MgCl_2$. A: 0 mM. B: 1 mM. C: 2 mM. D: 3 mM. E: 4 mM. A utilização adicional de $MgCl_2$ diminuiu a eficiência da amplificação.

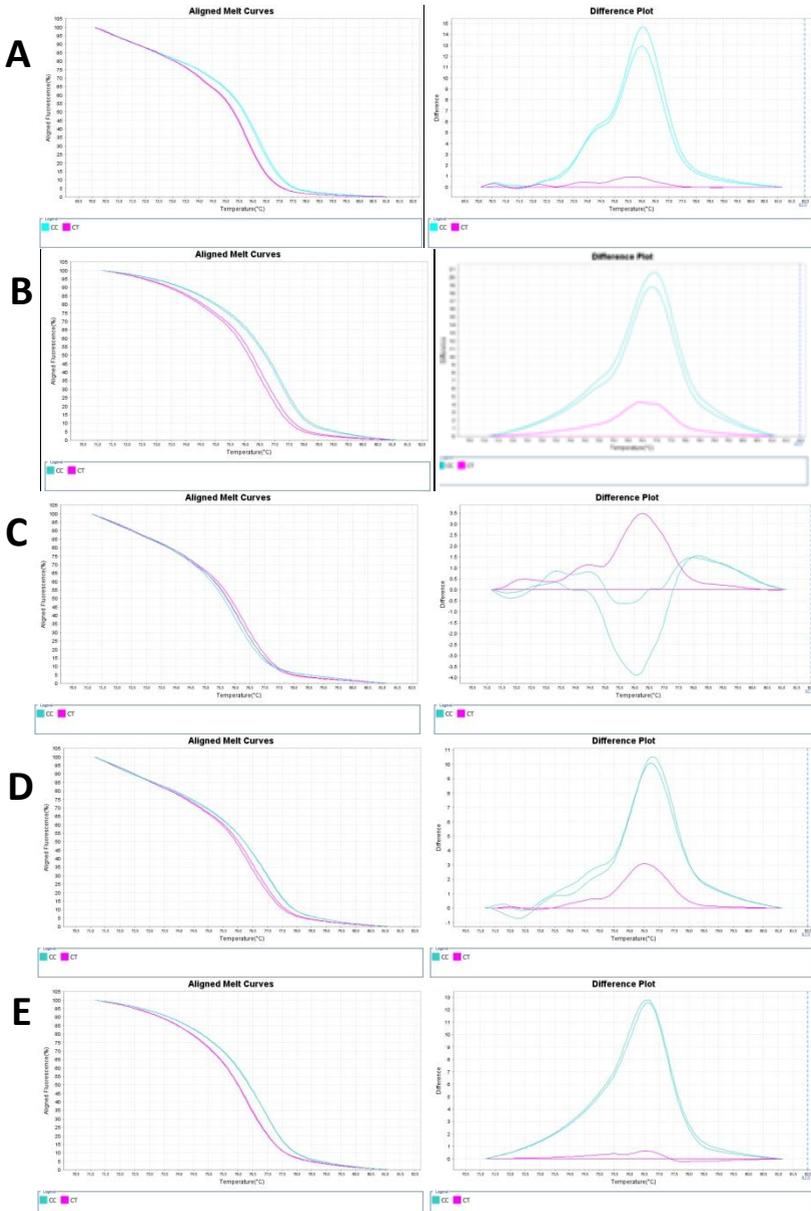


Figura 16: Gráficos das Análises por HRM gerados a partir das reações de PCR em Tempo Real com diferentes concentrações de MgCl₂. A: 0 mM. B: 1 mM. C: 2 mM. D: 3 mM. E: 4 mM.

c) Programa de Ciclagem da PCR em Tempo Real

Observou-se que as curvas de amplificação da PCR em Tempo Real não estavam atingindo a fase de platô. Assim, a ciclagem utilizada para a reação foi aumentada de 40 para 45 ciclos. Após essa alteração, as curvas de amplificação atingiram a fase de platô (Figura 17).

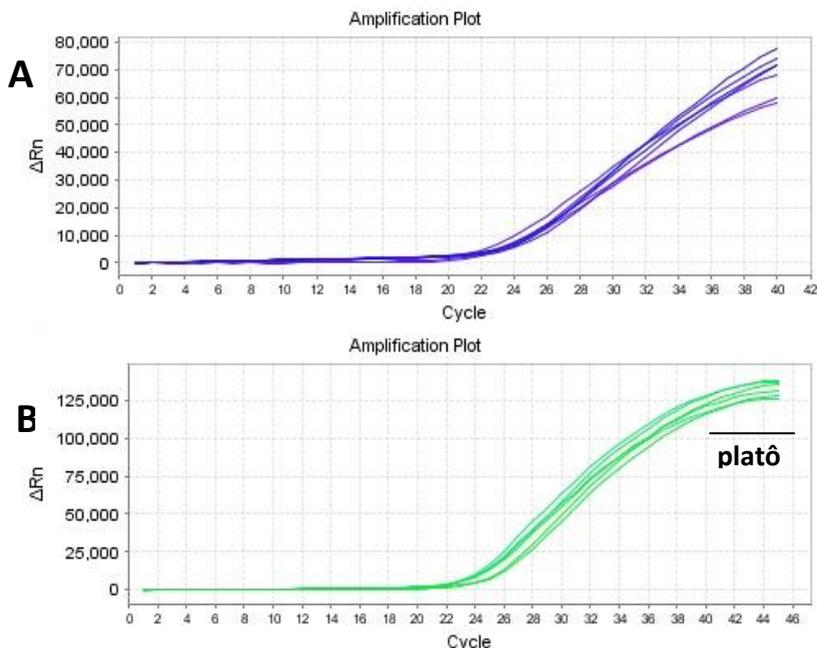


Figura 17: Gráficos de amplificação gerados para as reações de PCR em Tempo Real com diferentes programas de ciclagem. A: PCR realizada com 40 ciclos. B: PCR realizada com 45 ciclos.

d) Quantidade de DNA

Na reação de PCR em Tempo Real a quantidade de DNA foi aumentada de 1,0 para 2,0 μ l em virtude da baixa quantidade de DNA apresentada pelas amostras extraídas por *salting-out* (MILLER et al., 1988), o que poderia impossibilitar as análises de genotipagem por HRM.

5.1.2 Genotipagem por HRM após otimização da PCR em Tempo Real

Após etapa de otimização da PCR em Tempo Real foram realizadas duas reações de genotipagem; uma delas utilizando as amostras extraídas no Laboratório Biogenética e outra utilizando amostras extraídas no Laboratório de Polimorfismos Genéticos.

As amostras de DNA extraídas por *Salting out* não apresentaram uma amplificação homogênea (Figura 18), o que fez com que as curvas pertencentes a um mesmo genótipo não ficassem bem agrupadas na análise por HRM.

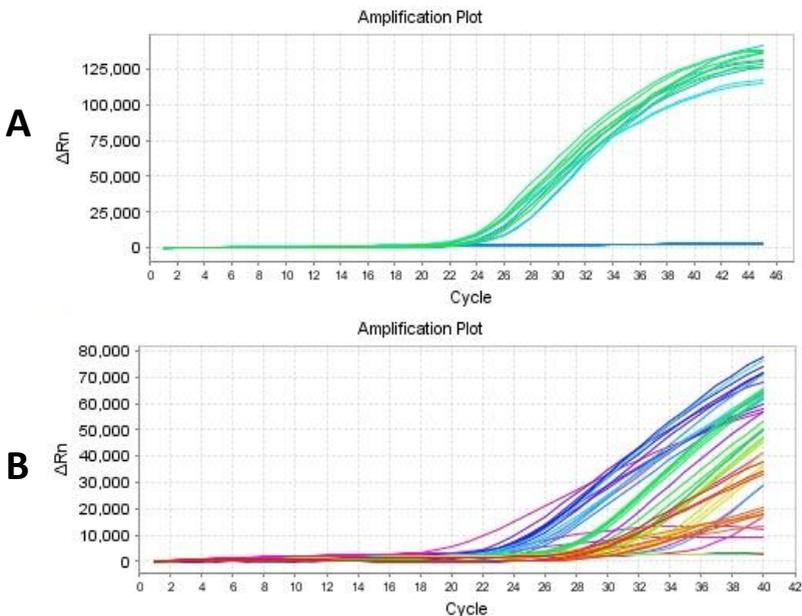


Figura 18: Comparação dos Gráficos de amplificação da PCR em Tempo Real gerados a partir de reações com amostras obtidas por diferentes métodos de extração. A: experimento realizado com amostras de DNA extraídas por kits de extração da Qiagen e OralCollect-OC-100. B: experimento realizado com amostras de DNA extraídas pela técnica de *salting-out*.

Como pode ser observado pelo gráfico B da Figura 19 não foi possível a correta atribuição dos genótipos na reação que utilizou amostras extraídas por *Salting out*.

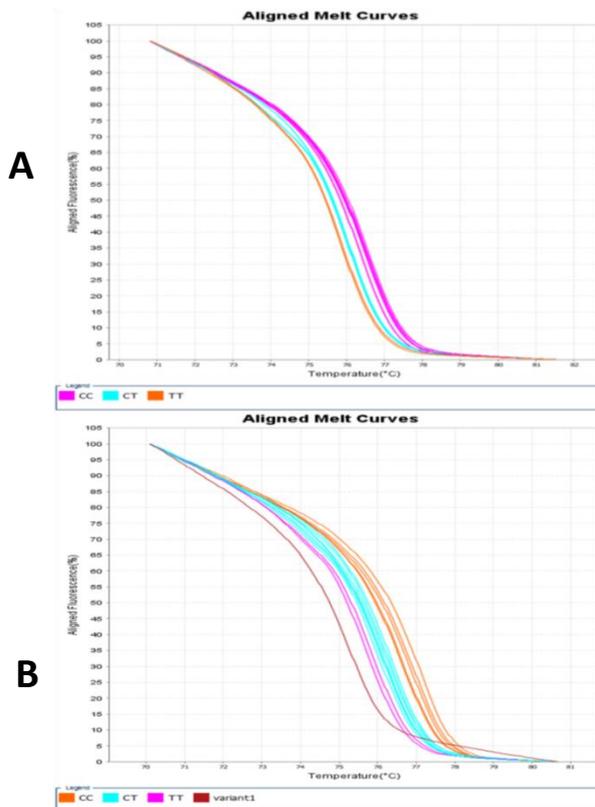


Figura 19: Comparação dos “Gráficos de Curvas de Dissociação Alinhadas” gerados a partir de reações com amostras obtidas por diferentes métodos de extração. A: experimento realizado com amostras de DNA extraídas por kits de extração da Qiagen e OralCollect-OC-100. B: experimento realizado com amostras de DNA extraídas pela técnica de *salting-out*.

5.1.3 Purificação das amostras de DNA extraídas por *Salting-out*

A purificação das amostras de DNA é indicada pelo fabricante como forma de diminuir os efeitos causados pelo sal. Como as amostras extraídas pela técnica de *salting-out* apresentaram problemas em relação à amplificação por PCR em Tempo Real e em relação à análise por HRM foram testadas duas alternativas de purificação: purificação com água ultrapura e purificação em Tris-EDTA (TE).

a) Purificação com Água Ultrapura

As amostras extraídas por *Salting out* foram purificadas através de diluição em Água ultrapura (Figura 20):

- 1:10 = 1 μ l de DNA (20 η g/ μ l) para 10 μ l de água ultrapura;
- 1:20 = 1 μ l de DNA (20 η g/ μ l) para 20 μ l água ultrapura;

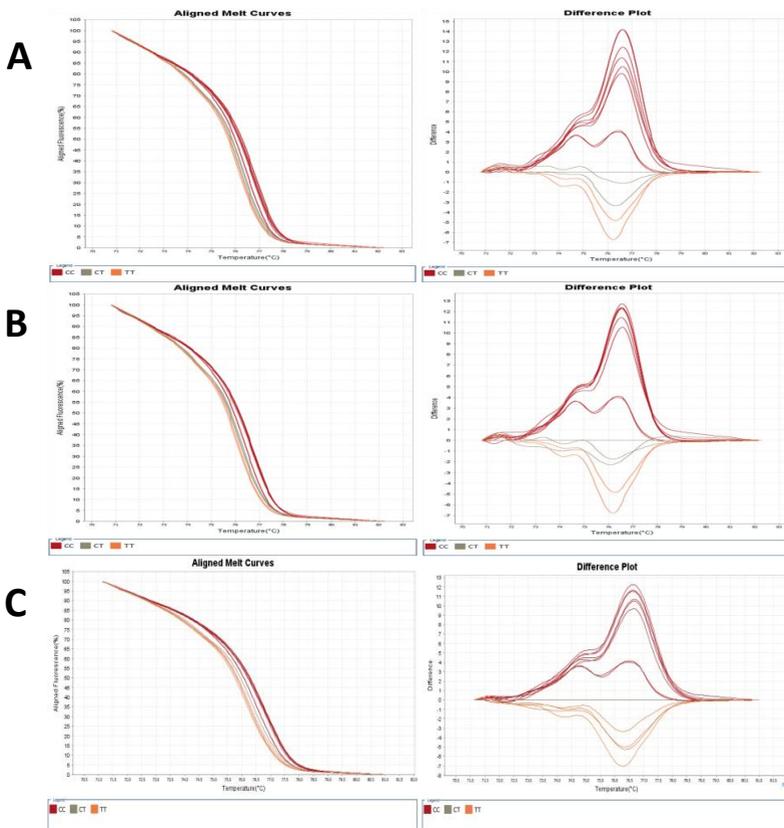


Figura 20: Gráficos das análises por HRM gerados a partir de reações realizadas com amostras extraídas pela técnica de *Salting-out* e purificadas com Água ultrapura. A: controle, com amostras não purificadas. B: reação com amostras purificadas (1:10). C: reação com amostras purificadas (1:20).

Não foram observadas mudanças significativas na análise por HRM após a purificação com água.

b) Purificação em Tris-EDTA (TE)

A purificação em Tris-EDTA (TE) foi realizada seguindo etapas alternadas de centrifugação e aquecimento em banho seco das amostras de DNA e foi realizada em microtubos contendo colunas de purificação, os quais contêm membranas de retenção do DNA.

O protocolo estabelecido para purificação em TE é indicado abaixo:

Procedimento para Purificação em TE:

- a) Aquecer o TE a 56°C em banho seco.
- b) Separar 50 µl de DNA (20ng/µl) de cada amostra e transferir esse DNA para um microtubo contendo colunas de purificação.
- c) Centrifugar as amostras durante 1 minuto a 6.000g.
- d) Transferir a coluna de purificação para um novo microtubo de 1,5 ml.
Observação: Não descartar o volume eluído. Caso a ressuspensão em TE não funcione esse conteúdo filtrado continuará sendo utilizado como fonte de moldes de DNA durante as reações de amplificação.
- e) Adicionar 200 µl de TE aquecido a 56°C a cada amostra.
- f) Incubar o DNA no banho seco a 56°C durante 3-5 minutos.
- f) Centrifugar as amostras durante 1 minuto a 6.000g.
- g) Armazenar as amostras de DNA a -20°C.

A comparação dos resultados de genotipagem obtidos antes e após a purificação em TE podem ser visualizados na Figura 21.

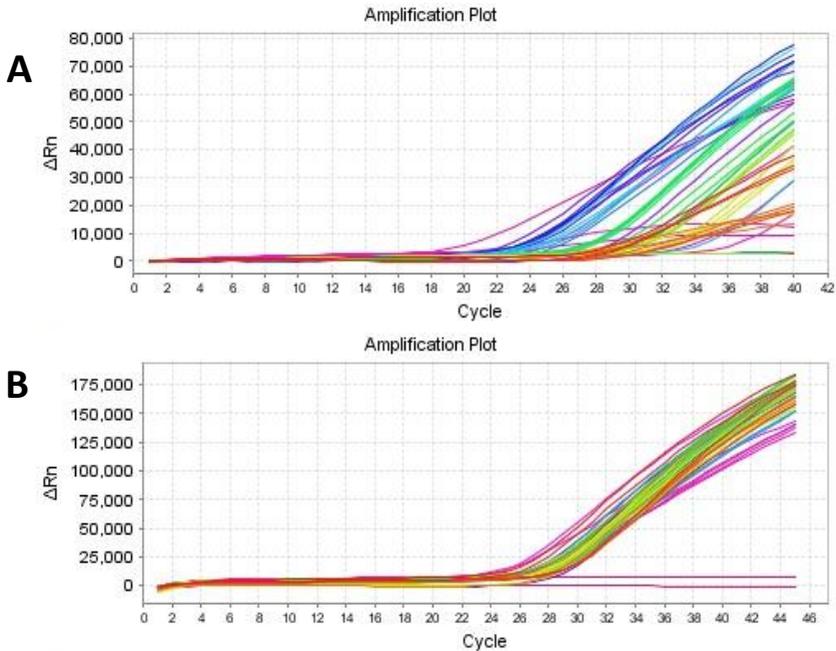


Figura 21: Comparação dos gráficos de amplificação da PCR em Tempo Real gerados a partir de reações com amostras de DNA obtidas por *salting-out* antes e após ressuspensão em TE. A: experimento realizado com amostras de DNA não ressuspensas em TE. B: experimento realizado com amostras de DNA ressuspensas em TE.

5.1.4 Genotipagem por HRM após etapa de purificação das amostras de DNA

Após otimização da PCR em Tempo Real e purificação das amostras de DNA foi possível genotipar as amostras extraídas por *salting out* para o SNP C1858T (Figura 22).

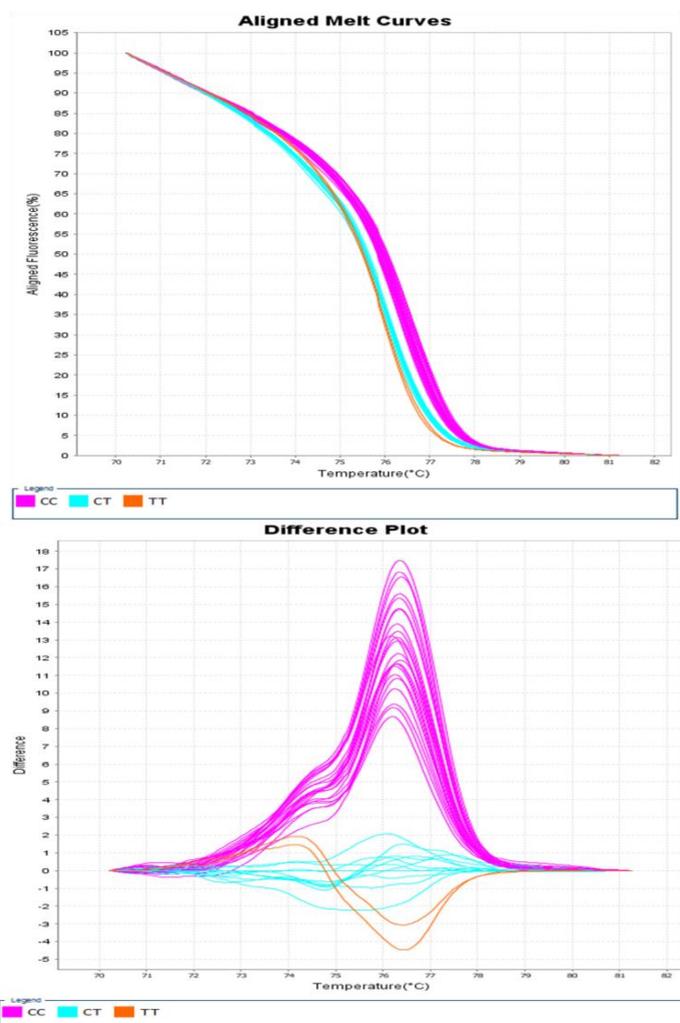


Figura 22: Gráficos das análises por HRM gerados a partir da reação otimizada de PCR em Tempo Real realizada com amostras de DNA purificadas.

5.1.5 Confirmação da genotipagem por HRM pelo método de RFLP

Houve concordância de 100% entre os genótipos estabelecidos pelas duas técnicas (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação da Genotipagem do SNP C1858T por HRM e PCR-RFLP

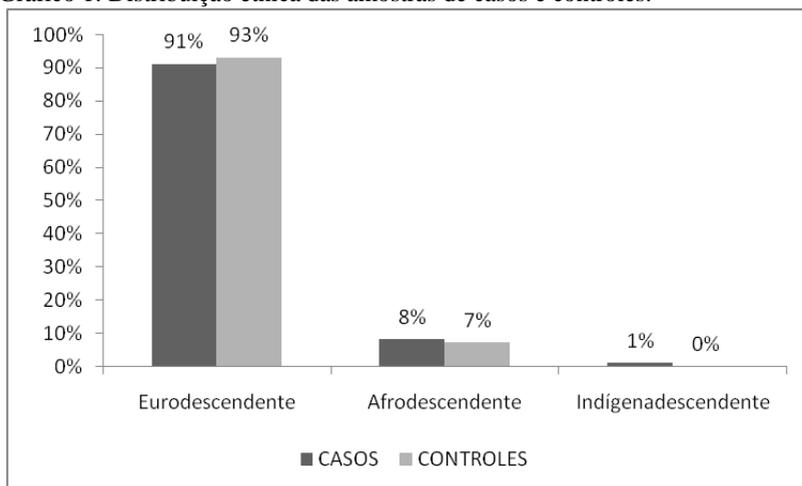
Genótipos	Amostras Testadas por Genótipo	Concordância
CC	33	33/33
CT	4	4/4
TT	0	NA

5.2 ESTUDO CASO-CONTROLE

5.2.1 Caracterização da amostra populacional

Quanto à cor da pele, os indivíduos foram agrupados de acordo com a classificação em: euro, afro e ameríndio-descendentes (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição étnica das amostras de casos e controles.



Observou-se um predomínio de indivíduos com ascendência europeia nos dois grupos analisados. Os grupos de casos e controles são homogêneos em relação à cor da pele (Tabela 9).

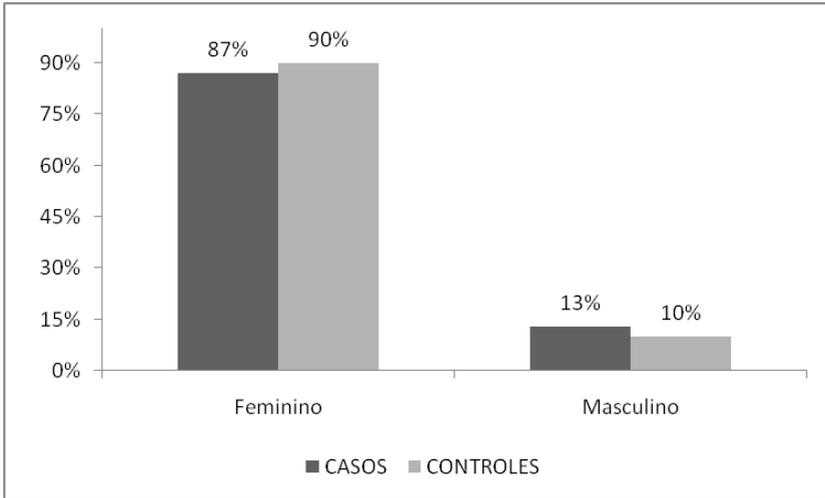
Tabela 9: Teste de Homogeneidade da Ascendência entre casos e controles

ASCENDÊNCIA	χ^2 Pearson	valor de p^a
Euro-descendente	0,272	0,602
Afro-descendente	0,720	0,788
Ameríndio-descendente	1,005	0,316

^a valor de p referente ao teste χ^2 Pearson.

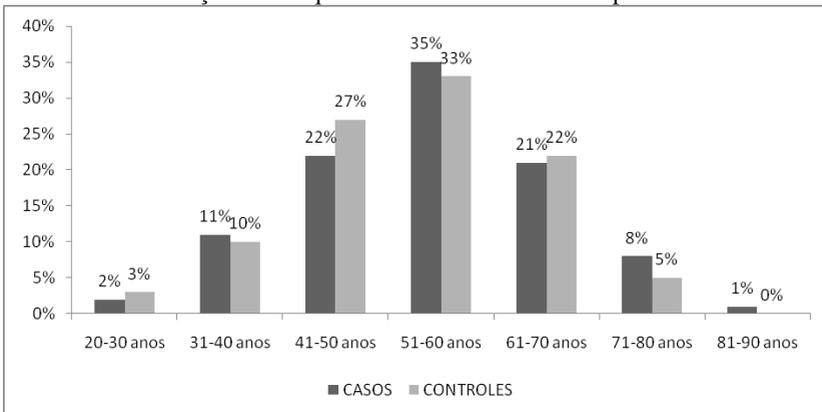
Com relação ao sexo, os dois grupos também são homogêneos entre si ($\chi^2_{(1)} = 0,442$, $p = 0,506$). Observou-se um predomínio de mulheres no grupo de indivíduos do presente estudo (Gráfico 2).

Gráfico 2: Distribuição das frequências dos sexos feminino e masculinos em casos e controles.



Em relação à idade, os indivíduos foram classificados em classes de 10 anos (Gráfico 3). Observou-se um predomínio de indivíduos na faixa de 51 a 60 anos de idade. A média de idade foi de 54,67 ($\pm 11,76$) no grupo de casos e de 52,69 ($\pm 11,76$) no grupo controle. Segundo o teste *t* de Student os dois grupos são homogêneos com relação à média de idade ($p=0,235$).

Gráfico 3: Distribuição das frequências de casos e controles por faixa etária



Como fatores epidemiológicos foram analisados o tabagismo, a idade da menarca e o uso de anticoncepcional (Tabela 10).

Tabela 10: Categorização epidemiológica do grupo de casos (pacientes) e controles, quanto a tabagismo, menarca precoce e uso de anticoncepcional.

CARACTERÍSTICA	CONTROLES n= 100 (%)	PACIENTES n= 100 (%)	p^a
TABAGISMO			
Fumante	17 (17%)	37 (37%)	0,075
Não fumante	66 (66%)	62 (62%)	
NI	17 (17%)	1 (1%)	
MENARCA PRECOCE			
SIM (> 15 anos)	10 (10%)	9 (9%)	0,869
NÃO (≤ 15 anos)	80 (80%)	78 (78%)	
NA	10 (10%)	13 (13%)	
NI	0 (0%)	0 (0%)	
USO ANTICONCEPCIONAL			
SIM (últimos 10 anos)	33 (33%)	29 (29%)	0,835
NÃO	56 (56%)	52 (52%)	
NA	10 (10%)	13 (13%)	
NI	1 (1%)	6 (6%)	

NI: Não Informado

NA: Não Aplicado. Referente a indivíduos do sexo masculino.

^a valor de *p* referente ao teste *t* de Student.

5.2.2 SNP *PTPN22* C1858T

As frequências alélicas e genotípicas do SNP C1858T estão descritas na Tabela 11. As frequências do alelo de risco (1858T) no presente estudo foram de 0,090 em pacientes e de 0,045 no grupo controle. As frequências genotípicas nos dois grupos estão em EHW.

Tabela 11: Frequências alélicas e genotípicas do SNP C1858T.

Grupo	<i>PTPN22</i> C1858T					p^a
	CC (%)	CT (%)	TT (%)	C	T*	
Controles	91(91%)	9 (9%)	0 (0%)	0,955	0,045	1,00
Pacientes	83(83%)	16(16%)	1 (1%)	0,091	0,090	0,56

* alelo de risco para AR

^a valor de *p* referente ao teste de EHW

As frequências genótípicas podem ser observadas na Tabela 12.

Tabela 12: Frequências genótípicas observadas e esperadas para o SNP *PTPN22* C1858T em casos (AR) e controles (CONT).

<i>PTPN22</i> C1858T	Genótipos Observados (Genótipos Esperados)	Genótipos Observados (Genótipos Esperados)
	(%)	(%)
	AR (n=100)	CONT (n=100)
CC	83 (87)	91 (87)
CT	16 (12,5)	9 (12,5)
TT	1 (0,5)	0 (0,5)
$\chi^2_{(2)}$	3,3278, 0,10 > p > 0,05	

A análise da associação do SNP C1858T à AR é apresentada na Tabela 13. Não foram observadas associações significativas em nenhum dos modelos analisados.

Tabela 13: Análise da associação do SNP C1858T à AR no presente estudo.

Modelo	OR (95% IC)	p	
Aditivo	Ajustado*	2,120 (0,919 - 4,890)	0,078
	Ajustado**	2,166 (0,903 - 5,196)	0,084
	Não Ajustado	2,100 (0,915 - 4,823)	0,080
Dominante	Ajustado*	2,091 (0,880 - 4,970)	0,095
	Ajustado**	2,135 (0,861 - 5,295)	0,102
	Não Ajustado	2,071 (0,875 - 4,899)	0,097
Comparação de Heterozigoto	Ajustado*	1,967 (0,821 - 4,714)	0,129
	Ajustado**	2,001 (0,801 - 5,001)	0,138
	Não Ajustado	1,949 (0,817 - 4,648)	0,132

* modelo ajustado por: sexo, idade e ascendência

** modelo ajustado por: tabagismo

5.2.3 Caracterização dos pacientes com Artrite Reumatoide

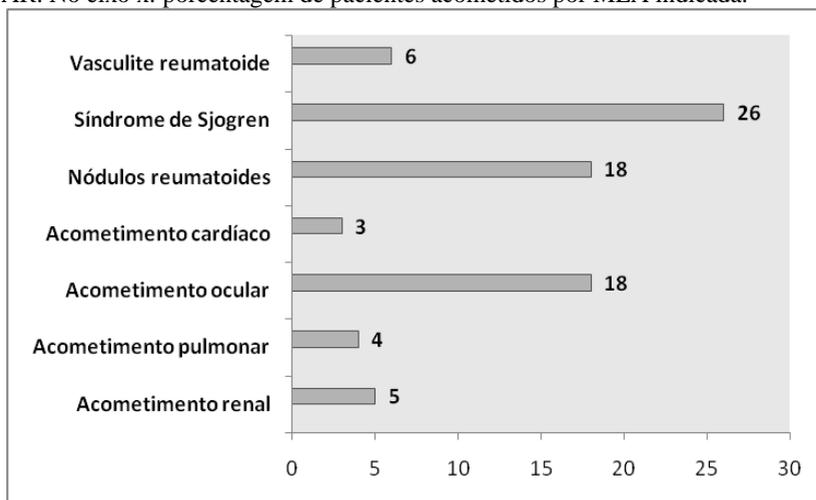
Os pacientes com AR apresentaram em média 43,69 ($\pm 12,56$) anos de idade quando foram diagnosticados. Destes, uma parcela considerável apresentou MEA, níveis elevados do FR e em menor proporção erosão óssea (Tabela 14).

Tabela 14: Caracterização dos pacientes com AR.

CARACTERÍSTICA	n=100 (%)
Fator Reumatoide	
Positivo	46 (46%)
Negativo	46 (46%)
Ni	8 (8%)
Manifestações Extra-Articulares	
Positivo	41 (41%)
Negativo	57 (57%)
Ni	2 (2%)
Erosão óssea	
Positivo	13 (13%)
Negativo	87 (87%)
Ni	2 (2%)

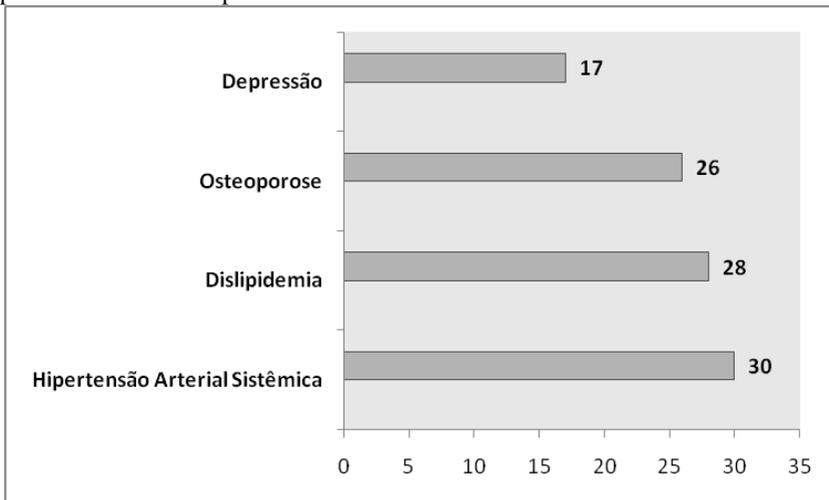
Os pacientes com AR apresentaram diversas MEAs. Das MEAs, a mais comum nos pacientes com AR foi a Síndrome de Sjögren (Gráfico 4).

Gráfico 4: Manifestações extra-articulares apresentadas pelos pacientes com AR. No eixo x: porcentagem de pacientes acometidos por MEA indicada.



A comorbidade associada à AR mais frequente entre os pacientes deste estudo foi a Hipertensão Arterial Sistêmica (Gráfico 5).

Gráfico 5: Comorbidades associadas à AR. No eixo x: porcentagem de pacientes acometidos por comorbidade indicada.



Os pacientes com AR foram classificados de acordo com a positividade ao autoanticorpo FR em dois grupos. O tabagismo e fatores indicativos de pior prognóstico (presença de MEAs e de erosões ósseas) foram avaliados nesses dois grupos de pacientes através do teste *t* de Student (Tabela 15).

Tabela 15: Avaliação do tabagismo e de indicativos de pior prognóstico nos grupos de pacientes FR+ e FR-

	FR+ n= 46 (%)	FR- n= 46 (%)	valor de <i>p</i> ^a
Tabagismo	28 (61%)	8 (17%)	<0,001
MEAs	19 (41%)	16 (35%)	0,573
Tabagismo e MEAs	10 (22%)	2 (4%)	0,025
Erosão óssea	6 (13%)	7 (15%)	0,765
Tabagismo e Erosão óssea	4 (9%)	1 (2%)	0,194

^a valor de *p* referente ao teste *t* de Student

5.2.4 SNP *PTPN22* C1858T e Prognóstico da AR

A associação do SNP C1858T foi analisada em relação aos grupos de pacientes FR+ e FR-. Nenhuma associação significativa foi encontrada (Tabela 16).

Tabela 16: Análise da associação do SNP C1858T ao grupo FR+

Modelo	OR (95% IC)	p
Aditivo	0,767 (0,278 – 2,118)	0,609
Dominante	0,853 (0,281 - 2,583)	0,778
Comparação de heterozigoto	0,974 (0,312 - 3,043)	0,964

Foram realizadas análises de interação entre a presença do SNP no Modelo Aditivo e de fatores indicativos de pior prognóstico (Tabela 17). Não foi encontrada qualquer associação significativa.

Tabela 17: Análise da associação do SNP C1858T e de fatores indicativos do prognóstico ao grupo FR+

Modelo Aditivo	OR (95% IC)	p
SNP C1858T + MEAs	0,978 (0,059 - 16,124)	0,987
SNP C1858T + Erosões ósseas	0,739 (0,156 - 3,494)	0,702

Modelos de interação envolvendo o SNP C1858T e fatores indicativos de pior prognóstico (Tabagismo + SNP C1858T x MEA; Tabagismo + SNP C1858T x Erosões ósseas; SNP C1858T x Tabagismo + MEA; SNP C1858T + Tabagismo x MEA) não foram analisados devido ao reduzido número amostral.

6. DISCUSSÃO

6.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HRM PARA DETECÇÃO DO SNP *PTPN22* C1858T

O crescente número de publicações envolvendo a técnica de HRM indica o potencial do método em se tornar uma das ferramentas mais utilizadas em análises genômicas (MARTINO; MANCUSO; ROSSI, 2010). Dentre as vantagens oferecidas pela técnica e que a colocam como método de escolha para uso em laboratórios clínicos estão:

- Facilidade de implementação e baixo custo: para ser realizado necessita apenas de um corante dsDNA de alta saturação e um conjunto de *primers*, o que o torna ideal para utilização em testes “*in house*”;

- Versatilidade: pode identificar variantes conhecidas e realizar a triagem por novas mutações em uma mesma reação, uma vez que não requer o uso de sondas, que detectam apenas as variações presentes em sua sequência.

A técnica de HRM vem sendo utilizada com sucesso em diversas aplicações como: detecção de mutações, estudos de metilação e genotipagem de SNPs (WITTWER, 2009; ERALI; VOELKERDING; WITTWER, 2008).

Os SNPs representam o tipo de variação de DNA mais comum no genoma humano; ocorrendo em média a cada 1.000 pb. Atualmente, são muito utilizados como marcadores em diversos estudos e possuem inúmeras aplicações, desde o auxílio na conduta medicamentosa em farmacogenética até o uso em protocolos de diagnóstico de doenças (MARTINO; MANCUSO; ROSSI, 2010).

As variações do tipo SNP são divididas em transversões e transições. Em torno de 65% dos SNPs são transições, representadas pelas mutações C/T e A/G. Esta classe de SNP é a que produz a maior diferença de temperatura de *melting*, em torno de 0,8 a 1,4 °C (CAI et al., 2010). O SNP analisado neste estudo pertence a essa classe de variação. A diferença verificada na temperatura de *melting* entre os homozigotos do SNP *PTPN22* C1858T (em média de 0,6 °C) foi menor que aquela geralmente verificada para essa classe de SNP.

Existem três tipos de ensaios desenvolvidos para genotipagem por HRM: metodologias que utilizam *snapback primers*, sondas não-rotuladas e genotipagem de pequenos fragmentos (CAI et al., 2010). A

utilização de pequenos fragmentos na genotipagem por HRM apresenta vantagens como:

- menor possibilidade de interferência de outras variantes na sequência analisada;
- maior eficiência de amplificação. Pequenos fragmentos (40-90pb) garantem uma amplificação mais robusta e facilitam a otimização dos ensaios;
- menor tempo de ciclagem;
- maiores mudanças na intensidade de fluorescência (a mudança produzida na intensidade de fluorescência é maior em menores fragmentos).

A utilização de pequenos fragmentos (até 150 pb) tem sido sugerida como efetiva e adequada para a maior parte das análises por HRM (REED; WITTEWER, 2004). No presente estudo foram desenhados *primers* para a amplificação de um fragmento de 81pb. As análises realizadas demonstraram a especificidade e eficiência desses primers na amplificação do fragmento contendo o SNP e na posterior diferenciação dos alelos através da técnica de HRM.

Assim como o tamanho do fragmento, outros parâmetros como: conteúdo de bases CG e variáveis, tais como: qualidade e quantidade do DNA, ciclagem da PCR em Tempo Real e uso de $MgCl_2$ podem interferir no comportamento da curva de dissociação (GUNDRY et al., 2003).

Concentração de *primers*

Os componentes da PCR são dinamicamente alterados à medida que a reação prossegue, sendo que a proporção entre eles afeta a eficiência da amplificação (LIU; SAINT, 2002). A concentração de primer é um dos fatores, portanto, que pode interferir na qualidade de amplificação e conseqüentemente nas análises por HRM.

Para determinação da concentração ótima a ser utilizada na genotipagem foram testadas diferentes concentrações de *primer*. Foi observado que para as análises por HRM a concentração mais adequada foi de 0,5 μM (2,0 μl). Essa concentração foi a que permitiu maior diferenciação entre o genótipo heterozigoto e homozigoto variante.

Concentração de MgCl₂

Os íons Mg²⁺ são cofatores vitais para a enzima *Taq* Polimerase e sua concentração afeta o sucesso e especificidade da amplificação. A adição de MgCl₂ promove um aumento na temperatura de dissociação das amostras de DNA, facilitando a diferenciação entre os grupos de variantes (VOSSEN et al., 2009; GUNDRY et al., 2003; WILSON, 1997).

Diferente do resultado encontrado por Aihara et al. (2012) em que a inclusão do MgCl₂ produziu uma melhor separação entre as curvas de dissociação, no presente estudo foi observada uma diminuição na qualidade de genotipagem após inclusão do mesmo em concentrações seriadas, descartando a necessidade de incluí-lo no protocolo utilizado.

Ciclagem da PCR em Tempo Real

O número de ciclos mais adequado para as análises realizadas no presente protocolo foi de 45; menor que o utilizado (50 ciclos) na padronização de pequenos fragmentos por Cai et al., (2010) e maior que aquele padronizado (40 ciclos) por Norambuena et al. (2009).

A alteração na ciclagem permitiu que a curva de amplificação atingisse o platô e aumentou o ângulo de inclinação das curvas, fatores esses necessários para uma boa qualidade da reação de amplificação.

Quantidade de DNA

Conforme indicado por Wittwer (2009), a concentração de DNA pode variar pelo menos quatro vezes sem que a análise por HRM seja afetada. Norambuena et al. (2009) também observaram que uma variação entre 10-50 ng de DNA não interfere nas análises por HRM.

A quantidade de DNA presente em uma amostra é refletida no Ct observado durante a PCR em Tempo Real. Quanto maior o número de cópias iniciais do DNA alvo, menor será o Ct e mais cedo se observará um aumento na fluorescência (KUBISTA et al., 2006).

Como observado nos resultados de amplificação, as amostras extraídas com os kits da Qiagen e Oral Collect OC-100 apresentaram Cts abaixo de 27, enquanto àquelas extraídas por *salting out* exibiram Cts mais elevados.

As amostras utilizadas no estudo caso-controle foram extraídas pela técnica de *salting-out*. A fim de garantir o mínimo de molde inicial

requerido para as análises por HRM, a quantidade de DNA utilizada no protocolo de PCR foi duplicada (de 1,0 para 2,0 μ l).

Qualidade do DNA

Inibidores podem reduzir a eficiência da PCR e gerar resultados imprecisos (DEMEKE; JENKINS, 2010). Diversos reagentes utilizados na etapa de extração do DNA podem atuar como inibidores da PCR como, por exemplo, o sal, fenol, clorofórmio (ROSSEN et al., 1992).

Sendo a sensibilidade e especificidade do HRM altamente dependentes da temperatura de *melting* de cada amostra individual, a variação na concentração de sal, dentre outros fatores, pode gerar perfis de melting heterogêneos (GARRITANO et al., 2009).

A boa qualidade de amplificação e uma grande homogeneidade entre as amostras de DNA são fundamentais para que se obtenha uma alta eficiência nas análises por HRM. A presença de contaminantes é um dos fatores associados à qualidade de DNA que podem interferir nas análises por HRM.

Como forma de reduzir a interferência dos contaminantes presentes é sugerida a realização de uma diluição seriada. Esse procedimento tem como princípio diluir o contaminante e diminuir seu efeito sobre a PCR, aumentando a eficiência da reação a cada passo de diluição (RAMAKERS et al., 2003). Nesse sentido, foi realizada a diluição das amostras de DNA em água ultrapura, porém, não foi observada melhora significativa durante as análises por HRM.

A adição de um tampão como o TE pode aumentar a resolução da análise ao permitir o melhor agrupamento das amostras pertencentes a um mesmo genótipo (VOSSSEN et al., 2009).

Após purificação em TE as curvas de amplificação das amostras tornaram-se mais homogêneas entre si, o que possibilitou as análises por HRM (Figura 21). Assim, este método de purificação foi escolhido para purificação das amostras de DNA extraídas por *salting-out* e permitiu a genotipagem das amostras do estudo caso-controle.

6.2 ESTUDO CASO-CONTROLE

O gene *PTPN22* é conhecido por seu papel no processo de regulação imune. A substituição causada na presença do alelo 1858T (Arg620Trp) altera o limiar de ativação de linfócitos T e B, interferindo

no processo de seleção negativa dessas células e, por conseguinte, na geração do processo autoimune (VANG et al., 2008).

O gene *PTPN22* pertence a uma família de *loci* compartilhados de autoimunidade e tem sido associado a diversas doenças autoimunes, principalmente àquelas caracterizadas pela presença de autoanticorpos, como a AR (BEHRENS, 2011). Dentre os diversos genes que contribuem para susceptibilidade à doença o SNP rs2476601 *PTPN22* C1858T é o segundo *locus* de maior influência (KURKÓ et al, 2013).

6.2.1 *PTPN22* C1858T e a susceptibilidade à AR

O primeiro relato de associação do alelo 1858T do gene *PTPN22* à AR ocorreu em 2004 (BEGOVICH et al., 2004) e desde então estudos têm replicado essa associação em diversas populações mundiais. Até o presente, essa possibilidade não havia sido verificada na população brasileira.

O alelo 1858T não foi associado à AR no presente estudo (OR modelo aditivo = 2,120; IC95% 0,919 - 4,890 ; $p = 0,078$). Como a frequência do alelo de risco é extremamente baixa é possível que a associação não tenha sido verificada devido ao tamanho da amostra. Essa afirmação é corroborada por repetidas confirmações de associação do alelo com a doença em outras populações, as quais utilizaram número de amostras superior a 200 (TORRES-CARRILLO et al., 2012; TOTARO et al., 2011; MAJORCZYK; PAWLIK; KUSNIERCZYK, 2010; PIERER et al., 2006; OROZCO et al., 2005; PLENGE et al., 2005; SIMKINS et al., 2005; VAN OENE et al., 2005; ZHERNAKOVA et al., 2005; BEGOVICH et al., 2004).

Mudanças sutis no funcionamento dos linfócitos T podem influenciar a produção de autoanticorpos e a imunidade humoral, o que poderia explicar a associação preferencial do alelo 1858T a doenças caracterizadas pela presença de autoanticorpos e no caso da AR, ao grupo soropositivo - ACPA ou FR+. (HARRISON et al., 2006). Muitos estudos verificaram que o alelo 1858T está associado apenas ao grupo de pacientes soropositivo (ATES et al., 2011; KOKKONEN et al., 2007; DIEUDÉ et al., 2005; SELDIN et al., 2005). No presente estudo, o modelo aditivo foi utilizado para verificar a associação do alelo 1858T com o grupo de pacientes FR+. Não foi encontrada associação do alelo 1858T ao grupo de pacientes FR+ (OR aditivo = 0,767; IC95% 0,278 - 2,118 ; $p = 0,609$).

6.2.2 Identificação da frequência alélica de 1858T

Ao comparar a frequência do grupo controle (0,045) com as verificadas na literatura (Tabela 18) percebe-se que ela é mais próxima àquela encontrada nas populações italiana (0,037) e colombiana (0,040).

Tabela 18: Frequências alélicas do SNP C1858T do gene *PTPN22* em casos (AR) e controles (CONT) de diversos estudos.

População estudada	Tamanho amostral AR / CONT	Frequência SNP C1858T AR / CONT	Referência
AMÉRICA			
Brasil	100 / 100	0,090 / 0,045	Presente Estudo
Estados Unidos *	475 / 475	0,138 / 0,088	BEGOVICH et al., 2004
Estados Unidos	840 / 876	0,167 / 0,084	PLENGE et al., 2005
México	309 / 347	0,055 / 0,020	TORRES- CARRILLO et al., 2012
Colômbia	298 / 308	0,060 / 0,040	GOMEZ et al., 2005
Canadá	906 / 603	0,140 / 0,083	VAN OENE et al., 2005
EUROPA			
Noruega	861 / 559	0,165 / 0,114	VIKEN et al., 2007
Noruega	238 / 555	0,174 / 0,115	LIE et al., 2007
Suécia	89 / 360	0,208 / 0,103	JOHANSSON et al., 2006
Suécia	1,530 / 881	0,157 / 0,125	PLENGE et al., 2005
Suécia	505 / 970	0,180 / 0,114	KOKKONEN et al., 2007
Finlândia	1,030 / 1,400	0,212 / 0,155	SELDIN et al., 2005
Rússia	121 / 200	0,173 / 0,175	ZHEBRUN et al., 2011
Reino Unido *	302 / 374	0,159 / 0,084	STEER et al., 2005

População estudada	Tamanho amostral AR / CONT	Frequência SNP C1858T AR / CONT	Referência
Reino Unido *	4,789 / 3,630	0,150 / 0,103	MORGAN et al., 2009
Reino Unido *	686 / 566	0,139 / 0,103	HARRISON et al., 2006
Holanda	667 / 286	0,154 / 0,097	WESOLY et al., 2007
Alemanha	390 / 349	0,213 / 0,100	PIERER et al., 2005
Polônia	173 / 543	0,194 / 0,115	MAJORCZYK et al., 2007
Polônia	371 / 543	0,197 / 0,112	MAJORCZYK, PAWLIK, KUŚNIERCZYK, 2010
Eslováquia	520 / 303	0,165 / 0,107	STARK et al., 2009
Hungria	399 / 107	0,244 / 0,112	FARAGO et al., 2009
Espanha *	826 / 1,036	0,104 / 0,074	OROZCO, 2005
Itália	396 / 477	0,057 / 0,037	TOTARO, et. al., 2011
Grécia	378 / 430	0,033 / 0,029	ELIOPOULOS et al., 2011
Turquia	167 / 177	0,033 / 0,025	SAHIN et al., 2009
Turquia	323 / 426	0,042 / 0,027	ATES et al., 2011
ÁFRICA			
Tunísia	150 / 236	0,023 / 0,026	CHABCHOUB et al., 2009
ÁSIA			
Índia	133 / 149	0,058 / 0,010	MASTANA et al., 2007
Japão	1,128 / 455	0,002 / 0,002	IKARI et al., 2006
OCEANIA			
Nova Zelândia *	869 / 563	0,151 / 0,099	SIMKINS et al., 2005

Nota: * Estudo realizado apenas com indivíduos caucasianos

Em relação aos estudos que analisaram o SNP C1858T na população brasileira a frequência observada no presente trabalho (0,045) foi muito semelhante (0,051) àquela encontrada em um estudo de associação à diabetes tipo 1 na população do Rio Grande do Sul e menor que àquelas relatadas nos demais estudos (Tabela 19).

Tabela 19: Frequências alélicas do SNP C1858T do gene *PTPN22* na população brasileira de casos* e controles

Autor	Número Amostral Casos / Controles	Frequência do SNP na população Controle
Presente Estudo	100 / 100	0,045
GOMES et al., 2009	140 / 180	0,092
CHAGASTELLES, et al., 2010	211 / 241	0,051
LINS et al., 2010	200	0,073
BIANCO et al., 2010	142 / 180	0,092
MAINARDI-NOVO, 2011	612 / 792	0,106

Nota:*Grupos de casos envolvem pacientes com as seguintes doenças: diabetes autoimune, endometriose, Síndrome de Turner.

6.2.3 Caracterização do grupo de pacientes com AR

O grupo de pacientes do presente estudo é composto em sua maioria por mulheres, em uma taxa de aproximadamente 9:1, proporção acima da média mundial, de 3:1 (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Este resultado concorda com a observação realizada por Myasoedova et al. (2010) de que a incidência da doença pode estar aumentando no sexo feminino.

Hipóteses relacionando essa maior prevalência em mulheres à participação dos hormônios sexuais motivaram estudos a verificarem a influência, dentre outros fatores, do uso de anticoncepcionais e do tempo de exposição aos hormônios sexuais femininos na susceptibilidade à AR. Estudos mais recentes (LIAO; ALFREDSSON; KARLSON, 2009; PIKWER et al., 2009) afirmam que a maior prevalência da doença no sexo feminino não pode ser explicada pela exposição a esses hormônios, o que concorda com os resultados obtidos no presente trabalho ($p_{\text{menarca}} = 0,835$; $p_{\text{uso de anticoncepcional}} = 0,869$), que

não demonstraram qualquer relação entre exposição hormonal e susceptibilidade à AR.

No presente estudo, a maior parcela dos indivíduos pertence ao grupo eurodescendente (91%), refletindo o histórico de colonização do estado de Santa Catarina, que possui uma população composta principalmente por descendentes de italianos, portugueses e alemães (STELLA; LEVY, 1974).

Verificou-se que a maior parcela dos pacientes encontra-se na classe de 51-60 anos de idade. Mundialmente, o pico de incidência da AR ocorre na faixa de 60 -70 anos, ou seja, uma década mais tarde que o verificado na população do presente estudo (JEFFERY, 2010). A idade média de diagnóstico da doença foi de 43,69 ($\pm 12,56$) anos, também menor que a idade média verificada em outros estudos (MYASOEDOVA et al., 2011; HOLMQVIST et al., 2010), o que pode indicar que na população estudada a doença ocorre mais cedo ou que o período para determinação do diagnóstico é menor.

Cerca de 37% do pacientes com AR são tabagistas (37%). O cigarro é identificado como principal fator de risco ambiental para AR. Estudos indicam que fumantes apresentam um risco 2-4 vezes maior de desenvolver AR (SUGIYAMA et al., 2010). Além disso, o cigarro é indicado como preditor do desenvolvimento do FR (AHO, HELIOVAARA, 2004), o que também foi verificado na população estudada (OR= 7,824; IC95% 2,960 – 20,676 ; $p < 0,001$).

O FR é o autoanticorpo clássico na AR. Em geral, este marcador está presente em 60-80% dos pacientes com AR (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Na população estudada este autoanticorpo foi observado em 46% dos pacientes.

A positividade ao FR e ao ACPA (dados relacionados aos ACPA não foram analisados devido ao pequeno número de amostras) permite diferenciar os pacientes em dois grupos distintos, os quais variam quanto à severidade dos sintomas e efeito dos fatores genéticos e ambientais. De modo geral, o grupo de pacientes FR+ apresenta uma doença mais severa e que está relacionada a um maior número de MEAs (GOODSON; FARRAGHER; SYMMONS, 2008; DE RYCKE et al., 2004). No presente estudo o FR+ não prediz pior prognóstico; considerando a presença de MEAs ($p=0,573$) ou o desenvolvimento de erosões ósseas ($p=0,765$).

Ainda como marcador de prognóstico da doença, foi verificada a relação do tabagismo com a presença de MEAs e o desenvolvimento de erosões ósseas. Embora o cigarro seja um fator de risco bem

estabelecido para AR, particularmente em relação ao grupo soropositivo, seu efeito na severidade à doença permanece controverso (FINCKH et al., 2007).

Erosões ósseas são representativas da evolução da AR e suspeita-se que possam predizer uma doença mais severa, com maior incapacitação funcional e mortalidade (SCHETT; GRAVALLESE, 2012). Diferente da associação encontrada por Masdottir et al. (2000) e Saag et al. (1997), mas concordando com o resultado negativo apresentado por Finckh et al. (2007), no presente estudo não foi verificada qualquer relação entre tabagismo e desenvolvimento de erosões ósseas ($p= 0,194$).

Por outro lado, no presente estudo o tabagismo e o FR+ foram associados a um aumento do risco para MEAs (OR= 6,143; IC95% 1,262 – 29,895 ; $p =0,025$). Este resultado reafirma a observação de que o cigarro esteja relacionado ao desenvolvimento da AR FR + (PADYUKOV et al., 2004) e de que este grupo de pacientes apresenta um curso menos favorável da doença, com maior frequência de MEAs (AHO; HELIOVAARA, 2004).

MEAs são indicativas de uma doença mais agressiva e com pior prognóstico e ocorrem em 18-41% dos pacientes com AR (PRETE et al., 2011; TURESSON et al., 2007). No presente estudo, 41% dos pacientes apresentaram alguma MEA, sendo a Síndrome de Sjögren a mais frequente (26%). Zlatanovic (2010) observou que as manifestações oculares (dentre as quais se enquadra a Síndrome de Sjögren) estavam presentes em 27% dos pacientes com AR, valor próximo ao observado neste estudo. Outros estudos apontam os nódulos reumatoides e complicações cardíacas e pulmonares como MEAs mais frequentes (YOUNG; KODURI, 2007; TURESSON et al., 2003). Parte da discrepância observada na literatura pode ser relacionada a não padronização dos sintomas como MEAs ou comorbidades associadas. Alguns dos sintomas foram classificados como comorbidades associadas, tendo em vista que podem não se relacionar com a patogênese da AR. Destas, as mais frequentes foram: HAS, dislipidemia, osteoporose e depressão.

6.2.4 SNP *PTPN22* C1858T e Prognóstico da AR

Fatores genéticos podem influenciar o fenótipo e o curso da doença. De acordo com Lie et al. (2007) o alelo de risco do *PTPN22*

exerce influência no prognóstico da AR, predispondo a um fenótipo mais severo da doença.

Assim como verificado na população espanhola (OROZCO et al. 2005), no presente estudo o alelo 1858T não está associado ao grupo de pacientes FR+ ou a fatores indicativos de pior prognóstico, como a presença de erosões ósseas (OR=0,739; IC95% 0,156-3,494; p=0,702) ou de MEAs (OR=0,978; IC95% 0,059-16,124; p=0,987). Desse modo, a amostra de pacientes estudada não identificou o SNP *PTPN22* C1858T como marcador clínico de progressão da AR.

7. CONCLUSÕES

Ao considerar os dados apresentados neste estudo é possível observar que:

- Foi desenvolvido um sistema experimental otimizado para identificação por *High Resolution Melting* do polimorfismo C1858T do gene *PTPN22*;
- Este trabalho foi o primeiro a realizar um estudo de associação caso-controle do SNP C1858T do gene *PTPN22* na população brasileira com AR;
- O alelo 1858T do gene *PTPN22* não foi associado com a AR nessa população. A frequência do alelo T foi de 0,090 em casos e de 0,045 em controles;
- Os fatores epidemiológicos analisados no presente estudo (tabagismo e fatores hormonais) não foram associados à AR;
- Fatores relacionados ao pior prognóstico da AR (presença de MEAs e de erosões ósseas) não foram associados ao grupo de pacientes FR+;
- O hábito tabagista pode ser considerado como preditor do desenvolvimento do FR na população de pacientes com AR (OR= 7,824; IC95% 2,960 – 20,676 ; $p < 0,001$);
- Os dados clínicos e epidemiológicos obtidos no presente estudo permitiram a atualização do banco de dados de pacientes com AR do LAPOGE.

8. REFERÊNCIAS

AHO, K.; HELIÖVAARA, M. Risk factors for rheumatoid arthritis. **Annals of Medicine**, v. 36, n. 4, p. 242-251, jan. 2004.

AIHARA, M. et al. Optimizing high-resolution melting analysis for the detection of mutations of GPR30/GPER-1 in breast cancer. **Gene**, v. 501, n. 2, p. 118-26, 15 jun. 2012.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 3, p. 130-6, mar. 2005.

ALAMANOS, Y.; VOULGARI, P. V; DROSOS, A. A. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 3, p. 182-8, dez. 2006.

ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569-81, set. 2010.

ALVAREZ, et al. The Rheumatoid Arthritis-Associated Allele HLA-DR10 (DRB1*1001) Shares Part of Its Repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n.6, p. 1630-1639, 2008.

ATES, A et al. Association of the PTPN22 gene polymorphism with autoantibody positivity in Turkish rheumatoid arthritis patients. **Tissue Antigens**, v. 78, n. 1, p. 56-9, jul. 2011.

AMUR, S; PAREKH, A; MUMMANENI P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. **J Autoimmun.** 38(2-3):J254-65, 2012.

BAKER, J. F. et al. Associations between body mass, radiographic joint damage, adipokines and risk factors for bone loss in rheumatoid arthritis. **Rheumatology(Oxford, England)**, v. 50, n. 11, p. 2100-7, nov. 2011.

BEHRENS, T. W. et al. Lyp breakdown and autoimmunity. **Nature Genetics**, v. 43, p. 821-822, 2011.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**, 4ª Edição, Guanabara Koogan, 2002, 288 p.

BIANCO, B. et al. PTPN22 polymorphism is related to autoimmune disease risk in patients with Turner syndrome. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, n. 3, p. 256-9, set. 2010.

BOEHMER, H. VON; MELCHERS, F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, p. 14-20, 2009.

BOTTINI, N. et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nature Genetics**, v. 36, n. 4, p. 337-8, 2004.

BOWES, J.; BARTON, A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 47, n. 4, p. 399-402, abr. 2008.

BURN, G. L. et al. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? **FEBS Letters**, 20 abr. 2011.

CAI, Y. et al. Allele-specific extension allows base-pair neutral homozygotes to be discriminated by high-resolution melting of small amplicons. **Analytical Biochemistry**, v. 406, n. 1, p. 29-33, 1 nov. 2010.

CARLTON, V. E. H. et al. PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. **American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 4, p. 567-81, out. 2005.

CHABCHOUB, G. et al. The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase 22 gene in autoimmune thyroid diseases and rheumatoid arthritis in the Tunisian population. **Annals of Human Biology**, v. 36, n. 3, p. 342-9, 2009.

CHAGASTELLES, P. C. et al. Association between the 1858T allele of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 and type 1 diabetes in a Brazilian population. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 2, p. 144-8, ago. 2010.

CHAN, K. W. et al. The lag time between onset of symptoms and diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 37, p.814– 820, 1994.

CHO, J. H.; GREGERSEN, P. K. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 17, p. 1612-23, 2011.

COHEN, S. et al. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. **Blood**, v. 93, n. 6, p. 2013-24, 15 mar. 1999.

CULSHAW, S.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. What can the periodontal community learn from the pathophysiology of rheumatoid arthritis? **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38 Suppl 1, p. 106-13, mar. 2011.

DA MOTA, L. M. H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 52, n. 2, p. 135-174, 2012.

DELGADO-VEGA, A. M.; ANAYA, J.-M. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 6, p. 402-8, jun. 2007.

Del PUENTE et al. High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima indians. **American Journal of Epidemiology**, v. 129, n. 6, p. 1170-8, 1989.

DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 1977-90, mar. 2010.

DE RYCKE, L. et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 12, p. 1587-93, dez. 2004.

DE VRIES, R. Genetics of rheumatoid arthritis: time for a change! **Current opinion in Rheumatology**, v. 23, n. 3, p. 227-32, maio. 2011.

DIEUDÉ, P. et al. Rheumatoid arthritis seropositive for the rheumatoid factor is linked to the protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22-620W allele. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 6, p. R1200-7, jan. 2005.

DORAN, M. F. et al. The Effect of Oral Contraceptives and Estrogen Replacement Therapy on the Risk of Rheumatoid Arthritis: A Population Based Study. **Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 2, 2004.

DORIA, A. et al. Autoinflammation and autoimmunity: Bridging the divide. **Autoimmunity Reviews**, n.12, p.22-30, 2012.

EBERHARDT, K; LARSSON, B.M.; NIVED, K. Early Rheumatoid Arthritis – some Social, Economical and Psychological Aspects. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 22, n. 3, p. 119-123, 1993.

EDWARDS et al. Efficacy of B cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. **New England of Journal Medicine**, n.25, p. 2572-2581, 2004.

ELIOPOULOS, Eet al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetically homogeneous population of Crete. **Lupus**, v.20, n.5, p.501–506, 2011.

ERALI, M.; VOELKERDING, K. V; WITTWER, C. T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, n. 1, p. 50-8, ago. 2008.

FAIRWEATHER, D. Autoimmune Disease: Mechanisms. **Environment**, p. 1-6, 2007. doi: 10.1002/9780470015902.a0020193.

FARAGO, B. et al. Protein tyrosine phosphatase gene C1858T allele confers risk for rheumatoid arthritis in Hungarian subjects. **Rheumatology International**, v. 29, n. 7, p. 793-6, maio. 2009.

FARHEEN, K.; AGARWAL, S. K. Assessment of disease activity and treatment outcomes in rheumatoid arthritis. **Journal of Managed Care Pharmacy : JMCP**, v. 17, n. 9 Suppl B, p. S09-13, 2011.

FERRAZ, O. L. M.; VIEIRA, F. S. Direito à Saúde, Recursos Escassos e Equidade: Os Riscos da Interpretação Judicial Dominante. **DADOS – Revista de Ciências Sociais**, v. 52, n.1, p. 223-251, 2009.

FINCKH, A et al. Cigarette smoking and radiographic progression in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 8, p. 1066-71, ago. 2007.

GARRITANO, S. et al. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. **BMC genetics**, v. 10, p. 5, jan. 2009.

GARROD, A. B.; STOREY, G. D. Alfred Baring Garrod (1819–1907). **Rheumatology**, p. 1189-1190, 2001.

GERALD, K. **Biologia Celular e Molecular: conceitos e experimentos**, 3ª Edição, Editora Manole, 2005, 767 p.

GREGERSEN, P. K. et al. PTPN22: setting thresholds for autoimmunity. **Seminars in Immunology**, v. 18, n. 4, p. 214-23, ago. 2006.

GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune diseases-disorders of immune homeostasis. **Nature Reviews. Genetics**, v. 7, n. 12, p. 917-28, dez. 2006.

GREGERSEN, P. K.; OLSSON, L. M. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 363-91, jan. 2009.

GREGERSEN, P.K. Susceptibility Genes for Rheumatoid Arthritis. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 68, n. 3, p. 179-182, 2010.

GIBSON, N. J. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. **International Journal of Clinical Chemistry**, v. 363, p. 32-47, 2006.

GOMES, F. M. C. S. et al. PTPN22 C1858T polymorphism in women with endometriosis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 3, p. 227-32, 1 mar. 2010.

GOMEZ, L. M. et al. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 7, p. 628-631, 15 set. 2005.

GOODSON, N. J.; FARRAGHER, T. M.; SYMMONS, D. P. M. Rheumatoid factor, smoking, and disease severity: associations with mortality in rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 6, p. 945-9, jul. 2008.

GULLICK, N. J.; SCOTT, D. L. Co-morbidities in established rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 4, p. 469-83, ago. 2011.

GUNDRY, C. N. et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 396-406, mar. 2003.

HARRISON, P. et al. Effects of PTPN22 C1858T polymorphism on susceptibility and clinical characteristics of British Caucasian rheumatoid arthritis patients. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 45, n. 8, p. 1009-11, ago. 2006.

HARVEY et al. Rheumatoid Arthritis in a Chippewa Band. I Pilot screening study of disease prevalence. **Arthritis Rheumatism**, v. 24, n. 5, p. 717-21, 1981.

HASEGAWA, K. et al. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5658, p. 685-9, 30 jan. 2004.

HERNANDEZ-AVILA, M. et al. Exogenous sex hormones and the risk of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatism**, v. 33, n. 7, p. 947-953, 1990.

HERRMANN, M. G. et al. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1544-8, ago. 2007.

HILL, J. A. et al. Cutting Edge: The Conversion of Arginine to Citrulline Allows for a High-Affinity Peptide Interaction with the Rheumatoid Arthritis-Associated HLA-DRB1*0401 MHC Class II Molecule. **Journal Immunology**, n.171, p. 538-541, 2003.

HOLMQVIST, M. E. et al. Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. **Journal of Internal Medicine**, v. 268, n. 6, p. 578-85, dez. 2010.

HOOVESTOL, R. A; MIKULS, T. R. Environmental exposures and rheumatoid arthritis risk. **Current Rheumatology Reports**, v. 13, n. 5, p. 431-9, out. 2011.

IKARI, K. et al. Haplotype analysis revealed no association between the PTPN22 gene and RA in a Japanese population. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 45, n. 11, p. 1345-8, nov. 2006.

JACOB, N.; JACOB, C. O. Genetics of rheumatoid arthritis: an impressionist perspective. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 38, n. 2, p. 243-57, maio. 2012.

JEFFERY, R. C. Clinical features of rheumatoid arthritis. **Medicine**, v. 38, n. 4, p. 167-171, abr. 2010.

JOHANSSON, M. et al. PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future

onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, 2006.

KLARESKOG, L.; CATRINA, A. I.; PAGET, S. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 373, n. 9664, p. 659-72, 21 fev. 2009.

KLARESKOG, L. et al. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Seminars in immunology**, v. 23, n. 2, p. 92-8, abr. 2011.

KOKKONEN, H. et al. The PTPN22 1858C/T polymorphism is associated with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-positive early rheumatoid arthritis in northern Sweden. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 3, p. R56, jan. 2007.

KORB-PAP, A. et al. Early structural changes in cartilage and bone are required for the attachment and invasion of inflamed synovial tissue during destructive inflammatory arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, n. 6, p. 1004-11, jun. 2012.

KOTAKE Set al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **Journal Clinical Invest**, v. 103, p.1345-1352, 1999.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

KURKÓ, J. et al. Genetics of Rheumatoid Arthritis - A Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, 5 jan. 2013.

LAHIRI, M. et al. Modifiable risk factors for RA: prevention, better than cure? **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 51, n. 3, p. 499-512, mar. 2012.

LEGUERN, C. Regulatory T Cells for Tolerance Therapy: Revisiting the Concept. **Critical Review Immunology**, v. 31, n. 3, p. 189-207, 2011.

LEE, A T. et al. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 2, p. 129-33, mar. 2005.

LEIPE, J. et al. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 3, p. 93, 2005.

LIAO, K. P.; ALFREDSSON, L.; KARLSON, E. W. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 21, n. 3, p. 279-83, maio. 2009.

LIE, B. A et al. Associations between the PTPN22 1858C->T polymorphism and radiographic joint destruction in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 12, p. 1604-1609, 1 dez. 2007.

LIEW, M. et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1156-64, jul. 2004.

LINS, T. C. et al. Allele and haplotype frequency distribution in PTPN22 gene across variable ethnic groups: Implications for genetic association studies for autoimmune diseases. **Autoimmunity**, v. 43, n. 4, p. 308-16, jun. 2010.

LIU, W.; SAINT, D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, n. 2, p. 347-53, 7 jun. 2002.

MACGREGOR, A J. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 1, p. 30-7, jan. 2000.

MAINARDI-NOVO, D. T. O. **Estudo da região promotora do gene da interleucina (IL-21) e do polimorfismo do gene tirosina fosfatase, tipo não receptor 22 (PTPN22): associação com auto anticorpos em pacientes portadores de diabetes mellitos tipo 1.** São Paulo; s.n; 2011. [110] p.

MAJORCZYK, E. et al. Association of PTPN22 single nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis but not with allergic asthma. **European Journal of Human Genetics: EJHG**, v. 15, n. 10, p. 1043-8, out. 2007.

MAJORCZYK, E.; PAWLIK, A.; KUŚNIERCZYK, P. PTPN22 1858C>T polymorphism is strongly associated with rheumatoid arthritis but not with a response to methotrexate therapy. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 12, p. 1626-1629, dez. 2010.

MARTINO, A.; MANCUSO, T.; ROSSI, A. M. Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: a comparison with the TaqMan method. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 6, p. 623-9, jul. 2010.

MASDOTTIR, B. et al. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 39, n. 11, p. 1202-5, dez. 2000.

MASTANA, S. et al. Association of PTPN22 with rheumatoid arthritis among South Asians in the UK. **The Journal of Rheumatology**, v. 34, n. 10, p. 1984-6, out. 2007.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205-19, 8 dez. 2011.

MEFFRE, E.; WARDEMANN, H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 6, p. 632-638, 2008.

MERLINO, L. A et al. Estrogen and other female reproductive risk factors are not strongly associated with the development of rheumatoid arthritis in elderly women. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 2, p. 72-82, set. 2003.

MILLER, S.A; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, n.3, p.1215, 1988.

MORGAN, A. W. et al. Reevaluation of the interaction between HLA-DRB1 shared epitope alleles, PTPN22, and smoking in determining susceptibility to autoantibody-positive and autoantibody-negative rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 9, p. 2565-76, set. 2009.

MYASOEDOVA, E. et al. Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality. **Current Rheumatology Reports**, v. 12, n. 5, p. 379-85, out. 2010.

MYASOEDOVA, E. et al. Incidence of extraarticular rheumatoid arthritis in Olmsted County, Minnesota, in 1995-2007 versus 1985-1994: a population-based study. **The Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 6, p. 983-9, jun. 2011.

MUSTELIN, T.; VANG, T.; BOTTINI, N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, n. 1, p. 43-57, jan. 2005.

NORAMBUENA, P. A et al. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1308-1316, 2009.

NOTLEY, C. A; EHRENSTEIN, M. R. The yin and yang of regulatory T cells and inflammation in RA. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 10, p. 572-577, 2010.

PAIVA-CAVALCANTI, M; SILVA, R.; GOMES, YM. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537-542, 2010.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

OLIVER, J. E.; SILMAN, A. J. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, p. 1-9, 2009.

OROZCO, G. et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 1, p. 219-24, jan. 2005.

PADYUKOV, L. et al. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 10, p. 3085-92, out. 2004.

PADYUKOV, L. et al. A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 2, p. 259-65, fev. 2011.

PEDERSEN, M. et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 4, p. R133, jan. 2006.

PIERER, M. et al. Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 3, p. R75, jan. 2006.

PIKWER, M. et al. Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 4, p. 526-30, abr. 2009.

PLENGE, R. M. et al. Replication of Putative Candidate-Gene Associations with Rheumatoid Arthritis in 14,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. **American Journal of Human Genetics**, v. 77, n.6, p. 1044-1060, 2005.

POLLARD, K. M. Gender differences in autoimmunity associated with exposure to environmental factors. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, n. 2-3, p. J177-86, maio. 2012.

PRADHAN V, BORSE V, GHOSH K. PTPN22 gene polymorphisms in autoimmune diseases with special reference to systemic lupus erythematosus disease susceptibility. **Journal Postgrad Med**, v.56:239-242, 2010.

PRETE, M. et al. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 2, p. 123-31, dez. 2011.

PRUIJN, G. J.; WIIK, A.; VAN VENROOIJ, W. J. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 203, jan. 2010.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, mar. 2003.

RAYCHAUDHURI, S. et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. **Nature Genetics**, v. 44, n. 3, p. 291-6, jan. 2012.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Heredity**, 86:248-249, 1995.

REED, G. H.; KENT, J. O.; WITTWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 6, p. 597-608, jun. 2007.

REED, G. H.; WITTWER, C. T. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 1748-54, out. 2004.

RHEE, I.; VEILLETTE, A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 5, p. 439-47, maio. 2012.

RIECK, M. et al. Genetic variation in PTPN22 Corresponds to Altered Function of T and B Lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 4704-4710, 2007.

ROBINSON, P. C.; TAYLOR, W. J. Decreasing time to treatment in rheumatoid arthritis: review of delays in presentation, referral and assessment. **Int. Journal Clin. Rheumatol.**, v.6, n.2, p. 173-187, 2011.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37-45, set. 1992.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Bioinformatics Methods and Protocols- Human Press**, p. 365–386, 2000.

RUTGER PERSSON, G. Rheumatoid arthritis and periodontitis - inflammatory and infectious connections. Review of the literature. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, jan. 2012.

RUMEL, D. “Odds ratio”: algumas considerações. **Revista da Saúde Pública de São Paulo**, v. 20, n. 3, p. 253-258, 1986.

RUYSSSEN-WITRAND, A et al. New insights into the genetics of immune responses in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 2, p. 105-18, ago. 2012.

SAAG, K. G. et al. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 56, n. 8, p. 463-9, ago. 1997.

SAHIN et al., No association of PTPN22gene polymorphism with rheumatoid arthritis in Turkey. **Rheumatol. Int.**, v. 30, p. 81–83, 2009.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. **International Reviews of Immunology**, v. 24, n. 3-4, p. 211-226, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 3TH Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHETT, G.; GRAVALLESE, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 11, p. 656-64, dez. 2012.

SCOOT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 376, p. 1094-1108, 2010.

SCOTT, I. C. et al. Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 4, p. 447-68, ago. 2011.

SELDIN, M. F. et al. Finnish case-control and family studies support PTPN22 R620W polymorphism as a risk factor in rheumatoid arthritis, but suggest only minimal or no effect in juvenile idiopathic arthritis. **Genes and Immunity**, p. 720-722, 18 ago. 2005.

SIMKINS, H. M. A. et al. Association of thePTPN22 locus with rheumatoid arthritis in a New Zealand Caucasian cohort. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 7, p. 2222-2225, jul. 2005.

SILVERSTEIN, A. M. Paul Ehrlich, archives and the history of immunology. **Nature Immunol.** v. 6, p. 639, 2005.

STARK, K. et al. Association of common polymorphisms in known susceptibility genes with rheumatoid arthritis in a Slovak population using osteoarthritis patients as controls. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. R70, jan. 2009.

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

STEER et al., Association of R602W in a protein tyrosine phosphatase gene with a high risk of rheumatoid arthritis in a British population:

evidence for an early onset/disease severity effect. **Arthritis & Rheumatism**, v.52, n.1, p. 358-359, 2005.

STELLA, M.; LEVY, F.; O, M. S. F. O papel da migração internacional na evolução da população brasileira (1872 a 1972). **Revista de Saúde Pública**, v. 8, 1974.

STRAND, V.; KIMBERLY, R.; ISAACS, J. D. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 1, p. 75-92, jan. 2007.

STRITESKY, G. L.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Selection of self-reactive T cells in the thymus. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 95-114, jan. 2012.

SUGIYAMA, D. et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 1, p. 70-81, jan. 2010.

SYMMONS, D. P. M. Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 16, n. 5, p. 707-722, dez. 2002.

TAKANO, E. A et al. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. **BMC Cancer**, v. 8, p. 59, jan. 2008.

TAYLOR, P. C.; MEHTA, P.; TULL, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. **Medicine**, v. 38, n. 4, p. 163-166, abr. 2010.

TOBÓN, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. A288-92, mar. 2010.

TORRES-CARRILLO, N. M. et al. The +1858C/T PTPN22 gene polymorphism confers genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population from the Western Mexico. **Immunology Letters**, v. 147, n. 1-2, p. 41-6, set. 2012.

TOTARO, M. C. et al. PTPN22 1858C>T Polymorphism Distribution in Europe and Association with Rheumatoid Arthritis: Case-Control Study and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24292, 16 set. 2011.

TORTORA, G. J. Princípios de anatomia humana. 6ª ed., Editora Guanabara Koogan, 2008.

TURESSON, C. et al. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 8, p. 722-7, ago. 2003.

TURESSON, C. et al. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 1, p. 59-64, jan. 2007.

UHLIG, T. Special Report The History of Rheumatoid Arthritis. **Touch Musculoskeletal**, p. 145-147, 2011.

VALASEK, M. A; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151-9, set. 2005.

VAN DER HELM-VAN MIL, A H. M. et al. A high body mass index has a protective effect on the amount of joint destruction in small joints in early rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 6, p. 769-74, jun. 2008.

VAN DER HELM-VAN MIL, A. H. M.; TOES, R. E. M.; HUIZINGA, T. W. J. Genetic variants in the prediction of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 9, p. 1694-6, set. 2010.

VANG Tet al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. **Nat. Genet.**, v. 37, p. 1317–1319, 2005.

VANG, T. et al. Protein tyrosine phosphatases in autoimmunity. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 29-55, jan. 2008.

VAN OENE, M. et al. Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in

Canadian populations. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 7, p. 1993-8, jul. 2005.

VAN VENROOIJ, W. J.; VAN BEERS, J. J. B. C.; PRUIJN, G. J. M. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 7, n. 7, p. 391-8, jul. 2011.

VAZ, N. M.; PORDEUS, V. Visita à Imunologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 350-362, 2005.

VIKEN, M. K. et al. The PTPN22 promoter polymorphism -1123G>C association cannot be distinguished from the 1858C>T association in a Norwegian rheumatoid arthritis material. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 3, p. 190-7, set. 2007.

VOSSSEN, R. H. A. M. et al. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. **Human Mutation**, v. 30, n. 6, p. 860-6, jun. 2009.

WAGENLEITER, S. E. N. et al. A case-control study of tyrosine phosphatase (*PTPN22*) confirms the lack of association with Crohn's disease. **International Journal of Immunogenetics**, v. 32, p. 323-324, 2005.

WANG, S. et al., Identification of a variant form of tyrosine phosphatase LYP. **BMC Molecular Biology**, v. 11 (78), p. 1-7, 2010.

WEGNER, N. et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, v. 233, p. 34-54, 2009.

WESOLY, J. et al. The 620W allele is the PTPN22 genetic variant conferring susceptibility to RA in a Dutch population. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 46, n. 4, p. 617-21, abr. 2007.

WILSON, I. G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3741-3751, 1997.

WITTEWER, C. T. et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 6 Pt 1, p. 853-60, jun. 2003.

WITTEWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. **Human Mutation**, v. 30, n. 6, p. 857-9, jun. 2009.

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

YOUNG, A.; KODURI, G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 5, p. 907-27, out. 2007.

ZHANG, R. et al. SNP Cutter: a comprehensive tool for SNP PCR-RFLP assay design. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server issue, p. W489-92, 1 jul. 2005.

ZHANG, J. et al. The autoimmune disease-associated PTPN22 variant promotes calpain-mediated Lyp/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness. **Nature Genetics**, v. 43, n. 9, p. 902-7, set. 2011.

ZHEBRUN, D. et al. Association of PTPN22 1858T/T genotype with type 1 diabetes, Graves' disease but not with rheumatoid arthritis in Russian population. **Aging**, v. 3, n. 4, p. 368-73, abr. 2011.

ZHERNAKOVA, A et al. Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 6, p. 459-461, 5 maio. 2005.

ZIKHERMAN, J. et al. PTPN22 deficiency cooperates with the CD45 E613R allele to break tolerance on a non-autoimmune background. **Journal of Immunology**, v. 182 (7), p. 4093-4106, 2009.

ZLATANOVIC, G. et al. Ocular manifestation of rheumatoid arthritis-different forms and frequency. **Bosn. Journal Basic Med. Sci**, v.10, n.4, p. 323-27, 2010.

ANEXO A

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO

Informações aos participantes,

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos da saúde e genéticos de pacientes que desenvolveram artrite Reumatoide 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.

ANEXO B
DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

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

Florianópolis,

Assinatura: _____

RG: _____

ANEXO C



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
Reumatoide

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 Reumatoide Nódulos Reumatoides
 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 Reumatoide Nódulos Reumatoides
 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 =

Tratamento Atual: CORTICosteróides: () S () N Qual? _____
 Dose? _____ Freqüência? _____
 METOtrexato: () S () N Dose? _____
 Freqüência? _____ SULFASSALazina: () S () N Dose? _____
 Freqüência? _____
 ANTIMALárico: () S () N Qual? _____
 Dose? _____ Freqüência? _____
 CICLOFosfamida: () S () N Dose? _____ Freqüência? _____
 INFLIXÍmab: () S () N Ampolas? _____ Freqüência? _____
 ETANERcept: () S () N Ampolas? _____ 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
 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? _____

ANEXO D

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos de Pesquisa:

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

e

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

Informações:

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

Procedimentos:

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

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

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

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

Riscos:

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

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios

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

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____

ANEXO E**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

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

Florianópolis,

Assinatura: _____

RG: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____
 Cidade onde nasceu: _____
 Descendência _____ do _____ pai:
 Materna _____ Paterna _____
 Profissão: _____

Nome da mãe: _____
 Cidade onde nasceu: _____
 Descendência _____ da _____ mãe:
 Materna _____ Paterna _____
 Profissão: _____

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

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

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? () Sim () Não
 Tipo: _____

Quantidade: () menos de 30 min () 30 min () 1h () mais de 1 h
 Frequência: () 1x semana () 2-3x semana () 4-6x semana
 () Todos 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:

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª gestação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

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

TRAT. HORMONAL:

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

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

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

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

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações _____

Histórico MédicoCaso 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
 DISTÚRPIO RENAL: ()Sim () Não
 DISTÚRPIO PULMONAR: ()Sim () Não
 DISTÚRPIO 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: _____
