



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

JOSÉ EDUARDO ADELINO SILVA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA (SNP) DO GENE MYD88
COM A ARTRITE REUMATOIDE E PERFIL DE EXPRESSÃO EM
CULTURAS GENÓTIPO-GUIADAS DE MONÓCITOS**

Recife

2017

JOSÉ EDUARDO ADELINO SILVA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA (SNP) DO GENE MYD88
COM A ARTRITE REUMATOIDE E PERFIL DE EXPRESSÃO EM
CULTURAS GENÓTIPO-GUIADAS DE MONÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética. Área de concentração: Genética.

Orientadora: Prof^a Dra. Paula Sandrin Garcia

Coorientadora: Prof^a Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Silva, José Eduardo Adelino

Avaliação de polimorfismo de base única (SNP) do gene MYD88 com a artrite reumatoide e perfil de expressão em culturas genótipo-guiadas de monócitos / José Eduardo Adelino Silva– 2021.

92 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Paula Sandrin Garcia

Coorientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Polimorfismos- genética 2. Artrite reumatoide 3. Monócito I. Garcia, Paula Sandrin (orient.) II. Silva, Jaqueline Azevedo (coorient.) III. Título

576.5

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-340

JOSE EDUARDO ADELINO SILVA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA (SNP) DO GENE MYD88
COM A ARTRITE REUMATOIDE E PERFIL DE EXPRESSÃO EM
CULTURAS GENÓTIPO-GUIADAS DE MONÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em: 30/08/2017

BANCA EXAMINADORA

Dra. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Michelly Cristiny Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. André de Souza Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco

Aos pacientes com Artrite Reumatoide

Agradecimentos

A minha orientadora, Prof^a Dra. Paula Sandrin, por todo apoio, suporte, paciência e muita dedicação em todos esses anos de convivência. Sua contribuição na minha vida acadêmica é formidável. Obrigado por me ensinar a fazer pesquisa por vocação, sempre pautado na ética, respeito, compromisso e estabelecimento de parcerias

A minha co-orientadora, Prof^a Dra. Jaqueline de Azevêdo, pelo estímulo para realizar a parte funcional deste trabalho .

Aos meus pais, Carlos e Edilene, e meus irmãos Henrique e Lucas por todo suporte que me foi dado até hoje. Agradeço também por sempre acreditar nos meus sonhos e pela imensa contribuição em torná-los realidade

Ao grupo de Autoimunidade. Em especial a Camilla pela amizade, dedicação e suporte estatístico para realização deste e de outros trabalhos e a Suelen, pela presença em todos os momentos deste mestrado e pelo auxílio nos experimentos de expressão gênica.

Aos alunos de iniciação científica Matheus Mesquita e Werbson Guaraná pela convivência, menção honrosa e elogios recebidos ao apresentar trabalhos em congressos. Vocês são incríveis! Muito obrigado pela confiança! Também agradeço a Hugo Kenji e Vanessa pela contribuição na obtenção de voluntários na etapa final do mestrado. Vocês nem imaginam o quanto foram importantes para mim. A vocês minha sincera gratidão.

Ao Prof. Fabrício de Oliveira Souto e Daniel Siqueira pela disponibilidade, ajuda e suporte material e operacional na citometria de fluxo.

A Victor Passos pelo auxílio na interpretação dos dados de citometria de fluxo

A Thaysa Lopes e Juliana Gonçales, do Setor de Virologia do LIKA, pelo auxílio durante a realização do ELISA

A todos os voluntários que participaram deste trabalho como paciente ou controle. Obrigado por acreditar e confiar no nosso trabalho!

A equipe médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Prof^o Dr. Paulo Louzada e Dr. Renê Donizeti, pelas amostras e informações clínicas dos pacientes e controles do estado de São Paulo

A equipe médica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz: Dra. Maria Helena Mariano e Eliézer Rushansky

Ao Prof José Arthur Bogo Chies, Prof. Tiago Degani Veit e Dra. Priscila Vianna, do Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela acolhida em Porto Alegre e parceria científica

A Wlisses e Moézio pela ajuda durante a disciplina de Genética Molecular

Aos incríveis colegas de trabalho/amigos que convivi durante esses anos no grupo de pesquisa Patologia Molecular e Medicina Genômica: Éden Arthur, Madson Aragão, Jéssyca Kalyne, Jeanne Freitas, Ronaldo Celerino, Anna Paula, Vanessa, Ariane, Leandro Andrade, Emily, Jeyzon, Isaura, Larissa, Neyla, Almerinda, Malu, Heitor e Fran. Agradeço por tornar o ambiente de trabalho dinâmico, leve e produtivo. Obrigado por tornar meus dias melhores!

A Bárbara por todos esses anos de amizade, conselhos e companheirismo.

Aos colegas que me acompanham desde a graduação: Isabela e Joanna

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami pelo fornecimento de toda infraestrutura necessária para realização deste trabalho

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FACEPE

Foco. Estratégia. Paciência.

(O autor)

RESUMO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune que acomete articulações sinoviais. A MyD88 atua como proteína adaptadora, mediando a via TLRs (*Toll Like Receptors*) e a transcrição para citocinas envolvidas na doença. Assim, é possível que polimorfismos no *MYD88* possam estar envolvidos nos processos funcionais do gene, e conseqüentemente na produção de Interleucina 1 β (IL1 β). Este estudo avaliou se existe associação entre o polimorfismo rs6853 no *MYD88* e o possível impacto funcional dele no desenvolvimento da doença. Pacientes com AR e indivíduos saudáveis (424 e 356, respectivamente) dos estados de Pernambuco e São Paulo, foram genotipados para o polimorfismo rs6853 [A>G]. A análise funcional consistiu da avaliação da expressão gênica de cultivo celular de monócitos de indivíduos com os genótipos AA, AG e GG, e também da avaliação da secreção de IL1 β realizada por ELISA. O polimorfismo rs6853 foi associado com menor suscetibilidade à AR em ambas as populações estudadas. O genótipo GG mostrou-se 4 vezes mais expresso que o RNAm do genótipo AA, quando estimulado com LPS, simulando o processo de inflamação. Entretanto, a dosagem de IL1 β apresentou níveis mais elevados para o genótipo AA (44,83 pg/mL) comparado ao GG (8,33pg/mL), sinalizando que algum mecanismo de regulação da expressão gênica regulou a alta quantidade de mRNA do genótipo GG na condição estimulada. Este estudo sugere, pela primeira vez, a participação do polimorfismo rs6853 no processo de desencadeamento da AR.

Palavras-chave: *MYD88*; autoimunidade; monócitos; interleucinas

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects synovial joints. MyD88 acts as an adapter protein, mediating the TLR (*Toll Like Receptors*) pathway inducing transcription for cytokines involved in the disease. Thus, it is possible that polymorphisms in *MYD88* may alter the transcriptional profile of *MYD88*, and consequently in the production of Interleukin 1 β (IL1 β). This study evaluated the possible association between rs6853 polymorphism in *MYD88* and its possible functional impact on the development of the disease. Patients with RA and healthy individuals (424 and 356, respectively) from the states of Pernambuco and São Paulo, were genotyped for rs6853 polymorphism [A> G]. The functional analysis consisted of the evaluation of the cell culture gene expression of monocytes from individuals with the AA, AG and GG genotypes, as well as the evaluation of IL1 β secretion performed by ELISA. The rs6853 polymorphism was associated with lower susceptibility to RA in both studied populations. The GG genotype was shown to be 4 times more express than the AA genotype mRNA when stimulated with LPS, simulating the inflammation process. However, the IL1 β dosage showed higher levels for the AA genotype (44.83 pg / mL) compared to GG (8.33pg / mL), signaling that some mechanism of regulation of gene expression regulated the high amount of mRNA from GG genotype in the stimulated condition. This study suggests, for the first time, the participation of the rs6853 polymorphism in the process of RA triggering.

Keywords: *MYD88*; autoimmunity; monocytes; interleukins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Manifestação articular clássica da AR: dedos em forma de pescoço de cisne.....	17
Figura 2 – O quadro a seguir mostram critérios para classificação diagnóstica da AR.....	19
Figura 3 – Representação da conversão do aminoácido arginina para citrulina.....	20
Figura 4 – Imagem clássica de um fator reumatoide: Anticorpo IgM dirigido à porção Fc da imunoglobulina G.....	22
Figura 5 – Esquemática do início da AR.....	23
Figura 6 – Os fibroblastos sinoviais contribuem para fisiopatologia da AR através da redução da apoptose.....	25
Figura 7 – Estágios do dano ósseo na artrite reumatoide.....	26
Figura 8 – O papel dos macrófagos na AR.....	28
Figura 9 – Panorama histórico de polimorfismos de susceptibilidade à AR identificados.	32
Figura 10 – A via dos receptores do tipo <i>Toll</i> (adaptado de Wang 2014).....	36
Figura 11 – localização do gene <i>MYD88</i>	37
Figura 12 – <i>Dot plot</i> por densidade da região dos monócitos com aumento de 1000 vezes.....	52
Figura 13 – Estratégia de <i>gate</i> utilizando SSC e CD45 para determinar células positivas para CD45.....	52
Figura 14 – Histograma representando a população relativa de células positivas para CD45 que também expressam CD14.....	53
Figura 15 – <i>Dot plot</i> representativo das subpopulações de monócitos.....	53
Figura 16 – Histograma representativo da intensidade média de fluorescência para o marcador CD14.....	54
Figura 17 – Expressão do <i>MYD88</i> em relação aos genótipos.....	55
Figura 18 – Produção total de IL1 β a partir de cultivo de monócitos.....	56
Figura 19 – Produção total de IL1 β a partir de cultivo de monócitos com estratificação para os genótipos.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Par de primers para detecção do mRNA do gene MYD88	46
Tabela 2 – Caracterização das populações de estudo.....	49
Tabela 3 – Distribuição alélica e genotípica e análises estatísticas para o polimorfismo rs6853 na população de Pernambuco.....	51
Tabela 4 – Distribuição alélica e genotípica e análises estatísticas para o polimorfismo rs6853 na população de São Paulo.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Epidemiologia	15
3.2 Manifestações Clínicas	16
3.3 Classificação diagnóstica da AR	17
3.3.1 O mecanismo de citrulinação e os autoanticorpos	19
3.4 Imunopatologia	22
3.4.1 O papel dos monócitos e macrófagos na AR	27
3.5 Fatores Genéticos da AR	29
3.5.1 Agregação familiar	29
3.5.2 MHC de Classe II	30
3.5.3 Genes fora do MHC de classe II	31
3.5.2 Genes das Citocinas	32
3.5.3 A via dos receptores do tipo <i>Toll</i>	35
3.5.4 Gene MYD88.....	37
4 MATERIAS E MÉTODOS	40
4.1 Recrutamento de pacientes com Artrite Reumatoide	40
4.2 Recrutamento de indivíduos saudáveis	41
4.3 Comitê de Ética	41
4.4 Coleta de sangue, extração e quantificação do DNA genômico	42
4.5. Seleção do polimorfismo de base única (SNP)	42
4.6 Genotipagem	43
4.7 Isolamento de células mononucleares e cultivo de monócitos genótipo guiados	43

4.8	Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	44
4.9	Extração de RNAm e síntese de cDNA	45
4.10	Desenho e validação de <i>primers</i> para avaliação da expressão gênica	46
4.11	PCR em Tempo Real quantitativa	47
4.12	Avaliação da Expressão Gênica	47
4.13	Quantificação de IL1 β	48
4.14	Análises estatísticas	48
5.	RESULTADOS.....	48
5.1	População de estudo	48
5.2	Associação alélica e genotípica com a AR	49
5.3	Imunofenotipagem dos monócitos	51
5.4	Análise da expressão gênica	54
5.5	Dosagem de IL-1 β do sobrenadante de cultura.....	55
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
	ANEXO I - Artigo publicado na revista Scandinavian Journal of Rheumatology.	74
	ANEXO II - Artigo publicado na revista Rheumatology.....	77
	ANEXO III – Parecer do Comitê de Ética das amostras do Estado de São Paulo	79
	ANEXO IV – Parecer do Comitê de Ética das amostras de Pernambuco ..	80
	ANEXO V – Curva de calibração do ELISA	81
	ANEXO VI – Eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do RNA de cultura	82
	ANEXO VII - Currículo Lattes referente ao período do mestrado.....	83

1 INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune de caráter inflamatório que acomete 1% da população mundial. De etiologia desconhecida, a AR é classificada como doença multifatorial, pois fatores genéticos, ambientais e imunológicos possuem papel relevante na imunopatologia da doença. Esse distúrbio é uma artropatia de evolução crônica e de alta morbidade em decorrência das deformidades ósseas. Dessa forma, é importante ressaltar que os pacientes com AR possuem diminuição da capacidade laboral, gerando impactos na vida pessoal e social, além dos impactos previdenciários para a economia.

A AR é uma doença caracterizada pela inflamação e espessamento da membrana sinovial, denominado *pannus*, provocada pela perda da capacidade de apoptose dos fibroblastos sinoviais. Na articulação de um paciente acometido pela AR, ocorre a formação de vasos sanguíneos por onde leucócitos migram para o interior da articulação. O *pannus* é responsável pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, moléculas essenciais para manutenção do estado inflamatório. Estas citocinas são produtos de ativação da via dos receptores do tipo *Toll* que estão cronicamente ativados em pacientes com AR.

Os fatores genéticos envolvidos na AR incluem principalmente os polimorfismos da base única (SNPs). Estas variantes genéticas, quando associadas à doença, podem representar importantes marcadores tanto para susceptibilidade quanto para o prognóstico da doença. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se a variação genética rs6835 [A>G] no gene MYD88, que produz uma proteína adaptadora MYD88, pode contribuir para a susceptibilidade à AR, além de observar em modelos celulares de monócitos a influência desse SNP no perfil de expressão gênica do MYD88 e, conseqüentemente, a participação do gene nas vias de sinalização da resposta imune, gerando um maior conhecimento em relação ao desenvolvimento da AR, que poderão futuramente ser utilizados para o desenvolvimento de ensaios farmacogenéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar a possível associação de polimorfismo no gene MYD88 com a susceptibilidade à artrite reumatoide e a sua modulação na expressão gênica.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar polimorfismos e determinar as frequências alélicas e genóticas para esses SNPs no gene MYD88 em pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle;
- Avaliar a possível associação destes polimorfismos com a susceptibilidade à artrite reumatoide e com os índices clínicos da doença, como: DAS28, HAQ, CDAI e positividade para FR;
- Avaliar se os polimorfismos estudados alteram o perfil de expressão do gene MYD88 em culturas de monócitos genótipo guiadas;
- Mensurar a interleucina 1 β no sobrenadante de cultivo dos monócitos genótipo guiadas e correlacionar com o perfil transcricional de MYD88

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia

A Artrite Reumatoide (AR) é a artrite inflamatória mais comum e que causa maior incapacidade funcional, sendo associada com alta morbidade e mortalidade. A expectativa de vida dos pacientes com AR é cerca de 3 a 10 anos menor que na população em geral.

A incidência e prevalência da AR é variável entre populações diferentes. A prevalência tanto no Norte da Europa quanto na América do Norte é mais alta que no Sul da Europa, sendo 0,5% a 1,1% e 0,3% a 0,7%, respectivamente. No Brasil, estudos de prevalência mostram uma variação entre 0,2% e 1%. Quanto à incidência, na América do Norte e no Norte da Europa, varia entre 20 a 50 casos/100.000 habitantes/ano (CARMONA et al., 2010), enquanto no Sul da Europa essa taxa é mais baixa, entre 9 a 24 casos/100.000 habitantes/ano. Não há estudos de incidência da doença no Brasil. Essa diferença entre as taxas de prevalência e incidência nas diferentes regiões do mundo deve-se principalmente às variações genéticas, populacionais e ambientais (ALAMANOS; VOULGARI; DROSOS, 2006; CARMONA et al., 2010; TOBÓN; YOUINO; SARAUX, 2010).

Assim como outras doenças autoimunes, a AR é mais comum em mulheres do que em homens, na proporção de 4:1. Em um estudo realizado no estado do Piauí, foi observada a relação de 8 mulheres para cada homem afetado pela doença (ALMEIDA; ALMEIDA; BERTOLO, 2014). Em contrapartida, em estudo retrospectivo realizado por Louzada-Júnior et. al (2007) no estado de São Paulo, foi observada uma relação de 5:1. Em um estudo mais recente, realizado na cidade de Cascavel (Paraná), a relação encontrada foi semelhante à do estado de São Paulo, com a proporção de 5,3 mulheres para cada homem afetado (MAXIMIANO DAVID et al., 2013). Dessa forma, os estudos brasileiros estão em concordância com os estudos internacionais, onde as mulheres são mais acometidas pela AR que os homens (LOUZADA-JUNIOR et al., 2007).

A forma infantil da doença, denominada Artrite Idiopática Juvenil (AIJ), acomete crianças e adolescentes até 18 anos de idade. Nos Estados Unidos, é

a segunda doença mais frequente do tecido conectivo na infância, com prevalência de 7 a 400 casos/100.000 crianças e incidência de 0,8 a 22,6/100.000/ano (MANNERS; BOWER, 2002).

Aproximadamente 55% dos pacientes com AR estão em idade laboral, portanto, a doença também exerce impacto no sistema público de saúde (SUS), na previdência social e na economia do país. Um indivíduo com AR possui redução na produtividade laboral, afetando aproximadamente 16-20% dos homens e 25-37% das mulheres nesta fase da vida. Neste caso, os pacientes necessitariam de 1,15 horas extra por dia para realizar todas as atividades laborais. Outro fator que merece destaque é o risco elevado de desemprego em indivíduos com AR, que atinge 1,2 a 3,4 vezes quando comparada à população não portadora de doenças autoimunes (Moli 2013).

A AR corresponde a dois terços dos pacientes com alguma incapacidade funcional. O perfil de pacientes com AR que possui alguma incapacidade também varia durante o curso da doença atingindo até 15% no primeiro ano, entre 20 e 40% até os 3 anos e 50-60% até 10 anos após o desenvolvimento da doença. O percentual ainda é maior após esse período com 80% após 15 anos e 90% após 30 anos de desenvolvimento da AR (GRONDAL et al., 2008).

Devido aos custos diretos e indiretos, e ao aumento da expectativa de vida da população, a AR pode ser considerada uma doença de alto custo. Em um estudo realizado no estado de Santa Catarina no ano de 2010, o custo médio de um indivíduo com AR para o SUS foi de R\$ 19.860,16, sendo o SUS responsável pelo pagamento de 73,6% do total desse valor. Deste valor, 90,8% corresponde à aquisição de medicamentos; 2,5% às hospitalizações; 2,2% aos exames complementares e 2,1% às consultas médicas periódicas. Esta despesa é maior que o Produto Interno Bruto (PIB) *per capita*, que foi de R\$ 19.016,00 naquele mesmo ano (GOMES et al., 2017).

3.2 Manifestações Clínicas

O curso clínico da AR é variável, apresentando períodos de doença ativa e de remissão. Os primeiros sintomas da doença são: fadiga, mal-estar, dor musculoesquelética generalizada, e, após semanas ou meses, envolvimento

das articulações. É importante ressaltar que as manifestações clínicas da AR são divididas em articulares e extra-articulares (GOELDNER et al., 2011).

As manifestações articulares da AR podem ser reversíveis durante a fase inicial da doença, porém, as alterações relacionadas ao dano cumulativo da doença são irreversíveis, pois significa que danos aos componentes das articulações foram estabelecidos. Nesses indivíduos, as articulações apresentam-se edemaciadas, quentes e dolorosas, caracterizando a poliartrite simétrica. Geralmente o acometimento articular é simétrico e as pequenas articulações são afetadas antes das maiores. Além disso, uma grande particularidade da AR é a rigidez matinal; este sintoma é sugestivo de AR quando tem duração maior que 60 minutos (DAVID et al., 2013).

Sem o diagnóstico precoce e tratamento inicial, a evolução da doença é progressiva e leva a deformidades nos ossos, cartilagens, cápsula articular e tendões (GOELDNER et al., 2011). Em fases mais tardias ocorre ainda desvio radial do punho e ulnar dos dedos, caracterizando a deformidade clássica da doença que são os dedos em forma de pescoço de cisne (Figura 1).

Figura 1 – Manifestação articular clássica da AR: dedos em forma de pescoço de cisne



Fonte: Revista Brasileira de Medicina

3.3 Classificação diagnóstica da AR

A classificação diagnóstica da AR é realizada através de achados clínicos e exames laboratoriais. Até 2010, a classificação era baseada nos critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR), estabelecidos em 1987. Esses critérios, no entanto, eram eficientes para diagnosticar apenas a AR bem estabelecida, pois incluíam alterações radiográficas e nódulos reumatóides, entretanto eram ineficientes para identificação da AR inicial. Visando diminuir o tempo de diagnóstico e a rápida intervenção terapêutica,

novos critérios foram estabelecidos em 2010 pelo ACR juntamente com a Liga Europeia de Combate ao Reumatismo (EULAR) (ALETAHA et al., 2010), onde dados laboratoriais de atividade inflamatória e sorologia foram adicionados a esses critérios. Os dados laboratoriais exigidos para diagnosticar e avaliar a atividade da doença são as provas de atividade inflamatória, avaliadas pela velocidade de hemossedimentação (VHS) e dosagem da proteína C reativa (PCR). Já os dados sorológicos envolvem a positividade para o fator reumatoide (FR) e para a produção de autoanticorpos contra peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), que serão explicados com detalhe na próxima seção 2.2.1. (ALETAHA et al., 2010).

Para ser avaliado pelos critérios classificatórios do ACR/EULAR 2010, o paciente deve apresentar sinovite clínica ativa no momento da avaliação em pelo menos uma articulação. Além disso, esses critérios serão aplicáveis apenas aos pacientes cuja sinovite não possa ser explicada por outros diagnósticos. Os critérios atuais baseiam-se em um sistema de pontuação através de escore de soma direta, onde as manifestações são divididas em quatro eixos: acometimento articular (0-5), sorologia (0-3), duração dos sintomas (0-1) e provas de atividade inflamatória (0-1). Nesse aspecto, um paciente é classificado como tendo AR quando a pontuação mínima de 6 pontos é atingida. (ALETAHA et al., 2010) (Figura 2).

Figura 2 - O quadro a seguir mostram critérios para classificação diagnóstica da AR

Critérios	Pontuação	
A	Envolvimento articular – por envolvimento entende-se edema ou sensibilidade à palpação, que pode ser confirmado por exames de imagem. Excluem-se: interfalanganas distais, primeira carpometacarpiana e primeira tarsometatarsiana	
	• 1 articulação grande (cotovelos, ombros, joelhos, coxofemorais e tornozelos)	0
	• 2-10 articulações grandes (cotovelos, ombros, joelhos, coxofemorais e tornozelos)	1
	• 1-3 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalanganas, interfalanganas proximais, segunda a quinta metatarsofalanganas, interfalanganas do hálux e punhos	2
	• 4-10 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalanganas, interfalanganas proximais, segunda a quinta metatarsofalanganas, interfalanganas do hálux e punhos	3
	• + 10 articulações (com pelo menos uma articulação pequena incluída)	5
B	Sorologia – o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação	
	• FR negativo e anti-CCP negativo (valores inferiores ou iguais ao limite fornecido pelo laboratório)	0
	• FR positivo fraco ou anti-CCP positivo fraco (valores positivos fracos = até três vezes o limite positivo fornecido pelo laboratório)	2
	• FR fortemente positivo ou anti-CCP fortemente positivo (valores fortemente positivos = três vezes acima do limite positivo fornecido pelo laboratório)	3
C	Reagentes de fase aguda – o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação	
	• PCR e VHS normais	0
	• PCR ou VHS alterados	1
D	Duração dos sintomas autorreferidos pelo paciente	
	• < 6 semanas	0
	• ≥ 6 semanas	1

Fonte: Goeldner et al., (2011)

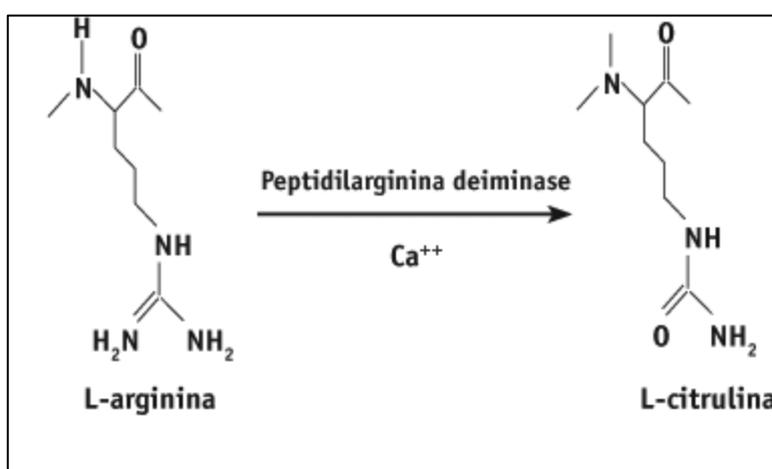
3.3.1 O mecanismo de citrulinização e os autoanticorpos

A presença de proteínas citrulinadas foi inicialmente relatada como um processo presente em tecidos inflamatórios (DARRAH et al., 2013; VIATTE et al., 2016). Peptídeos citrulinados foram detectados em amostras de biópsia sinovial de pacientes com AR, enquanto que a biópsia sinovial de indivíduos saudáveis exibiram quantidades escassas desses peptídeos, sugerindo um possível papel da citrulinização na AR (ANZILOTTI et al., 2010).

A citrulinização é a modificação pós-traducional do aminoácido arginina pelo aminoácido citrulina catalisada pelas peptidildeaminases (PADs) dependentes de cálcio. Cada aminoácido convertido leva a um aumento de massa de 0,984 Da e a perda de carga positiva da arginina (Figura 3) A alteração na carga da arginina provoca uma mudança significativa na acidez da cadeia lateral do aminoácido, alterando, dessa forma, o ponto isoelétrico (pI) de 11,41 para 5,91. Além disso, ela pode influenciar a capacidade de formação de

ligações de hidrogênio e interações com outros aminoácidos. Assim, é possível que uma alteração conformacional possa ocorrer e, conseqüentemente, uma eventual alteração funcional, resultando no aumento da meia-vida da proteína constituída pela citrulina ao invés da arginina. Essa alteração irá aumentar conseqüentemente a imunogenicidade das proteínas, através do reconhecimento das células apresentadoras de antígeno, desencadeando, dessa forma, uma reação autoimune (VALESINI et al., 2015).

Figura 3 -- Representação da conversão do aminoácido arginina para citrulina. A reação é catalisada pelas enzimas PAD. Esta conversão leva à mudança na estrutura terciária dos peptídeos citrulinados.



Fonte: Adaptado de Alarcon et. al (2007).

No contexto da AR, a citrulinização está relacionada com a produção de autoanticorpos contra peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP). Estes anticorpos apresentam especificidade de 90% para AR (PAYET et al., 2014), podendo prever o desenvolvimento da doença até 10 anos antes do início dos sintomas. Com isso, os anti-CCPs se tornaram importantes biomarcadores clínicos da AR, sendo inseridos desde 2010 como um dos critérios de diagnóstico pelo ACR/EULAR (ALETAKHA et al., 2010). Outro fator importante na positividade do anti-CCP é o seu valor prognóstico, uma vez que a positividade para o anti-CCP está relacionada ao pior prognóstico da doença, sendo que esses pacientes terão maior frequência de consultas e necessitará de um tratamento mais agressivo para controlar a doença (VAN DER HELM-VAN MIL et al., 2005).

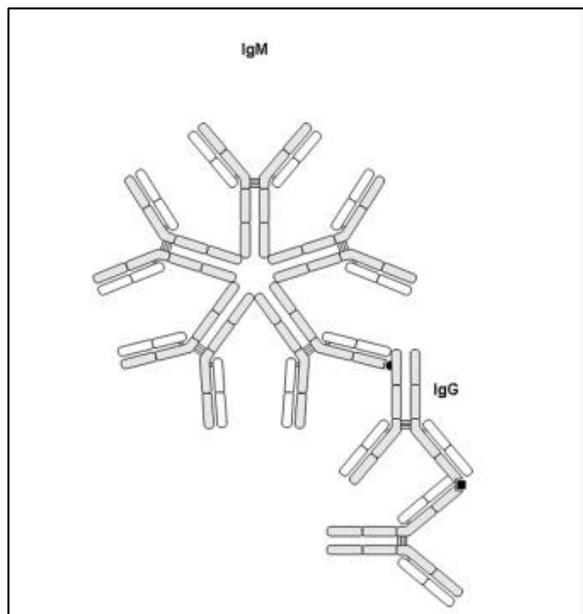
A estreita associação entre a taxa de destruição das articulações e a positividade para o anti-CCP ocorre devido à presença aumentada de células B produtoras do anti-CCP no fluido sinovial, sugerindo a produção local de anti-CCP no interior das articulações (SNIR et al., 2010). Esses anticorpos formam imunocomplexos com as proteínas citrulinadas, e levam ao recrutamento de células que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, atuando no início da reação autoimune que desencadeia a AR (ROOS et al., 2016).

Embora o anti-CCP seja considerado o melhor teste diagnóstico para a AR, seu custo é elevado, inviabilizando o acesso desta ferramenta diagnóstica pelos pacientes do SUS. Por essa razão, o Fator Reumatoide (FR) é o mais usual para a classificação diagnóstica da AR atualmente.

O FR corresponde a uma classe de autoanticorpos dirigidos contra a região Fc da imunoglobulina G (Figura 4). Porém alguns isotipos de IgM, IgA, IgE e IgD também são detectados. O FR é detectado em até 52% dos pacientes com AR, mas em menos de 5% dos pacientes com outras doenças do tecido conjuntivo. Além disso, a presença de isotipos IgA e IgG-RF na ausência de IgM-RF é mais prevalente em pacientes com doenças do tecido conjuntivo do que nos pacientes com AR, ao passo que um aumento nos RFs IgM e IgA é quase exclusivamente observado em pacientes com AR. A especificidade IgM-RF aumenta consideravelmente em títulos elevados (BAX; HUIZINGA; TOES, 2014)

Apesar de sua baixa sensibilidade e especificidade, os FRs foram inicialmente detectados em pacientes com AR, mas também podem ser encontrados em pacientes com outras doenças autoimunes e não-autoimunes, assim como em indivíduos saudáveis (SONG; KANG, 2010). O FR parte da propedêutica para o diagnóstico diferencial de artropatias. Na prática clínica, é recomendada a dosagem de anti-CCP e fator reumatoide juntos, pois os dois marcadores melhoram a precisão do diagnóstico, em especial no caso da artrite (INGEGNOLI; CASTELLI; GUALTIEROTTI, 2013).

Figura 4 – Imagem clássica de um fator reumatoide: Anticorpo IgM dirigido à porção Fc da imunoglobulina G

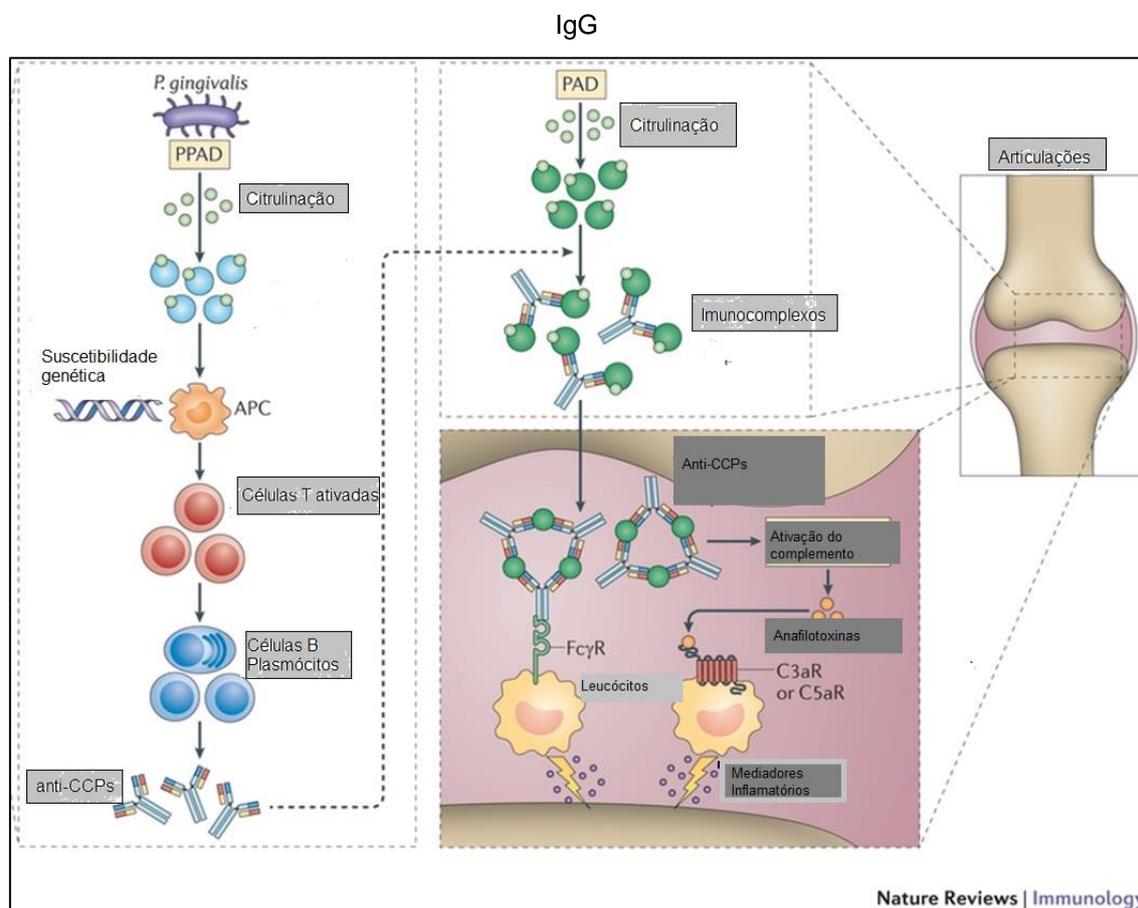


3.4 Imunopatologia

As doenças autoimunes são caracterizadas pela falha nos mecanismos de tolerância imunológica através da supressão de células e moléculas reguladoras, além de apresentar uma resposta imune exacerbada dirigida a antígenos próprios. Essas alterações desempenham papel central na imunopatologia da AR. Nesse contexto, é válido analisar como as células e moléculas próinflamatórias contribuem para a imunopatologia da AR (RAMÍREZ et al., 2016).

Acredita-se que o início da AR ocorra com a detecção dos peptídeos citrulinados em indivíduos geneticamente suscetíveis. A citrulinação pode ocorrer mediante peptidil deaminases (PADs), que são enzimas presentes na *P. gingivalis*, bactéria causadora da gengivite. Em humanos, a PADI4 também está relacionada com o aumento da citrulinação. Esse mecanismo pode formar neoepítotos, acarretando a formação dos anti-CCPs (Figura 5) (KOZIEL; MYDEL; POTEMPA, 2014).

Figura 5 – Esquemática do início da AR. Em indivíduos geneticamente suscetíveis, peptídeos citrulinados são apresentados por células apresentadoras de antígenos para ativar células T, e por sua vez, induzir as células B a produzirem anticorpos dirigidos aos peptídeos citrulinados. O anti-CCP se liga a peptídeos citrulinados formando imunocomplexos que, por sua vez, podem mediar inflamação sinovial por ativar o sistema complemento e receptores de



As células circulantes da sinóvia detectam imunocomplexos, conduzindo a um aumento da vasopermeabilidade preferencialmente nas extremidades distais. Posteriormente, o aumento da permeabilidade vascular permite o influxo de células inflamatórias para os tecidos articulares (A. HITCHON; EL-GABALAWY, 2011). É conhecido que os complexos imunitários estão presentes no sangue e no fluido sinovial de pacientes com AR estabelecida, mas o seu papel nas fases iniciais da doença ainda não está bem elucidado. As células dendríticas (CD) são fundamentais para a imunidade inata e podem iniciar e/ou perpetuar a sinovite, apresentando antígenos artritogênicos aos componentes do sistema imune adaptativo. A ativação e maturação de CD ocorre após a exposição a agentes microbianos, incluindo produtos de vírus e bactérias, além de citocinas, imunocomplexos e até mesmo

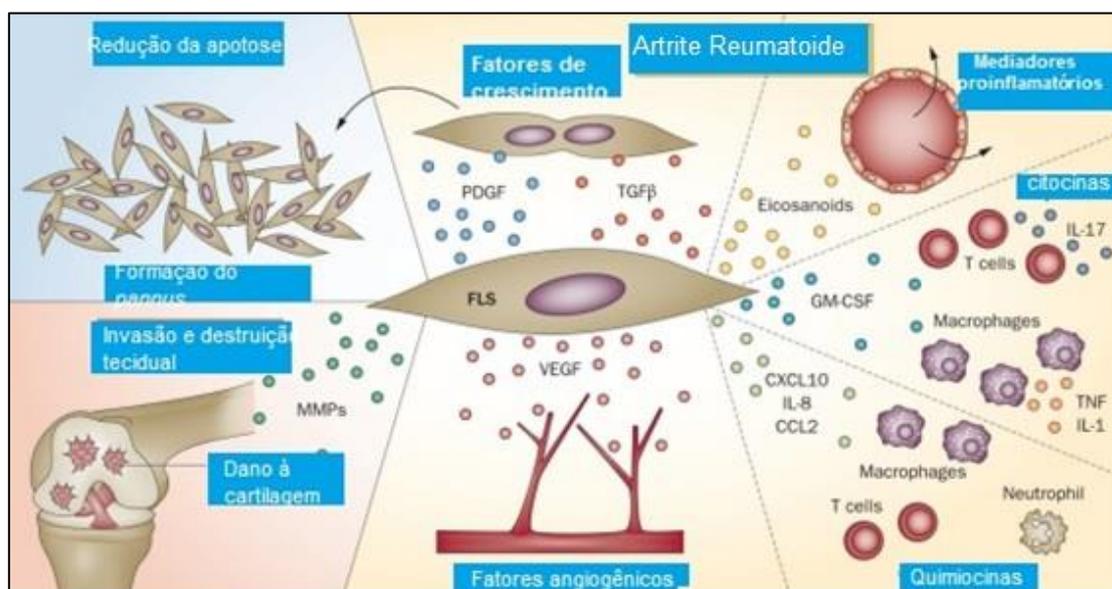
a interrupção do contato célula-célula. As células dendríticas expressam quimiocinas e o TLR9 e estão em maior quantidade na AR, principalmente nos soropositivos para o FR e anti-CCP. Essas células também secretam IL-18 e IL-15, que terão seus papéis discutidos adiante, além de IL-23, que promove a expansão das células Th17 (LEBRE et al., 2008).

Os fibroblastos sinoviais são predominantes na sinóvia de pacientes com AR. Este tipo celular é ativado através dos receptores do tipo *Toll* no estágio inicial de ativação sinovial por componentes microbianos, ligantes endógenos ou até mesmo RNA oriundo de células que sofreram necrose no fluido sinovial (OSPELT et al., 2008). Nos fibroblastos sinoviais, os TLRs levam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-18, que promovem a quimiotaxia de monócitos para o interior da articulação. Além disso, a resposta Th1 promove o aumento da expressão de I-CAM e V-CAM, além de metaloproteinases nos fibroblastos sinoviais (HU et al., 2014).

As metaloproteinases (MMPs) são endopeptidases que estão envolvidas na remodelação tecidual. Sua atividade catalítica é finamente regulada pelos inibidores de metaloproteinases de matriz (TIMPs). Citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α e IL1 β , assim como fatores de crescimento induzem a expressão de MMPs via ativação transcricional. Os efeitos específicos de diferentes citocinas na expressão das metaloproteinases dependem do tipo celular e da via de transdução de sinal ativada (ZEISEL et al., 2005)

Os fibroblastos sinoviais também secretam IL-32, uma citocina que induz a expressão de TNF α , IL-1 e IL18 por macrófagos e células dendríticas (Brentano et al 2005). A Figura 6 esquematiza as principais funções dos fibroblastos sinoviais na imunopatologia da AR.

Figura 6 – Os fibroblastos sinoviais contribuem para fisiopatologia da AR através da redução da apoptose (formando o *pannus*), além de estimular a produção de proteases que degradam a matriz extracelular e promovem invasão da cartilagem. Além disso, são capazes de produzir uma variedade de moléculas que modulam o crescimento, a inflamação, a angiogênese e o recrutamento celular, e induzem a ativação e a produção de citocinas por células imunitárias



Fonte: Adaptado de Bottini (2013).

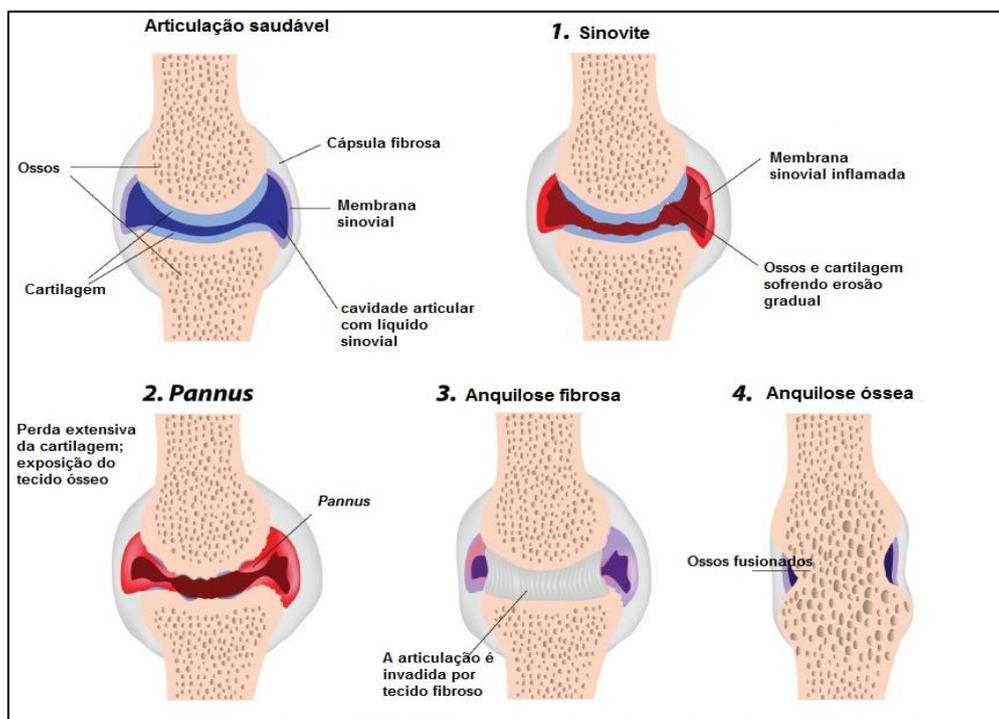
A presença de angiogênese é outra característica fundamental na fisiopatologia da AR. Ela ocorre na fase inicial da doença, ainda assintomática. Diversos fatores pro-angiogênicos são expressos pelos fibroblastos sinoviais, como a IL-18, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento básico para fibroblastos e TGF β (fator de crescimento tumoral β) (HITCHON et al., 2002). Esse mecanismo leva à infiltração de células mononucleares, promovendo a hiperplasia da membrana sinovial, contribuindo para a formação do *pannus* (BAETEN et al., 2000; MUZ et al., 2009)

A formação do *pannus* e a hiperplasia sinovial são características marcantes da AR causadas pela proliferação de fibroblastos e infiltração de células do sistema imune. O *pannus* é um tecido edemaciado, rico em vasos sanguíneos e formado a partir dos fibroblastos sinoviais que não sofreram apoptose. Estes eventos dependem do recrutamento de leucócitos, da ativação de células, e da produção de mediadores inflamatórios e proteinases, os quais, eventualmente, desencadeiam danos aos tecidos ósseo e cartilaginoso. Uma ampla variedade de células tem sido observada nas articulações de pacientes

com AR, incluindo os monócitos, macrófagos, células T CD4, células T CD8, células B, células NK, células T $\gamma\delta$, mastócitos e fibroblastos sinoviais. Diversos mediadores produzidos por estas células têm sido correlacionados com a progressão da doença e/ou a gravidade de RA, como por exemplo: o FR, os anti-CCP, TNF α , e as interleucinas 6, 1, e 17A (ROBERTS; DICKINSON; TAAMS, 2015).

Uma das principais consequências da formação do *pannus* é a aderência e consequente destruição da matriz extracelular. Este mecanismo ocorre através do aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície dos fibroblastos, que intensificam sua interação, seus produtos de ativação e a matriz extracelular, culminando na destruição do tecido ósseo e cartilaginoso adjacentes (KLARESKOG; CATRINA; PAGET, 2009). A ligação de fibroblastos sinoviais com a cartilagem corresponde a etapa inicial da invasão sinovial, sendo o colágeno do tipo II e algumas glicosaminoglicanas os principais componentes desta matriz. A Figura 7 mostra como o *pannus* contribui para o dano articular.

Figura 7 – Estágios do dano ósseo na artrite reumatoide



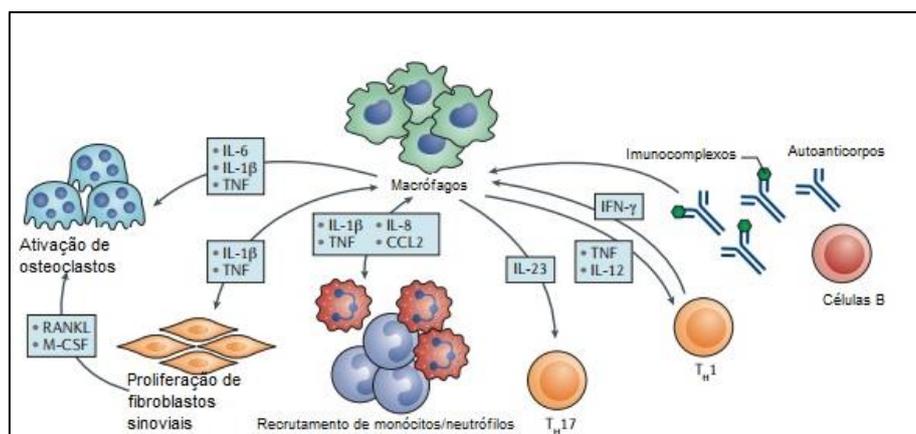
Fonte: Winnipeg Regional Health Authority (2017).

As integrinas representam uma família de proteínas transmembrana com capacidade de adesão célula-matriz e promovem a ligação dos fibroblastos sinoviais aos sítios ricos de fibronectina da cartilagem, assim como ao colágeno. Após a adesão dos fibroblastos sinoviais, as integrinas juntamente com o fator de adesão vascular (V-CAM) interagem com cascatas de sinalização que regulam o ciclo celular e a expressão de metaloproteinases (BHATTARAM; CHANDRASEKHARAN, 2016). Nesse contexto, a galectina-3 é altamente expressa dentro dos fibroblastos sinoviais e contribuem para inflamação e inibição da apoptose (NEIDHART et al., 2004). Em consequência disso, ocorre o crescimento, proliferação e invasão de células no tecido sinovial, levando à degradação dos tecidos ósseo e cartilaginoso. Essa degradação ocorre principalmente em decorrência da ativação de metaloproteinases (KUNISCH et al., 2012).

3.4.1 O papel dos monócitos e macrófagos na AR

Os monócitos e macrófagos são células que secretam uma grande variedade de citocinas próinflamatórias que estão envolvidas na imunopatologia da AR, além de MMPs, que conduzem a ativação de células endoteliais e promovem lesão da cartilagem (LI; MOUNTZ, 2013). Estas células também produzem uma ampla gama de quimiocinas, que ajudam a recrutar leucócitos adicionais à articulação inflamada. Além disso, os monócitos têm alta expressão de HLA-DR, o que proporciona a capacidade de apresentação de antígenos para as células T CD4+, além de se diferenciar em osteoclastos, os quais têm um papel tardio na fisiopatologia da AR. É importante salientar que os monócitos e macrófagos são vistos como alvos terapêuticos de alta relevância na RA devido à ativação de vias que levam a produção de citocinas de papel relevante na AR (DAVIGNON et al., 2013).

Figura 8 – papel dos macrófagos na AR. Os macrófagos produzem citocinas, que recrutam células, promovem a polarização de células T e ativam fibroblastos sinoviais



Fonte: Adaptado de Udalova (2016).

Os monócitos humanos podem ser divididos em subpopulações com base na expressão de CD14 (co-receptor para LPS) e CD16 (FcγRIII). O perfil CD14⁺⁺ CD16⁻ são considerados monócitos clássicos, pois formam o subconjunto mais prevalente, representando aproximadamente 90% dos monócitos do sangue em indivíduos saudáveis. Células que expressam CD16 são menos frequentes entre monócitos circulantes, mas são prevalentes em infecções e condições inflamatórias (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2014). Os monócitos CD16⁺ podem ser ainda subdivididos em CD14⁺⁺/brilhante (também chamados de intermediários) e CD14^{dim} (não clássicos). Alguns estudos que não fazem uma discriminação entre CD14⁺⁺/brilhante CD16⁺ e CD14^{dim} CD16⁺ mostraram um aumento na porcentagem de monócitos CD14⁺ CD16⁺ no sangue de pacientes com AR. Monócitos CD14⁺ CD16⁺ expressam altos níveis de CCR1, CCR5, ICAM-1 e TLR2 (KAWANAKA et al., 2002). A elevada frequência de monócitos CD14⁺ CD16⁺ foram associados com parâmetros clínicos, como atividade da doença (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003)

Além das funções inatas dos monócitos/macrófagos tratando-se da produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, seu papel inflamatório na AR também está ligado à imunidade adaptativa. Foi observada uma interação entre monócitos CD14⁺ com células T CD4⁺ na sinóvia de pacientes com AR, além de tonsilas, sugerindo que células TCD4⁺ interagem com monócitos *in vivo* em sítios de inflamação (ALONSO et al., 2011).

Os monócitos e macrófagos são os maiores produtores de IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23, citocinas que estão exacerbadas na articulação acometida pela AR. A IL-12 está envolvida na polarização de células Th1, enquanto IL-1 β , IL-6 e IL-23 realizam e mantêm a polarização da resposta Th17. Recentemente, a IL-17 e a resposta Th17 ganharam atenção como mediadores da patogênese da AR. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que atua em sinergismo com TNF α para induzir eventos inflamatórios e danos nas articulações (MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009). O IL-17RA e IL-17RC são receptores da IL-17 e são altamente expressos na sinóvia de pacientes com AR, incluindo também os monócitos e macrófagos CD14+ (ZRIOUAL et al., 2008).

3.5 Fatores Genéticos da AR

A AR é um dos principais alvos de estudo de variações genéticas na atualidade. Dessa forma, diversos genes já foram identificados e relacionados à doença. A contribuição individual de apenas um gene para susceptibilidade à AR é baixa. Com isso, pode-se inferir que cada gene com um polimorfismo associado à doença tenha apenas uma pequena contribuição para os processos patológicos da doença. Os polimorfismos de base única (SNPs) são alvos de estudo em diversos estudos, e através deles, pode-se evidenciar um significativo *background* genético na fisiopatologia da AR; esta evidência indica também uma heterogeneidade étnica de fatores genéticos existentes para as diversas populações no mundo (SHEN et al., 2015).

3.5.1 Agregação familiar

A história familiar é reconhecida como um importante fator de risco para o desenvolvimento da AR. Devido ao caráter multifatorial da doença, o termo agregação familiar deve ser mais evidenciado, uma vez que esta terminologia engloba os fatores genéticos e os fatores ambientais compartilhados por indivíduos da mesma família (FRISELL; SAEVARSDOTTIR; ASKLING, 2016).

Nesse contexto, os fatores de risco observados podem ser utilizados para estimar a hereditariedade da doença, o que é essencial para contextualizar outros estudos etiológicos, especialmente estudos genéticos, pois podem prever o curso clínico e prognóstico da doença. O método clássico

para avaliar o risco familiar de desenvolver doenças multifatoriais é a utilização de gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Com isso, pode-se determinar a herdabilidade da AR. O primeiro relato utilizou gêmeos finlandeses com AR e observou taxas de concordância de 12% em gêmeos monozigóticos e 3% em pares dizigóticos. O segundo estudo recrutou 203 pares de gêmeos afetados pela doença no Reino Unido e relatou uma taxa de concordância de 15% em gêmeos monozigóticos e 4% em dizigóticos (SILMAN et al., 1993).

3.5.2 MHC de Classe II

O mapa genômico do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) se estende por cerca de 7,6 Mb e contém aproximadamente 421 loci do gene em uma região contígua no cromossomo 6 (FERNANDO et al., 2008). Os loci clássicos de HLA, que desempenham papel central no sistema imune são chamados A, B e C (classe I) e DRB1, DQB1 e DPB1 (classe II). Particularmente, os genes HLA de classe I e classe II codificam proteínas que se ligam a antígenos peptídicos pequenos e os leva para a superfície da célula para serem apresentados. (BAX et al., 2011)

Mais de 90% do pacientes que apresentam quadro clínico grave da AR possuem o (s) alelo (s) HLA-DRB1 * 0401, HLA-DRB1 * 0404 e/ou HLA-DRB1 * 0101 que codificam para o HLA-DR4.1, HLA-DR4.4 e HLA DR1, respectivamente (JONES et al., 2006). Estas proteínas compartilham um trecho comum de aminoácidos nas regiões de ligação a peptídeos nas posições 67–74 da cadeia β do HLA-DR, sendo chamado de epítipo compartilhado. A hipótese do epítipo compartilhado baseia-se no pressuposto de que as moléculas de classe II estão envolvidas diretamente na etiologia e patogênese de desordens autoimunes. O desencadeamento de uma resposta imunitária das células T exige ativação, e esta ativação requer a presença de antígenos e moléculas de classe II em células apresentadoras de antígenos (APCs). Esta hipótese diz ainda que as diferenças estruturais entre moléculas de classe II influenciam essa interação, seja no nível de apresentação dos antígenos ou das células T durante a diferenciação no timo. Apesar desta hipótese ainda não estar completamente elucidada, a presença do epítipo compartilhado também postula a apresentação de autoantígenos artritogênicos, sendo o colágeno tipo

II citrulinado o principal autoantígeno, ou o mecanismo de mimetismo molecular com antígenos exógenos capazes de moldar o repertório de células T (Gregersen et al.1987).

Alelos do epítipo compartilhado HLA-DRB1 estão presentes em 64-70% dos pacientes com AR e em 55% dos seus parentes em primeiro grau; esta frequência é significativamente superior à observada em indivíduos saudáveis (35,8%). Essa interação entre os fatores de risco genéticos associados ao HLA-DR e a presença de autoanticorpos podem aumentar o risco em parentes de primeiro grau de desenvolver a doença (CASTRO-SANTOS; DÍAZ-PE, 2015).

3.5.3 Genes fora do MHC de classe II

O gene *PTPN22* (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) codifica uma tirosino-fosfatase intracelular em células T, células B, e várias células hematopoiéticas. O polimorfismo C1858T também chamado Arg620Trp mostrou-se associado inicialmente no Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) (LADNER et al., 2005), e desde então, foram investigados e associados com outras doenças autoimunes, incluindo o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (NAMJOU et al., 2013) e a AR (NABI et al., 2016).

O *PTPN22* codifica uma proteína chamada Lyp (*Lymphoid protein tyrosine phosphatase*). A Lyp se liga ao Csk (*C-terminal Src tyrosine kinase or Csk*) e regula negativamente a ativação de células T. O alelo T do polimorfismo C1858T promove uma hiper-reatividade das células T por impedir a ligação entre Lyp e Csk. Um estudo de metanálise revelou associação apenas em população de descendência europeia, no entanto, o mesmo estudo não encontrou relação entre este polimorfismo e doenças autoimunes em asiáticos (Nabi et al. 2016).

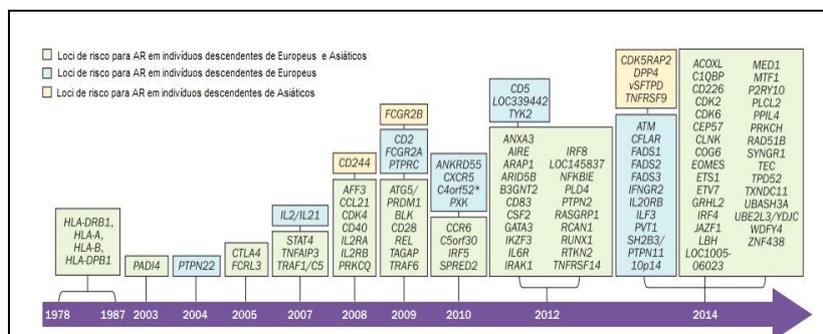
Além do *PTPN22*, outros genes também já foram associados com a AR, como o *PADI4* e *FCRL3*. O *PADI4* (*Peptidyl Arginine Deiminase 4*) codifica uma enzima que catalisa a conversão da arginina em citrulina. O papel da citrulinização está intimamente relacionado à positividade para o anti-CCP e a gravidade da AR, conforme discutido anteriormente. Inicialmente, foi relatado que o gene *PADI4* tem haplótipos constituídos por vários SNPs associados

com AR em indivíduos japoneses (SUZUKI et al., 2003). Estes haplótipos estão localizados na região codificante do gene e proporcionam uma maior estabilidade do RNA mensageiro, proporcionando maior tradução e disponibilidade da proteína para promover citrulinização. Ao contrário do *PTPN22*, os polimorfismos genéticos no *PADI4* foram observados com frequências semelhantes em populações asiáticas e descendentes de europeus em estudos de associação (KOCHI et al., 2011). Alguns estudos de metanálise também mostram que o risco genético associado com este haplótipo ocorre em populações do Extremo Oriente (IWAMOTO et al., 2006).

O gene *FCRL3* (*Fc receptor-like 3*), por sua vez, tem heterogeneidade semelhante entre os grupos étnicos e está associado com a suscetibilidade a doenças reumáticas. *FCRL3* codifica uma molécula da membrana específica de linfócitos B com função de co-fator de receptores de células B. O SNP -169C/T na região promotora foi inicialmente associado com AR (YANG et al., 2012) e LES (GIBSON et al., 2010) em indivíduos japoneses.

Estudos de associação de genoma completo, também chamados de GWAS (Genome Wide Association Studies), consistem em avaliar um conjunto de milhares polimorfismos de base única (SNPs) em grande quantidade de indivíduos buscando associação genética com várias patologias. O mais recente GWAS realizado em indivíduos com AR, os genes *PTPN22*, *STAT4*, *HLA-DRB1* foram considerados genes de risco para a doença. A Figura 9 representa uma visão geral quantitativa dos genes já associados à AR ao longo dos anos, considerando as populações descendentes de asiáticos e descendentes de europeus (YAMAMOTO et al., 2015).

Figura 9 – Panorama histórico de polimorfismos de susceptibilidade à AR identificados.



Fonte: Adaptado de Yamamoto et al. (2015).

3.5.2 Genes das Citocinas

As citocinas são moléculas secretadas por diversas células, cuja função é estimular ou inibir a resposta imune. Diversas citocinas foram alvo de estudos na artrite reumatoide, em associação com níveis séricos e genéticos. SNPs em genes de citocinas associados com AR são responsáveis pelo aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias e diminuição dos níveis de citocinas, caso ela desempenhe atividade reguladora.

A IL-18 é uma proteína de 18 kD que é convertida através da ativação do complexo inflamassoma e mediada pela caspase-1. Esta citocina é secretada por monócitos, macrófagos, osteoblastos, condrócitos, células dendríticas, células de Kupffer, queratinócitos e fibroblastos sinoviais. Ela é responsável pelo aumento da interação célula-célula que, por sua vez, leva à produção de citocinas em células T e macrófagos, induzindo IL-2, IL-2Ra, TNF α , GM-CSF, prostaglandina E2, iNOS, a estromelina, a COX-2 e quimiocinas (DINARELLO et al., 2013). A IL-18 atua no estímulo à angiogênese, uma característica peculiar na AR por onde os leucócitos migram dos vasos para o interior da cartilagem, através da secreção de VEGF e também estimula a migração leucocitária através da ativação de I-CAM e V-CAM (AMIN et al., 2007). Níveis elevados de IL-18 foram encontrados na membrana sinovial, FS e no soro de pacientes com AR. O polimorfismo rs1946518 no gene IL18 (- 607 C/A) foi associado o aumento da susceptibilidade a RA na população chinesa (CHEN et al., 2012).

A IL-33, que também é membro da família IL1, também é conhecida como IL-1F11, e necessita da clivagem mediada pela caspase 1 para ser ativada. Ela é expressa em macrófagos, fibroblastos e células dendríticas. Ao se ligar ao receptor de IL1 (IL1R), ocorre o recrutamento da quinase associada ao receptor de IL1 (IRAK1), IRAK4 e o fator de diferenciação mielóide (MyD88), que, por sua vez, ativa NF κ B, promovendo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (SCHMITZ et al., 2005), dependendo da célula. A IL-33 também foi detectada no tecido sinovial de fibroblastos de pacientes com AR oriundos de cultivo celular. Além disso, após análise histológica da cartilagem de ratos estimulados com IL-33, foi observada erosão óssea e cartilaginosa com infiltração de células mononucleares e polimorfonucleares além de hiperplasia sinovial (ABDEL-WAHAB et al., 2016). O silenciamento de IL-33 promoveu a supressão de TNF α , IL-6 e IL-8 (KUNISCH et al., 2012).

A interleucina 4 (IL-4) está envolvida na formação da resposta Th2 através da diferenciação de células T naive. Através de *feedback* positivo, IL4 adicional é formada pela resposta Th2. Sua principal função é inibir a formação de citocinas próinflamatórias, como TNF α , IL-1 β e IL-6 pelos fibroblastos sinoviais, tecido sinovial e monócitos. Estudos *in vitro* mostram que a IL4 reduz a absorção óssea pela inibição dos osteoclastos através do bloqueio de MMPs (JOOSTEN et al., 1997). O polimorfismo -590 T/C foi associado como fator de risco para AR em descendentes de europeus e chineses (PARK et al., 2016).

A IL-6 é uma glicoproteína de 22-29 KD com propriedades próinflamatórias. Ela é produzida por um vasto número de células, como células B, células T, fibroblastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos, queratinócitos e condrócitos. Altos níveis de IL-6 foram encontrados no sangue e no fluido sinovial de pacientes com AR. A IL-6 promove a inflamação e a destruição da cartilagem por estimular os neutrófilos a produzirem espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas proteolíticas. Ela também estimula a diferenciação de osteoclastos (YOSHIDA; TANAKA, 2014). Foi observado sinergismo com o TNF α e IL-1 β na produção de VEGF, que é uma molécula chave na formação e manutenção do *pannus*. Alguns achados laboratoriais são associados com o aumento da produção de IL-6, como proteína C reativa (PCR) (DAYER; CHOY, 2010). Além disso, a IL-6 pode estar relacionada aos eventos cardiovasculares da AR, através do aumento de chances entre o infarto agudo do miocárdio e seus níveis elevados (ROSE-JOHN, 2012). O polimorfismo rs1800795 na posição -174 G/C foi associado como fator de risco para AR e para erosões ósseas. Já o polimorfismo -572 G/C (rs1800796) está associado como o aumento da susceptibilidade a AR na população chinesa (LI et al., 2014).

A IL-10 tem propriedades anti-inflamatórias e diminui a formação de citocinas próinflamatórias como TNF α , IL-1 β , IL-1 α , IL-16, IL-18, IL-12 e GM-CSF (MÖTTÖNEN et al., 1998). Além disso, ela inibe a expressão do HLA-DR e a consequente apresentação de antígenos. Também está relacionada à inibição da produção da MMPs e a inibição da indução do TNF α para produzir prostaglandina E2 nos fibroblastos sinoviais (ALANÄRÄ et al., 2010). Polimorfismos no gene IL10 estão relacionados com a diminuição da produção da citocina, além de associação com baixa severidade da doença, assim como

menor susceptibilidade ao desenvolvimento da AR em diversas populações (SHEN et al., 2015)

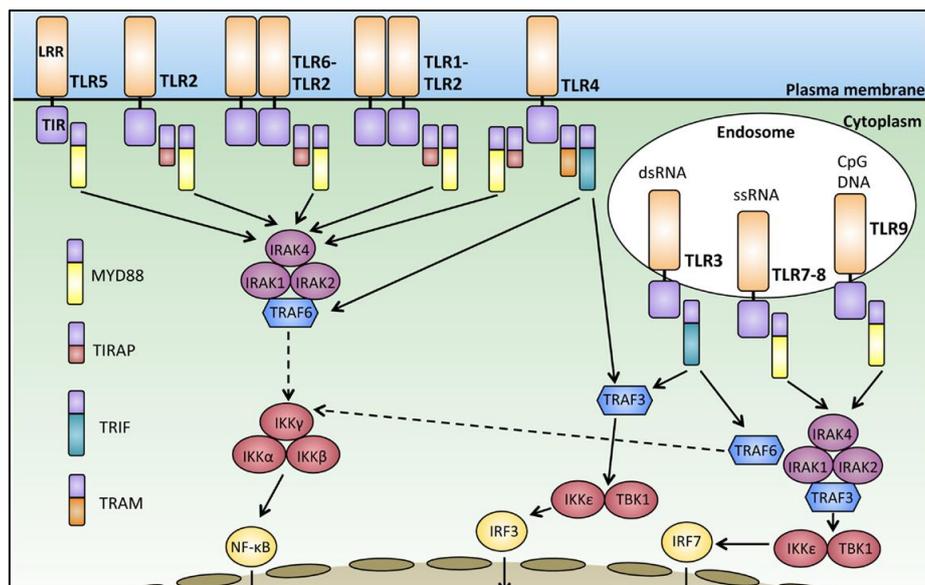
3.5.3 A via dos receptores do tipo *Toll*

Partículas estranhas e prejudiciais para o organismo contêm sequências altamente conservadas e são detectáveis por receptores da imunidade inata, que alertam o sistema imune para desencadear uma resposta inflamatória rápida. Esses patógenos invasores são denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e permitem a discriminação entre o próprio e o não próprio (THWAITES; CHAMBERLAIN; SACRE, 2014).

Além disso, é importante ressaltar que o dano tecidual também requer resposta inflamatória, e nesse contexto, incluem as células lesadas, assim como os autoantígenos, no caso de doenças autoimunes. Assim, são exemplificados os padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) (THWAITES; CHAMBERLAIN; SACRE, 2014).

A família de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), cuja função é detectar PAMPs e DAMPs incluem a via dos receptores do tipo *Toll* (THWAITES; CHAMBERLAIN; SACRE, 2014). Em humanos, já foram identificados 13 TLRs. O TLR4 foi o primeiro membro da família a ser estudado em mamíferos. Ele foi identificado como o receptor para o lipopolissacarídeo (LPS), componente de bactérias gram-negativas. Atualmente, 11 receptores do tipo *Toll* já foram identificados (Figura 10)

Figura 10 – A via dos receptores do tipo *Toll*



Fonte: Adaptado de Wang (2014).

A família de TLRs é dividida em dois grupos com base na localização subcelular: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 são receptores da superfície das células. Por outro lado, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR11 são encontrados intracelularmente em compartimentos endossomais. Devido ao seu papel no reconhecimento de PAMPs e DAMPs, os TLRs estão amplamente expressos em células do sistema imunológico. Os monócitos e macrófagos, por sua vez, expressam altos níveis de TLR2 e TLR4 na sua superfície celular, em comparação com níveis baixos dos mesmos receptores em neutrófilos e nenhuma expressão em eosinófilos (KAY; SCOTLAND; WHITEFORD, 2014).

As vias de sinalização dos TLRs estão correlacionadas com o desenvolvimento e manutenção da AR. Uma variedade de TLRs incluindo TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9 estão altamente expressos na sinóvia de pacientes com AR comparados com indivíduos saudáveis e pacientes com osteoartrite (AO). A ativação do TLR2 nos fibroblastos sinoviais induz a produção de várias citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF- α , na articulação de pacientes com AR (SABROE et al., 2002).

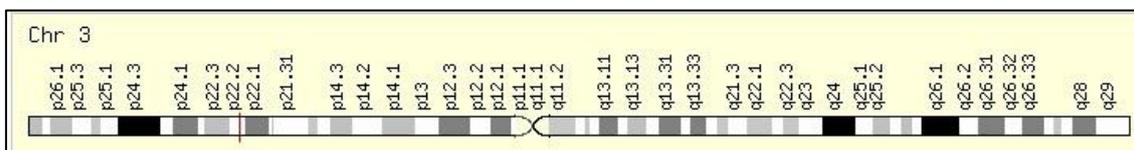
Estudos mostram a correlação entre a expressão alterada dos TLRs e seus produtos de ativação, além de associação de SNPs nesses genes ou em moléculas envolvidas na sua sinalização e o desenvolvimento de várias doenças autoimunes, incluindo DM1, LES e AR. Em uma população turca, o genótipo TT do SNP rs187084 no *TLR9* aumentou a susceptibilidade à AR (OR

= 2.34; $p = 0,009$), embora não tenha sido associado em estudos nas populações holandesa e francesa (COENEN et al., 2010). Além disso, o SNP rs5741883 no TLR8 foi associado com a AR através da positividade de autoanticorpos em um estudo com 319 indivíduos europeus (Além disso não se observou qualquer correlação entre a patologia e SNPs nos genes TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9 em uma coorte de pacientes francesa (ZHOU et al., 2015). O estudo de caso-controle realizado pelo grupo de Sanchez analisou a possível associação de SNPs no gene TLR4 rs4986790 (Asp299Gly) e rs4986791 (Thr399Ile) com AR em 224 pacientes espanhóis acometidos pela RA e 199 indivíduos saudáveis, entretanto, nenhuma associação foi encontrada ((COENEN et al., 2010).

3.5.4 Gene MYD88

O gene MYD88 está localizado no braço curto do cromossomo 3 (p22.2) (Figura 11)

Figura 11 – Localização do gene MYD88



Fonte: Gene Cards (2016).

A sinalização da via dos TLRs é dependente do recrutamento de proteínas adaptadoras, sendo a MyD88 a principal proteína. A via dependente de MyD88 é necessária para todos os TLRs, exceto o TLR3, e a sua sinalização é constituída de uma serino-quinase associada ao IL-1R, formando as IRAKs (IRAK-1, IRAK-2, IRAK-3 e IRAK-4) (AVBELJ; HORVAT; JERALA, 2011). A fosforilação da IRAK4 promove sua dissociação com o MyD88 e subsequente associação com o TNFR associado ao fator 6 (TRAF6), quinase ativada pelo TGF β (TAK-1), resultando na formação e ativação do fator nuclear kB (NF kB) fator de transcrição formado pelas vias do IKK (indutor de quinases) e MAP quinases (MAPK) (PREMKUMAR et al., 2010) (Figura 10) .

A translocação do NFkB ao núcleo resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α , IL-1 β e IL-6, citocinas de importante papel

na fisiopatologia da AR, como discutido anteriormente (TAKEDA; AKIRA, 2004). Já foi relatado que a via dos receptores do tipo *Toll* dependente de MyD88 é essencial na produção de metaloproteinases (MMP) em cultura de membrana sinovial de pacientes com AR, uma vez que esta via ativa IL1 β , interleucina de papel fundamental na ativação de MMPs (SACRE et al., 2007).

A ligação entre a MyD88 e o TLR4 é essencial para resposta ao LPS através da indução da transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Este fato torna-se claro através de experimentos onde camundongos MyD88^{-/-} não produziram as citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 quando estimulados com qualquer ligante dos TLRs (FUJIHARA et al., 2003).

Em modelos animais de isquemia cerebral, uma doença de caráter inflamatório que acomete o cérebro, camundongos MyD88^{-/-} apresentaram inibição da ativação de NF κ B e redução na expressão de IL1 β , IL-6 e COX-2, além de melhorar a função neurológica nos ratos MyD88 *knockout*, demonstrando que o déficit de MyD88 foi capaz de inibir o aumento da resposta inflamatória e aumentar a sinalização neuroprotetiva (YE et al., 2016). Resultados semelhantes foram encontrados em modelos animais de psoríase. Neste estudo, foi observado que a presença do *MYD88* é crucial para inflamação da pele e espessamento da epiderme, além de promover a expansão e ativação de linfonodos (COSTA et al., 2017).

Outro estudo objetivou determinar os efeitos de um possível inibidor do MyD88 criado em laboratório, o TJ-M2010-6, na prevenção e tratamento de *Diabetes Mellitus*. O TJ-M2010-6 foi capaz de interagir com resíduos de aminoácidos do domínio TIR do MyD88 inibindo sua homodimerização. A administração contínua de TJ-M2010-6 reduziu significativamente os efeitos da diabetes durante o período de observação em camundongos (36,4% vs. 80%, $P < 0,01$). *In vitro*, o TJ-M2010-6 inibiu a maturação de células dendríticas, levando à supressão da ativação de células T e secreção inflamatória de citocinas (ZHANG et al., 2016).

Entretanto, a deficiência de MyD88 comprometeu a resposta imunitária de ratos MYD88^{-/-}. Em histopatologia de ratos Myd88^{-/-} observou-se bacteremia e peritonite com formação de abscessos. Além disso, ocorreu notória presença de coccobacilos gram-negativos. Culturas de amostras do sangue cardíaco de um rato mostrou crescimento de *Pseudomonas*

aeruginosa. (VILLANO; RONG; COOPER, 2014). Além desse estudo, outro também mostrou a suscetibilidade de camundongos MYD88^{-/-} a infecção por *Staphylococcus aureus* (TAKEUCHI; HOSHINO; AKIRA, 2000), mas não pelo *Mycobacterium tuberculosis* (SUGAWARA et al., 2003). É possível que este resultado controverso é devido à infecção por *Staphylococcus aureus* ser de natureza aguda, enquanto a infecção pelo *M. tuberculosis* ser de natureza crônica.

Sabendo-se que os receptores do tipo *Toll* estão cronicamente ativados em indivíduos com artrite reumatoide e que a proteína adaptadora MYD88 desempenha papel central na via TLRs-NFκB, nossa hipótese é que variações genéticas no gene MYD88 possam modular a expressão e a resposta imune dependente desta via, e conseqüentemente estar associada ao desenvolvimento da AR.

Até o presente momento, nenhum estudo envolvendo polimorfismo de base única do gene MYD88 em associação com AR realizado. Neste sentido, é possível que o polimorfismo rs6853 A>G, localizado na região 3'UTR do gene MYD88 possa alterar o perfil de expressão gênica, além de alterar a produção de citocinas próinflamatórias. Através destes resultados, será possível elucidar um potencial alvo farmacogenético na AR.

4 MATERIAS E MÉTODOS

Este foi um estudo caso-controle, no qual o grupo formado dos pacientes compõem o grupo “caso” e o grupo formado por indivíduos saudáveis formam o grupo “controle”.

4.1 Recrutamento de pacientes com Artrite Reumatoide

Este estudo envolveu 424 indivíduos portadores de AR provenientes de dois estados brasileiros: Pernambuco e São Paulo. Das duzentas e trinta e três amostras provenientes de Pernambuco, 123 foram obtidas no ambulatório de Artrite Reumatoide do Centro de Infusão de Imunobiológicos do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (UPE), coletadas entre março e agosto de 2015; e 110 amostras foram provenientes de um banco de amostras do grupo de pesquisa Patologia Molecular e Medicina Genômica (PatGen), coletadas entre os anos de 2011 e 2012. Do estado de São Paulo, foram coletadas entre os anos de 2011 a 2016, 191 amostras provenientes do Setor de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP), através de colaboração com o reumatologista Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior.

Todos os indivíduos com AR foram diagnosticados de acordo com os critérios clínicos definidos pelo Colégio Americano de Reumatologia em 2010. Foram obtidos os seguintes parâmetros clínicos: idade, gênero, tempo de doença, velocidade de hemossedimentação (VHS), atividade da doença estabelecido pelo DAS28, estado funcional articular avaliado pelo HAQ (*Health Assessment Questionnaire*), presença de tabagismo, fator reumatoide, valor da proteína C reativa (PCR) e medicamentos em uso.

O critério de inclusão para os 3 grupos amostrais foram: indivíduos portadores Artrite Reumatoide diagnosticada pelos critérios de 2010 e maiores de 18 anos de idade. Já a presença de co-morbidades reumatológicas e autoimunes não relacionadas à AR e a idade abaixo de 18 anos foram utilizadas como critério de exclusão para os 3 grupos amostrais.

4.2 Recrutamento de indivíduos saudáveis

Foram selecionados 356 indivíduos saudáveis para participar do grupo controle. Destes, 189 indivíduos eram provenientes da região metropolitana de Recife, sendo 73 do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (UPE), coletadas entre agosto de 2015 e março de 2016, e 116 do ambulatório de Osteoporose do Setor de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, coletadas entre março de 2011 e abril de 2016. Do estado de São Paulo foram coletados 157 indivíduos entre 2012 e 2016 no Hemocentro de Ribeirão Preto (USP). Todos os participantes do grupo controle foram pareados percentualmente com o grupo de pacientes por idade e sexo.

Foram critérios clínicos de exclusão: presença de doença autoimune ou doença com comprometimento do tecido ósseo; parentesco de até segundo grau com alguma doença autoimune; indivíduos aparentados com algum indivíduo do grupo controle e do grupo de pacientes, indivíduos com doença infecciosa até três meses da data da coleta. Também foi um critério de exclusão utilizado a partir de 2015 para os voluntários saudáveis o histórico de *Febre Chikungunya*.

Dados laboratoriais também foram utilizados como critérios de exclusão, como: proteína C reativa (PCR) > 0,8 mg/dL, velocidade de hemossedimentação (VHS) > 15mm, positividade para o fator reumatoide (FR), positividade para o anti-CCP e presença dos alelos HLA-DR * 0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102 ou *1001, considerados alelos de risco para AR. Os dois últimos critérios laboratoriais foram utilizados apenas no grupo controle de Ribeirão Preto.

4.3 Comitê de Ética

Todos os envolvidos no grupo caso e controle convidados para participar da pesquisa preencheram termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Oswaldo Cruz, sob o parecer 1.097.918 (anexo 1) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), sob o protocolo 2981/2009 (ANEXO II).

4.4 Coleta de sangue, extração e quantificação do DNA genômico

Foram coletados até 8ml de sangue periférico de indivíduos com AR e indivíduos saudáveis, sendo 4 ml em tubos com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e 4 ml em tubo sem anticoagulante. As amostras coletadas em tubo sem anticoagulante foram centrifugadas e tiveram o soro aliquotado em até 4 microtubos de 250ul e armazenados em ultrafreezer à temperatura de -80°C, enquanto as amostras coletadas em tubos de EDTA foram destinadas à extração de DNA genômico. A extração e purificação de DNA foram realizadas de acordo com o protocolo de *Salting Out*. A pureza do DNA foi avaliada utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (ThermoFisher, Foster City, EUA), considerando a razão entre as absorbâncias 260/280nm e 260/230nm. As amostras consideradas satisfatórias apresentaram valor igual ou superior a 100ng/ µL de DNA, a razão 260/280 nm entre 1.8 e 2.2 e a razão 260/230 aproximadamente de 2.0. Após isso, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

4.5. Seleção do polimorfismo de base única (SNP)

A seleção do SNP foi realizada através do 1000genomes Project Browser (<http://browser.1000genomes.org>) e Hapmap (<http://www.hapmap.org>). O polimorfismo escolhido foi o rs6853 A>G, que está localizado na região 3'UTR do gene MYD88.

Os critérios de seleção do SNP foram: frequência do alelo minoritário (MAF) maior que 10% nas populações Europeia (EUR) e Africana (AFR), considerando as subpopulações Caucasiana (CEU) e Yoruba (YRI). O MAF do alelo G na subpopulação YRI foi de 33%, enquanto na população CEU foi 13%. Devido à miscigenação da população brasileira, as subpopulações CEU e YRI foram escolhidas, uma vez que elas representam a etnia dos colonizadores, oriundos da Europa, e dos escravos, vindos do oeste da África.

O possível impacto funcional do SNP rs6853 na expressão do gene MYD88 também foi um critério de escolha, uma vez que este promove uma transição da base adenina (A) para guanina (G) na região 3'UTR do gene MYD88. Esta é uma região conhecida pela manutenção da estabilidade do mRNA, além de ser alvo dos microRNAs durante a regulação da expressão

gênica. Assim, é possível que variações nesta região poderiam alterar o perfil de expressão do *MYD88*.

4.6 Genotipagem

A genotipagem foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time PCR) utilizando a sonda Taqman C_8824617_10 (ThermoFisher, Foster City, EUA). Para a PCR, foram utilizados 5ul de Taqman Genotyping Master Mix (ThermoFisher, Foster City, EUA), 3,85ul de água milli-Q, 0,15µL de sonda Taqman (ThermoFisher, Foster City, EUA), e 1µL de DNA genômico na concentração 25ng/ul. A ciclagem consistiu em 1 ciclo de 1 minuto a 60°C, 1 ciclo de 5 minutos a 95°C e 50 ciclos com 30 segundos a 95°C e 1 minuto e 30 segundos a 60°C e, por fim, 1 ciclo a 60°C correspondente à pós-PCR.

4.7 Isolamento de células mononucleares e cultivo de monócitos genótipo guiados

Foram coletados 8 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA de 13 indivíduos, sendo 5 portadores do genótipo AA, 5 do genótipo AG e 3 do genótipo GG. Em um tubo cônico de 15mL foram adicionados 4mL de *Ficoll Histopaque* (Sigma Aldrich) e posteriormente a amostra de sangue. Em seguida a amostra foi centrifugada por 40 minutos a 1.200 rpm em *no break* por 5 minutos para o início e 5 minutos para o término da centrifugação. Após a centrifugação, foram observadas 4 fases: a fase com hemácias, a fase com Ficoll, uma estreita fase com as células mononucleares e uma fase com o plasma. Com o auxílio de uma pipeta de transferência a fase composta pelas células mononucleares foi aspirada e transferida para um novo tubo cônico de 15 ml. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes com tampão PBS e centrifugadas durante 10 minutos à velocidade de 1200 rpm. Por fim, o precipitado celular foi ressuscitado em um 1mL de meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) enriquecido com 5% de soro fetal bovino e estreptomicina (100ug/mL) à temperatura de 37°C.

Posteriormente, as células mononucleares foram distribuídas em 7 poços de placas do tipo Falcon com poços de 35 milímetros de diâmetro cada e

permaneceram incubadas em estufa de CO₂ à temperatura de 37°C por 4h, tempo para ocorrer a aderência dos monócitos à superfície plástica do fundo da placa. Decorridas 4h, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com PBS para remoção de *debris* e outras células que não foram de interesse do estudo. Após 24h, as células foram observadas em microscópio invertido para avaliar a integridade e possível contaminação. Para ocorrer ativação dos monócitos e indução da expressão do *MYD88*, as células foram estimuladas com 100 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* e incubadas por mais 24h a 37°C em estufa de CO₂. Em seguida, ocorreu a extração de RNA do poço no tempo zero.

Para cada indivíduo, foram destinados 7 poços de placas do tipo Falcon com 6 poços de 35 milímetros de diâmetro. Os dois primeiros poços foram destinados à citometria de fluxo, sendo um poço estimulado com LPS e o outro sem estímulo. Quatro poços foram destinados à extração do RNA, sendo 2 poços com estímulo de LPS e 2 poços sem estímulo. O sétimo poço correspondeu ao t₀. Após 24h de cultivo pós estímulo, o sobrenadante de cada foi coletado e distribuído em um microtubo para centrifugação do tipo Eppendorf com capacidade para 1,5mL e armazenado em ultrafreezer vertical a -80°C, para posterior quantificação de IL1β.

Todos os experimentos de cultivo celular foram realizados em réplica para todos os indivíduos analisados.

4.8 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

Após 24h de estímulo com LPS, os dois poços (estimulado e não estimulado) destinados à citometria foram tratados com 100μL de tripsina/EDTA e incubados por 5 minutos em estufa de CO₂ à 37°C. Após esse período, a perda da aderência dos monócitos à superfície da placa foi confirmada através da visualização das células em microscópio invertido. A inativação da tripsina foi realizada adicionando 300 μL de soro fetal bovino. As células foram recolhidas e transferidas para um microtubo de centrifugação do tipo *Eppendorf* de 1,5 ml e centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm. A seguir, o precipitado foi lavado com PBS e centrifugado novamente. Por fim, o precipitado foi ressuspendido em uma solução de PBS/BSA.

Após a obtenção das células, foi realizada a marcação com 3 anticorpos monoclonais: um anticorpo anti-CD45 humano marcado com ficoeritrina (PE), outro anticorpo anti-CD14 com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e um anticorpo anti-CD16 marcado com ficoeritrina conjugada à cianina 7 (PE-Cy7). Em seguida, as células marcadas com os anticorpos foram incubadas por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão PBS para retirar os anticorpos residuais e, por fim, foram adicionados 200 μ L de PBS/BSA.

A aquisição de células marcadas foi realizada com o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) com obtenção de, no mínimo, 10.000 eventos por amostra. As células foram visualizadas em gráfico de pontos (*dot plot*) bidimensional onde foram analisados os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), para identificação da população celular de interesse. Em seguida, realizou-se um *gate* para delimitar a região dos monócitos, excluindo os dupletos e *debris*. A determinação da população de células mononucleares foi confirmada através da positividade para CD45. A partir daí, a análise seletiva de monócitos foi estabelecida pela combinação de marcadores CD45^{High}D14^{High}, para discriminar e selecionar de forma segura, os monócitos como células CD14⁺⁺ CD16⁻ ou CD14^{High}D16^{Low}. Os limites dos quadrantes marcados foram definidos com base na marcação dos controles isotípicos e nas populações negativas.

Além disso, foram feitos histogramas e *dot plots* para análise dos marcadores CD45, CD14 e CD16 através do BD Accuri C6 Software (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) e do FCS Express versão 6.04.0015 (De Novo Software, Los Angeles, EUA)

4.9 Extração de RNAm e síntese de cDNA

Para extração do RNA das células cultivadas, foram adicionados 750 μ L de Trizol a cada poço da placa de cultura e ressuspenso diversas vezes para lisar as células, sendo transferidos para um microtubo de centrifugação do tipo Eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente foram adicionados 200 μ L de clorofórmio e centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, observaram-se 2 fases: uma com *debris* celulares e outra aquosa contendo

RNA. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo e nele foi adicionado isopropanol para precipitação do RNA. Após a incubação, o precipitado foi suspenso em etanol 75%, reidratado em água livre de RNAses e armazenado em ultrafreezer vertical a -80°C. A concentração de RNA total foi determinada no espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (ThermoFisher, Foster City, EUA). As amostras apropriadas para uso apresentaram concentração superior a 100ng/μL e razão 1,8 e 2,0 na absorbância 260/280nm.

A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 2%. O gel foi preparado com água deionizada enriquecida com 1% de dietilpirocarbonato (DEPC), para minimizar a ação de RNAses, em tampão TBE 0,5X contendo brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada durante 60 minutos e o gel revelado pela luz ultravioleta. O RNA foi considerado íntegro quando apresentava as bandas 28S e 18S nítidas e não apresentavam rastros nas suas bandas.

Para a síntese de cDNA, foram adicionados 500ng de RNA total em um tubo RNASEfree e utilizada a reação de transcriptase reversa através da enzima M-MLV RT (ThermoFisher, Foster City, EUA) e Random Primer (ThermoFisher, Foster City, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.10 Desenho e validação de *primers* para avaliação da expressão gênica

Com o auxílio da ferramenta “OlygoAnalyserTool” do IDT Biotecnologia, foi desenhado um par de primers para detecção do mRNA do gene MYD88. A sequência do gene foi obtida da GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) e os primers foram projetados pelo NCBI Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

Tabela 1 –Par de primers para detecção do mRNA do gene MYD88

Identificação	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	TA*	%GC
MYD88-F	AGCGACTGATCCCCAT	20	59.53	55.00
	CAAG			
MYD88-R	GGTGTAGTCGCAGACA	20	59.40	55.00
	GTGA			

TA* = temperatura de anelamento

O valor de eficiência (E) para cada primer foi determinado através de curva padrão a partir de cinco pontos de diluição em série de 10 vezes para cada amostra de cDNA. Os valores aceitáveis foram definidos entre 95% e 105%. Estes dados e os coeficientes de correlação (R²) foram calculados pelo software do sistema ABI 7500 (ThermoFisher, Foster City, EUA).

A expressão do gene GAPDH foi realizada através da sonda Taqman Hs02786624_g1 (ThermoFisher, Foster City, EUA).

4.11 PCR em Tempo Real quantitativa

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para o gene MYD88 foi realizada no equipamento ABI 7500 (ThermoFisher, Foster City, EUA) utilizando os primers desenhados para o gene MYD88. Foram utilizados 1 µL de cDNA, 10 µM dos primers *forward* e *reverse*, 5 µL de SYBR[®] Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific; Foster City, USA) e água ultrapura para completar o volume final de 10µL. A ciclagem consistiu de 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Para o gene GAPDH, foram utilizados 0,5µL de sonda Taqman[®] (ThermoFisher, Foster City, EUA), 4,5 µL de água deionizada e 5 de Master Mix[®] ThermoFisher, Foster City, EUA). A qPCR foi realizada em triplicata para cada amostra.

4.12 Avaliação da Expressão Gênica

A quantificação relativa (QR) do mRNA do gene MYD88 foi avaliada da seguinte forma: os valores do ciclo de quantificação (Cq) obtidos para os 3 grupos do *MYD88* (AA, AG e GG) e do gene de referência foram classificados em casos e controles. Em seguida, o valor médio para o gene de referência *GAPDH* foi utilizado para calcular os níveis de RNAm de cada grupo do *MYD88* usando $2^{-\Delta\Delta Cq}$ como método de quantificação em todas as amostras. O *GAPDH* foi usado individualmente para a normalização de dados para obter dois valores QR para cada amostra e o valor QR final foi calculado como a média desses dados. Os valores de QR apresentados são baseados em duplicatas biológicas e triplicados técnicos.

4.13 Quantificação de IL1 β

Após as coletas dos sobrenadantes de cultura, os mesmos foram armazenados a -80°C até a realização das dosagens. Os níveis de IL1 β foram quantificados por ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), utilizando o kit EH2IL1B da Thermo Scientific (Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A leitura dos resultados foi realizada através do comprimento de onda 450nm no Leitor de Placas de Absorvância IRE96 (SFRI Medical Diagnostics, Saint Jean d'Ilac, França). A curva-padrão e conversão dos dados para pg/mL foi realizada através do software MasterPlex ReaderFit® (Hitachi Solutions, San Bruno, EUA).

4.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas para avaliar a possível associação com a suscetibilidade à AR foram realizadas através do teste exato de Fisher, no Programa R. Em relação às análises do polimorfismo com os índices clínicos, foi realizada regressão logística através do pacote SNPAssoc, também no programa R. Os níveis de significância foram considerados com o valor de *p value* $< 0,05$.

O Teste T de Student e análise de variância (ANOVA) com teste Tukey como pós-teste foram realizados para comparar os valores de média dos níveis de expressão do *MYD88*. Estas análises foram realizadas pelo software SPSS versão 18.0 considerando estatisticamente significativo o *p.value* $< 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 População de estudo

A Tabela 2 mostra os dados descritivos dos grupos avaliados neste estudo. Evidenciando as informações dos pacientes, foram incluídos 770 indivíduos, 424 indivíduos com AR e 356 indivíduos do grupo controle. Considerando os indivíduos do grupo de pacientes, 413 eram mulheres e 11 homens com idade média de 51,8 anos $\pm 10,34$. A idade média de diagnóstico desses pacientes foi de 41,8 anos $\pm 10,18$ e o tempo médio de doença foi 11 anos 7,89. Considerando os dados laboratoriais dos pacientes: 55,1% dos pacientes tinham fator reumatoide positivo, 85% tinham a presença de erosões

ósseas, 75% tinham proteína C reativa alterada (PCR) e 71% dos pacientes tinham velocidade de hemossedimentação alterada (VSH).

Ainda considerando a caracterização clínica dos pacientes, a média dos índices que avaliam a atividade da doença foi $3,84 \pm 1,15$ para o índice de atividade da doença em 28 articulações (DAS28) e $20,33 \pm 10,02$ para o índice clínico de atividade de doença (CDAI). A média para o *Health Assessment Questionnaire* (HAQ), índice que avalia o dano cumulativo da AR, foi de $1,43 \pm 0,66$.

5.2 Associação alélica e genotípica com a AR

Após a genotipagem para o polimorfismo rs6853, foram analisadas a distribuição das frequências alélicas e genotípicas nos grupos de pacientes e controles nas duas populações estudadas. O alelo G apresentou frequência de 15,3% nos pacientes de Pernambuco e 15,1% nos pacientes de São Paulo. Já a frequência do alelo G no grupo controle foi de 23,3% em Pernambuco e 21,5% em São Paulo. Após as análises estatísticas, o alelo G mostrou-se associado com menor susceptibilidade à AR em Pernambuco (OR= 0,65; IC = 0,4 – 0,8; $p = 0,002$) e em São Paulo (OR = 0,54; IC = 0,35 – 0,82; $p = 0,04$). Considerando as análises genotípicas, o genótipo GG apresentou frequência de 2,3% nos pacientes e 7,5% nos controles na população de Pernambuco, apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0007$) neste grupo. Entretanto, não houve associação genotípica para os indivíduos do estado de São Paulo (Tabela 3).

Tabela 2 – Caracterização das populações de estudo

Características Demográficas	n (%)
Grupo de pacientes	424 (57,5)
Grupo controle	356 (42,5)
Idade média dos pacientes	$51,8 \pm 10,34$
Idade média dos indivíduos saudáveis	$57 \pm 11,3$
Pacientes	
Gênero	
Feminino	413(97,6)

Masculino	11 (2,4)
Tabagismo	
Sim	54 (13,39)
Não	370 (86,61)
Características Clínicas	Média ±DP
Idade ao diagnóstico	41,86±10,18
Tempo de doença (em anos)	11,01±7,89
HAQ	1,43±0,66
CDAI	20,33±10,02
DAS28	3,84±1,15
PCR	5,08±10,43
Dados Laboratoriais	n (%)
PCR	
Níveis normais	312 (75,6)
Níveis alterados	112 (24,4)
Fator Reumatoide	
Negativo	203 (44,1)
Positivo	221 (55,9)
VSH	
Normal	198 (41,1)
Alterado	226 (58,9)
Erosões ósseas	
Sim	108 (85)
Não	19 (15)

Tabela 3 – Distribuição alélica e genotípica e análises estatísticas para o polimorfismo rs6853 na população de Pernambuco.

MYD88	Pacientes		Controles		OR	IC	p.value
	N = 233	%	N =189	%			
Genótipo							
AA	167	71,6	115	60,8	Ref		
AG	61	26,1	60	31,7	0,57	0,44 – 1,0	0,1
GG	5	2,3	14	7,5	0,24	0,06 – 0,75	0,007
Alelo							
A	395	84,7	290	76,7	Ref		
G	71	15,3	88	23,3	0,65	0,4 – 0,8	0,002

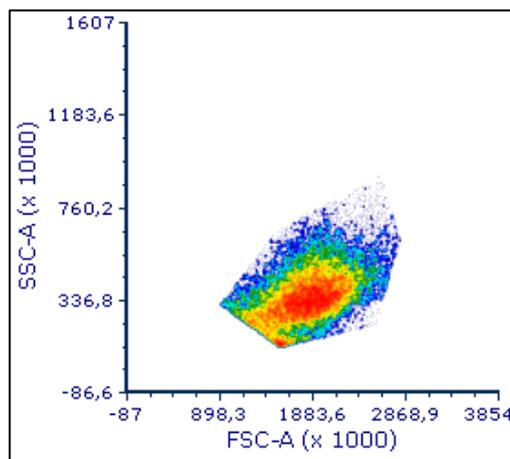
Tabela 4 – Distribuição alélica e genotípica e análises estatísticas para o polimorfismo rs6853 na população de São Paulo.

MYD88	Pacientes		Controles		OR	IC	p.value
	N =191	%	N =157	%			
Genótipo							
AA	134	70,1	98	62,4	Ref		
AG	52	27,2	55	35	0,69	0,45 – 1,12	0,1
GG	5	2,7	4	2,6	0,91	0,1 – 4,37	1
Alelo							
A	320	84,9	231	78,5	Ref		
G	57	15,1	63	21,5	0,54	0,35 – 0,82	0,04

5.3 Imunofenotipagem dos monócitos

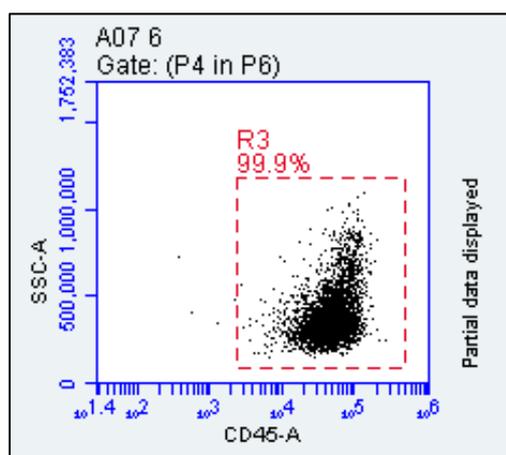
Após a aquisição de células pelo citômetro de fluxo, foram avaliadas as características das células através dos parâmetros FSC e SSC. A Figura 12 ilustra as características de tamanho (SSC) e complexidade (FSC) das células cultivadas. Esta população foi delineada pela área P4, pois representa uma população de células maiores com características de monócitos.

Figura 12 – *Dot plot* por densidade da região dos monócitos com aumento de 1000 vezes. Em vermelho, maior densidade de células expressando o marcador CD45. SSC: *Side-scattered light*. FSC: *Forward-scattered light*



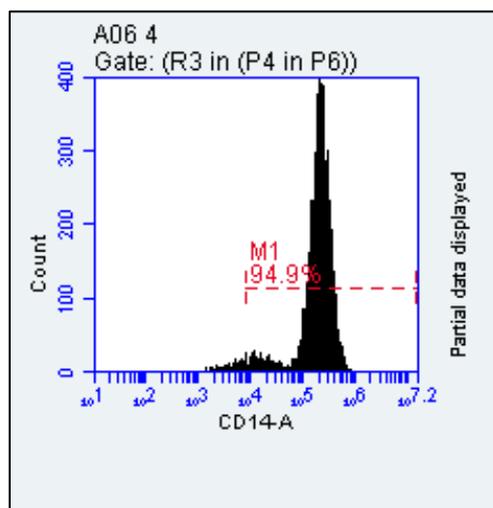
A Figura 13 representa o percentual de células delimitado em P4 que são positivas para o marcador de leucócitos CD45. Observa-se que da área delimitada, 99,9%, com variação de 5%, são células que expressam CD45.

Figura 13 – Estratégia de *gate* utilizando SSC e CD45 para determinar células positivas para CD45. A região delimitada em R3 ilustra as células com pouca granulosidade e positivas para CD45



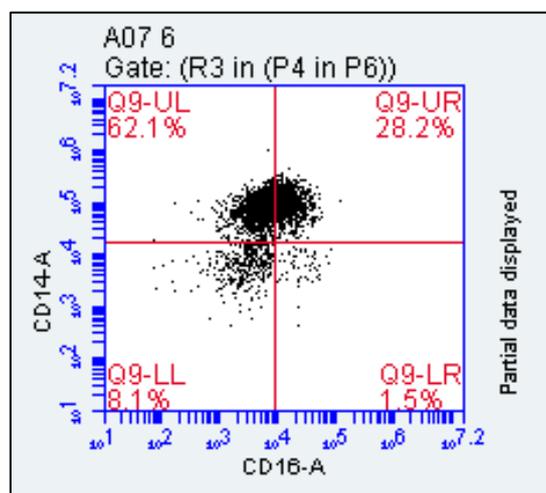
No histograma da Figura 14, observa-se a população relativa de células com expressão de CD45 que também expressam CD14. Do total de células CD45 positivas, 94,9% expressam o marcador CD14. Este marcador é específico para monócitos.

Figura 14 – Histograma representando a população relativa de células positivas para CD45 que também expressam CD14



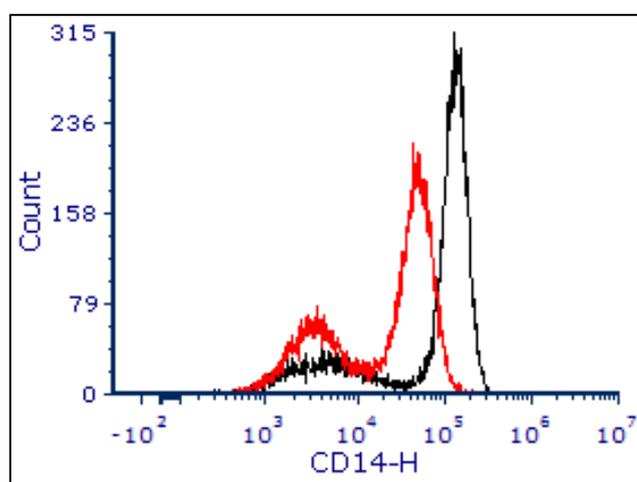
Em seguida, foram delimitadas as subpopulações de monócitos em um *dot plot*. Aproximadamente 64,1% expressavam apenas o marcador CD14, sendo consideradas CD14^{High} D16^{Low}, 28,2% eram CD14^{high}CD16+. Apenas 1,5% eram CD14^{low}CD16^{High} e 8,1% não expressava nenhum dos marcadores. (Figura 15).

Figura 15 – *Dot plot* representativo das subpopulações de monócitos. Em Q9-UL estão as células positivas para CD14. Em Q9-UR estão as células positivas para CD14 e CD16. Em Q9-LR estão as células positivas para CD16. Em Q9-LL estão as células com ausência de expressão tanto para CD14 quanto para CD16. O eixo foi estabelecido através dos controles isotípicos



Também foi analisada a expressão do marcador celular CD14 e comparada a intensidade média de fluorescência (IMF) entre os grupos estimulados e não estimulados. O histograma da Figura 16 representa a variação da expressão do CD14 em monócitos não estimulados (vermelho) e estimulados (preto). A IMF pré-estímulo foi de 34468,46 e pós-estímulo 115920,77. Esta análise comprova a funcionalidade do estímulo por LPS, pois aumenta em 3,36 vezes a expressão do marcador CD14.

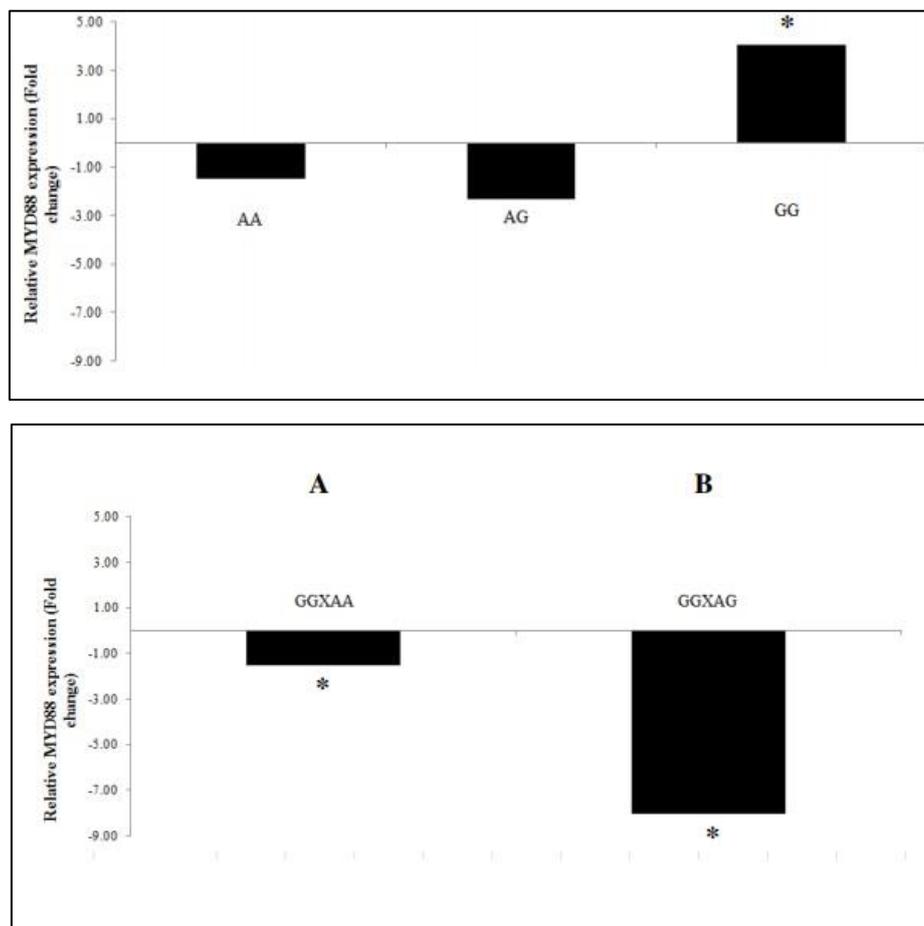
Figura 16 – Histograma representativo da intensidade média de fluorescência para o marcador CD14. Em vermelho, o pico de IMF no tempo 0 (T_0), Em preto, o IMF no tempo 24h (T_{24h}) do grupo correspondente de células da condição estimulada.



5.4 Análise da expressão gênica

As análises de expressão gênica utilizando o $2^{-\Delta\Delta Cq}$ como método de quantificação mostraram que os monócitos não estimulados dos indivíduos com genótipo GG apresentam menor perfil de transcrição do *MYD88* quando comparados ao AA (1,55 *folding change*, $p = 0,04$) e AG (8,06 *folding change*, $p = 0,03$). Após 24 horas de estímulo com LPS, os monócitos apresentaram perfil transcricional 1,11 vezes maior quando estimulados do que os monócitos não estimulados, sem considerar os genótipos. Após estratificação genotípica, as células com genótipo AA e AG apresentam diminuição nos níveis de expressão do *MYD88* em 1,47 e 2,33 vezes, respectivamente. Entretanto, os monócitos com genótipo GG apresentam aumento na expressão em 4,06 vezes ($p = 0,013$; $t = -4,24$) (Figura 17).

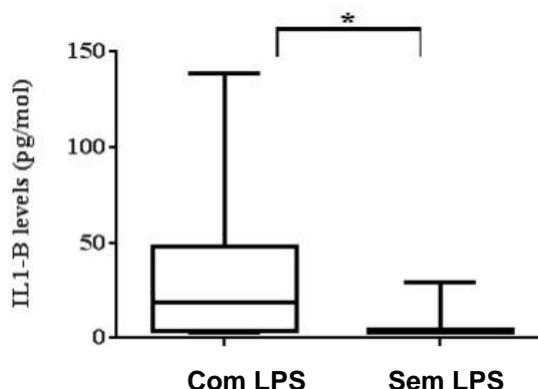
Figura 17 – Expressão do *MYD88* em relação aos genótipos. 1: Expressão em monócitos estimulados com LPS durante 24 horas em comparação com células não estimuladas usando PCR quantitativa em tempo real. Os resultados foram normalizados para GAPDH. A expressão de *MYD88* em monócitos não estimulados é normalizada para 1. 2: Expressão de *MYD88* em monócitos não estimulados após 24 horas. A: mudança relativa de GG em relação ao genótipo AA. B: mudança relativa de GG em relação ao AG.



5.5 Dosagem de IL-1 β do sobrenadante de cultura

A Figura 18 representa os níveis de IL1 β secretados pelos monócitos nas condições estimulado e não estimulado. De forma global, os monócitos não estimulados produziram 6,94 (\pm 7,95) pg/mL da citocina, enquanto os estimulados produziram 30,83 (\pm 33,64) pg/mL após 24 horas de estímulo com LPS, $p = 0,001$, teste T = 0,001.

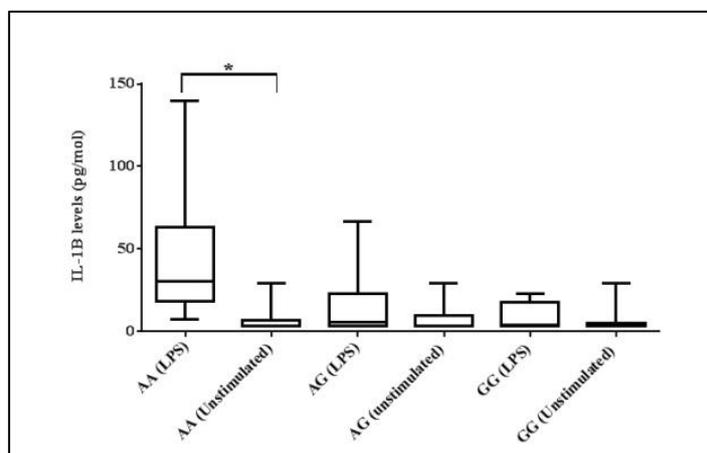
Figura 18 – Produção total de IL1 β a partir de cultivo de monócitos. LPS: condição estimulada com lipopolissacarídeo de *E. coli*. Sem LPS: condição de cultivo sem estímulo.



Quando a produção de IL1 β é comparada entre os grupos estimulado e não estimulado de acordo com os genótipos para o polimorfismo rs6853, observa-se que o genótipo AA na condição sem estímulo produz 6,56 pg/mL e na condição estimulada produz 44,83 pg/mL, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$). Os sobrenadantes de cultura dos indivíduos com genótipo AG produziram 7,6 pg/mL na condição não estimulada e, ao estimular os monócitos, a secreção da IL1 β aumentou para 15,27 pg/mL. Esta diferença, no entanto, não foi significativa do ponto de vista estatístico ($p = 0,980$).

Por fim, a produção de IL1 β dos indivíduos com genótipo GG foi de 7,27 pg/mL na condição não estimulada e, após o estímulo por 24h, a produção da interleucina foi elevada para 8,33, sem diferença estatística ($p = 0,612$).

Figura 19 – Produção total de IL1 β a partir de cultivo de monócitos com estratificação para os genótipos AA, AG e GG do polimorfismo rs6853. LPS: condição estimulada com lipopolissacarídeo de *E. coli*. Sem LPS condição de cultivo sem estímulo



6 DISCUSSÃO

Citocinas de papel importante na imunopatologia da Artrite Reumatóide são transcritas mediante o recrutamento do *MYD88* e ativação do NF- κ B. Estas moléculas pró-inflamatórias contribuem para o recrutamento de leucócitos, manutenção da inflamação e dano articular, sendo secretadas de forma significativa em monócitos de pacientes com a doença. No presente estudo, relatamos pela primeira vez evidências genéticas de que o polimorfismo rs6853 [A>G], localizado na região 3'UTR do gene *MYD88* pode estar envolvido no desenvolvimento da AR.

Na avaliação da associação do SNP com a susceptibilidade da doença, foi observada que a distribuição do alelo G nos indivíduos do grupo controle apresentou a frequência de 23,3%, no estado Pernambuco e 21,5% em São Paulo, sendo este um valor superior aos 18% observado no estudo realizado por Carrasco-Colom et al. (2015) na população da Catalunha, Espanha, que associou o alelo G com doença pneumocócica (OR = 1,9 I: 1.462–2.563, p.value = 0,0007) Enquanto isso, Capparelli et al. (2013) encontrou frequência de 27%, 29% e 11% nas populações italiana, romena e ucraniana, respectivamente. Em um estudo que associou o alelo A com resistência à tuberculose (OR = 5,78 p.value = 0,001) Nossos resultados mostram associação estatisticamente significativa entre o alelo G com a AR em Pernambuco (OR = 0,65; IC = 0,4 – 0,8; p.value = 0,002) e São Paulo (OR = 0,54; IC = 0,35 – 0,82; p.value = 0,04).

Com o intuito de avaliar o possível impacto funcional do genótipo GG deste polimorfismo na via TLR-NF- κ B, foi realizado cultivo de monócitos em duas condições: estimulados com LPS e não estimulados com LPS, e de acordo com os três genótipos AA, AG e GG. Além disso, foi feita a dosagem de IL1 β , com o objetivo de avaliar o produto final desta via. Este desenho experimental utilizou o estímulo com LPS para simular um possível estado inflamatório nas células, como o que é observado em indivíduos portadores da Artrite Reumatoide.

Na condição sem estímulo, os resultados mostram que o perfil transcricional do *MYD88* é 1,1 vezes menor nos indivíduos com o genótipo GG do que nos indivíduos com o genótipo AA. A quantificação de IL1 β no grupo

GG também apresentou diminuição quando comparado ao grupo AA. Entretanto, quando os monócitos foram estimulados com LPS, observamos que o perfil transcricional do *MYD88* para o genótipo GG aumentou mais de 4 vezes, quando comparado aos grupos AA e AG. Dessa forma, por produzirem pouca quantidade de transcritos de *MYD88* na condição sem LPS, as células dos indivíduos com o genótipo GG reagiram de forma mais abrupta ao estímulo com LPS, aumentando a transcrição de *MYD88* possivelmente como um mecanismo compensatório da baixa produção sem estímulo para combater um possível patógeno.

Outro resultado do estudo foi a diminuição da produção de IL1 β nos cultivos do genótipo GG. Estes indivíduos apresentaram produção 5 vezes menor de IL1 β quando comparados com indivíduos do genótipo AA e AG (8,33 versus 44,83 pg/mL, 15,27 pg/mL de AG). A nossa explicação para o fato que houve aumento em 4 vezes no perfil transcricional do *MYD88*, sendo que este não acarretou em aumento, mas sim em diminuição da produção de IL1 β , quando comparadas ao grupo AA, é que houve algum mecanismo de regulação da expressão gênica que foi capaz de modular a grande quantidade de transcritos de *MYD88*, diminuindo assim a tradução da molécula e, conseqüentemente, produzindo menores níveis de IL1 β quando comparados ao genótipo AA. Portanto, podemos considerar que os indivíduos com genótipo GG são baixo produtores de IL1 β .

Baseando-se nos resultados encontrados neste estudo, uma hipótese para o aumento de transcrito de *MYD88* acompanhada de uma diminuição do produto final de sua via, a IL1 β , seria a regulação através da ação de microRNAs, que são potentes reguladores da expressão gênica a nível transcricional. Polimorfismos na região 3'UTR podem modificar a sequência-alvo de alguns miRNAs, criando novos sítios-alvo ou eliminando os sítios existentes. Até o presente momento, nem todos os alvos de miRNAs foram validados experimentalmente e a identificação desses sítios depende de uma análise preliminar por predição através de bioinformática (Jin and Lee 2013).

Para observar se a região do polimorfismo rs6853 é alvo de ligação de microRNAs, utilizou-se a plataforma *miRNA-SNP: microRNA-related Single Nucleotide Polymorphisms* disponível no endereço eletrônico <http://www.bioguo.org/miRNASNP/index.php>. Na análise realizada para este

trabalho, observou-se que na presença do alelo G ocorre a formação de um sítio de ligação para o microRNA hsa-miR-516a-5p com delta G -18.20 kcal/mol de energia, garantindo uma ótima consideração termodinâmica para o pareamento do microRNA com sítio criado pelo alelo G

Assim, é possível sugerirmos que, ao serem estimulados com LPS, os monócitos dos indivíduos com genótipo GG aumentaram a taxa de transcrição de mRNA do *MYD88*, porém foram alvo da regulação pelo hsa-miR-516a-5p, o que provocou regulação da produção proteica de MYD88, resultando em baixa quantidade de IL1 β .

Recentemente, outros estudos também mostraram os efeitos da diminuição de MYD88. Em modelo animal utilizando camundongos MYD88^{-/-}, ocorreu a redução de eosinofilia além da diminuição de produção da citocina IL17A, molécula efetora da resposta Th17. Neste mesmo estudo, camundongos MYD88^{+/+} demonstraram proliferação e expansão da resposta Th17 em resposta à sinalização por IL-23, revelando que o MyD88 exerce papel crítico na alergia e inflamação através da via IL1R1 e diferenciação de células Th17 (PHAM VAN et al., 2016). Outro estudo realizado com células de carcinoma pulmonar, observou que a proteína MyD88 estava altamente expressa em 62,2% das células cancerosas, enquanto, sua expressão foi observada em apenas 10% das células controle. Dentre os pacientes com este tipo de câncer, a elevada expressão da MyD88 foi associada com pior prognóstico, metástase e diminuição da sobrevida dos pacientes em 5 anos (ZHU et al., 2011)

Com base nos resultados apresentados até o momento, o alelo G confere vantagem genética garantindo menor susceptibilidade dos indivíduos portadores do alelo G no desenvolvimento da AR através da criação de um sítio para o hsa-miR-516a-5p. Dessa forma, a expressão do gene MYD88 é regulada negativamente e, por consequência, ocorre menor transcrição de citocinas próinflamatórias via NF- κ B. Nesse contexto, pode-se sugerir que o alelo G desempenha função imunomoduladora da via TLRs-NF- κ B, podendo modular a secreção de citocinas em monócitos de pacientes com a doença.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou pela primeira vez que o polimorfismo rs6853 está associado com menor suscetibilidade à AR nas populações dos estados de Pernambuco e de São Paulo. Além disso, o SNP associado foi capaz de regular a expressão do mRNA do *MYD88* e a subsequente produção de IL1 β em cultivo de monócitos. Dessa forma, podemos sugerir que o alelo G possa atuar como um baixo produtor de citocinas pró-inflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HITCHON, Carol A.; EL-GABALAWY, Hani S. The Synovium in Rheumatoid Arthritis. **The Open Rheumatology Journal**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 107–114, 2011. DOI: 10.2174/1874312901105010107.

ABDEL-WAHAB, Shimma M.; THARWAT, Ibrahim; ATTA, Doaa S.; EL-SAMMAK, Ahmad A.; ATEF, Rehab. Serum level of interleukin-33 in rheumatoid arthritis patients and its association with bone erosion and interstitial lung disease. **The Egyptian Rheumatologist**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 99–104, 2016. DOI: 10.1016/j.ejr.2015.06.001.

ALAMANOS, Yannis; VOULGARI, Paraskevi V.; DROSOS, Alexandros A. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 182–188, 2006. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2006.08.006.

ALANÄRÄ, T.; KARSTILA, K.; MOILANEN, T.; SILVENNOINEN, O.; ISOMÄKI, P. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 118–126, 2010. DOI: 10.3109/03009740903170823.

ALARCON, Renata T.; ANDRADE, Luís Eduardo C.. Anticorpos antiproteínas citrulinadas e a artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 180–187, 2007. DOI: 10.1590/S0482-50042007000300007.

ALETAHA, Daniel et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 62, n. 9, p. 2569–2581, 2010. DOI: 10.1002/art.27584.

ALMEIDA, Maria do Socorro T. M.; ALMEIDA, João Vicente M.; BERTOLO, Manoel B.. Características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatoide no Piauí, Brasil – avaliação de 98 pacientes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 360–365, 2014. DOI: 10.1016/j.rbr.2014.02.005.

ALONSO, Michael N. et al. TH1, TH2, and TH17 cells instruct monocytes to

differentiate into specialized dendritic cell subsets. **Blood**, [S. l.], v. 118, n. 12, p. 3311–3320, 2011. DOI: 10.1182/blood-2011-03-341065.

AMIN, Mohammad A.; MANSFIELD, Pamela J.; PAKOZDI, Angela; CAMPBELL, Phillip L.; AHMED, Salahuddin; MARTINEZ, Rita J.; KOCH, Alisa E. Interleukin-18 induces angiogenic factors in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblasts via distinct signaling pathways. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 1787–1797, 2007. DOI: 10.1002/art.22705.

ANZILOTTI, Consuelo; PRATESI, Federico; TOMMASI, Cristina; MIGLIORINI, Paola. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. **Autoimmunity Reviews**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 158–160, 2010. DOI: 10.1016/j.autrev.2009.06.002.

AVBELJ, M.; HORVAT, S.; JERALA, R. The Role of Intermediary Domain of MyD88 in Cell Activation and Therapeutic Inhibition of TLRs. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 187, n. 5, p. 2394–2404, 2011. DOI: 10.4049/jimmunol.1100515.

BAETEN, D; et al. Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [S. l.], v. 59, n. 12, p. 945–953, 2000. DOI: 10.1136/ard.59.12.945.

BAX, Marieke; HUIZINGA, Tom W. J.; TOES, René E. M. The pathogenic potential of autoreactive antibodies in rheumatoid arthritis. **Seminars in Immunopathology**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 313–325, 2014. DOI: 10.1007/s00281-014-0429-5.

BAX, Marieke; VAN HEEMST, Jurgen; HUIZINGA, Tom W. J.; TOES, Rene E. M. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Immunogenetics**, [S. l.], v. 63, n. 8, p. 459–466, 2011. DOI: 10.1007/s00251-011-0528-6.

BHATTARAM, Pallavi; CHANDRASEKHARAN, Unnikrishnan. The joint synovium: a critical determinant of articular cartilage fate in inflammatory joint diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.05.009.

CARMONA, Loreto; CROSS, Marita; WILLIAMS, Ben; LASSERE, Marissa;

MARCH, Lyn. Rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 733–745, 2010. DOI: 10.1016/j.berh.2010.10.001.

CASTRO-SANTOS, Patricia; DÍAZ-PE, Roberto. Review article Genetics of rheumatoid arthritis : a new boost is. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 171–177, 2015. DOI: 10.1016/j.rbre.2015.10.004.

CHEN, Shuilian; JIANG, Feng; REN, Jiangping; LIU, Jiajing; MENG, Wei. Association of IL-18 polymorphisms with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Asian populations: a meta-analysis. **BMC Medical Genetics**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 107, 2012. DOI: 10.1186/1471-2350-13-107.

COENEN, Marieke J. H. et al. Genetic Variants in Toll-Like Receptors Are Not Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility or Anti-Tumour Necrosis Factor Treatment Outcome. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. e14326, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0014326.

COSTA, Sara et al. Role of MyD88 signaling in the imiquimod-induced mouse model of psoriasis: focus on innate myeloid cells. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 791–803, 2017. DOI: 10.1189/jlb.3MA0217-054RR.

DARRAH, Erika; GILES, Jon T.; OLS, Michelle L.; BULL, Herbert G.; ANDRADE, Felipe; ROSEN, Antony. Erosive Rheumatoid Arthritis Is Associated with Antibodies That Activate PAD4 by Increasing Calcium Sensitivity. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 186, 2013. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005370.

DAVID, Juliano M.; MATTEI, Rodrigo Antônio; MAUAD, Juliana L.; DE ALMEIDA, Lauren Gabrielle; NOGUEIRA, Márcio Augusto; MENOLLI, Poliana Vieira da Silva; MENOLLI, Rafael Andrade. Clinical and laboratory features of patients with rheumatoid arthritis diagnosed at rheumatology services in the Brazilian municipality of cascavel, PR, Brazil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 57–65, 2013. DOI: 10.1590/S0482-50042013000100006.

DAVIGNON, Jean Luc; HAYDER, Myriam; BARON, Michel; BOYER, Jean Frederic; CONSTANTIN, Arnaud; APPARAILLY, Florence; POUPOT, R??my;

CANTAGREL, Alain. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (United Kingdom)**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 590–598, 2013. DOI: 10.1093/rheumatology/kes304.

DAYER, J. M.; CHOY, E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. [S. l.], v. 49, n. 1, p. 15–24, 2010. DOI: 10.1093/rheumatology/kep329.

DINARELLO, Charles A.; NOVICK, Daniela; KIM, Soohyun; KAPLANSKI, Gilles. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 4, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00289..

FERNANDO, Michelle M. A.; STEVENS, Christine R.; WALSH, Emily C.; DE JAGER, Philip L.; GOYETTE, Philippe; PLENGE, Robert M.; VYSE, Timothy J.; RIOUX, John D. Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. e1000024, 2008. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000024.

FRISELL, Thomas; SAEVARSDOTTIR, Saedis; ASKLING, Johan. Family history of rheumatoid arthritis: an old concept with new developments. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 335–343, 2016. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.52.

FUJIHARA, Mitsuhiro; MUROI, Masashi; TANAMOTO, Ken-ichi; SUZUKI, Tsuneo; AZUMA, Hiroshi; IKEDA, Hisami. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 171–194, 2003. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2003.08.003.

GEISSMANN, Frederic; JUNG, Steffen; LITTMAN, Dan R. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. **Immunity**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 71–82, 2003. DOI: 10.1016/S1074-7613(03)00174-2.

GIBSON, Andrew W. et al. The FCRL3 –169CT promoter single-nucleotide polymorphism, which is associated with systemic lupus erythematosus in a Japanese population, predicts expression of receptor protein on CD19+ B cells. **Arthritis & Rheumatism**. [S. l.], v. 60, n. 11, p. 3510–3512, 2010. DOI: 10.1002/art.24915.

GOELDNER, Isabela; SKARE, Thelma L.; REASON, Iara T. de Messias; UTIYAMA, Shirley Ramos da Rosa. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 495–503, 2011. DOI: 10.1590/S1676-24442011000500002.

GOMES, Rafael Kmiliauskis Santos; PIRES, Fabio Antero; NOBRE, Moacyr Roberto Cuce; MARCHI, Mauricio Felippi de Sá; RICKLI, Jennifer Cristina Kozechen. Impacto da artrite reumatoide no sistema público de saúde em Santa Catarina, Brasil: análise descritiva e de tendência temporal de 1996 a 2009. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 57, n. 3, p. 204–209, 2017. DOI: 10.1016/j.rbr.2016.05.003.

GREGERSEN, Peter K.; SILVER, Jack; WINCHESTER, Robert J. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 30, n. 11, p. 1205–1213, 1987. DOI: 10.1002/art.1780301102.

GRONDAL, Lollo; TENGSTRAND, Birgitta; NORDMARK, Birgitta; WRETENBERG, Per; STARK, André. The foot: still the most important reason for walking incapacity in rheumatoid arthritis: Distribution of symptomatic joints in 1,000 RA patients. **Acta Orthopaedica**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 257–261, 2008. DOI: 10.1080/17453670710015067.

HITCHON, Carol; WONG, Keng; MA, Guoping; REED, Jennifer; LYTTLE, David; EL-GABALAWY, Hani. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 46, n. 10, p. 2587–2597, 2002. DOI: 10.1002/art.10520.

HU, Fanlei et al. Toll-Like Receptors Expressed by Synovial Fibroblasts Perpetuate Th1 and Th17 Cell Responses in Rheumatoid Arthritis. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. e100266, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0100266.

INGEGNOLI, Francesca; CASTELLI, Roberto; GUALTIEROTTI, Roberta. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. **Disease Markers**, [S. l.], v. 35, p. 727–734, 2013. DOI: 10.1155/2013/726598.

IWAMOTO, T.; IKARI, K.; NAKAMURA, T.; KUWAHARA, M.; TOYAMA, Y.;

TOMATSU, T.; MOMOHARA, S.; KAMATANI, N. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Rheumatology**, [S. l.], v. 45, n. 7, p. 804–807, 2006. DOI: 10.1093/rheumatology/kel023.

JONES, E. Yvonne; FUGGER, Lars; STROMINGER, Jack L.; SIEBOLD, Christian. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 271–282, 2006. DOI:

JOOSTEN, Leo A. B.; LUBBERTS, Erik; DUREZ, Patrick; HELSEN, Monique M. A.; JACOBS, Marike J. M.; GOLDMAN, Michel; VAN DEN BERG, Wim B. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 249–260, 1997. DOI: 10.1002/art.1780400209.

KAWANAKA, Norikuni et al. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 46, n. 10, p. 2578–2586, 2002. DOI: 10.1002/art.10545.

KAY, Emma; SCOTLAND, Ramona S.; WHITEFORD, James R. Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential. **BioFactors**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 284–294, 2014. DOI: 10.1002/biof.1156.

KLARESKOG, Lars; CATRINA, Anca Irinel; PAGET, Stephen. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, [S. l.], v. 373, n. 9664, p. 659–672, 2009. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60008-8.

KOCHI, Yuta et al. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 512–515, 2011. DOI: 10.1136/ard.2010.130526.

KOZIEL, Joanna; MYDEL, Piotr; POTEPA, Jan. The Link Between Periodontal Disease and Rheumatoid Arthritis: An Updated Review. **Current Rheumatology Reports**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 408, 2014. DOI: 10.1007/s11926-014-0408-9.

KUNISCH, Elke; CHAKILAM, Saritha; GANDESIRI, Muktheshwar; KINNE, Raimund W. IL-33 regulates TNF dependent effects in synovial fibroblasts. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 530–540,

2012. DOI: 10.3892/ijmm.2012.883.

LADNER, Martha B.; BOTTINI, Nunzio; VALDES, Ana M.; NOBLE, Janelle A. Association of the single nucleotide polymorphism C1858T of the PTPN22 gene with type 1 diabetes. **Human Immunology**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 60–64, 2005. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.09.016.

LEBRE, M. Cristina; JONGBLOED, Sarah L.; TAS, Sander W.; SMEETS, Tom J. M.; MCINNES, Iain B.; TAK, Paul P. Rheumatoid Arthritis Synovium Contains Two Subsets of CD83–DC-LAMP– Dendritic Cells with Distinct Cytokine Profiles. **The American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 172, n. 4, p. 940–950, 2008. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070703.

LI, Jun; HSU, Hui-Chen; MOUNTZ, John D. Managing Macrophages in Rheumatoid Arthritis by Reform or Removal. **Current Rheumatology Reports**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 445–454, 2012. DOI: 10.1007/s11926-012-0272-4.

LI, Xiang; CHAI, Wei; NI, Ming; XU, Meng; LIAN, Zijian; SHI, Lewis; BAI, Yang; WANG, Yan. The Effects of Gene Polymorphisms in Interleukin-4 and Interleukin-6 on the Susceptibility of Rheumatoid Arthritis in a Chinese Population. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2014, p. 1–5, 2014. DOI: 10.1155/2014/265435.

LOUZADA-JUNIOR, Paulo; SOUZA, Branca Dias Batista; TOLEDO, Roberto Acayaba; CICONELLI, Rozana Mesquita. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 84–90, 2007. DOI: 10.1590/S0482-50042007000200002.

MANNERS, Prudence Joan; BOWER, Carol. Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? **The Journal of rheumatology**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 1520–30, 2002. DOI: 12136914.

MAXIMIANO DAVID, Juliano; ANTONIO MATTEI, Rodrigo; LUSTOZA MAUAD, Juliana; DE ALMEIDA, Lauren Gabrielle; AUGUSTO NOGUEIRA, Márcio; DA SILVA MENOLLI, Poliana Vieira; ANDRADE MENOLLI, Rafael. Estudo clínico e laboratorial de pacientes com artrite reumatoide diagnosticados em serviços de reumatologia em Cascavel, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**,

[S. l.], v. 53, n. 1, p. 61–65, 2013. DOI: 10.1590/S0482-50042013000100006.

MIOSSEC, Pierre; KORN, Thomas; KUCHROO, Vijay K. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 361, n. 9, p. 888–898, 2009. DOI: 10.1056/NEJMra0707449.

MÖTTÖNEN, M.; ISOMÄKI, P.; SAARIO, R.; TOIVANEN, P.; PUNNONEN, J.; LASSILA, O. Interleukin-10 inhibits the capacity of synovial macrophages to function as antigen-presenting cells. **British journal of rheumatology**, [S. l.], v. 37, n. 11, p. 1207–14, 1998.

MUZ, Barbara; KHAN, Moddasar N.; KIRIAKIDIS, Serafim; PALEOLOG, Ewa M. The role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 201, 2009. DOI: 10.1186/ar2568.

NABI, Gowher; AKHTER, Naseem; WAHID, Mohd; BHATIA, Kanchan; MANDAL, Raju Kumar; DAR, Sajad Ahmad; JAWED, Arshad; HAQUE, Shafiul. Meta-analysis reveals PTPN22 1858C/T polymorphism confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Caucasian but not in Asian population. **Autoimmunity**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 197–210, 2016. DOI: 10.3109/08916934.2015.1134514.

NAMJOU, Bahram et al. PTPN22 Association in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) with Respect to Individual Ancestry and Clinical Sub-Phenotypes. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. e69404, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0069404.

NEIDHART, M.; ZAUCKE, F.; VON KNOCH, R.; JÜNGEL, A.; MICHEL, BA; GAY, RE; GAY, S. Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [S. l.], v. 64, n. 3, p. 419–424, 2004. DOI: 10.1136/ard.2004.023135.

OSPELT, Caroline; BRENTANO, Fabia; RENGEL, Yvonne; STANCZYK, Joanna; KOLLING, Christoph; TAK, Paul P.; GAY, Renate E.; GAY, Steffen; KYBURZ, Diego. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: Toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 3684–3692, 2008. DOI: 10.1002/art.24140.

PARK, Hyun Kyung; KIM, Su Kang; KWEON, Hae Yong; LEE, Kwan Gill; ARASU, Mariadhas Valan; KIM, Young Ock. Promoter polymorphism (–590, T/C) of interleukin 4 (IL4) gene is associated with rheumatoid arthritis: An updated meta-analysis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 4, p. 1–6, 2016. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.01.013.

PAYET, Judith et al. Anticyclic Citrullinated Peptide Antibodies in Rheumatoid and Nonrheumatoid Rheumatic Disorders: Experience with 1162 Patients. **The Journal of Rheumatology**, [S. l.], v. 41, n. 12, p. 2395–2402, 2014. DOI: 10.3899/jrheum.131375.

PHAM VAN, Linh; GERMAUD, Nathalie; RAMADAN, Abdulraouf; THIEBLEMONT, Nathalie. MyD88 modulates eosinophil and neutrophil recruitment as well as IL-17A production during allergic inflammation. **Cellular Immunology**, [S. l.], v. 310, p. 116–122, 2016. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.08.014.

PREMKUMAR, Vummidigiridhar; DEY, Moul; DORN, Ruth; RASKIN, Ilya. MyD88-dependent and independent pathways of Toll-Like Receptors are engaged in biological activity of Triptolide in ligand-stimulated macrophages. **BMC Chemical Biology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 3, 2010. DOI: 10.1186/1472-6769-10-3.

RAMÍREZ, Julio; CELIS, Raquel; USATEGUI, Alicia; RUIZ-ESQUIDE, Virginia; FARÉ, Regina; CUERVO, Andrea; SANMARTÍ, Raimon; PABLOS, José L.; CAÑETE, Juan D. Immunopathologic characterization of ultrasound-defined synovitis in rheumatoid arthritis patients in clinical remission. **Arthritis Research & Therapy**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 74, 2016. DOI: 10.1186/s13075-016-0970-9.

ROBERTS, Ceri A.; DICKINSON, Abigail K.; TAAMS, Leonie S. The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4+ T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00571.

ROOS, Karin; MARTINSSON, Klara; ZIEGELASCH, Michael; SOMMARIN, Yngve; SVÄRD, Anna; SKOGH, Thomas; KASTBOM, Alf. Circulating secretory IgA antibodies against cyclic citrullinated peptides in early rheumatoid arthritis

associate with inflammatory activity and smoking. **Arthritis Research & Therapy**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 119, 2016. DOI: 10.1186/s13075-016-1014-1.

ROSE-JOHN, Stefan. IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. **International Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 1237–1247, 2012. DOI: 10.7150/ijbs.4989.

SABROE, Ian; JONES, Elizabeth C.; USHER, Lynne R.; WHYTE, Moira K. B.; DOWER, Steven K. Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 168, n. 9, p. 4701–4710, 2002. DOI: 10.4049/jimmunol.168.9.4701.

SACRE, Sandra M.; ANDREAKOS, Evangelos; KIRIAKIDIS, Serafim; AMJADI, Parisa; LUNDBERG, Anna; GIDDINS, Grey; FELDMANN, Marc; BRENNAN, Fionula; FOXWELL, Brian M. The Toll-Like Receptor Adaptor Proteins MyD88 and Mal/TIRAP Contribute to the Inflammatory and Destructive Processes in a Human Model of Rheumatoid Arthritis. **The American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 170, n. 2, p. 518–525, 2007.

SCHMITZ, Jochen et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. **Immunity**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 479–490, 2005. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.09.015.

SHEN, Li; ZHANG, Hui; ZHOU, Xindie; LIU, Ruiping. Association between polymorphisms of interleukin 12 and rheumatoid arthritis associated biomarkers in a Chinese population. **Cytokine**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 363–367, 2015. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.09.007.

SILMAN, A. J.; MACGREGOR, A. J.; THOMSON, W.; HOLLIGAN, S.; CARTHY, D.; FARHAN, A.; OLLIER, W. E. R. TWIN CONCORDANCE RATES FOR RHEUMATOID ARTHRITIS: RESULTS FROM A NATIONWIDE STUDY. **Rheumatology**, [S. l.], v. 32, n. 10, p. 903–907, 1993. DOI: 10.1093/rheumatology/32.10.903.

SNIR, Omri et al. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 62, n.

1, p. 44–52, 2010. DOI: 10.1002/art.25036.

SONG, Y. W.; KANG, E. H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. **QJM**, [S. l.], v. 103, n. 3, p. 139–146, 2010. DOI: 10.1093/qjmed/hcp165.

SUGAWARA, Isamu; YAMADA, Hiroyuki; MIZUNO, Satoru; TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. Mycobacterial Infection in MyD88-Deficient Mice. **Microbiology and Immunology**, [S. l.], v. 47, n. 11, p. 841–847, 2003. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03450.x.

SUZUKI, A. et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 520–527, 2003. DOI: 10.1038/ng1206.

TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004. DOI: 10.1016/j.smim.2003.10.003.

TAKEUCHI, Osamu; HOSHINO, Katsuaki; AKIRA, Shizuo. Cutting Edge: TLR2-Deficient and MyD88-Deficient Mice Are Highly Susceptible to Staphylococcus aureus Infection. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 165, n. 10, p. 5392–5396, 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.165.10.5392.

THWAITES, Ryan; CHAMBERLAIN, Giselle; SACRE, Sandra. Emerging Role of Endosomal Toll-Like Receptors in Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 5, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00001.

TOBÓN, Gabriel J.; YOUINOU, Pierre; SARAUX, Alain. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 10–14, 2010. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.12.009.

UDALOVA, Irina A.; MANTOVANI, Alberto; FELDMANN, Marc. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 472–485, 2016. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.91.

VALESINI, Guido; GERARDI, Maria C.; IANNUCELLI, Cristina; PACUCCI, Viviana A.; PENDOLINO, Monica; SHOENFELD, Yehuda. Autoimmunity

Reviews Citrullination and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 490–497, 2015. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.01.013.

VAN DER HELM-VAN MIL, Annette HM; VERPOORT, Kirsten N.; BREEDVELD, Ferdinand C.; TOES, René EM; HUIZINGA, Tom WJ. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. R949, 2005. DOI: 10.1186/ar1767.

VIATTE, Sebastien et al. Replication of Associations of Genetic Loci Outside the HLA Region With Susceptibility to Anti-Cyclic Citrullinated Peptide–Negative Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, [S. l.], v. 68, n. 7, p. 1603–1613, 2016. DOI: 10.1002/art.39619.

VILLANO, Jason S.; RONG, Fang; COOPER, Timothy K. Bacterial Infections in Myd88 -Deficient Mice. **Comparative Medicine**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 110–114, 2014.

WANG, James Q.; JEELALL, Yogesh S.; FERGUSON, Laura L.; HORIKAWA, Keisuke. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 5, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00367.

YAMAMOTO, Kazuhiko; OKADA, Yukinori; SUZUKI, Akari; KOCHI, Yuta. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia—present and future. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 375–379, 2015. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.7.

YANG, Bin et al. Association of polymorphisms in pre-miRNA with inflammatory biomarkers in rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. **Human Immunology**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 101–106, 2012. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.10.005.

YE, Xinchun; KONG, Delian; WANG, Jun; ISHRAT, Tauheed; SHI, Hongjuan; DING, Xiaohui; CUI, Guiyun; HUA, Fang. MyD88 contributes to neuroinflammatory responses induced by cerebral ischemia/reperfusion in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 480, n. 1, p. 69–74, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.007.

YOSHIDA, Y.; TANAKA, T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. **Biomed Res**

Int, [S. l.], v. 2014, p. 698313, 2014. DOI: 10.1155/2014/698313.

ZEISEL, Mirjam B.; DRUET, Vanessa A.; WACHSMANN, Dominique; SIBILIA, Jean. MMP-3 expression and release by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes induced with a bacterial ligand of integrin alpha5beta1. **Arthritis research & therapy**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. R118-26, 2005. DOI: 10.1186/ar1462.

ZHANG, Xue et al. Beyond knockout: A novel homodimerization-targeting MyD88 inhibitor prevents and cures type 1 diabetes in NOD mice. **Metabolism**, [S. l.], v. 65, n. 9, p. 1267–1277, 2016. DOI: 10.1016/j.metabol.2016.05.005.

ZHOU, Xindie; ZHU, Jinlong; ZHANG, Hui; ZHOU, Guoxin; HUANG, Yong; LIU, Ruiping. Is the microRNA-146a (rs2910164) polymorphism associated with rheumatoid arthritis? Association of microRNA-146a (rs2910164) polymorphism and rheumatoid arthritis could depend on gender. **Joint Bone Spine**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 166–171, 2015. DOI: 10.1016/j.jbspin.2014.12.009.

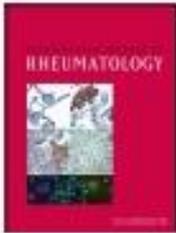
ZHU, Wenhua; MENG, Liesu; JIANG, Congshan; HE, Xiaojing; HOU, Weikun; XU, Peng; DU, Heng; HOLMDAHL, Rikard; LU, Shemin. Arthritis is associated with T-cell-induced upregulation of Toll-like receptor 3 on synovial fibroblasts. **Arthritis Research & Therapy**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. R103, 2011. DOI: 10.1186/ar3384.

ZIEGLER-HEITBROCK, Loems et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. [S. l.], v. 116, n. 16, p. 5–7, 2014. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.

ZRIOUAL, Saloua; TOH, Myew-Ling; TOURNADRE, Anne; ZHOU, Yuan; CAZALIS, Marie-Angélique; PACHOT, Alexandre; MIOSSEC, Vincent; MIOSSEC, Pierre. IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 180, n. 1, p. 655–663, 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.180.1.655.

Takeuchi, O., Hoshino, K., and Akira, S. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J. Immunol.* 165: 5392–5396

ANEXO I - Artigo publicado na revista Scandinavian Journal of Rheumatology. Fator de Impacto 2.669. Qualis B1



Scandinavian Journal of Rheumatology

ISSN: 0300-9742 (Print) 1502-7732 (Online) journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/irha20>

A genetic variant within SLC30A6 has a protective role in the severity of rheumatoid arthritis

JE Adelino, C Addobbati, A Pontillo, TS Fragoso, ÂLBP Duarte, S Crovella, J De Azevedo Silva & P Sandrin-Garcia

To cite this article: JE Adelino, C Addobbati, A Pontillo, TS Fragoso, ÂLBP Duarte, S Crovella, J De Azevedo Silva & P Sandrin-Garcia (2016): A genetic variant within SLC30A6 has a protective role in the severity of rheumatoid arthritis, Scandinavian Journal of Rheumatology, DOI: [10.1080/03009742.2016.1209551](https://doi.org/10.1080/03009742.2016.1209551)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/03009742.2016.1209551>

 Published online: 19 Oct 2016.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=irha20>

Download by: [Cornell University Library] Date: 19 October 2016, At: 06:50

LETTER

A genetic variant within *SLC30A6* has a protective role in the severity of rheumatoid arthritis

JE Adelino^{1,2}, C Addobati^{1,2}, A Pontillo³, TS Fragoso⁴, ÁLBP Duarte⁵, S Crovella^{1,2}, J De Azevedo Silva^{1,2}, P Sandrin-Garcia^{1,2}

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

²Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

³Department of Immunology, São Paulo State University, São Paulo, Brazil

⁴Division of Rheumatology, Clinical Hospital, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil

⁵Division of Rheumatology, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by an exacerbated inflammation response, leading to tissue damage and functional disability. Zinc (Zn) is a trace element crucial for immune cell function. Low serum levels of Zn are able to increase systemic inflammation and pro-inflammatory cytokines, which exacerbate RA activity (1). The zinc transporter ZNT6 is encoded by *SLC30A6* (2p22.3) and regulates Zn at the cellular level. ZNT6 is located at the Golgi apparatus, promotes Zn efflux, and is essential for transporting it from cells to the body (2). As Zn levels in the body fluctuate, they may be responsible for preventing or even aggravating degenerative conditions related to programmed cell death, such as RA (3). As RA is an autoinflammatory disorder with a strong genetic role, *SLC30A6* variations able to modulate Zn function may be associated

with RA development and its clinical and laboratory manifestations.

We recruited 128 RA patients (mean age 51.2 ± 11.7 years) from the Division of Rheumatology, University Hospital of the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. The diagnosis of RA was performed according to criteria defined by the American College of Rheumatology (4). Health Assessment Questionnaire (HAQ) and Clinical Disease Activity Index (CDAI) scores were obtained for the RA patients. The control group comprised 143 healthy individuals (mean age 39.2 ± 14.2 years) from the same geographical area (Recife, Pernambuco, Brazil). The study was approved by the Medical Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (CAAE 03065312.30000.5208).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using a Wizard Genomic DNA Purification Kit

Table 1. Genotype analysis for the *SLC30A6* SNP rs430759 and CDAI score in different genetic models.

	n	CDAI		95% CI	p	AIC
		Mean \pm sd	Difference*			
rs430759						
G/G	52	20.36 \pm 2.07	0			
G/A	58	17.71 \pm 1.73	-2.64			
A/A	18	11.73 \pm 1.96	-8.63	-15.84 to -1.42	0.66	1033
Dominant model						
G/G	52	20.36 \pm 2.07	0			
G/A-A/A	76	16.29 \pm 1.42	-4.06	-8.86 to 0.70	0.09	1034
Recessive model						
G/G-G/A	110	18.96 \pm 1.34	0			
A/A	18	11.73 \pm 1.96	-7.23	13.93 to -0.53	0.03	1032
Overdominant model						
G/G-A/A	70	18.14 \pm 1.68	0			
G/A	58	17.71 \pm 1.73	-0.42	-5.19 to 4.33	0.86	1037

SNP, Single nucleotide polymorphism; CDAI, Clinical Disease Activity Index; CI, confidence interval; AIC, Akaike information criterion; sd, standard deviation.

*Mean difference in relation to the G/G genotype.

(Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's recommendations. The single nucleotide polymorphism (SNP) assessed in this study was rs430759 A>G, located in the 3' untranslated region (UTR) of the *SLC30A6* gene [minor allele frequency (MAF) = 0.42]. Genotype frequencies were compared for Hardy-Weinberg expectations using the Genotype Transposer (5).

Allelic and genotype frequencies from patients and controls were compared to detect any statistically differential distributions using Fisher's exact test in R Software. We also assessed their possible association with HAQ and CDAI scores using the logistic regression test with the SNPAssoc Package in R Software (6). Allelic and genotypic frequencies in patients and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium. We observed an association between the A/A genotype and low severity of disease in RA patients, measured by the CDAI score, and represented by a low mean value of this score (11.73 ± 1.98 , p -value = 0.03) (Table 1). We did not detect any association with disease susceptibility.

Our study evidences an association between the A/A genotype from *SLC30A6* and a low susceptibility to RA severity. It is noteworthy that the relevant action of Zn depends on its sufficient availability intra- and extracellularly to regulate immune function. Zn concentrations have been described as lower in RA patients when compared with healthy individuals, leading to the suggestion that low serum levels of Zn are associated with the presence of RA (7). In addition, serum Zn deficiency correlates with high levels of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-8, and tumour necrosis factor (TNF)- α in RA (1). IL-1 β , IL-8, and TNF- α are known to contribute to RA severity through angiogenesis and leucocyte recruitment in RA joints. Indeed, intracellular Zn activates nuclear factor kappa B (NF κ B), a transcription factor that modulates those cytokines. Moreover, Zn therapy has shown beneficial effects in RA patients, decreasing joint swelling and morning stiffness and increasing walking time (8).

To investigate the possible functional impact of this SNP, we also conducted an in-silico analysis of the 3' UTR of *SLC30A6* using the MiR SNP database (9). Our analysis shows that the 3' UTR region of the

SLC30A6 gene is a target site for miR-4760-3p. When the A allele from rs430759 A>G is present, it abrogates the miR-4760-3p binding site and therefore modulates *SLC30A6* regulation. Considering our results and the role of microRNAs in gene expression regulation, it can be concluded that the A allele upregulates *SLC30A6* expression due to mRNA accumulation. In conclusion, and in accordance with the role of Zn in inflammation, we suggest that RA patients with the A/A genotype rs430759 present a predisposition to low disease activity. Thus, the A/A genotype rs430759 may confer a suitably balanced Zn level and downregulate NF κ B activation, resulting in lower production of pro-inflammatory cytokines regulating this transcription factor.

References

1. Bao B, Prasad AS, Beck FW, Godmere M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285: E1095-102.
2. Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev* 2015;14:277-85.
3. Truong-Tran AQ, Ho LH, Chai F, Zalewski PD. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J Nutr* 2000;130(Suppl 5):1459S-66S.
4. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569-81.
5. Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics* 2001;17:738-9.
6. González JR, Amengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007;23:644-5.
7. Sabehari M, Ayati R, Mirzaii H, Sabehkar A, Hejazi S, Saghati M, et al. Serum trace element concentrations in rheumatoid arthritis. *Biol Trace Elem Res* 2016;171:237-45.
8. Simkin PA. Oral zinc sulphate in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1976;2:539-42.
9. Liu C, Zhang F, Li T, Lu M, Wang L, Yue W, et al. MiR SNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics* 2012;13:661.

José Eduardo Adelino, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, CEP 50760-901, Brazil. E-mail: eduardoadelino@hotmail.com

Accepted 1 July 2016

ANEXO II - Artigo publicado na revista Rheumatology. Fator de impacto 4.868. Qualis A2

Rheumatology Advance Access published January 12, 2017

RHEUMATOLOGY

53

Letter to the Editor (other)

doi:10.1093/rheumatology/kew398

CCR5 Δ 32 and the genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in admixed populations: a multi-centre study

Rheumatology key message

- CCR5 Δ 32 is associated with protection to rheumatoid arthritis in Brazilian populations.

SIR, RA is a systemic autoimmune disease characterized by chronic and symmetric joint inflammation, which leads to bone erosion and swollen articulations caused by leucocyte infiltration, resulting in progressive loss of function. Although the triggers for the disease remain elusive, it is established that it possesses strong genetic and immunological components.

The C-C chemokine receptor type five (CCR5) belongs to a superfamily of G protein-coupled receptors with seven transmembrane domains. Several studies have suggested its role on leucocyte migration to inflammatory sites, activated by ligand binding [1, 2]. A 32 bp deletion polymorphism in the CCR5 gene (CCR5 Δ 32) creates a premature stop codon and thus a truncated protein that is not expressed at the cell surface. Most previous studies that have assessed the influence of the CCR5 genotype in the genetic susceptibility to RA were mainly single centre studies regarding European or European-derived populations. Here, we conducted a multicentre analysis encompassing four Brazilian admixed populations from different regions of Brazil. A total of 740 patients with RA, diagnosed according to the ACR, and 676 controls from the cities of Porto Alegre (South), Belém (North), Recife (Northeast) and Ribeirão Preto (Southeast) were PCR genotyped for the CCR5 Δ 32 polymorphism as previously described [3]. This study was approved by the Ethics

admixure component of the other three cohorts (remembering that Native-American and African populations lack this allele) [4–6]. Ribeirão Preto, the only city that did not follow a trend towards a lower frequency of Δ 32 among patients, was the smallest of the four cohorts. In order to globally evaluate the effect of CCR5 Δ 32 in the susceptibility to RA in these populations, we applied a binary logistic regression model. The odds ratio associated to the risk conferred by the Δ 32 allele was 0.599 (95% CI: 0.40, 0.90), pointing to a protective role of CCR5 Δ 32 against RA susceptibility. By this model, CCR5 Δ 32 carriers are ~1.7 times less likely to develop RA than non-carriers.

A number of genetic association studies have been conducted in order to assess the effect of CCR5 Δ 32 in the susceptibility to RA, and the data from those studies were collectively analysed in a recent meta-analysis [7] that pointed to a protective role of this polymorphism against RA. However, the vast majority of the data involved European populations, and currently there is a lack of data assessing the influence of CCR5 Δ 32 in admixed populations like those in Brazil, where several individuals phenotypically regarded as black (African-derived) or brown (European-African admixed ancestry) are carriers of this typically European allele. Moreover, although half of those studies had a high power detecting small genetic effects, only two of them were able to observe a significant association between CCR5 Δ 32 and protection against RA. This implies that either the genetic effect conferred by this polymorphism in susceptibility to RA is too small or that it varies among different populations. In support of this second hypothesis, our group has previously shown that, in SLE, another autoimmune disease, the effect of CCR5 polymorphism on the genetic susceptibility and clinical outcome varied with genetic/ethnic background, being protective in European-derived patients whereas African-derived female carriers were not protected and were also more prone to develop class IV

Committees from all medical centres involved and all patients and controls gave their informed consent.

In three out of the four cities analysed, we observed a lower frequency of CCR5 Δ 32 carriers in patients as compared with controls (Table 1). Remarkably, the two largest cohorts—Porto Alegre and Belém—presented significant differences in CCR5 Δ 32 carrier frequencies between patients and controls ($P=0.016$ and 0.022 , respectively) despite significant differences in their ethnic composition [4]. Of note, the sample from Porto Alegre was composed exclusively of subjects of European ancestry (self-declared as white), while the other three cohorts were composed of individuals from the general population selected regardless of skin colour. Porto Alegre presented a much higher Δ 32 allele frequency in both patients and controls (and was also the only population to present Δ 32 homozygotes—two, both in the control group), probably due to the high

nephritis [8]. Thus, it is also possible that such an admixed genetic background, with a significant contribution of an African-derived component (among other ethnic contributions), could influence the genetic impact of CCR5 Δ 32 in the development of RA. Of note, we observed significant associations in the cities known to present a lower African genetic component (Porto Alegre and Belém). The possibility that the lack of association in the other two cities could result from the interaction of the CCR5 Δ 32 allele with different genomic contexts is of great interest and remains to be assessed by future studies.

Concluding, we observed an overall protective effect associated to the presence of the CCR5 Δ 32 allele against RA susceptibility that was evidenced in cities with a lower African genetic component. Our results highlight the importance of assessing the influence of CCR5 under different genetic backgrounds.

TABLE 1 CCR5 Δ 32 carrier frequencies in RA patients and controls

	Patients	Controls	OR (95% CI)	P-value ^f
Porto Alegre ^a (n)	361	233		
Δ 32 carrier, n (%)	29 (8.0)	33 (14.2)	0.53 (0.31, 0.90)	0.016
Δ 32 non-carrier, n (%)	332 (92.0)	200 (85.8)		
Δ 32 allele freq.	0.040	0.075		
Belém ^b (n)	186	206		
Δ 32 carrier, n (%)	4 (2.2)	14 (6.8)	0.30 (0.08, 0.89)	0.022
Δ 32 non-carrier, n (%)	182 (97.8)	192 (93.2)		
Δ 32 allele freq.	0.011	0.034		
Recife ^c (n)	104	154		
Δ 32 carrier, n (%)	4 (3.8)	8 (5.2)	0.73 (0.19, 2.48)	0.660
Δ 32 non-carrier, n (%)	100 (96.2)	146 (94.8)		
Δ 32 allele freq.	0.019	0.026		
Ribeirão Preto ^d (n)	89	83		
Δ 32 carrier, n (%)	8 (9.0)	3 (3.6)	2.63 (0.69, 12.59)	0.168
Δ 32 non-carrier, n (%)	81 (91.0)	80 (96.4)		
Δ 32 allele freq.	0.045	0.018		
Overall effect ^e				
Δ 32 carrier			0.599 (0.40, 0.90)	0.015
City			—	<0.001

^aReported ancestry: European 85.5%, African 5.3%, Amerindian 9.3% [4]. ^bReported ancestry: European 69.7%, African 10.9%, Amerindian 19.3% [4]. ^cReported ancestry: European 59.7%, African 23.0%, Amerindian 17.3% [5]. ^dReported ancestry: European 64.4%, African 17.8%, Amerindian 11.7% [6]. ^eBinary logistic regression. ^fbold values refer to P-values under 0.05.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [305839/2015-2, 460762/2014-1].

Bruno Toson¹, Eduardo José dos Santos^{2,5}, José Eduardo Adelino³, Paula Sandrin-Garcia³, Sergio Crovella³, Paulo Louzada-Júnior⁴, Renê Donizete Ribeiro Oliveira⁴, Larysse Santa Rosa Aquino Pedroza², Maria de Fátima Lobato Cunha Sauma², Clayton Pereira Silva de Lima², Fabiola Brasil Barbosa⁵, Claiton Viegas Brenol^{6,a}, Ricardo Machado Xavier⁶, José Artur Bogo Chies⁷ and Tiago Degani Veit^{1,7}

¹Laboratório de Imunogenética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, ²Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, Belém, ³Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, ⁴Serviço de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, ⁵Serviço de Reumatologia, Centro Universitário do Estado do Pará- CESUPA, Belém, ⁶Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and ⁷Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Revised version accepted 3 October 2016

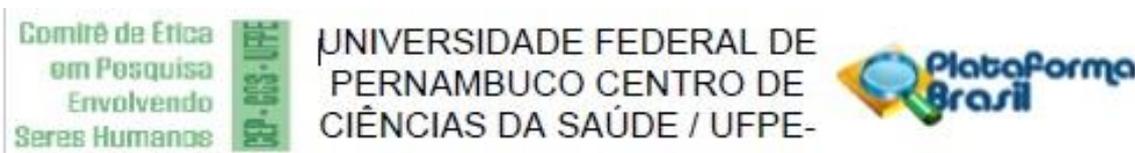
Correspondence to: Tiago Degani Veit, UFRGS - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Av. Sarmento Leite 500, Prédio 12101, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP-90050170. E-mail: tiagoveit@terra.com.br

^aCurrent address: Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

References

- Mueller A, Strange PG. The chemokine receptor, CCR5. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;36:35-8.
- Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 1996;271:17161-6.
- Chies JA, Hutz MH. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:71-5.
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;16:e17063.
- Coelho AV, Moura RR, Cavalcanti CA et al. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res* 2015;14:2876-84.
- Ramos BR, Mendes ND, Tanikawa AA et al. Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: a case control study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2016;16:30.
- Lee YH, Bae S, Song GG. Association between the chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Modern Rheumatol* 2013;23:304-10.
- Schauren JS, Marasca JA, Veit TD et al. CCR5delta32 in systemic lupus erythematosus: implications for disease susceptibility and outcome in a Brazilian population. *Lupus* 2013;22:802-9.

ANEXO III – Parecer do Comitê de Ética das amostras do Estado de São Paulo



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICANTES DA IMUNIDADE INATA É ADAPTATIVA COM A SUSCEPTIBILIDADE AO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATÓIDE EM UMA POPULAÇÃO DO SUDESTE BRASILEIRO"

Pesquisador: PAULA SANDRIN GARCIA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34636013.9.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 836.784

Data da Relatoria: 23/10/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

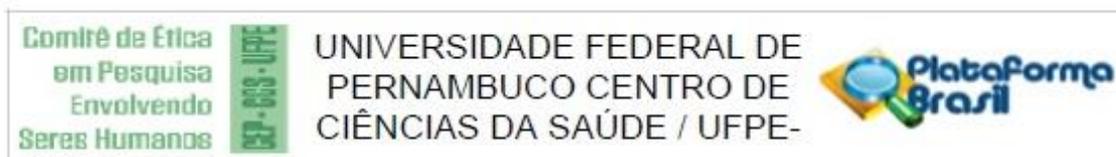
Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

s/recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado.

ANEXO IV – Parecer do Comitê de Ética das amostras de Pernambuco

Continuação do Parecer: 836.784

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

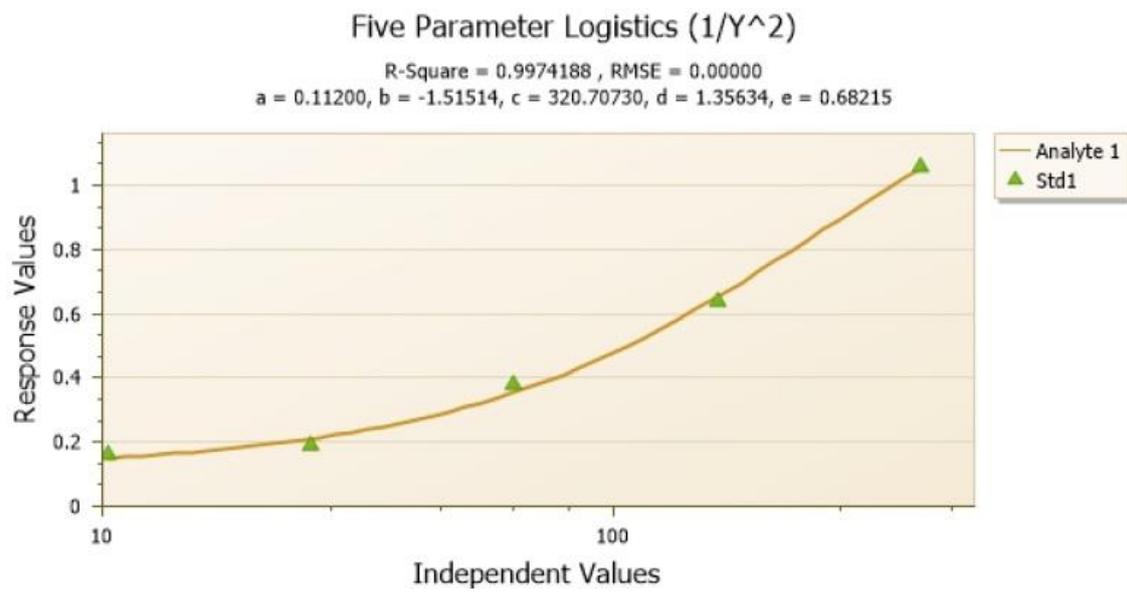
Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

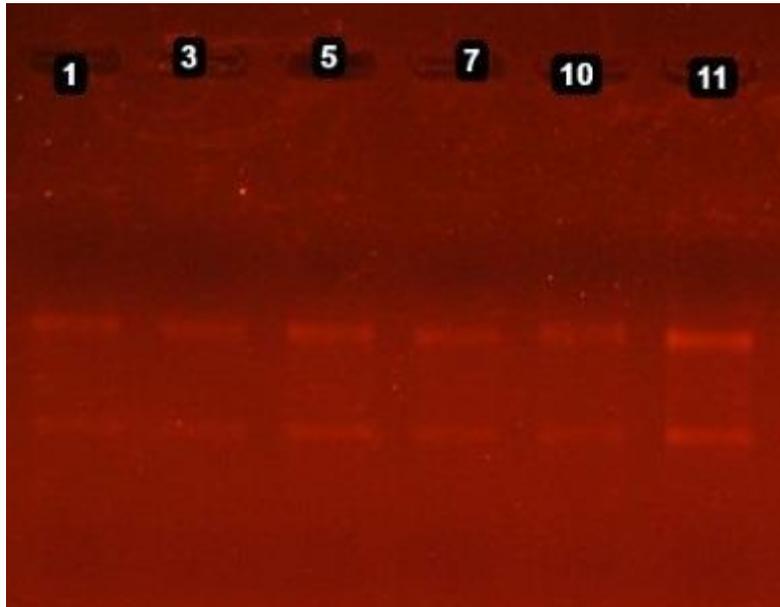
Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação " e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado .

RECIFE, 18 de Outubro de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

ANEXO V – Curva de calibração do ELISA

ANEXO VI – Eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do RNA de cultura



ANEXO VII - Currículo Lattes referente ao período do mestrado

José Eduardo Adelino Silva

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome José Eduardo Adelino Silva
Filiação Luiz Carlos Adelino da Silva e Edilene Adelino da Silva
Nascimento 21/09/1992 - Caruaru/PE - Brasil
Carteira de Identidade 8537736 SDS - PE - 13/05/2008
CPF 093.353.184-26

Endereço residencial Rua Visconde de Barbacena, 339, apto 102; Várzea
Jardim Panorama - Recife
50740445, PE - Brasil
Telefone: 81 995316184
Celular 81 995316184

Endereço profissional Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia
Keizo Asami
Av. Profº Moraes Rego, S/N , Grupo de Pesquisa Variabilidade
Genética Humana
Várzea - Recife
50670901, PE - Brasil
Telefone: 81 21268000

Endereço eletrônico

E-mail para contato : eduardoadelino@hotmail.com
E-mail alternativo eduardoadelino2010@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2015 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA E PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE MYD88 EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE
Orientador: Profª Dra. Paula Sandrin Garcia
Co-orientador: Profº Dra. Jaqueline de Azevedo Silva

2010 - 2014 Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
com período sanduíche em Universidade Católica Portuguesa
(Orientador : Maria José Serol de Brito Correia)
Título: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO DO GENE CARD8 (CASPASE RECRUITMENT DOMAIN MEMBER 8) COM A SUSCEPTIBILIDADE À ARTRITE REUMATOIDE
Orientador: Profaª Dra. Paula Sandrin Garcia e MsC. Catarina Addobbati
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Formação complementar

- 2015 - 2015** Citometria de Fluxo. . (Carga horária: 80h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Princípios e Aplicações da Técnica de RNAi.
(Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Ferramentas Aplicadas ao Estudo de
microRNAs. (Carga horária: 10h).
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2014 - 2014** Extensão universitária em Curso de Inverno de Genética. (Carga horária:
36h).
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Innate Immunity. (Carga horária: 6h).
Universidade de Coimbra, UC, Coimbra , Portugal
- 2013 - 2013** PCR em Tempo Real: Princípios Básicos e Aplicações. . (Carga horária:
60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2012 - 2012** Extensão universitária em Hematologia Laboratorial. (Carga horária: 80h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Análise da Expressão Gênica pela PCR em
Tempo Real. (Carga horária: 4h).
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Interpretação de Exames Lab. e Coleta de
Sangue. (Carga horária: 60h).
Instituto Nacional de Biomedicina, INB, Brasil
- 2011 - 2011** Atualização em Fisiologia Endócrina. . (Carga horária: 45h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2011 - 2011** Radiobiologia em Biomedicina. . (Carga horária: 8h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Atualidades na Resistência Bacteriana. (Carga
horária: 4h).
Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES, Caruaru, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Recentes avanços na Biotecnologia. (Carga
horária: 10h).
Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES, Caruaru, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Tendências atuais em controle epidemiológico.
(Carga horária: 10h).
Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES, Caruaru, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2015 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
 Outras informações:
 Bolsista de Mestrado do Programa de Pós-graduação de Genética
- 2014 - 2015** Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor de Genética Humana , Carga horária: 12, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Monitor da disciplina de Genética Humana para o curso de Odontologia, sob orientação da Profª Drª Paula Sandrin Garcia

Atividades

- 04/2014 - 02/2015** Outra atividade técnico-científica, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética
 Especificação:
 Monitor da disciplina de Genética Humana
- 03/2012 - Atual** Outra atividade técnico-científica, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical
 Especificação:
 Monitor de Parasitologia
- 03/2011 - 12/2011** Outra atividade técnico-científica, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia
 Especificação:
 Monitor da disciplina de Histologia Geral

2. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA

Vínculo institucional

- 2011 - 2015** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva
 Outras informações:
 Bolsista de Iniciação Científica pela FACEPE desenvolvendo o projeto ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE CARD8 COM A SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE.

Projetos

- Projetos de pesquisa
2015 - Atual Identificação de Marcadores Genéticos na Artrite Reumatoide
 Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
 Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2);
 Integrantes: José Eduardo Adelino Silva; Paula Sandrin-Garcia (Responsável); Maria Helena Queiroz de Araújo; Eliézer Rushansky; Paulo Roberto Eleutério de Souza; Isaura Gomes

2011 - 2014 Polimorfismos dos genes codificantes pelas proteínas dos inflamassomas: Associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento do Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide e a gravidade das doenças

Descrição: O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e a Artrite Reumatóide (AR) são duas das doenças auto-imunes reumatológicas mais prevalentes na população e acometem principalmente adultos em idade laborativa. Diversos órgãos e sistemas são alvos destas doenças e altos graus de morbidade e até mesmo o desfecho fatal de alguns destes pacientes são possíveis consequências. Doenças inflamatórias e auto-imunes comuns apresentam uma patogênese multifatorial, no qual o fator genético é importante, como mostrado pela recorrência familiar da doença, e pela presença concomitante de múltiplas doenças auto-inflamatórias e auto-imunes. Segundo a literatura, os inflamassomas têm um papel importante na imunidade inata, e também na imunidade adaptativa, e é possível que polimorfismos na seqüência dos genes das proteínas que constituem os inflamassomas estejam associados a maior susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide, além de maior gravidade e dano orgânico nestes pacientes.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (2);

Integrantes: José Eduardo Adelino Silva; Thiago Sotero Fragoso; Alessandra Pontillo; Sérgio Crovella; Paula Sandrin-Garcia (Responsável); Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti

Áreas de atuação

1. Genética Humana e Médica
2. Biologia Molecular

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Prêmios e títulos

2016 Menção Honrosa - XXI ENGENE, Sociedade Brasileira de Genética

2016 Prêmio Jovem Geneticista - 2º Lugar - XXI ENGENE, Sociedade Brasileira de Genética

2014 Menção Honrosa - LX Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. TOSON, BRUNO; DOS SANTOS, EDUARDO JOSÉ; **ADELINO, JE**; SANDRIN-GARCIA, PAULA; CROVELLA, SERGIO; LOUZADA-JÚNIOR, PAULO; OLIVEIRA, RENÉ DONIZETE RIBEIRO; PEDROZA, LARYSSE SANTA ROSA AQUINO; DE FÁTIMA LOBATO CUNHA SAUMA, MARIA; DE LIMA, CLAYTON PEREIRA SILVA; BARBOSA, Fabíola Brasil; BRENOL,

Claiton Viegas; XAVIER, Ricardo Machado; CHIES, J. A. B.; VEIT, T. D.
 <i>CCR5-32</i> and the genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in admixed populations: a multicentre study. RHEUMATOLOGY. , v.56, p.kew398 - 497, 2017.

2. **ADELINO, JE**; ADDOBBATI, C; PONTILLO, A; FRAGOSO, TS; DUARTE, ÂLBP; CROVELLA, S; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P

A genetic variant within <i>SLC30A6</i> has a protective role in the severity of rheumatoid arthritis. SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY. , v.1, p.1 - 2, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. GUARANA, W. L.; **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; CROVELLA, S; PAULA SANDRIN-GARCIA

A GENETIC POLYMORPHISM WITHIN IL-18 IS ASSOCIATED WITH MALAR RASH IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS FROM STATE OF PERNAMBUCO In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

2. **ADELINO, JE**; OLIVEIRA, A. V.; ADDOBBATI, Catarina; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P.

A genetic variant in NLRP3 inflammasome is not associated with Rheumatoid Arthritis development In: VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, 2016, Garanhuns, PE.

Anais do VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental. , 2016.

3. **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P.

A genetic variant targeted by hsa-miR-3529-3p within NLRP3 confers lower susceptibility do Lupus Nephritis In: VII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics - SINATER, 2016, Recife.

Anais do VII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics. , 2016.

4. HORLANDO, H.; **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; MESQUITA, M. S.; LUNA-ARAGAO, M. A.; PONTILLO, A; CROVELLA, Sérgio; PAULA SANDRIN-GARCIA

A GENETIC VARIANT WITHIN CASP1 GENE IS NOT A GENETIC FACTOR FOR SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS SUSCEPTIBILITY In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

5. **ADELINO, JE**; LIMA, C. A. D.; DEMERY, P.; LUNA-ARAGAO, M. A.; HORLANDO, H.; ARAÚJO, MHQ; RUSHANSKY, E; CROVELLA, Sérgio; de Azevedo Silva, J; PAULA SANDRIN-GARCIA

A GENETIC VARIANT WITHIN IL10 GENE IS ASSOCIATED WITH A LOWER SEVERITY OF RHEUMATOID ARTHRITIS AND UPREGULATES IL10 LEVELS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

6. **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P.

A single nucleotide polymorphism in SLC30A6 gene is not a genetic factor in Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility In: VII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics - SINATER, 2016, Recife.

Annals of VII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics. , 2016.

7. MESQUITA, M. S.; **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; LUNA-ARAGAO, M. A.; PONTILLO, Alessandra; CROVELLA, Sérgio; de Azevedo Silva, J; PAULA SANDRIN-GARCIA

A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM WITHIN CARD8 IS NOT ASSOCIATED WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS SUSCEPTIBILITY In: XXI Encontro de Genética do

Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

8. GUARANA, W. L.; **ADELINO, JE**; SANDRIN-GARCIA, P.

A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM WITHIN CASP1 IS NOT A GENETIC FACTOR FOR RHEUMATOID ARTHRITIS DEVELOPMENT In: 52º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2016, Maceió.

Anais do 52º Congresso Brasileiro de Medicina Tropical. , 2016.

9. MESQUITA, M. S.; **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; HORLANDO, H.; CARVALHO-SILVA, W. H.; PONTILLO, Alessandra; CROVELLA, Sérgio; de Azevedo Silva, J; PAULA SANDRIN-GARCIA

A 3'UTR SNP IN NLRP3 GENE IS ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

10. LUZ, A. E. M.; **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; PONTILLO, Alessandra; CROVELLA, Sérgio; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P.

AIM2 POLYMORPHISMS AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS SUCEPTIBILITY IN PATIENTS FROM STATE OF PERNAMBUCO In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

11. GUARANA, W. L.; **ADELINO, JE**; ADDOBBATI, Catarina; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P.

AIM2 polymorphisms are not associated with Rheumatoid Arthritis susceptibility In: VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, 2016, Garanhuns, PE.

Anais do VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental. , 2016.

12. CARVALHO-SILVA, W. H.; SANTOS, J. L. A.; LUNA-ARAGAO, M. A.; HORLANDO, H.; **ADELINO, JE**; COELHO, A. V. C.; GUIMARAES, R. L.

ASSOCIATION STUDY OF CCR5DELTA32 POLYMORPHISM WITH THE SUSCEPTIBILITY TO HIV-1 INFECTION IN POPULATIONS FROM STATE OF PERNAMBUCO In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

13. **ADELINO, JE**; GUARANA, W. L.; SANDRIN-GARCIA, P.

CC chemokine receptor 5 Δ32 polymorphism: associated analysis in Rheumatoid Arthritis patients from State of Pernambuco In: VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, 2016, Garanhuns, PE.

Anais do VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental. , 2016.

14. BRUNO TOSON; JOSÉ ARTUR BOGO CHIES; EDUARDO JOSÉ DOS SANTOS; **ADELINO, JE**; SANDRIN-GARCIA, P.; LOUZADA-JUNIOR, P.; LARYSSE SANTA ROSA AQUINO PEDROZA; CLAITON VIEGAS BRENOL.; RICARDO MACHADO XAVIER; TIAGO DEGANI VIET

CCR5Δ32 e a suscetibilidade genética à artrite reumatoide em populações miscigenadas: um estudo multicêntrico In: 36ª Semana Científica do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 2016, Porto Alegre.

Anais da 36ª Semana Científica do Hospital das Clínicas de Porto Alegre. , 2016.

15. LUNA-ARAGAO, M. A.; **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; PONTILLO, Alessandra; CROVELLA, Sérgio; de Azevedo Silva, J; PAULA SANDRIN-GARCIA

GENETIC ASSOCIATION BETWEEN IL1Δ POLYMORPHISM WITH A LOWER SUSCEPTIBILITY TO PHOTSENSITIVITY IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

16. ADDOBBATI, C; **ADELINO, JE**; FRAGOSO, T. S.; BARBOSA, A. D.; DUARTE, ÂLBP; DONIZETI, R.; LOUZADA-JUNIOR, P.; DONADI, E. A.; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo

Silva, J; CROVELLA, Sérgio; PAULA SANDRIN-GARCIA
INFLAMMASOME GENES POLYMORPHISMS AND EXPRESSION PROFILE IN BRAZILIAN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

17. **ADELINO, JE**; LIMA, C. A. D.; DEMERY, P.; MESQUITA, M. S.; CARVALHO-SILVA, W. H.; ARAÚJO, MHQ; RUSHANSKY, E; CROVELLA, Sérgio; de Azevedo Silva, J; PAULA SANDRIN-GARCIA

MYD88 SNP rs6853 IS NOT ASSOCIATED WITH RHEUMATOID ARTHRITIS SUSCEPTIBILITY AND TNFα LEVELS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

18. LUZ, A. E. M.; **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; PONTILLO, A; CROVELLA, Sérgio; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P.

NLRC4 POLYMORPHISM IS NOT ASSOCIATED WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

19. GUARANA, W. L.; **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; de Azevedo Silva, J; PAULA SANDRIN-GARCIA

POLYMORPHISMS WITHIN NLRP1 ARE NOT ASSOCIATED WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

20. LIMA, S. C.; **ADELINO, JE**; CROVELLA, Sérgio; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P.

PPTN22 polymorphism and susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: a systematic review and update meta-analysis In: VII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics, 2016, Recife.

Annals of VII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics. , 2016.

21. **ADELINO, JE**; OLIVEIRA, A. V.; ADDOBBATI, Catarina; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo Silva, J; SANDRIN-GARCIA, P.

Single Nucleotide Polymorphisms in NLRC4 Inflammasome are not associated with Rheumatoid Arthritis In: VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, 2016, Garanhuns.

Anais VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental. , 2016.

22. OLIVEIRA, A. P.; LIMA, C. A. D.; **ADELINO, JE**; BARBOSA, A. D.; RUSHANSKY, E; SANDRIN-GARCIA, P.; DEMERY, P.; de Azevedo Silva, J

Th1 and Th2 profile in patients with rheumatic diseases' serum In: 41ª Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2016, Campos do Jordão.

Anais do 41ª Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia. , 2016.

23. MESQUITA, M. S.; **ADELINO, JE**; ASANO, N. M.; VALENTE, L. M.; de Azevedo Silva, J; LIMA, S. C.; SANDRIN-GARCIA, P.

TLR4 rs7873784 [G>C] snp is not a genetic factor to lupus nephritis susceptibility In: VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, 2016, Garanhuns, PE.

Anais do VI Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental. , 2016.

24. **SILVA, J. E. A.**; ADDOBBATI, Catarina; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo Silva, J; DONIZETI, R.; LOUZADA-JUNIOR, P.; DONADI, E. A.; DUARTE, A. L. B. P.; FRAGOSO, T. S.; CROVELLA, Sérgio; SANDRIN-GARCIA, P.

A genetic variant in NLRP3 inflammasome is associated with Rheumatoid Arthritis in Brazilian population In: 61º Congresso Brasileiro de Genética, 2015, Águas de Lindoia.

60º Congresso Brasileiro de Genética. , 2015.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo Silva, J; PAULA SANDRIN-GARCIA

A genetic variant targeted by hsa-miR-3529-3p within NLRP3 confers lower susceptibility do Lupus Nephritis, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

2. **ADELINO, JE**; CRUZ, H. L. A.; PONTILLO, Alessandra; de Azevedo Silva, J; PAULA SANDRIN-GARCIA

A single nucleotide polymorphism in SLC30A6 gene is not a genetic factor in Systemic Lupus Erythematosus susceptibility, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

3. **SILVA, J. E. A.**; de Azevedo Silva, J; ARAÚJO, MHQ; RUSHANSKY, E; SANDRIN-GARCIA, P.

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO DO GENE MYD88 E A SUSCEPTIBILIDADE À ARTRITE REUMATOIDE, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Demais produções bibliográficas

1. **ADELINO, JE**

Ferramentas de Biologia Molecular aplicadas ao estudo de doenças do sistema imune. Palestra - I Workshop Campinense de Biomedicina - Uninassau - Campina Grande. , 2016. (Outra produção bibliográfica)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **ADELINO, JE**

Ferramentas de Biologia Molecular aplicadas ao estudo de Doenças do Sistema Imune, 2016. (Outra produção técnica)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **II International Symposium on Rare Diseases**, 2016. (Simpósio)

.

2. **VII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics**, 2016. (Simpósio)

A genetic variant targeted by hsa-miR-3529-3p within NLRP3 confers lower susceptibility do Lupus Nephritis.

3. **I International Symposium on Rare Diseases**, 2015. (Simpósio)

.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **LXI Congresso Brasileiro de Genética**, 2015. (Congresso)

A GENETIC VARIANT IN NLRP3 INFLAMMASOME IS ASSOCIATED WITH RHEUMATOID ARTHRITIS IN BRAZILIAN POPULATION.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2015. (Encontro)

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO DO GENE MYD88 E A SUSCEPTIBILIDADE À ARTRITE REUMATOIDE.

Organização de evento

1. SILVA, J. E. A.; Bezerra, RS

VIII Simpósio em Inovação em Ciências Biológicas - SICBIO, 2016. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. SILVA, J. E. A.; MIRANDA, J. L.; SILVA-JUNIOR, A. A.

Participação em banca de Bruna Albuquerque Barreto. **Causas da icterícia neonatal: uma revisão de literatura**, 2016

(Biomedicina) Centro Universitário Maurício de Nassau - Campina Grande

2. SILVA, J. E. A.; SILVA-JUNIOR, A. A.; MIRANDA, J. L.

Participação em banca de Andrey Tavares de Moura. **Efeitos tóxicos de metais pesados no organismo humano**, 2016

Centro Universitário Maurício de Nassau - Campina Grande

3. SILVA, J. E. A.; MIRANDA, J. L.; SILVA-JUNIOR, A. A.

Participação em banca de Yuska Taíse de Souza Ferreira. **Imunoterapia e seus resultados no tratamento de alergia: uma revisão**, 2016

Centro Universitário Maurício de Nassau - Campina Grande

4. SILVA, J. E. A.; MIRANDA, J. L.; SILVA-JUNIOR, A. A.

Participação em banca de Talyta Emaely Nascimento Diniz. **Intoxicação por benzodiazepínicos: uma revisão**, 2016

Centro Universitário Maurício de Nassau - Campina Grande

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos	completos	publicados	em
periódico.....			2
Trabalhos	publicados	em	de
eventos.....		anais	27
Apresentações	de		trabalhos
(Congresso).....			6
Apresentações	de		trabalhos
(Simpósio).....			2
Apresentações	de		trabalhos
(Outra).....			2
Demais			produções
bibliográficas.....			1

Produção técnica

Outra			produção
técnica.....			1

Eventos

Participações	em	eventos
(congresso).....		8

Participações	em	eventos	
(simpósio).....			6
Participações	em	eventos	
(encontro).....			2
Participações	em	eventos	
(outra).....			3
Organização	de	evento	
(congresso).....			1
Organização	de	evento	
(outro).....			2
Participação	em banca de trabalhos de	conclusão	
(graduação).....			4

