

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Kamila De Melo Vilar

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO *GENE IL22RA1* COM
OS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-22 E COM PARÂMETROS CLÍNICOS
DE PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATÓIDE**

Recife

2015

Kamila De Melo Vilar

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO *GENE IL22RA1* COM
OS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-22 E COM PARÂMETROS CLÍNICOS
DE PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATÓIDE**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica**

Orientadora: Prof^a. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Michelly Cristiny Perreira

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Vilar, Kamila de Melo

Associação de polimorfismos no gene *IL22RA1* como os níveis séricos de IL-22 e com parâmetros clínicos de pacientes portadores de artrite reumatóide/ Kamila de Melo Vilar. – Recife: O Autor, 2015.

109 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadora: Michelly Cristiny Perreira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos

1. Artrite reumatóide 2. Polimorfismo I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orientadora) II. Perreira, Michelly Cristiny (coorientadora) III. Título

616.7227

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-160

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^ª. Dr^ª Maria Eduarda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^ª. Dr^ª Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^ª. Dr^ª Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 10 de julho de 2015

Dissertação de mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 10 de março de 2015, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores: apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre

PRESIDENTE E EXAMINADORA INTERNA: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta
(Departamento de Bioquímica -Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
(Departamento de Biofísica e Radiobiologia -Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Pablo Rafael Silveira Oliveira
(Instituição de Saúde Coletiva -Universidade Federal da Bahia)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha melhor amiga, meu exemplo, minha vida:

Minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por seu infinito amor e por tantas bênçãos derramadas sobre.

À minha Mãe, meu maior exemplo de vida e superação. Obrigada por sempre estar junto comigo, comprando minhas lutas e comemorando minhas vitórias, melhor nossas vitórias. Tudo isso é pra senhora, te amo demais!

À minha família que mesmo distante se faz sempre presente, me dando palavras e motivações para nunca desistir, amo vocês!

À Prof^a Dr^a Maira Galdino da Rocha Pitta, por me dar a oportunidade de participar desse grupo de pesquisa, sendo uma das responsáveis pelo meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigada!

À Dr^a Michelly Cristiny Pereira, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, paciência, dedicação, conselhos, pelas idas a UPE e HC, muito obrigada!

Ao Prof^o Dr^o Moacyr Rêgo, pelos conselhos e por sempre estar disposto a me ajudar, muito obrigada!

Aos médicos do HC, em especial Dr^o Laurindo Rocha e Dr^a Andrea Dantas, sem a ajuda deles esse trabalho não seria o mesmo, muito obrigada!

À todos colegas LINATEanos, pelos momentos de descontração e aprendizado, em especial: Antonio Félix, Wanessa Sena, Adson Paixão, Lucas Tavares, Michael Leal, Flaviana Alves, Helena Neta, Maria Clara e Thiago Lins, muito obrigada pelos conselhos, ajudas e momentos de descontração que tive durante todo esse tempo.

À todos meus amigos que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, em especial: André, Erwelly, Fabianne, Felipe, Hugo, Karla e Laís, muito obrigada pelas conversas, apoio, momentos e desesperos compartilhados.

À FACEPE e INCT_i, pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

Deus não atrasa, não se engana, não erra endereço de entrega, não adormece, não desiste, não esquece! Ouve cada oração, anota cada lágrima!

Autor desconhecido.

RESUMO

VILAR, K M. ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO *GENE IL22RA1* COM OS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-22 E COM PARÂMETROS CLÍNICOS DE PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATÓIDE 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O processo inflamatório associado à liberação de citocinas está diretamente envolvido na patogênese da artrite reumatóide (AR). Um estudo anterior do nosso grupo relatou que pacientes com AR apresentaram níveis elevados da citocina IL-22 em relação aos controles e este aumento foi associado a um pior quadro clínico. Polimorfismos em interleucinas ou nos receptores específicos podem modificá-los funcionalmente, e assim, contribuir para o desenvolvimento da AR. O objetivo deste estudo foi identificar polimorfismos no receptor da citocina IL-22 que possam estar associados ao risco de desenvolver AR. Cento e trinta e oito portadores de AR foram recrutados pelo Serviço de Reumatologia do HC - UFPE, cumprindo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia foram genotipados para os polimorfismos no *IL22RA1* (rs4292900 e rs10794665) através da metodologia TaqMan®; o grupo controle foi formado por cento e vinte e oito indivíduos saudáveis. Os SNPs foram identificados por meio de consulta ao site HapMap, com uma frequência do alelo menor (MAF) de pelo menos 0,1% em caucasianos. Todas as frequências genéticas foram verificadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e a comparação das proporções foi realizada através do qui-quadrado (X^2) ou teste exato de Fisher. Resultados: O genótipo TT (rs4292900) foi significativamente associado a AR quando comparados aos controles (37.79% e 21.36%, respectivamente, $p=0,0054$, odds ratio=2.23). Os pacientes heterozigotos CT e homozigotos TT para o polimorfismo rs4292900 apresentaram níveis significativamente elevados da citocina IL-22 comparados ao homozigoto CC ($p=0.0018$ e $p=0.0324$, respectivamente). Quanto aos parâmetros clínicos o genótipo CT (rs4292900) apresentou valores maiores do índice de atividade da doença (CDAI) comparado aos homozigotos; o mesmo ocorreu com o rs1079466. Observamos que os indivíduos TT para o rs 4292900 apresentaram maiores valores de hemossedimentação (VSH) comparados aos heterozigotos ($p=0.016$). Conclusão: Nossos resultados sugerem uma associação entre o rs4292900 e uma maior susceptibilidade a artrite reumatóide. Os dois SNPs não foram associados a pior quadro clínico da doença, no entanto o genótipo TT do rs4292900 foi associado com o altos níveis do VSH.

Palavras-chave: Artrite Reumatóide, IL-22, *IL22RA1*, SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único).

ABSTRACT

VILAR, K M. ASSOCIATION OF INTERLEUKIN-22 RECEPTOR ALPHA-1 (IL-22RA1) POLYMORPHISMS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS IN BRAZILIAN PATIENTS 2015. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The inflammatory process associated with the release of cytokines is directly involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). A previous study from our group reported that RA patients had higher levels of IL-22 cytokine compared to controls and this increase was associated worse clinical condition. Interleukins or polymorphisms in the specific receptors can modify them functionally, therefore contributing to the development of the RA. The objective of this study was to identify polymorphisms in the IL-22 cytokine receptor that may be associated with risk of developing RA. One hundred and thirty-eight patients with RA were recruited at the Rheumatology Service HC - UFPE, meeting the American College of Rheumatology criteria they were genotyped for polymorphisms in IL22RA1 (rs4292900 and rs10794665) through the TaqMan method; the control group consisted of one hundred twenty-eight healthy individuals. SNPs were identified by query of the HapMap site with a minor allele frequency (MAF) of at least 0.1% in Caucasians. All genetic frequencies were checked for Hardy-Weinberg and the comparison of proportions was performed using the chi-square (X^2) or Fisher's exact test. Results: The TT genotype (rs4292900) was significantly associated with RA compared to controls (37.79% and 21:36% respectively, $p = 0.0054$, odds ratio = 2.23). Patients heterozygous CT, and homozygous TT for the polymorphism rs4292900 had significantly elevated levels of the cytokine IL-22 compared to the homozygous CC ($p = 0.0018$ and $p = 0.0324$, respectively). As for the clinical parameters the CT genotype (rs4292900) showed higher values of disease activity index (CDAI) compared to homozygous; so has the rs1079466. We observe that the TT individuals for rs4292900 showed higher erythrocyte sedimentation rate (ESR) values compared to heterozygotes ($p = 0.016$). Conclusion: Our results suggest an association between rs4292900 and increased susceptibility to rheumatoid arthritis. The two SNPs were not associated worse clinical disease, however the rs4292900 TT genotype was associated with high levels of ESR.

Keywords: Rheumatoid Arthritis, IL22, *IL22RA1*. Polymorphisms, SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Acometimento simétrico das mãos e pés na Artrite Reumatóide. 20
- Figura 2.** Células e moléculas específicas que podem participar do desenvolvimento da AR. 25
- Figura 3.** Estrutura cristalográfica da IL-22. 34
- Figura 4.** Interação da citocina IL-22 com seus receptores. 36
- Figura 5.** Desenho do receptor *IL22RA1*, contendo os SNPs selecionados rs4292900, rs 16829207 e rs10794665. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas associadas à patogênese da Artrite Reumatóide.	26
Tabela 2. Critérios do <i>American College of Rheumatology</i> (ACR)1987 para classificação da Artrite Reumatóide.	27
Tabela 3. Critérios classificatórios para Artrite Reumatóide 2010 ACR/EULAR.	28
Tabela 4. Principais mecanismos da IL-22 nas doenças auto-imunes.	38
Tabela 5. Lista dos reagentes utilizados na extração de DNA “In House”, com suas funções.	51
Tabela 6. Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).	55

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACPA	-	Anticorpos Anti-Peptídeos Citrulinados
ACR	-	Colégio Americano de Reumatologia (do inglês, <i>American College of Rheumatology</i>)
APCs	-	Células Apresentadoras de Antígenos
AR	-	Artrite Reumatóide
CD	-	Doença de Crohn
CCR6	-	Receptor Quimioquinado 6
CDAI	-	Índice Clínico de Atividade da Doença (do inglês, <i>Clinical Disease Activity Index</i>)
Das28	-	Escore de Atividade da Doença em 28 articulações (do inglês, <i>Disease Activity Score 28</i>)
DA	-	Dermatite Atópica
EULAR	-	Liga Européia contra o Reumatismo (do inglês, <i>European League Against Rheumatism</i>)
IBD	-	Doenças Inflamatórias do Intestino
IL	-	Interleucina
IFN- γ	-	Interferon Gama
FGF	-	Fator de Crescimento de Fibroblastos
HLA	-	Antígeno Leucocitário Humano
HAQ	-	Questionário de Avaliação de Saúde (do inglês, <i>Health Assessment Questionnaire</i>)
TNFs	-	Fatores de Necrose Tumoral

TGF- β	-	Fator de Transformação de Crescimento Beta
FR	-	Fator Reumatóide
LES	-	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MMP	-	Metaloproteinases da Matriz
NK	-	Natural Killer
NK22	-	Subconjunto de Células Natural Killer 22
NO	-	Óxido Nítrico
PCR	-	Proteína C Reativa
PDB	-	Banco de Dados de Proteínas (do inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
PDGF	-	Fator Derivado de Plaquetas
PTPN22	-	Proteína Tirosina Fosfatase, Não Receptor do Tipo 22(linfóide) (do inglês, <i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22 (lymphoid)</i>)
PXK	-	PX Contendo Domínio de Serina / Treonina-Quinase
RANKL	-	Receptor do Sistema Ativador Nuclear Fator-KappaB Ligante (do inglês, <i>Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand</i>)
RT-PCR	-	Reação em Cadeia Da Polimerase em Tempo Real
RFLP	-	Polimorfismo do Fragmento de Restrição (do inglês <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
STR	-	Repetições em Tandem (do inglês, <i>Tandem Repeats</i>)
SNP	-	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
STAT4	-	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 4
TCR	-	Receptor Antígeno Específico
TRAF1	-	Fator Associado ao Receptor de TNF 1
Th	-	T auxiliar (do inglês, <i>T helper</i>)

- TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
- TNFAIP3 - Fator de necrose tumoral-alfa induzida por proteína 3 (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3*)
- TTP - Trombocitopenia Imune
- UC - Colite Ulcerativa
- VSH - Taxa de Sedimentação de Eritrócitos
- VNTR - Repetição em Tandem de Número Variável (do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*)

SUMÁRIO

1.Introdução	18
2.Revisão da Literatura	20
2.1. Artrite Reumatóide	20
2.1.1. Epidemiologia da Artrite Reumatóide	21
2.1.2. Fisiopatologia da Artrite Reumatóide	23
2.1.3. Critérios clínicos e laboratoriais para diagnóstico da AR	27
2.2. Papel do sistema imune no desenvolvimento da Artrite Reumatóide	31
2.2.1. Fenótipo Th22 e a Interleucina 22 (IL-22)	34
2.2.2. Interleucina -22 nas doenças autoimunes	37
2.2.3. IL-22 na Artrite Reumatóide	39
2.3. Polimorfismo	40
2.3.1. Polimorfismos implicados na suscetibilidade à Artrite Reumatóide	43
3.Justificativa	45
4.Objetivos	46
4.1.Objetivo Geral	46
4.2.Objetivos Específicos	46
5. Procedimentos Metodológicos	47
5.1 Métodos	47
5.1.1 População e Local do Estudo	47
5.1.2 Critérios de Inclusão	47
5.1.3 Critérios de Exclusão	47
5.1.4 Variáveis	48
5.1.4.1 Independentes	48
5.1.5 Coleta e Armazenamento de Amostras Biológicas	49
5.1.6 Extração do DNA Genômico	49

5.1.7 Determinação da concentração de DNA das amostras	52
5.1.8 Seleção dos Polimorfismos	52
5.1.9 Desenho do Gene	52
5.1.10 Genotipagem	54
5.1.10.1 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)	54
5.1.11 Dosagem de Citocina	55
5.1.12 Análise Estatística	56
6. Resultados	57
6.1. Artigo: Association of interleukin-22 receptor alpha-1 (<i>IL22RA1</i>) polymorphisms with rheumatoid arthritis in Brazilian patients	58
7. Discussão	76
8. Conclusão	78
9. Perspectivas	79
Referências	80
Apêndices	88
Apêndice A	88
Apêndice B	89
Apêndice C	90
Apêndice D	96
Anexos	106
Anexo I	106

1. Introdução

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica de etiologia desconhecida, que atinge estruturas articulares podendo afetar o tecido conjuntivo de qualquer parte do organismo. Causa uma destruição articular progressiva levando, assim, as mais variadas manifestações sistêmicas, como por exemplo, deformidades físicas e até mesmo a morte precoce. Aproximadamente 1% da população mundial é acometida pela doença, que tem maior incidência nas mulheres da quarta a sexta décadas de vida (Silman AJ, et. al., 2002).

A AR é considerada uma doença multifatorial, uma vez que há participação de vários genes e uma importante influência do meio ambiente no estabelecimento da doença. As citocinas inflamatórias estão diretamente implicados na patogênese da AR, como parte de uma rede de regulação complexa relacionados a processos imunológicos específicos que promovem a auto-imunidade, inflamação crônica e destruição tecido (Firestein GS. et. al., 2003).

Inicialmente, a etiologia da doença foi associada a uma resposta Th1, no entanto novos estudos sugerem a participação de células Th17 e Th22 no desenvolvimento da AR. A IL-22 é uma interleucina produzida tanto pelas células Th17 e Th22. A IL-22 é membro da família da interleucina 10 e tem como função a defesa contra patógenos, cicatrização de feridas e remodelamento tecidual. A IL-22 exerce sua função a partir da sinalização que ocorre através da ligação desta citocina a um complexo heterodimérico constituído dos receptores IL-10R2 e IL-22RA1 (Zhang L, et. al. 2011. Lubberts E. et. al., 2008).

Recentemente, nossa equipe evidenciou a participação da IL-22 na AR, no qual foram detectados níveis aumentados de IL-22 em pacientes com AR quando comparados com o controles sadios (Rocha Jr, LF. et. al., 2012).

Foi observado também que os níveis de IL-22 são significativamente relacionados com a atividade da doença (avaliada através de índices específicos - DAS28 e CDAI), presença de fator reumatóide e erosões articulares. Nesse estudo, pioneiro em associar os níveis de IL-22 com a atividade da doença de acordo com DAS28 e CDAI, sugere-se que a IL-22 possa ter um papel agravante na patogenia da AR (Rocha Jr, LF. et. al., 2012).

Alterações nos genes de interleucinas ou de seus receptores específicos podem alterar suas funções, aumentando ou diminuindo suas atividades pró-inflamatórias, e consequentemente podem contribuir para o agravamento de doenças. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar se a presença de polimorfismos no receptor da citocina IL-22 são associada ao risco de desenvolver AR, à gravidade da doença ao aumento dos níveis séricos da citocina (IL-22).

2. Revisão da Literatura

2.1. Artrite Reumatóide

A AR é uma doença sistêmica, caracterizada por inflamação sinovial e destruição da cartilagem articular e do osso mediada por síntese persistente de citocinas inflamatórias e metaloproteinases da matriz (MMP). Há uma produção de autoanticorpos e destruição óssea e articular, decorrente da proliferação e inflamação da membrana sinovial (Arend WP, et. al, 1995).

O acometimento articular geralmente é simétrico, com rigidez matinal que pode durar de minutos a horas. O quadro clínico pode apresentar as mais variadas manifestações articulares e extra-articulares como, por exemplo, dor, inchaço e vermelhidão, podendo acometer outras articulações tais como joelhos, tornozelos, ombros e cotovelos, podendo também atingir a coluna vertebral, como mostrado na figura 1.

Figura 1. Acometimento simétrico articular das mãos e pés na Artrite Reumatóide.



Fonte: Adaptado de Hochberg do Colégio Americano de Reumatologia, 2011.

A doença também pode apresentar sintomas extra-articulares, relacionados com pior prognóstico, com manifestações oculares, pleuropulmonares, cardíacas e nervosas.

A maioria dos pacientes apresenta um curso crônico, flutuante e períodos de remissão e exacerbação, que evolui com destruição articular progressiva, deformidades, incapacidade física e até mesmo morte precoce (Liao KP, et. al., 2011).

A AR acomete indivíduos em idade produtiva e pode, assim, promover a limitação na capacidade funcional e perda da capacidade laboral. Estudos mostram que pacientes com AR, possuem mais chances de desenvolver doenças associadas ao sistema cardiovascular (como hipertensão arterial sistêmica) e diabetes mellitus (Scholes M, et. al., 2009).

Considerada uma doença multifatorial, foram identificados fatores genéticos que aumentam o risco de desenvolver a AR em cerca de 10 vezes maior de manifestar a doença, dos quais podemos destacar: polimorfismos nos genes HLA (antígeno leucocitário humano) que apresentam vários subtipos, como o HLA-DR4 ou o HLA-DR1 que são mais comuns em alguns grupos de pessoas com AR (Furukawa H, et al., 2015); e no gene da Proteína Tirosina Fosfatase, Não Receptor do Tipo 22 (linfóide) (PTPN22), que foram por diversas vezes associados à AR (Chang HH, et al., 2015). Entretanto, há quem possua esses polimorfismos e não desenvolva a AR, assim como nem todas as pessoas com a doença têm essas alterações genéticas. Supõe que exista uma participação de vários genes, com diferentes contribuições a susceptibilidade no desenvolvimento da doença (Klareskog et. al., 2009; Pawlik A, et. al., 2005).

2.1.1. Epidemiologia da Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide é uma enfermidade que atinge aproximadamente 0,3 % a 1% da população mundial adulta, sendo mais comum em mulheres e em países desenvolvidos, como América do Norte e Europa, segundo dados da Organização

Mundial da Saúde (OMS) (Disponível em <http://www.who.int/en/> Acesso em: 01 junho 2015).

No Brasil, um estudo de 2004 mostrou prevalência de 0,46%, representando quase 1 milhão de pessoas com AR, no território nacional este estudo corrobora o achado de um estudo multicêntrico realizado em 1993, que verificou uma prevalência de AR em adultos variando de 0,2% a 1%, correspondendo a uma estimativa de 1,3 milhão de pessoas acometidas no Brasil (Marques Neto JF, et. al 1993). Segundo dados da OMS, esta doença pode se manifestar em qualquer idade, sendo mais frequente entre a quarta e sexta décadas de vida, apresentando maior incidência nas mulheres do que nos homens. A mortalidade nos pacientes com AR é cerca de duas vezes maior do que a população normal e a expectativa de vida é inversamente proporcional à gravidade da doença e sem idade de início (Queiroz M, et. al 2002).

Pesquisas sugerem que agentes infecciosos, como o vírus Epstein-Barr, citomegalovírus, ou o *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, podem atuar como gatilhos para o desenvolvimento da doença em pessoas com propensão genética, embora estes mecanismos ainda não estejam completamente elucidados. A formação de imunocomplexos durante o processo infeccioso desencadeia a formação do fator reumatóide, um auto-anticorpo de alta afinidade contra a porção Fc da imunoglobulina (Tamiya G, et. al., 2005; Toussirot, et.al. 2008; Ebringer A, et. al.,2014; Disaanayake DM et. al.,2014)

Além da resposta do organismo a eventos estressantes, como trauma físico ou emocional, outro mecanismo que pode desencadear AR são os hormônios femininos, uma vez que a incidência é maior nas mulheres (Vandenbroucke JP, et. al., 2007). Embora os mecanismos precisos da patogênese da AR ainda não tenham sido profundamente estudados, algumas citocinas possuem papéis importantes no

desenvolvimento da doença. No entanto, já se sabe que, o desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias promovem a indução da autoimunidade, inflamação e destruição das articulações (Lili Magyari, et. al. 2014).

2.1.2 Fisiopatologia da Artrite Reumatóide

Sendo a artrite reumatóide uma doença de etiologia multifatorial, a predisposição genética é responsável por aproximadamente 60% dos casos hereditários. Fatores ambientais, tais como infecções por agentes microbianos, o tabagismo e a obesidade, podem influenciar no desenvolvimento, na progressão e gravidade da AR (Woolf A, et. al., 2003).

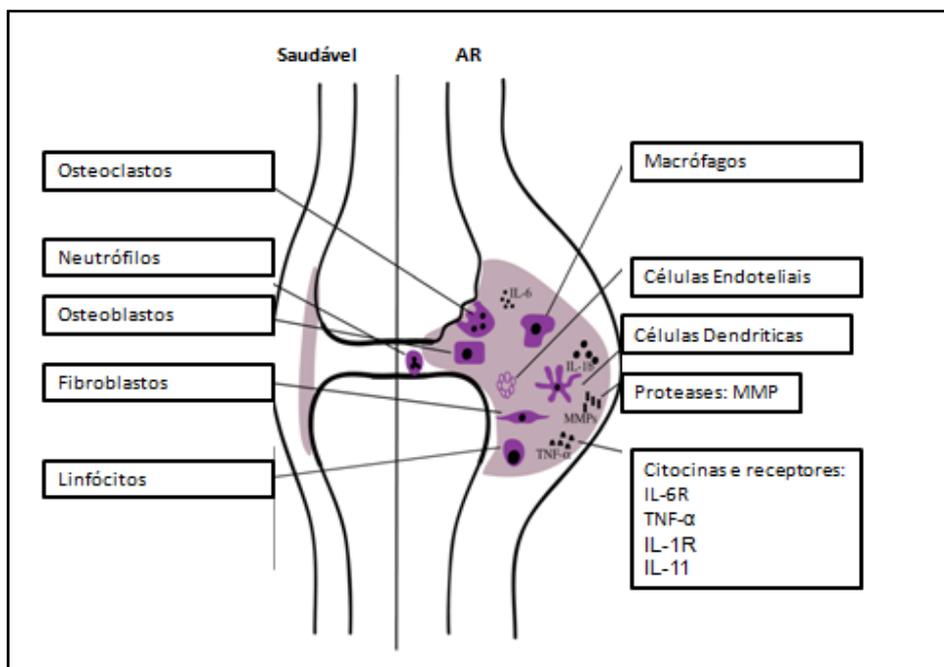
A doença possui causa desconhecida, associada a alterações no tecido conjuntivo, com manifestações típicas, como dor e tumefação das articulações. Inicialmente acreditava-se que a produção de anticorpos ocorria por meio das interações do sistema imune inato, através das células apresentadoras de antígenos (APCs), com o sistema imune adaptativo, sendo as células T CD4⁺ e células B fundamentais na etiopatogênese da doença. O processo inflamatório que ocorre na AR é ocasionado devido a migração de células sanguíneas e mediadores inflamatórios para o interior das articulações, causando hiperplasia e hipertrofia das células sinoviais, angiogênese e um infiltrado predominantemente de células T CD4⁺ (Magyari L, et. al., 2014).

As citocinas pró-inflamatórias, principalmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - 308) e duas interleucinas, as IL-1B e IL-6, são citocinas chaves que provêm a inflamação e o processo de destruição do tecido conjuntivo (Li F, et al., 2015). É provável que outras citocinas, tais como IL-23, IL-17A e o interferon gama (IFN- γ) também desempenhem papéis cruciais na patogênese da AR (Hamdy G, et al., 2015; Andersson A, et. al., 2015; Xia T, et. al., 2015). No entanto, outros estudos sugerem que

as citocinas, IL-4 e IL-10, não estão relacionadas com a patogênese da artrite, embora tenham relatado que essas citocinas são eficazes na redução do processo inflamatório. Porém não existem muitos estudos mostrando a ação da IL-4 e da IL-10 e porque não são capazes da resposta inflamatória na AR. (Kokkonen H. et.al., 2010; Ruschpler P. ET.al.,2002).

As citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento produzidos durante a AR como, o fator derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) facilitam o influxo de células inflamatórias, formando um infiltrado linfocitário nas cavidades articulares (Marques-Neto JF, et al. 1993). Na AR, a membrana sinovial se torna edemaciada e avermelhada ocasionando um aumento das vilosidades, ocupando assim uma extensa parte da cavidade articular, dando origem ao *pannus*, um tecido granulomatoso com capacidade de invadir e destruir os tecidos cartilagosos e ósseos (Lubberts E. et. al., 2010). As propriedades destrutivas do *pannus* estão relacionadas à produção de MMP, a estimulação da osteoclastogênese através do ligante do receptor do fator nuclear kapa B (RANKL) (que é mediada por osteoblastos), tendo as citocinas IL-6, IL-1 β , fatores de necrose tumoral (TNFs) e interleucina-11 (IL-11), como indutoras da atividade osteoclástica, demonstrada na figura 2. (Hideki Fujita, 2013).

Figura 2. Esquema de uma área saudável e uma com AR, onde estão presentes células e moléculas específicas que podem estar associadas ao desenvolvimento da doença.



Fonte: Adaptado de Put, Westhovens, Lahoutte & Matthys (2014).

A origem da doença ainda é desconhecido, porém fatores genéticos podem estar associados a AR. O antígeno leucocitário humano (HLA) – DRB1 foi o primeiro a ser descrito como um gene associado ao risco da AR (Burmester GR, et. al., 2015). Estudos de associação no genoma humano identificaram mais de 30 marcadores genéticos associados à AR, por exemplo polimorfismos nos genes HLA-DRB 1, Proteína Tirosina Fosfatase não Receptor Tipo 22 (lymphoid) (PTPN22), Fator de Necrose Tumoral Induzida pela Proteína 3 (TNFAIP3), fator associado ao receptor de TNF 1 (TRAF1), transdutor de sinal e ativador de transcrição 4 (STAT4), receptor quimioquinado 6 (CCR6), PX contendo domínio de serina / treonina-quinase (PXX), as funções desses genes/ prteínas são descritas na tabela 1 (Stahl EA, et. al., 2010).

Tabela 1. Genes associados à patogênese da Artrite Reumatóide

Proteínas	Funções
HLA-DRB1	Relacionado com o antígeno da molécula MHC; responsável pelo repertório de células T; forte ligação genética para a artrite reumatóide (Burmester GR, et. al., 2015).
PTPN22	Específico de linfócitos tirosina fosfatase envolvida na regulação da ativação de linfócitos. Com associação genética na AR (Messemaker TC, et. al., 2015).
TNFAIP3	Proteínas de sinalização e regulador negativo das células induzida por TNF α e ativação de NF-Kb (Hao G, et. al., 2014).
TRAF1	Regulador da superfamília de receptores TNF- α (por exemplo, a NF-kB e JNK) (Chen R, et. al. 2014).
STAT4	O transdutor de sinais de citocinas que regulam a proliferação, sobrevivência e diferenciação de linfócitos (Chen R, et. al. 2014).
CCR6	Diminui a susceptibilidade a doenças autoimunes. Inibindo células Th17 bem como o recrutamento Treg nos tecidos inflamatórios (Cheng P, et. al., 2015).
PXK	Envolvido na transmissão sináptica e a internalização induzida por ligação e degradação dos fatores de crescimento epidérmico (Prasad P, et. al., 2012).

Existem outros genes envolvidos na patologia da AR e muitos estudos tem mostrados que diversos polimorfismos desempenham papéis na atividade da doença, como será revisado mais adiante.

2.1.3. Critérios clínicos e laboratoriais para diagnóstico da AR

Para quantificar e avaliar a evolução clínica da AR, foram desenvolvidos diversos instrumentos metrológicos, entre os quais os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) de 1987, que avaliam a capacidade funcional, a qualidade de vida dos pacientes e os fatores de risco para o desenvolvimento da doença (tabela 2). Estes critérios possibilitam a definição da doença, mas têm uma limitação significativa em discriminar pacientes com AR daqueles com outras doenças reumáticas (Arnett et al., 1988).

Tabela 2. Critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) 1987 para classificação da Artrite Reumatóide.

Critério	Definição
1- Rigidez Matinal	Rigidez matinal com duração de pelo menos 1 hora até a melhora máxima.
2- Artrite de Três ou Mais Áreas Articulares	Ao menos três áreas articulares simultaneamente afetadas, observadas pelo médico.
3- Artrite das Articulações das Mãos	Artrite em punhos, metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais.
4- Artrite Simétrica	Envolvimento simultâneo de áreas de ambos os lados do corpo.
5- Nódulos Reumatóides	Nódulos subcutâneos sobre as proeminências ósseas.
6- Fator Reumatóide Sérico Positivo	Presença de quantidades anormais de fator reumatóide.
7- Alterações Radiográficas	Radiografias posteriores de mãos e punhos, demonstrando rarefação óssea.

Com o desenvolvimento de novos critérios de classificação da AR em 2010 pelo ACR e pela *European League Against Rheumatism* (EULAR), foi elaborada uma nova abordagem para a classificação da, facilitando o estudo de indivíduos em estágios iniciais da doença (Aletaha et al., 2010) (tabela 3).

Tabela 3. Critérios classificatórios para a Artrite Reumatóide (2010 ACR/EULAR).

População-alvo

Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema); e sinovite que não seja melhor explicada por outra doença.

Acometimento articular (0-5)

- 1 grande articulação – 0
- 2-10 grandes articulações – 1
- 1-3 pequenas articulações (grandes não contadas) – 2
- 4-10 pequenas articulações (grandes não contadas) – 3
- > 10 articulações (pelo menos uma pequena) – 5

Sorologia (0-3)

- Fator reumático (FR) negativo E anticorpos anti-citrulinados contra peptídeos (ACPA) negativo – 0
- FR positivo OU ACPA positivo em baixos títulos – 2
- FR positivo OU ACPA positivo em altos títulos – 3

Duração dos sintomas (0-1)

- < 6 semanas – 0
- ≥ 6 semanas – 1

Provas de atividade inflamatória (0-1)

- PCR normal E VHS normal – 0
 - PCR anormal OU VHS anormal – 1
-

Fonte: ACR/EULAR (2010)

Diante dos critérios da ACR/EULAR, foram criados questionários para avaliar a capacidade física desses pacientes visando a obtenção de um diagnóstico preciso e o acompanhamento da evolução da doença.

O *Health Assessment Questionnaire* (HAQ), possui o objetivo de avaliar a incapacidade física do paciente através da aplicação de um questionário de vinte questões sobre as atividades básicas da vida diária do paciente avaliado como: vestimenta e presença física, acordar, alimentar-se, andar, higiene, alcance, pegada e outras atividades do dia a dia. Para cada uma dessas categorias, o paciente indica o grau de dificuldade em quatro possíveis respostas que vão de “nenhuma dificuldade = 0” até “incapaz de fazê-lo = 3”. Inclui, também, um questionário sobre o uso de dispositivos de ajuda ou de suporte a terceiros para as atividades das oito categorias. A pontuação final do HAQ é a média das pontuações das oito categorias.

O *Clinical Disease Activity Index* (CDAI) utiliza uma contagem articular mais simplificada, de 28 articulações, e determinam um valor numérico para atividade da AR. Os pacientes em remissão são classificados com valores de CDAI menores que 2.8; quando os pacientes estão com atividade baixa os valores são menores que 10, na atividade moderada os valores estão entre 10 e 22 e os pacientes com alta atividade da doença são classificados com valores de CDAI maiores do que 22.

O *Disease Activity Score 28* (DAS 28) é o cálculo da atividade da doença por meio de um programa de computação (DAS-Score-NL), que avalia 28 articulações, incluindo os ombros, os cotovelos, os punhos, as articulações metacarpo-falângicas e as inter-falângicas proximais e os joelhos, bilateralmente. O resultado da avaliação clínica utilizando esse parâmetro define os pacientes em remissão ($DAS28 < 2.6$), em baixa atividade ($2.6 > DAS28 < 3.2$), em atividade moderada ($DAS28 > 3.2$) e em alta gravidade ($DAS > 5.1$).

A definição de remissão, no entanto, pode ser expressa pela taxa de sedimentação de eritrócitos (VHS) e de proteína C reativa (PCR) correlacionando-se com a atividade da doença. O acometimento de menos articulações pode representar uma resposta de fase aguda normal, apesar de apresentar uma inflamação significativa. A Sorologia positiva para o fator reumatóide (FR) e anticorpos anti-citrulinados contra peptídeos (ACPA) na AR precoce pode auxiliar na identificação de pacientes com maior probabilidade de se beneficiar de uma terapia agressiva (Van Leeuwen MA et. al., 1983).

O FR (auto-anticorpos contra a porção Fc da imunoglobulina-G) pode ser encontrada em até 60% dos pacientes com AR. O FR, que pode estar presente em doenças auto-imunes e infecções crônicas, apresenta uma sensibilidade aproximada de 65 % e especificidade de 82% na AR (Nishimura K, et. al., 2007)

2.2 Papel do Sistema Imune na Artrite Reumatóide

Na AR, há um complexo envolvimento das células e componentes do sistema imunológico. A resposta imune adaptativa é alvo das atenções nas doenças autoimunes, porém várias funções do sistema imune inato estão sendo descobertas, principalmente em relação aos receptores de reconhecimento e vias de sinalização intracelular, dados que fornecem informações sobre o papel do sistema imune inato na AR (Marinou I, et. al. 2007).

A resposta imune inata possui a função de conferir uma proteção rápida, eliminando os patógenos ou limitando a sua propagação. Várias moléculas podem ser liberadas durante o processo de infecção, como antígenos derivados de patógenos destruídos ou componentes das células do hospedeiro. Estes produtos celulares pode provocar a secreção de mediadores, incluindo as interleucinas (IL) 1, IL-6, IL-12, IL-18, fator de necrose tumoral α (TNF α) e óxido nítrico (NO). Essas moléculas podem auxiliar a resposta de células T, induzindo a destruição de patógenos e de células infectadas, ou desencadear o desenvolvimento de autoimunidade destrutiva (Pereira, I.A. et al. 2012).

Na AR há uma produção contínua de citocinas derivadas de macrófagos e linfócitos, como por exemplo: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-31, IL-33 entre outras. Algumas dessas citocinas, estão diretamente envolvidas na patogênese da AR e participam da ativação persistente do sistema imune. (Perricone C, et. al., 2011).

Os linfócitos T CD4⁺ estão presentes nas áreas perivasculares da membrana sinovial, onde estão associados às células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) (Lin H, et. al., 2015). Inicialmente, duas formas polarizadas de respostas Th efetoras foram identificadas, tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) (Pawlik A, et. al., 2005). Células Th1 produzem principalmente interferon gamma (IFN)- γ e seu

principal papel é o de proteger contra microorganismos intracelulares, em contraste, células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e estão envolvidos na proteção contra nematódeos gastrintestinais, mas são também responsáveis por alergias (Xia T, et. al., 2015; Zare HR, et. al., 2015). Células Th1 e Th2 se desenvolvem através da ativação de vários fatores de transcrição, sendo os mais importantes STAT-4 e T-bet em células Th1, e STAT-6 e GATA-3 em células Th2 (Rengarajan, Szabo, et al., 2000). A rápida produção de IFN- γ , IFN- α , ou IL-12 por células do sistema imune inato direciona a diferenciação Th1, enquanto que a produção precoce de IL-4, em a ausência de IL-12, é relacionada com a diferenciação Th2 (Chtanova, Mackay, 2001).

Um terceiro tipo de célula TCD4⁺ foi detectado e é essencialmente caracterizado pela produção da citocina IL-17 e, por isso, foi denominado Th17 (Xin N, et. al., 2015). O gene regulador do programa de diferenciação Th17 é o ROR γ t (Kim KW, et. al., 2015). Foi identificado que células Th17 expressam altos níveis de outro receptor nuclear conhecido com ROR α dependente do STAT-3, induzido por TGF- β e IL-6 (Brown C, et. al., 2015). As principais funções das citocinas produzidas por células Th17 são relacionadas à quimio atração de diferentes tipos de células, através da indução de outras citocinas e quimiocinas. Células Th17 também produzem IL-21, que é um poderoso fator diferenciação de células B, e que também desempenha efeito autócrino amplificando as respostas Th17 (Mellado M, et. al., 2015).

Porém o fato mais interessante em relação as células Th17 foi a descoberta de sua grande ligação com as doenças autoimunes. Foi descrito que a citocina IL-23 produzida em grande quantidade por essas células estava ligada diretamente a presença de doenças autoimunes (Langrish, Chen et al., 2005). Camundongos que tiveram deletada a subunidade p19 da IL-23 não desenvolveram encefalomielite autoimune experimental (Cua, Sherlock, et al., 2003) ou artrite induzida por colágeno (Murphy,

Langrish, et al., 2003). Esse dois trabalhos demonstram a necessidade da presença da IL-23 para a ocorrência dessas doenças autoimunes possivelmente devido a capacidade da IL-23 em ativar macrófagos e motivar a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos mesmos.

Os linfócitos T CD8 produzem uma grande quantidade de IL-4, no entanto produzem pouco IFN- γ . Estes linfócitos são importantes na regulação da resposta imune durante a AR e suprimem a ativação dos linfócitos T CD4+ (Warrington KJ, et. al., 2001). Os linfócitos T de memória, são os mais diferenciados e abundantes no meio sinovial reumatóide, tendo a função de influenciar fortemente a ativação de linfócitos T, apesar de apresentarem uma baixa capacidade proliferativa. A maior parte dos linfócitos T do sangue periférico possui na sua superfície um receptor antígeno específico (TCR) que contém dois polipeptídios variáveis: a cadeia α e a cadeia β (TCR α - β). Outro receptor dos linfócitos T, menos freqüente e descrito mais recentemente, é composto pelas cadeias γ e δ (TCR γ - δ) (Zhang J, et. al., 2011).

Os macrófagos sinoviais secretam grande quantidade de citocinas no meio sinovial reumatóide. Uma vez ativados, os macrófagos produzem substâncias que atuam de forma autócrina (IL-1 e TNF α) e outras que atuam de forma parácrina sobre as células B do revestimento sinovial e sobre os condrócitos (que liberam enzimas destrutivas). Além de tudo isso, proliferação massiva de fibroblastos sinoviais também contribui para a produção e acúmulo de proteases e citocinas destrutivas da cartilagens articulares (Alamanos Y, et. al., 2006).

Os neutrófilos, os mastócitos e as células natural killer (NK), estão presentes em grandes quantidades e amplamente distribuídas no tecido e líquido sinoviais, sendo capazes de produzir várias citocinas que estão envolvidas na patogênese da AR. Porém

os mecanismos de ação para o desenvolvimento da doença ainda não completamente conhecidos (Marques-Neto JF, et. al., 2002).

As células T regulatórias (Tregs) são importantes no controle das respostas inflamatórias e conseqüentemente das doenças autoimunes. Essas células inibem a indução de IL-2 e proliferação de células TCD4+ e TCD8+ e regulam as células apresentadoras de antígenos (APCs) (como os linfócitos B) e células dendríticas (Walter GJ, et. al., 2015) . Na AR, células de Tregs possuem a função é prejudicada, no entanto as contagens de células Treg circulantes podem ser variáveis (Boissier MC. et.al., 2008). A diferenciação de células Tregs resulta da expressão da fator de transcrição Foxp3 e sua estabilização, além de outras moléculas como Mtor (Venkatesha SH, et. al., 2015). Um estudo demonstrou uma correlação negativa entre a atividade da doença e o número de células Tregs no sangue periférico de mulheres no terceiro trimestre da gravidez, indicando um papel de protetor das Tregs (Boissier MC. et.al., 2009; Forger Fet.al., 2008).

2.2.1 Fenótipo Th22 e a Interleucina 22 (IL-22)

A IL-22 é uma glicoproteína pertencente da família IL-10, que compreende, além da própria IL-10 outras interleucinas como, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, e IL-29. A classificação destas citocinas baseia-se na homologia entre os genes que codificam suas proteínas e receptores (Zdanov A, et. al., 2004)

O gene da *IL22* humana localiza-se no braço longo do cromossomo 12, locus12q15, e possui cerca de 99 mil pares de bases (Wolk K, et. al., 2010). A estrutura da citocina IL-22 contém seis α -hélices, dispostos em uma conformação antiparalela, resultando em uma proteína monomérica, semelhante a um feixe, como demonstrado na figura 3.

Figura 3. Estrutura cristalográfica da IL-22



(Fonte: Banco de Dados de Proteínas (do inglês, *Protein Data Bank-PDB*)

As células Th22 e Th17, são as principais subpopulações de células T que produzem IL-22. Essa citocina também é expressa por células T CD8 + e outros linfócitos da imunidade inata, incluindo um subconjunto de células natural killer (NK22) (Duhon T, et. al., 2009. Zenewicz LA, et. al. 2008).

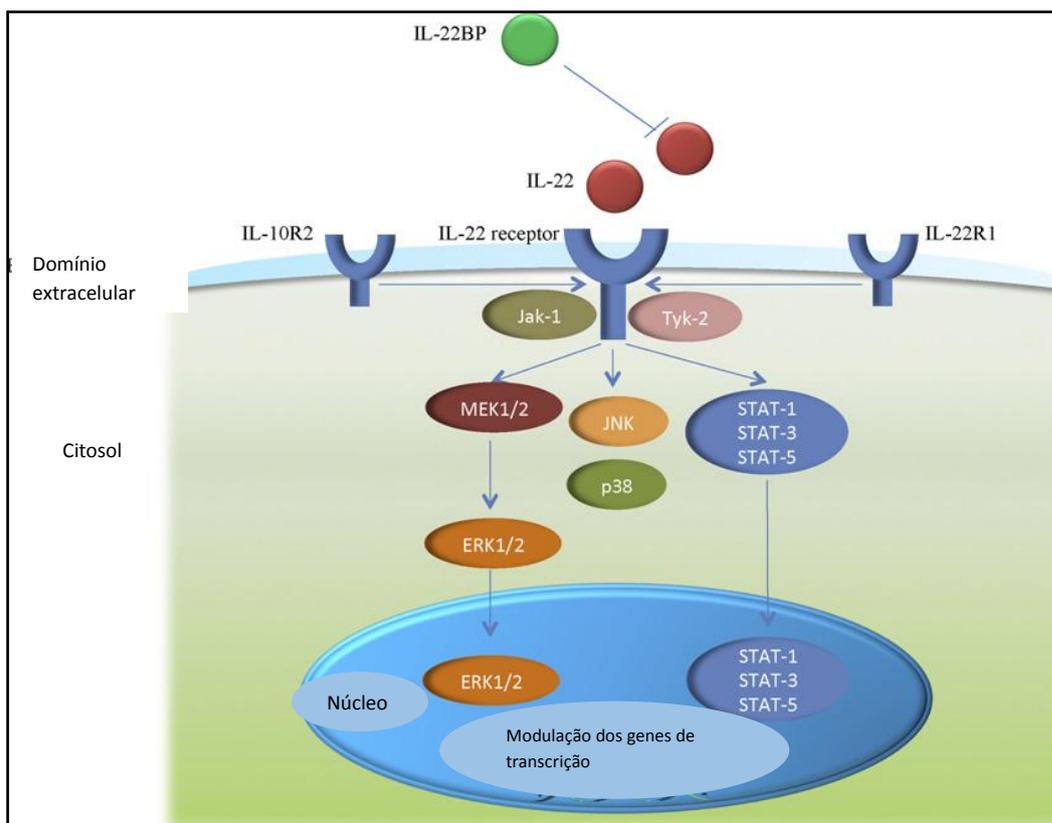
A IL-22 exerce sua função através da sua ligação à superfície da célula alvo por meio de um receptor complexo composto por duas cadeias, a IL-22RA1 e a IL-10R2, ambos pertencente à família de receptores de citocinas da classe II (CRF2) (Renauld JC. 2010. Kotenko SV, et. Al., 2001). Enquanto o IL-10R2 é expresso por uma ampla variedade de células, a expressão de IL-22RA1 ocorre provavelmente nas células epiteliais dos órgãos do aparelho digestivo e das vias respiratórias e da pele (Wolk K, et. al., 2006. Wolk K, et. al. 2004). Entre as células alvo da interleucina IL-22, estão queratinócitos da pele, células epiteliais do sistema respiratório e digestório,

miofibroblastos subepiteliais do cólon, fibroblastos derivados de pacientes com AR, hepatócitos e células pancreáticas (Pawlik A, et. al., 2005).

O gene que codifica a *IL22RA1* está localizado no cromossomo 1, locus 1q36.11. Inicialmente, a IL-22 se liga ao IL-22RA1, promovendo uma alteração conformacional na citocina que permite que ela se ligue secundariamente ao IL-10R2. Assim como ocorre com outros membros da família da IL-10, após a interação da IL-22 com seu receptor de IL-22, ocorre inicialmente, a ativação da via JAK / STAT, em particular de STAT3, mas de também STAT1/STAT5 (Reineke U, et. al., 1999; Buchs N, et. al., 2001).

Além do receptor de superfície, existe uma proteína solúvel que apresenta grave afinidade pela citocina da IL-22, denominada de proteína de ligação da IL-22 (ou IL-22 BP). Esta proteína representa um membro do receptor de fator de libertação de corticotropina (CRF2) que não possui o domínio intracelular e transmembrana. A IL22BP é codificada por um gene localizado no cromossomo 6, locus 6q24.1. Vários estudos mostram que a IL-22BP se liga a IL-22 e inibe potencialmente a secreção de IL-22 (Dumoutier L, et.al. 2001. Kotenko SV, et. al., 2001).

Figura 4: Interação da citocina IL-22 com seus receptores



Fonte: Adaptado de Hai-Feng Pan et. al. (2012)

2.2.2 IL-22 nas doenças auto-imunes

A IL-22 é secretada principalmente por células Th22, estando presentes também as células Th17, que desempenham um papel importante em doenças inflamatórias e auto-imunes. Esta citocina exerce sua função dependente da natureza do problema afetado e da sua interação com outras citocinas, podendo haver aumento da imunidade inata e regeneração, ou amplificação de sinais de TNF- α contribuindo com um papel protetor, para um microambiente pró-inflamatório da pele nas reações imunológicas (Zhang N, et. al., 2011). As principais funções da IL-22 nas doenças auto-imunes estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Principais mecanismos da IL-22 nas doenças auto-imunes.

Doenças	Função	Mecanismo da IL-22
Artrite Reumatóide	Patogênica	Promove uma resposta inflamatória no tecido sinovial e a osteoclastogênese (Kazantseva MG, et.al., 2014).
Psoríase	Protetora	Participa na cicatrização de feridas e reparação de tecidos (Saeki H. et.al., 2014).
Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)	Protetora	Desempenha um papel protetor em pacientes com LES (Cheng F. et.al.,2009).
Dermatite atópica (DA)	Patogênica	Apresenta um papel patogênico em manifestações cutâneas por modular e inibir os produtos de genes envolvidos na diferenciação dos queratinócitos (Esaki H et.al.,2015).
Doenças inflamatórias do intestino (IBD), incluindo doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC)	Protetora	Promove a cicatrização das feridas intestinais (Medrano LM et.al.,2012).
Trombocitopenia imune (ITP)	Patogênica	Apresenta um papel patogênico na doença e o bloqueio da IL-22 pode ser uma opção terapêutica em doentes ativos (Cao J. et.al.,2011)

2.2.3 IL-22 na Artrite Reumatóide

Recentemente, um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância da IL-22 na AR, devido ao aumento dos níveis desta citocina em pacientes com AR quando comparados a controles saudáveis (Rocha Jr, LF.et. al., 2012).

Zhang et al. (2012), evidenciou o aumento no número de células Th22 no sangue periférico de pacientes com AR, em comparação com pacientes com artrite óssea (OA) e controles saudáveis. Neste mesmo estudo, foi observada a correlação positiva entre a presença de células Th22 e a gravidade da doença. Da mesma forma, outros estudos apontam para um possível papel patogênico de IL-22 durante a AR (Kazantseva MG, et. al., 2012). Foi mostrado também uma associação entre os níveis séricos das IL-22 com a progressão radiográfica da AR, evidenciando a importância da IL-22 na artrite inflamatória crônica. (Ikeuchi H, et. al. 2005).

Outros estudos também mostraram que os níveis séricos de IL-22 são positivamente correlacionados com o número de Th22 em pacientes com AR (Zhang L, et. al., 2012). Um estudo recente mostrou uma correlação da citocina com a doença, onde os níveis séricos de IL22 e no líquido sinovial estão elevados em pacientes com AR. No entanto, uma investigação mais aprofundada necessária para explicar o papel exato de IL-22 na AR (Lili Magyari, et. al., 2014).

2.3 Polimorfismo

A maior parte do DNA de qualquer indivíduo, por volta de 99,5%, é exatamente a mesma, comparada com qualquer outro indivíduo. As diferenças na sequência de DNA entre indivíduos são chamadas de polimorfismos (Van Riel P, et. al., 2001).

Polimorfismos são definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior do que 1%. As variantes que estão presentes em frequências menores do que 1% na população são arbitrariamente chamadas de mutação (Van Riel P, et, al., 2001).

O produto de uma mutação é um novo alelo. O novo alelo pode: conferir uma melhoria no valor adaptativo do organismo, sendo considerado benéfico; pode não interferir no valor adaptativo do organismo, sendo considerado neutro ou pode impedir ou reduzir a capacidade funcional do organismo, sendo considerado deletério (Wakui M, et, al., 2013).

Em geral, quando alelos novos estão associados a características deletérias, suas frequências tendem a manter-se em níveis baixos na população. Em se tratando de uma patologia congênita, podemos supor que o potencial reprodutivo do organismo seja diminuído e, com isso, a transmissão do alelo às gerações descendentes é restrita. Entretanto, caso o novo alelo não esteja diretamente relacionado a uma diminuição no potencial adaptativo do organismo, ele será transmitido ao longo das gerações e poderá se fixar na população constituindo um polimorfismo genético (Soemedi R, et. al., 2014).

Os primeiros polimorfismos de DNA foram detectados nos anos 70 como polimorfismos de fragmentos de RFLP do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*). A diferença de fragmentos (dos tamanhos dos fragmentos deve-se a

clivagem ou não do DNA em sítios específicos de reconhecimento por enzimas de restrição. Enzimas de restrição ou endonucleases de restrição são enzimas que clivam o DNA em posições específicas, os chamados sítios de restrição. Em geral, um sítio de restrição é formado por uma sequência específica de 4 a 6 pares de bases. Cada pessoa tem sequências típicas de bases nitrogenadas, o número e os tamanhos dos fragmentos obtidos pelo corte enzimático acabam por caracterizar seu DNA (Carvalho et al., 2004).

Posteriormente, o desenvolvimento de novos métodos permitiu o aparecimento de uma segunda classe de RFLPs onde a variação do tamanho dos fragmentos de restrição deve-se a um número variável de repetições em sequência, ou em tandem (VNTR, do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*). Repetições em tandem são múltiplas sequências repetidas de DNA, também chamadas de minissatélites. Outro tipo de polimorfismo de VNTRs foi descrito baseado em repetições constituídas por apenas dois pares de bases, chamadas de microsatélites ou STR (*Short Tandem Repeats*). Os microsatélites estão presentes em muitas regiões do genoma humano e pelo seu tamanho diminuto podem ser facilmente detectados pela reação da polimerase em cadeia (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) (Weber e May, 1989).

Os polimorfismos de base única (SNP do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) encontram-se fartamente distribuídos ao longo do genoma, mais de seis milhões de SNPs validados são atualmente conhecidos segundo dados do *The International HapMap* 2013. Um polimorfismo de base única é a variação na sequência de DNA que ocorre quando um único nucleotídeo (A, T, C, ou G) em uma determinada sequência é alterado. Esta alteração difere entre indivíduos da mesma espécie ou entre os cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo, assim a diferença no tamanho dos fragmentos de restrição devido à clivagem ou não do DNA em um sítio específico pode

ser causada por um SNP, criando ou abolindo o sítio de reconhecimento de uma restrição específica. Os SNPs são os polimorfismos de DNA mais abundantes no genoma humano, e estão presentes numa frequência alélica mínima de 1 a 5% na população (Joosten LA, et. al., 2004).

Atualmente, diversos polimorfismos genéticos vêm sendo relacionados a um aumento de risco de ocorrência e/ou recorrência de uma série de patologias multifatoriais, sendo considerados como parte do componente genético que eleva a susceptibilidade de um indivíduo, consistindo em um risco relativo aumentado. (Ropers, 2007).

Um polimorfismo no promotor do gene *IL1b* (rs16944) foi associado com o risco de desenvolver AR. O alelo + 3954T foi associado com danos estruturais mais graves (Perricone C, et. al., 2011). Outros estudos relataram um polimorfismo *IL6*, -174G / C (rs1800795) e mostraram sua associação com danos radiológicos em pacientes com AR que eram anticorpos anti-peptídeos citrulinados (ACPA) e fator reumatóide positivo (FR) (Marinou I, et. al., 2007).

Foram estudados três polimorfismos na *IL10*, incluindo -1082G / A (rs1800896), -892C / T (rs1800871) e -592C / A (rs1800872). Os resultados mostram que o polimorfismo -1082G / A não é associado ao risco de AR, tanto em populações europeias quanto em populações asiáticas. De outro modo, este mesmo estudo mostrou que o polimorfismo -592 C/A é associado ao risco de desenvolver AR, indicando que os portadores do alelo G podem ter um efeito protetor contra a doença (Zhang J, et. al. 2011).

2.3.1 Polimorfismos implicados na suscetibilidade à AR

Um estudo revelou a importância de uma série de genes e suas variantes na suscetibilidade à AR, incluindo genes que codificam para várias citocinas pró e anti-inflamatórias. Em pacientes com AR, os SNPs de vários estudos têm revelado a importância de genes que predispõem e suas variantes, incluindo várias citocinas pró e anti-inflamatórias. Em pacientes com AR, os SNPs de citocinas têm sido investigados quanto uma associação com lesões erosivas, sendo um deles a IL-1 (Marinou I, et.al., 2009).

A literatura relata estudos genéticos com pacientes portadores de AR,. Dentre eles destacamos aqueles realizados por Harrion et. al, mostrando que o polimorfismo rs16944 no gene *IL1 β* é associado a uma maior suscetibilidade à AR, enquanto o polimorfismo rs1143623 tem um papel protetor contra a doença. Al-Rayes et. al, mostraram que polimorfismos no gene do *TNF- α* (-308) e *TNF- β* (+252) podem estar associados à suscetibilidade à AR. Em 2012, Lee e colaboradores estudaram dois polimorfismos presentes na região promotora do gene de *IL6*, o -174 G/C e o -572 G/C, em pacientes portadores de AR provenientes de diferentes populações e origens. Outro estudo encontrou a associação entre o polimorfismo *IL6* -174 G/C e AR na população europeia (Magyari L, et. al., 2014).

Um estudo realizado com a população da Tunísia avaliou polimorfismos em *IL1 β* (511C> T; rs16944), *TNF α* (-308 G> A; rs1800629), *IL10* (-1082 G> A; rs1800896) e *IL1RA* VNTR, devido aos seus papéis como modificadores da resposta imune. Os resultados indicam que a *IL1RA* VNTR, *IL1 β* (-511C> T) e *IL10* (-1082 G> A) são associados com o risco de desenvolver AR como demonstrados em estudos

anteriores. Além disso, polimorfismos em *IL1RA*, *IL1 β* e *TNF α* são também associados à gravidade da doença (Lagha A, et.al., 2015).

Foram estudados três polimorfismos no promotor de *IL10*, incluindo -1082G / A (rs 1800896), -892C / T (rs1800871) e -592C / A (rs1800872). Os resultados obtidos e mostram que o polimorfismo -1082G / A não é associado à AR em populações europeias ou asiática. Porém, outro estudo mostrou uma associação entre o SNP -108 G/A e a AR, indicando que os portadores do alelo G podem ter uma diminuição da gravidade da AR (de Souza TR, et. al., 2014).

3. Justificativa

Um importante estudo publicado por nosso grupo de pesquisa, mostrou uma elevação das concentrações séricas de IL-22 em pacientes com AR quando comparados a controles sadios. Foi observado também que a produção de IL-22 é positivamente correlacionada com a atividade da doença e outros parâmetros clínicos (DAS28 e CDAI). Esse estudo foi o pioneiro a associar os níveis séricos de IL-22 com a gravidade da doença, DAS28 e CDAI. (Rocha Jr, LF. et. al., 2012).

A partir dessas informações, é possível supor que estas alterações possam interferir no prognóstico dos pacientes com AR, nosso estudo objetiva avaliar os principais polimorfismos encontrados nesse receptor.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Identificar polimorfismos no gene *IL22RA1* que possam estar associados com o do risco de desenvolver AR.

4.2. Objetivos Específicos

- Quantificar IL-22 no soro de pacientes portadores de AR atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco de voluntários sadios;
- Selecionar os SNPs a serem genotipados no gene *IL22RA1*;
- Genotipar os SNPs presentes no gene *IL22RA1* em pacientes portadores de AR e em voluntários sadios;
- Avaliar a associação de alelos no gene da *IL22RA1* com os níveis séricos da citocina e parâmetros clínicos de atividade da doença.

5. Procedimentos Metodológicos

5.1. Métodos

5.1.1. População e Local do Estudo

Foram recrutados do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco 138 pacientes diagnosticados com artrite reumatóide pelos critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) (Scott DL, et al., 2010). O grupo controle consiste de 128 voluntários saudáveis, pareados por sexo e idade, sem diagnóstico de qualquer doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências.

5.1.2 Critérios de inclusão

Casos: Pacientes com diagnóstico de AR pelos critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) e com idade superior a 18 anos. Controles: Voluntários sem diagnóstico de outra doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências.

5.1.3 Critérios de exclusão

Casos: Pacientes com idade inferior a 18 anos e que não tenham o diagnóstico de artrite reumatóide pelos critérios do *American College of Rheumatology* (ACR).
Controles: Voluntários com diagnóstico de outra doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências.

5.1.4 Variáveis

5.1.4.1 Independentes

- Polimorfismo do gene *IL22RA1* – (rs4292900)

Localização: Chr.1: 24469814

Tipo do SNP: Substituição de transição

Categorização de rs4292900: T (alelo ancestral); C (alelo variante)

Categorização genotípica do SNP rs4292900: TT (Genótipo Homozigoto Ancestral); CT (Genótipo Heterozigoto) e CC (Genótipo Homozigoto variante)

O alelo variante (C) está associado a uma maior como à rinosinusite crônica (Edam et al., 2009).

- Polimorfismo gene *IL22RA1* – (rs10794665)

Localização: Chr.1: 24446128

Tipo do SNP:Substituição de transição

Categorização de rs10794665: A (alelo ancestral); G (alelo variante)

Categorização genotípica do SNP rs10794665: AA (Genótipo Homozigoto Ancestral); AG (Genótipo Heterozigoto) e GG (Genótipo Homozigoto variante)

O alelo ancestral (A) está associado a uma maior suscetibilidade à rinosinusite crônica (Edam et al., 2009).

- Polimorfismo no gene *IL22RA1* – (rs16829207)

Localização: Chr.1: 24456185

Tipo do SNP: Substituição de transição

Categorização do SNP rs16829207: G (alelo ancestral); T (alelo variante)

Categorização genotípica do rs16829207: GG (Genótipo Homozigoto Ancestral); GT (Genótipo Heterozigoto) e TT (Genótipo Homozigoto variante).

5.1.5 Coleta e armazenamento de Amostras Biológicas

A coleta do material biológico foi realizada no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) da UFPE. No referido laboratório, o DNA das amostras foi extraído, através do tubo de EDTA, e armazenado no à -80°C.

5.1.6 Extração do DNA Genômica

Embora exista um grande número de métodos empregados para a extração de DNA a partir de amostras biológicas, utilizamos a técnica de extração “In House” pela metodologia padrão de fenol-clorofórmio. Esse método tem como base três passos fundamentais, sendo o primeiro a lise das membranas plasmáticas e nucleares das células, o segundo a degradação de proteínas e o terceiro a purificação e solubilização do DNA.

As amostras foram centrifugadas a 2500g por 10 minutos, o plasma foi então coletado e armazenado a -80°C. Em seguida, as hemácias foram lisadas com uma solução de lise e centrifugadas a 2500g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado

e o precipitado foi transferido para um tubo de 15ml. 5 ml de TKM1 com uma gota de triton, para a lavagem das células, que foram centrifugadas a 2500g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente desprezado e adicionou-se 1ml de TKM1, transferindo o pellet para um microtubo, que foi centrifugado a 12000g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi dissolvido delicadamente em 400µl de TKM2, 25µl de SDS 10%, 30µl de proteinase K, Por fim, a solução foi incubada a 60°C por 1 hora.

Em seguida, foram adicionados 180µl de NaCl 5M à solução e foi centrifugada a 12000g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e misturado a 400µl de clorofórmio/álcool isoamílico e 400µl de fenol saturado. A solução foi centrifugada a 12000g por 5 minutos, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo, onde foram adicionados mais 800µl de clorofórmio/álcool isoamílico (centrifugação a 12000g por 5 min), Retira novamente o sobrenadante e colocar em novo microtubo. Acrescentado 10% do volume do sobrenadante com acetato de sódio 3M e 800µl de etanol absoluto gelado, centrifugou a 12000g por 5 min, o sobrenadante foi descartado sendo adicionado 500µl de etanol a 70% gelado, repetindo a centrifugação e deixar o DNA secando em temperatura ambiente em seguida ressuspende o DNA em 50µl água de injeção.

Tabela 5. Lista dos reagentes utilizados na extração de DNA “In House”, com suas funções.

Reagentes	Funções
Tampão de extração (SDS, EDTA, TKM1, TKM2)	Lisar as células do meio.
Proteinase K	Degradar proteínas que inativam as nucleases que degradam o DNA.
Fenol	Desnaturar as proteínas e solubilizá-las.
Clorofórmio	Desnaturar as proteínas com propriedades de maior estabilidade da interface entre o solvente e a fase aquosa.
Álcool Isoamílico	Prevenir a formação de espuma, tornando mais fácil a separação das fases orgânica e aquosa.

5.1.7 Determinação da concentração de DNA das amostras

A quantificação da concentração de DNA de cada amostra foi realizada com auxílio do NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) utilizando-se 1µL da amostra de DNA.

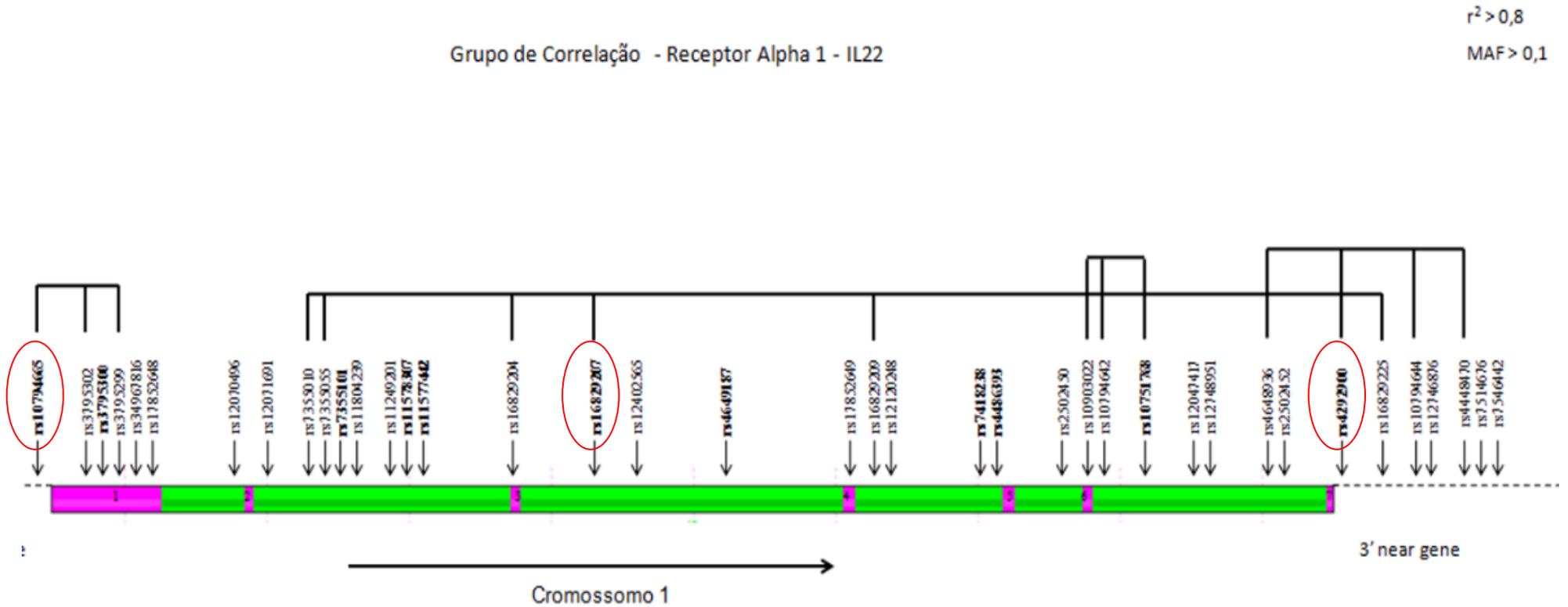
5.1.8 Seleção dos polimorfismos

Os polimorfismos foram selecionados através do site <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>, levando em consideração a frequência do Alelo Menor (MAF) maior que 0,1 na população europeia (CEU). Os SNPs presentes na região promotora e nos exons foram selecionados através do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Somente os SNPs genotipados e validados foram considerados. Outro fator importante para a seleção dos SNPs, foi a pesquisa de trabalhos descritos na literatura que encontraram associação de polimorfismos em alguma doença de caráter inflamatório.

5.1.9 Desenho do gene

Para o desenho do gene, utilizamos o programa *SNPbrowser 4.0*, e em seguida adicionamos os polimorfismos no desenho do gene, como mostrado na figura 5. Selecionamos três SNPs do receptor da IL-22 (rs4292900, rs10794665, rs16829207) para analisarmos sua influência na susceptibilidade à AR.

Figura 5. Desenho do receptor IL22RA1, contendo os SNPs selecionados rs4292900, rs 16829207 e rs10794665.



Fonte: *SNPbrowser 4.0*

5.1.10. Genotipagem

Para a determinação do genótipo dos polimorfismos selecionados, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação pelo método do *Real Time* PCR.

5.1.10.1. Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

A PCR (reação em cadeia da polimerase) é um método de criação de múltiplas cópias de um fragmento específico de DNA *in vitro*. A síntese de fragmentos de DNA necessita da utilização de um mix contendo os elementos básicos: desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), DNA polimerase (*Taq*), iniciadores (*primers*) e uma solução tampão.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando-se o sistema *TaqMan* (empresa- Life Tech).. Esse sistema utiliza, além dos *primers*, uma sonda (oligonucleotídeo) contendo um fluoróforo ligado a sua extremidade 5' e um *quencher* ligado a extremidade 3'. Essa sonda liga-se a uma região do DNA posterior ao *primer*. Quando a sonda está intacta há a transferência de energia entre o fluoróforo e o *quencher* não havendo, dessa forma, emissão de fluorescência. Entretanto, quando a *Taq* polimerase começa a sintetizar o fragmento de DNA a partir do *primer*, sua extremidade 3', com ação de exonuclease, sendo capaz de clivar a sonda e separar o fluoróforo do *quencher* havendo, dessa forma, liberação de um sinal fluorescente. Este sinal, por sua vez, é capturado por uma câmera presente no aparelho de *Real Time* PCR.

Cada alelo possui uma sonda fluorescente diferente, sendo possível determinar os genótipos de cada polimorfismo estudado de acordo com a(s) fluorescência(s) produzida(s). As PCRs foram realizadas utilizando-se *TaqMan*® *SNP Genotyping Master Mix*, da Applied Biosystem (mix contendo dNTPs, *Taq* polimerase e tampão de

incubação), *TaqMan® SNP Genotyping assay* (contendo o par de *primers* e sondas) e DNA genômico (na concentração de 20ng). As amostras foram diluídas em água ultra pura DNA/*RNAseFree* e foram utilizadas 165 µl do sistema de detecção *TaqMan® SNP Genotyping assay* e 16,5µl da sonda específica, detalhadas na tabela 6.

Tabela 6. Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Reagentes utilizados na RT-PCR	Quantidade
DNA Genômico	20ng
Água ultra pura DNA/<i>RNAse Free</i>	20µL
<i>TaqMan® SNP Genotyping assay</i>	1µL
Genotyping Master Mix	10µL

A reação de PCR foi realizada utilizando o termociclador 7900HT (*Applied Biosystem*) *Real-Time PCR* e consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Essas reações foram realizadas em placas de 96 poços.

5.1.11. Dosagem das citocinas

A citocina IL-22 no soro dos pacientes e dos controles foram quantificadas por ELISA sanduíche, tendo como limite de detecção 15pg/mg, seguindo as informações recomendadas pelo fabricante (*R&D Systems*).

5.1.12. Análise estatística

O estudo conduzido nesta dissertação foi do tipo caso-controle, o teste estatístico utilizado foi o qui-quadrado (X^2)(*Chi-Square Test*). Uma vez estabelecida a associação, o seu efeito foi descrito pela odds ratio. Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizamos os sites: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (García-Bermúdez et al., 2012) e <http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm> (Preacher, K. J. et.al.,2001); os resultados obtidos são descritos nos Apêndices A e B, respectivamente. Foi analisado se um determinado alelo no gene *IL22RA1*, leva a um aumento nos níveis de IL-22 no soro. Para isso, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, e os valores de $p > 0,05$ foram considerados significativos. Todos os gráficos foram elaborados pelo software *Graph Pad Prism* versão 6.

6. Resultados

Inicialmente, selecionamos os SNPs rs4292900, rs10794665 e rs16829225 presentes na região do gene *IL22RA1*. Verificamos que apenas os SNPs rs4292900 e rs10794665 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, desse modo o SNP rs16829225 foi excluído das análises posteriores (Apêndice A)

Foram genotipados 138 pacientes com AR e 128 controles sadios. A média de idade entre os pacientes com AR foi de 54.36, sendo 126 mulheres e 12 homens. O grupo controle consistiu de 128 indivíduos voluntários saudáveis sendo 72 mulheres e 56 homens, com uma média de idade de 42.72 anos.

6.1. Artigo: Association of interleukin 22 receptor alpha 1(*IL22RA1*) polymorphisms with rheumatoid arthritis in Brazilian patients

O processo inflamatório associado à liberação de citocinas inflamatórias está diretamente envolvido na patogênese da artrite reumatóide (AR), promovendo a inflamação crônica e destruição dos tecidos articulares. Um estudo anterior do nosso grupo relatou que pacientes com AR produzem quantidades maiores de IL-22, quando comparados aos indivíduos sadios, e este aumento foi associado a uma maior atividade da doença. Polimorfismos em interleucinas ou em seus receptores podem modificá-los funcionalmente, assim, contribuir para o desenvolvimento da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar se polimorfismos no receptor da citocina IL-22 alteram a suscetibilidade à AR.

O artigo a seguir será publicado na revista **Immunobiology**

- Fator de impacto: 3.0
- Qualis capes A2 (Farmácia)
-

Association of interleukin 22 receptor, alpha 1 (*IL22RA1*) polymorphisms with rheumatoid arthritis in Brazilian patients

Kamila de Melo Vilar^{1*}, Michelly Cristiny Pereira^{1*}, Adson Belém Ferreira da Paixão¹, Laurindo Ferreira da Rocha Jr^{1,2}, Andrea Tavares Dantas Andrea^{1, 2}, Ivan da Rocha Pitta³, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte ² and Maira Galdino da Rocha Pitta¹.

1.Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely-Galdino (NUPIT-SG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2. Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE.

3.Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Abstract

Background: Proinflammatory cytokine role in rheumatoid arthritis (RA) is well determined and IL-22 cytokine has been related to a worst prognosis of the disease. However, the potential association of interleukin22 receptor alpha 1 (IL22RA1) in the pathogenesis of RA has not been explored. We decided to investigate single nucleotide polymorphism (SNP) in IL22RA1 gene and to determine its relationship with RA.

Methods: We extracted DNA from 266 subjects, 138 RA patients and 128 controls age and gender matched. Three polymorphisms (rs4292900, rs10794665 and rs16829207) in IL22RA1 gene were selected from CEU HapMap dataset and genotyped using TaqMan SNP genotyping assay. A logistic regression analysis was performed to detect potential associations in our case-control sample and associations with clinical parameters. Serum concentrations of IL-22 were analyzed by ELISA.

Results:Our results show that the TT genotype of rs4292900 was significantly associated with RA patients compared to the controls (p=0.0054, odds ratio =2.23). We did not find any significant association betweenrs10794665 and RA risk. RA patients with one or more copy of the risk allele T (rs4292900) showed higher levels of IL-22

cytokine compared CC genotype ($p=0.0018$ and $p=0.0324$ respectively).CT genotype was also associated with higher values of CDAI measure compared to TT genotype. We did not find any significant association between DAS28 score and SNPs evaluated.TT genotype of rs4292900 was also associated with erythrocyte sedimentation rate (ESR)($p=0.016$).

Conclusion: Our results suggest for the first time that IL22RA1 rs4292900 polymorphism might influence the susceptibility to RA in Brazilian population.

Key words: immunogenetics, rheumatoid arthritis, IL22RA1 gene

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by destructive inflammation in multiple joints, which can lead to loss of function, disability and chronic pain [1, 2]. The RA pathogenesis is a complex combinations of genetic, environmental, hormonal and infectious factors and its progression requires an activation of innate immunity, genetic background and adaptative immune responses against autologous antigens [3, 4]. Genetic studies have been important in generating new insights into disease pathogenesis and into the treatment of RA. The human leukocyte antigen (HLA)-DR gene, resident in the major histocompatibility complex (MHC), for example, participates in antigen presentation and influence severity of disease if patients are homozygous for DR-genes, including DR4, DR14 and DR1[3].

Inflammatory cytokines have a key role in the development of RA [5, 6]. Th1 pathway had been associated to RA disease, in which TNF has a pivotal role, leading the induction of other cytokines, such as IL-6 and IL-8.[7, 8].These Th1 cytokines induce the inflammation and synovial cell proliferation that characterize rheumatoid arthritis (RA) joint destruction [9].The Th17 phenotype has also been associated to RA pathogenesis[10]. Th17 cells secrete not only IL-17A, but also IL-22, IL-21 and IL-23 that can induce inflammatory and hematopoietic effects on different cells [10, 11].

A study of our group showed that IL-22 cytokine is increased in serum of RA patients compared to controls and its levels was associated to disease activity [12]. Other studies have shown elevated levels of IL-22 and its receptor IL-22RA1 in RA synovial tissues and in collagen-induced arthritis mice model, and this cytokine has a proinflammatory role and also regulates antibody production [13, 14]. Interleukin-22 receptor alpha 1 belongs to the class II cytokine receptor family and it forms a complex with interleukin 10 receptor (IL10RA2)[15, 16]. This heterodimer complex of receptors associates to interleukin 22, inducing the activation of STAT3 signaling in several chronic inflammatory conditions, including psoriasis and rheumatoid arthritis[15, 17, 18].

Polymorphisms in cytokines have also been related to RA disease activity [19-21]. Polymorphisms in IL1B, TNFA, IL4, IL8, IL10 and IL6 have been investigated and only IL8 (781 C/T) was associated to RA diagnosis in younger age in Caucasian patients [19].

Few studies have investigated the role of IL22RA polymorphisms in autoimmune or inflammatory diseases. Edam et al. reported that IL22RA1 polymorphisms have been involved in chronic rhinosinusitis, an inflammatory disease of the nose and paranasal sinuses [22].

In this context, our study was the first to analyze if genetic polymorphisms in the IL22RA1 gene were associated to susceptibility for development RA.

Methods

Patients and controls

RA patient blood samples were obtained from the Rheumatology Outpatient Clinic at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A total

of 138 patients fulfilled four or more American College of Rheumatology (ACR) 1987 classification criteria [23]. Demographic, clinical and laboratory data were collected from hospital records or by questionnaire and reviewed by experienced physicians. Laboratory features of RA patients such as erythrocyte sedimentation rate (ESR) and rheumatoid factor positivity were recorded. Individual disease activity was quantified using the disease activity score (DAS28) [24] and the Clinical Activity Index (CDAI)[25]. A DAS28 lower than 2.6 implies remission, between 2.6 and 3.2 low disease activity, greater than (>) 3.2 to 5.1 implied moderate and a DAS28 above 5.1 means high disease activity; while CDAI less than 2.8 implies clinical remission, lower than 10 mild, greater than (>) 10 to 22 moderate and greater than 22 implies severity. The Health Assessment Questionnaire (HAQ)[26] score was also applied in patients to assess functional disability in arthritis. A cut off point of 1 was chosen as it is clinically relevant and indicates at least some difficulty in most of the activities of daily living [27]. Radiographs of hands were obtained from RA patients and were evaluated for the presence of erosions by an experienced rheumatologist blinded to the clinical data. The control group consisted of 128 matched, unrelated healthy blood donors, free of any rheumatologic disease.

All subjects gave their written consent to participate. The study was approved by the ethics committee (CCAЕ-0260.0.172.00011) of the UFPE.

SNP Selection and Genotyping

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) for interleukin 22 receptor alpha 1 (IL22RA1) were identified by querying the HapMap for all SNPs within IL-22RA1, with a minor allele frequency (MAF) of at least 0.1% in Caucasians Genomic. The SNPs rs4292900, rs10794665 and rs16829207 were evaluated. Genomic DNA was

extracted from the peripheral blood of RA patients and controls using the technical standard phenol-chloroform. Allelic discrimination with TaqMan real-time PCR was used to genotype for polymorphisms in the IL-22RA1 gene. The PCR products were generated in a 12 μ l reaction, containing 20 ng DNA and cycling parameters were: denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, and the annealing and extension at 60°C for 1 minute, in a 7900 HT Real-Time polymerase chain reaction (PCR) system, according to the conditions recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Serum IL-22 Levels Determination

Cytokine serum level was determined by Human IL-22 ELISA Kit (R&D Systems, Ltd. Abingdon, UK) according to the manufacturer's recommendation. The lower limit of detection for the ELISA IL-22 kit was 15pg/ml.

Statistical Analysis

All genotype data were checked for derivation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) using <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwal.pl> [20]. The differences in allele/ genotype frequencies between patients and controls were analyzed by Fisher's exact test. The association of serum IL-22 levels with clinical and laboratory measures of patients with RA were analyzed by univariate comparisons using nonparametric tests (Mann-Whitney tests). A logistic regression analysis was performed to detect potential associations in our case-control sample and associations with clinical parameters. Statistical significance was assumed at the $p < 0.05$. Statistical analyses of the data were performed using the GraphPad Prism (version 6.0) statistical program.

Results

A total of 266 subjects were genotyped, among which 138 RA patients and 128 controls were age and matched controls. The mean age for RA patients and controls was 54.36 ± 12.10 years and 42 ± 12.40 years respectively. Information on the main clinical characteristics of the RA patients are summarized in table 1.

All SNPs were in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE, $p > 0.05$), with exception of rs16829207 which was excluded from analyses. The genotypes and alleles frequencies in RA patients and control individuals are shown in table 2. The rs4292900 TT genotype showed a positive association with RA (37.79% in RA patients and 21.36% in controls, $p = 0.0054$, odds ratio = 2.23; 95%IC 1.265-3.951). Heterozygous CT were prevalent in controls group (58.11%) compared with RA patients (41.73%; $p = 0.014$, odds ratio = 0.56). When we compared TT genotype to CT in RA and controls we found a significant association with odds ratio of 2.46 (95%IC = 1.29- 4.71; $p = 0.003$); (data not shown). Comparison between the homozygous CC versus CT genotypes showed no significant association between patients and controls (odds ratio = 1.39; $p = 0.328$; 95%IC = 0.68-2.84) (data not shown). On the other hand, the allele and genotype frequencies of rs10794665 showed no association with RA (table 2).

A previous study from our group showed that IL-22 levels were increased in RA patients compared with controls and were associated with severity of disease [12]. To address the functional significance of IL22RA1 rs4292900, we examined serum IL-22 levels with each genotype of RA patients. As shown in Figure 1, IL-22 serum levels were significantly increased in CT genotypes (median 130.0 pg/ml) compared to homozygous CC (median 19.40 pg/ml; $p = 0.0018$) and TT (median 93.63 pg/ml; $p = 0.0324$). In contrast, genotype frequencies of rs10794665 showed no association with serum IL-22 levels in RA patients.

Regarding the Clinical Disease Activity Index (CDAI) stratified by genotypes of IL22RA polymorphisms, we observed that rs4292900 TT genotype showed lower CDAI values (median 14) compared to heterozygous CT (median 18; $p=0.047$) and to homozygous CC (median 17.75; $p=0.021$) (Figure 2a). When evaluating TT versus CT patients in remission or low activity ($CDAI < 10$) compared to patients in severity ($CDAI > 22$), significant association was found ($p < 0.038$), where the higher proportion of CT patients had $CDAI > 22$ (24 patients CT and 9 patients TT). We also evaluated the proportions of CT and TT patients with $CDAI < 10$ and $CDAI > 10 < 22$ (moderate), and no significant differences were found. On the other hand, when evaluating CT versus TT patients in moderate or in severity, we found significant association ($p=0.0082$), 24 CT patients with $CDAI > 22$ compared with 9 TT patients. There was no significant association among disease activity by DAS28 and patients carrying IL-22RA polymorphisms (Figure 2b).

The Health Assessment Questionnaire (HAQ) score to assess functional disability in rheumatoid arthritis was also evaluated but no significant differences were found according to rs4292900 genotypes (Figure 3a). The GG rs10794665 showed lower HAQ values compared to GT genotype ($p=0.017$) (data not shown). No statistically associations were observed among IL22RA1 polymorphisms and rheumatoid factor or bone erosions positivity. Interestingly, TT genotype (rs4292900) was significantly associated to higher ESR measures compared to CT genotype ($p=0.016$) (Figure 3b).

Discussion

Many studies have evaluated the role of polymorphisms in genes of cytokines and their receptors in rheumatoid arthritis[28-30].The present study was performed to investigate the association of IL22RA1 polymorphisms in Brazilian rheumatoid arthritis patients. The results showed that the TT genotype of rs4292900 was associated with a increased susceptibility to RA. However, there was no difference with regard to the genotypes of rs10794665. Few studies have investigated the role of IL22RA polymorphisms in autoimmune or inflammatory diseases[22, 31]. Edam et al. reported that IL22RA1 polymorphisms are associated with chronic rhinosinusitis, including the SNPs rs4292900 and rs10794665. The first SNP was also involved with the presence of asthma and chronic rhinosinusitis development [22].Another study showed that rs3795299 in IL22RA1 genewas associated with the reduced risk to immunoglobulin A nephropathy [31].

There have been no reports regarding an association between rheumatoid arthritis and IL22RA1 polymorphism, although IL-22 cytokine has been shown to have a important role in RA pathophysiology [13, 15, 32]. Patients with RA are associated with a chronic synovitis characterized by hyperplasia of the synovium and a marked increase in macrophage-like and fibroblast-like synoviocytes that expresse degradative enzymes resulting in destruction of local articular structures[3, 33]. High levels of IL-22 and IL22RA1 were expressed by synovial fibroblasts in the lining and sublining layers of synovium and this expression has been reported to contribute to joint destruction [13, 33].Interleukin-22 receptor alpha 1 belongs to the class II cytokine receptor family and it forms a complex with interleukin 10 receptor (IL10RA2) [15, 16]. When IL-22 binds to the extracellular domain of IL-22RA1, a conformational change is induced and IL-10R2 is able to bind to complex IL-22/IL22RA1 surface, leading to

JAK-STAT pathway activation[34, 35]. We decided to speculate a possible association in levels of IL-22 cytokine with polymorphisms in IL22RA1 receptor, since the responsiveness of IL-22 is determined by the expression of IL22RA1. In our study we showed that high IL-22 serum levels were associated to CT and TT genotype of rs4292900. Thus, association of serum IL-22 levels with IL22RA1 should be explained by a functional connection of both: IL-22/IL22RA1 complex. These findings make us to think that the presence of T allele may induce changes in the receptor that might lead to increased IL22 levels or prolong its action on target cells. However more specific functional studies would be required for hypothesis confirmation, since the biological impact of rs4292900 in IL22RA1 is currently unknown. Other studies have evaluated possible associations between the levels of cytokine and polymorphisms in their respective receptors. Hikami et al (2008) showed that rs2834167 of IL10RB receptor was associated to systemic sclerosis and with elevated serum IL-10 [37]. On the other hand, García-Bermúdez et al.(2012) analyzed interferon gamma (IFN- γ) polymorphisms in RA patients and they did not find significant differences between serum levels and genotypes [20].

A previous study of our group showed that high serum levels of IL-22 was correlated with disease activity according to DAS28 and CDAI scores [12]. The present study demonstrated that heterozygous CT patients showed higher CDAI values compared to homozygous TT. These findings suggest that this polymorphism could be associated to risk but not with disease activity in RA. And we did not find any association with DAS28 score in patients carrying IL22RA polymorphisms. Li F et al. investigated the polymorphisms of TNF- α and TNFR1 genes in RA patients of China, and they found that only TNF- α polymorphism (rs1800629) was associated to susceptibility to RA. However there is no correlation of these polymorphisms with

DAS28 and serum level of autoantibodies [37]. No significant associations were observed in RA genotypes for IL22RA patients and positivity for rheumatoid factor and bone erosions. However, we found significant association of TT genotype with laboratorial parameter ESR. Paradowska-Gorycka et al. showed significant correlation of ESR with IL-27 4730T/C polymorphism in RA patients, but in this case, patients with CC genotype were significantly lower values of ESR [38].

Despite these encouraging findings, our study had a limitation of small number of subjects analyzed. However our study is the first to investigate the role of IL22RA polymorphism in RA patients, improving knowledge about the genetic background of RA.

Conclusion

Our results suggest for the first time that genetic alterations in interleukin-22 receptor alpha 1 are associated to rheumatoid arthritis in Brazilian population. The IL22RA1 rs4292900 polymorphism might influence the susceptibility to RA. Both SNPs were not associated to high disease activity in this group however TT genotype was associated to high levels of ESR, an important marker of inflammation. These findings suggest that polymorphisms in IL22RA1 may be an interesting area to further exploration in rheumatoid arthritis.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Instituto de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if) and Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflicting interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S265-72.
2. Young A, Koduri G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007 Oct;21(5):907-27.
3. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):356-61.
4. Felson DT, Klareskog L. The genetics of rheumatoid arthritis: new insights and implications. *JAMA.* 2015 Apr 28;313(16):1623-4.
5. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2014 Jun;13(6):668-77.
6. Yoshida K, Hashimoto T, Sakai Y, Hashiramoto A. Involvement of the circadian rhythm and inflammatory cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol Res.* 2014; 2014:282495.
7. Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Nakazawa F, Uzuki M, Sawai T, Yonezawa T, Saeki Y, Panayi GS, Pitzalis C, Kimura T. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology (Oxford).* 2002 Mar;41(3):329-37.
8. Vasanthi, P., Nalini, G. And Rajasekhar, G. Role Of Tumor Necrosis Factor-Alpha In Rheumatoid Arthritis: a review. *APLAR Journal of Rheumatology,* 2007; 10: 270–274.
9. Park JY, Pillinger MH. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65 Suppl 1:S4-10.
10. Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014 Aug;31(4):256-61.
11. Fujimura K, Oyamada A, Iwamoto Y, et al. CD4 T cell-intrinsic IL-2 signaling differentially affects Th1 and Th17 development. *J Leukoc Biol* 2013; 94: 271-9.

12. da Rocha LF Jr, Duarte ÂL, Dantas AT, Mariz HA, Pitta Ida R, Galdino SL, Pitta MG. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *J Rheumatol*. 2012 Jul;39(7):1320-5.
13. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1037-46.
14. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:429-42.
15. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem*. 2000 Oct 6;275(40):31335-9.
16. Kotenko, S.V., Izotovo, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., Pestka, S. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10R-beta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J. Biol. Chem*. 276: 2725-2732, 2001.
17. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol*. 2011 Mar;23(3):159-63.
18. Jia L, Wu C. The biology and functions of Th22 cells. *Adv Exp Med Biol*. 2014;841:209-30.
19. Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, Wouters JM, Laman JD, Dolhain RJ. Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study. *BMC Med Genet*. 2011 Mar 7;12:36.
20. García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, Corrales A, Robledo G, Castañeda S, Miranda-Filloo JA, Blanco R, Fernández-Gutiérrez B, Balsa A, González-Alvaro I, Gómez-Vaquero C, Llorca J, Martín J, González-Gay MA. Analysis of the interferon gamma (rs2430561, +874T/A) functional gene variant in relation to the presence of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47166.
21. Shen L, Zhang H, Yan T, Zhou G, Liu R. Association between interleukin 17A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Gene*. 2015 Jul 15;566(1):18-22.
22. Endam LM, Bossé Y, Filali-Mouhim A, Cormier C, Boisvert P, Boulet LP, Hudson TJ, Desrosiers M. Polymorphisms in the interleukin-22 receptor alpha-1

- gene are associated with severe chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 May;140(5):741-7.
23. Arnett FC, Edworthy SM, Bioch DA, McShane DJ, Fries JF, Copper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-24.
 24. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 Jan; 38(1):44-8.
 25. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(4):R796-806.
 26. Ferraz MB, Oliveira LM, Araujo PM, Atra E, Tugwell P. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. *J Rheumatol.* 1990 Jun; 17(6):813-7.
 27. Sokka T, Häkkinen A, Krishnan E, Hannonen P. Similar prediction of mortality by the health assessment questionnaire in patients with rheumatoid arthritis and the general population. *Ann Rheum Dis.* 2004 May; 63(5):494-7.
 28. Peng H, Wang W, Zhou M, Liu CY, Li R, Wen PF, Qiu LJ, Pan HF, Ye DQ. Associations of interleukin-4 receptor gene polymorphisms (Q551R, I50V) with rheumatoid arthritis: evidence from a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013 Oct;17(10):768-74.
 29. Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. Interleukin-4, interleukin-4 receptor, and interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Immunol Invest.* 2013;42(6):455-69.
 30. Korczowska I. Rheumatoid arthritis susceptibility genes: An overview. *World J Orthop.* 2014 Sep 18;5(4):544-9.
 31. Suh JS, Cho SH, Chung JH, Moon A, Park YK, Cho BS. A polymorphism of interleukin-22 receptor alpha-1 is associated with the development of childhood IgA nephropathy. *J Interferon Cytokine Res.* 2013 Oct;33(10):571-7.
 32. Roeleveld DM, Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine.* 2015 Jul;74(1):101-7.
 33. Carrión M, Juarranz Y, Seoane IV, Martínez C, González-Álvarez I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I, Gomariz RP. VIP modulates IL-22R1 expression

- and prevents the contribution of rheumatoid synovial fibroblasts to IL-22-mediated joint destruction. *J MolNeurosci*. 2014 Jan;52(1):10-7
34. Wu PW, Li J, Kodangattil SR, Luxenberg DP, Bennett F, Martino M, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K, Gill DS, Wolfman NM, Fouser LA. IL-22R, IL-10R2, and IL-22BP binding sites are topologically juxtaposed on adjacent and overlapping surfaces of IL-22. *J Mol Biol*. 2008 Oct 24;382(5):1168-83.
 35. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):33676-82.
 36. Hikami K, Ehara Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita M, Oka T, Takehara K, Sato S, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of IL-10 receptor 2 (IL10RB) SNP with systemic sclerosis. *BiochemBiophys Res Commun*. 2008 Aug 29;373(3):403-7.
 37. Li F, Xu J, Zheng J, Sokolove J, Zhu K, Zhang Y, Sun H, Evangelou E, Pan Z. Association between interleukin-6 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Chinese Han population: a case-control study and a meta-analysis. *Sci Rep*. 2014 Jul 17;4:5714.
 38. Paradowska-Gorycka A, Raszkievicz B, Jurkowska M, Felis-Giemza A, Romanowska-Prochnicka K, Mańczak M, Olesinska M. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL27 gene with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*. 2014 Oct;80(4):298-305.

Tables:**Table 1.** Demographic and Clinical Parameters of RA patients and control population

N° Controls	128
Female/ male	96/32
Mean Age (min-max)	42.74 (19-79)
N° of patients	138
Female/ male	126/12
Mean age	54.36 (25-78)
Disease Activity Score 28 joints (%)	
Clinical remission	20 (14.49)
Moderatedisease	65 (47.10)
Severedisease	52 (37.68)
CDAI (%)	
Clinical remission	35 (25.54)
Moderate disease	55 (40.14)
Severe disease	47 (34.30)
HAQ	
<1	50 (36.23)
>1	88 (63.76)
Rheumatoidfactor (%)	
Positive	100 (76.33)
Negative	31(23.66)
Radiologicalerosions (%)	
Present	65 (65.65)
Absent	34 (34.43)
Erythrocyte sedimentation rate (ESR – mm/h)	39.64 (1-125)

Table 2: Genotype and allele frequencies of rs4292900 and rs 10794665 polymorphisms in RA patients and controls

<i>SNP genotype</i>	<i>RA</i>		<i>Control</i>		<i>p-value</i>	<i>RR</i>	<i>OR (95%IC)</i>
<i>rs4292900</i>	(N=127)	%	(N=117)	%			
CC	26	20.47	24	20.51	1.000	0.998	0.997 (0.535 - 1.859)
CT	53	41.73	68	58.11	0.014	0.728	0.516 (0.310 - 0.858)
TT	48	37.79	25	21.36	0.005	1.423	2.236 (1.265 - 3.951)
CT and TT	101	79.52	93	79.48	1.000	1.001	1.002 (0.538 - 1.868)
C- allele	105	41.33	116	49.57	0.069	0.851	0.716 (0.501 - 1.025)
T-allele	149	58.66	118	50.42	0.069	1.175	1.395 (0.975 - 1.995)
<i>rs10794665</i>	(N=114)	%	(N=115)				
AA	54	47.36	47	40.86	0.352	1.141	1.302 (0.771 - 2.197)
AG	44	38.59	54	46.95	0.230	0.840	0.710 (0.419 - 1.201)
GG	16	14.03	14	12.17	0.699	1.083	1.178 (0.545 - 2.542)
AG and GG	60	52.63	68	59.13	0.352	0.876	0.768 (0.455 - 1.296)
A-allele	152	66.66	148	64.34	0.623	1.053	1.108 (0.753 - 1.629)
G-allele	76	33.33	82	35.65	0.623	0.949	0.902 (0.613 - 1.327)

Figures:

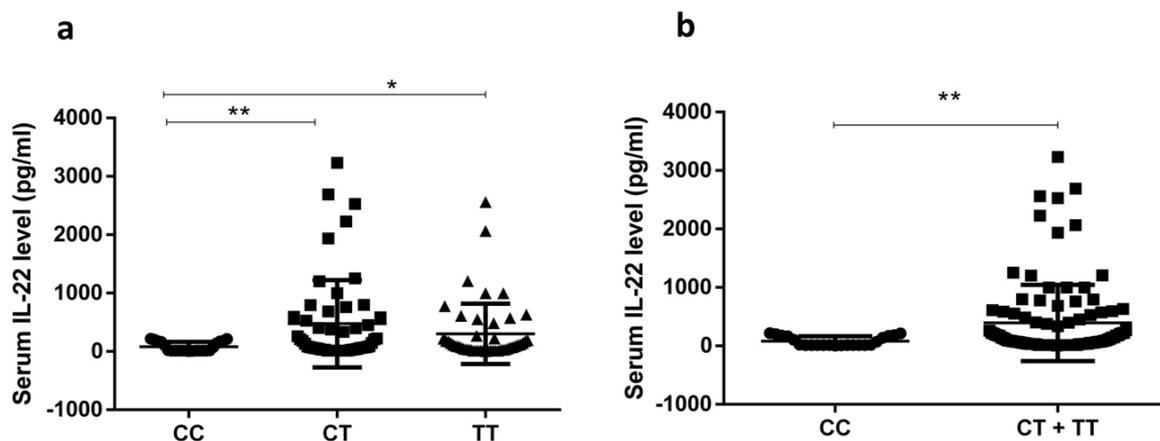


Figure 1: Association of IL-22RA1 rs4292900 polymorphism and serum IL-22 levels in patients with rheumatoid arthritis. (a) serum IL-22 levels stratified by genotypes CC, CT and CT; ** p=0.0018; *p=0.0324; (b) serum IL-22 levels in CC compared to CT+TT genotypes; **p=0.0038. n=135 patients.

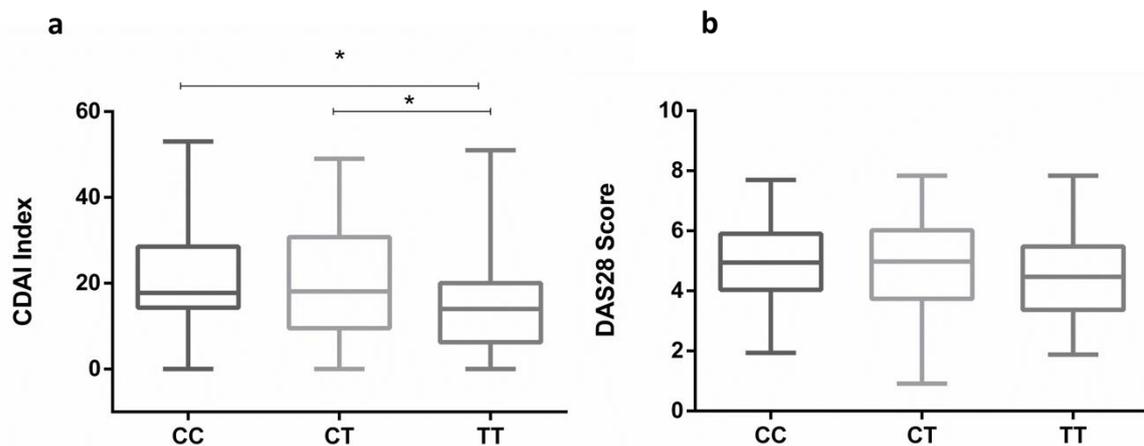


Figure 2: Clinical Disease Activity Index (CDAI) and Disease Activity Score for 28 joints (DAS28) stratified by genotypes of IL22RA polymorphisms in RA patients. (A) CDAI stratified by rs4292900 polymorphism; (B) DAS28 by stratified rs4292900 polymorphism.

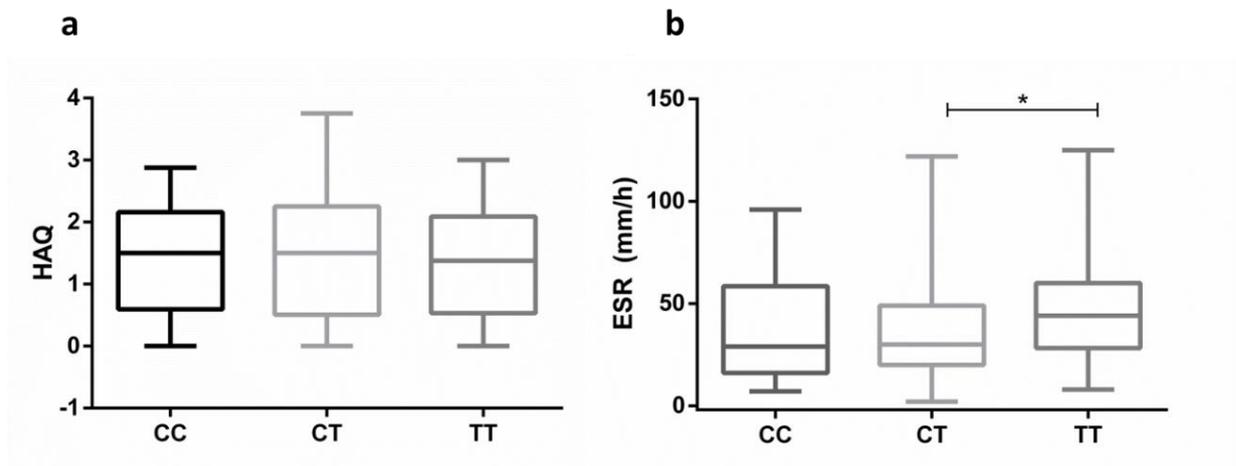


Figure 3: (a) Health Assessment Questionnaire (HAQ) score stratified by rs4292900 polymorphism (b) Erythrocyte sedimentation rate (ESR) stratified by rs4292900 polymorphism.

7. Discussão

A citocina IL-22 está envolvida em várias condições inflamatórias crônicas, incluindo a artrite reumatóide, e a sua expressão está relacionada com a atividade da doença e pode promover a erosão óssea (da Rocha LF. et al, 2012; Jia L, 2014).

Até o momento, não existe nenhum estudo sobre uma associação entre artrite reumatóide e polimorfismos no gene da *IL22RA1*, embora a citocina IL-22 apresente um papel importante na fisiopatologia AR (Roeleveld DM, et al., 2015).

Existem apenas dois trabalhos na literatura que abordam polimorfismos no receptor da IL22. O primeiro estudo aborda sobre os polimorfismos do receptor da IL22 na rinossinusite crônica grave (CRS), que é uma doença inflamatória que atinge os seios nasais e paranasais, implicando na qualidade de vida dos pacientes. Neste estudo foi sugerido que os rs4292900 e rs10794665 são associados com o risco da CRS, e que a associação da IL-22 com a *IL22RA1* é um fator importante na regulação da imunidade inata (Edam et al., 2009).

No segundo estudo, Suh JS et. al. (2013) avaliaram o papel da *IL22RA1* na patogênese da nefropatia da imunoglobulina A. *IL22RA1* foi recentemente identificada como imunomodulador em doenças humanas, estando relacionado com os mediadores de defesa na mucosa do indivíduo. O genótipo CC do polimorfismo rs3795299 na região do gene *IL22RA1* associado com um risco reduzido da nefropatia de imunoglobulina A.

Um estudo anterior do nosso grupo mostrou uma correlação entre pacientes com FR positivos e elevados níveis de IL-22 (Rocha Jr, LF. et al, 2012). No presente estudo foi mostrado que, o genótipo TT do SNP rs4292900 é associado a mais elevados níveis

de VHS, um importante marcador de inflamação. Bluett J. et.al. (2014) constatou uma variação genética no gene que codifica CR1 (codifica o receptor do complemento1-CD35), que atua como regulador negativo do sistema complemento. Seus resultados sugerem que esse SNP pode alterar os níveis de VSH, mas não de DAS28.

Nosso estudo também mostrou que para o rs429200, os pacientes heterozigotos CT apresentaram maiores valores de CDAI em relação aos homozigotos TT. Estas descobertas sugerem que esse polimorfismo pode ser associado ao risco, mas não com à gravidade da doença. Um estudo recente avaliou o TRAF1 (+16860A/L) como um preditor da resposta clínica ao tratamento anti-TNF e também a sua contribuição para a resistência ao tratamento em pacientes com AR. Os pacientes portadores do genótipo GG, apresentam uma expressão aumentada de TRAF1 nas células inflamatórias circulantes (Nishimoto T, et.al., 2014)

. Não foram encontradas associações significativas entre os genótipos de *IL22RA1* nos pacientes AR e fator reumatóide ou erosões ósseas. Hussein YM, et.al., investigaram se o SNP rs1982073 em *TGF-β1*(869C / T) *TGF-β1* é associado com a suscetibilidade à AR ou com a progressão de destruição das articulações. Eles evidenciaram que o genótipo de TT do *TGF-β1* pode determinar o desenvolvimento da osteoporose e erosão óssea em AR. Além disso, encontraram um sinergismo entre o genótipo TT de *TGF-β1* e FR, elevado ou elevados níveis séricos de PCR, que levam ao desenvolvimento da osteoporose e erosão óssea em pacientes com artrite reumatóide (Hussein YM, et.al.,2014)

8. Conclusão

Os nossos resultados sugerem, pela primeira vez que polimorfismos no gene *IL22RA1* são associados à artrite reumatóide. O polimorfismo rs4292900 do que *IL22RA1* pode influenciar a suscetibilidade à doença. Os dois SNPs não foram associados à alta atividade da doença. No entanto, o genótipo TT (rs4292900) foi associado a valores elevados de VHS.

9. Perspectivas

- Aumentar o “n” amostral de pacientes portadores de artrite reumatóide, para aumentar a confiabilidade do nosso estudo;
- Investigar se polimorfismos no gene do receptor solúvel IL-22BP também apresentam associações com o risco da artrite reumatóide.
- Selecionar outros polimorfismos que estejam associados com a artrite reumatóide em genes envolvidos na via do metabolismo do metotrexato, principal fármaco utilizado no tratamento da doença.

Referências

Aggarwal S, Xie MH, Maruoka M, et al. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:1047-53.

Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36(3):182–8.

Andersson A, Grahnemo L, Engdahl C, Stubelius A, Lagerquist MK, Carlsten H, Islander U. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells are regulated by estrogen during development of experimental arthritis. *Clin Immunol*. 2015 Sep 28;161(2):324-332.

Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005;129:969-84.

Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38:151-60.

Bluett J, Ibrahim I, Plant D, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, Isaacs JD;BRAGGSS, Barton A. Association of a complement receptor 1 gene variant with baseline erythrocyte sedimentation rate levels in patients starting anti-TNF therapy in a UK rheumatoid arthritis cohort: results from the Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate cohort. *Pharmacogenomics J*. 2014 Apr;14(2):171-5. doi: 10.1038/tpj.2013.26.

Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine*. 2008 Jul;75(4):373-5.

Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2009 Jan;76(1):10-4.

Brown C, Esterhazy D, Sarde A, Pullabhatla V, London M, Arno M, de Rinaldis E, Mucida D, Lord G, Noelle R. Role of retinoic acid in the stability of the T-helper-type 1 lineage and implications for autoimmunity. *Lancet*. 2015 Feb 26;385 Suppl 1:S25. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60340-3.

Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun* 2001; **2**: 222-228.

Burmester GR, Durez P, Shestakova G, Genovese MC, Schulze-Koops H, Li Y, Wang YA, Lewitzky S, Koroleva I, Agarwal Berneis A, Lee DM, Hueber W. Association of HLA-DRB1 alleles with clinical responses to the anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in active rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Aug 12. pii: kev258.

Carvalho G., Vergani, N. E Brunoni, D. Genetics of autism. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, v.26, p.270-272, 2004.

Cao J, Chen C, Zeng L, Li L, Li X, Li Z, Xu K. Elevated plasma IL-22 levels correlated with Th1 and Th22 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Clin Immunol*. 2011 Oct;141(1):121-3.

Chang HH, Dwivedi N, Nicholas AP, Ho IC. The W620 Polymorphism in PTPN22 Disrupts Its Interaction With Peptidylarginine Deiminase Type 4 and Enhances Citrullination and NETosis. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Sep;67(9):2323-34. doi: 10.1002/art.39215.

Cheng F, Guo Z, Xu H, Yan D, Li Q. Decreased plasma IL22 levels, but not increased IL17 and IL23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2009 Apr;68(4):604-6.

Chen R, Luo J, Zhang D. [Progress of molecular genetics research on rheumatoid arthritis]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2015 Oct 10;32(5):728-33. doi:10.3760/cma.j.

Cheng P, Zhang Y, Huang H, Zhang W, Yang Q, Guo F, Chen A. Association between CCR6 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Apr 15;8(4):5388-96. eCollection 2015. PubMed PMID: 26131115.

Chtanova T, Kemp RA, Sutherland AP, Ronchese F, Mackay CR. Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4(+) and CD8(+) type 1 and type 2 T cells. *J Immunol*. 2001 Sep 15;167(6):3057-63.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924)

De Souza TR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Duarte ÂP, Porter SR, Leão JC, Gueiros LA. Th1 and Th2 polymorphisms in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *J Oral Pathol Med*. 2014 Jul;43(6):418-26.

Disponível em <<http://www.who.int/en/>> Acesso em: 01 junho 2015.

Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, et al. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009;10:857-63.

Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renaud JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol* 2001;166:7090-5.

Esaki H, Ewald DA, Ungar B, Rozenblit M, Zheng X, Xu H, Estrada YD, Peng X, Mitsui H, Litman T, Suárez-Fariñas M, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Identification of novel immune and barrier genes in atopic dermatitis by means of laser capture microdissection. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Jan;135(1):153-63.

Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356-61.

Forger F, Marcoli N, Gadola S, et al. Pregnancy induces numerical and functional changes of CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:984e90.

Furukawa H, Oka S, Shimada K, Hashimoto A, Tohma S. Human leukocyte antigen polymorphisms and personalized medicine for rheumatoid arthritis. *J Hum Genet*. 2015 Apr 23. doi: 10.1038/jhg.2015.36.

García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, Corrales A, Robledo G, Castañeda S, Miranda-Fillooy JA, Blanco R, Fernández-Gutiérrez B, Balsa A, González-Alvaro I, Gómez-Vaquero C, Llorca J, Martín J, González-Gay MA. Analysis of the interferon gamma (rs2430561, +874T/A) functional gene variant in relation to the presence of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47166.

Hamdy G, Darweesh H, Khattab EA, Fawzy S, Fawzy E, Sheta M. Evidence of association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with Egyptian rheumatoid arthritis patients. *Hum Immunol*. 2015 Jun;76(6):417-20.

Hao G, Li Y, Liu J, Wo M. TNFAIP3 rs2230926 polymorphisms in rheumatoid arthritis of southern Chinese Han population: a case-control study. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Dec 1;7(12):8958-61. eCollection 2014. PubMed PMID: 25674272.

Hussein YM, Mohamed RH, El-Shahawy EE, Alzahrani SS. Interaction between TGF- β 1 (869C/T) polymorphism and biochemical risk factor for prediction of disease progression in rheumatoid arthritis. *Gene*. 2014 Feb 25;536(2):393-7. doi: 10.1016/j.gene.2013.11.042.

Hu J, Li Y, Chen L, Yang Z, Zhao G, Wang Y, Cheng J, Zhao J, Peng Y. Impact of IL-22 gene polymorphism on human immunodeficiency virus infection in Han Chinese patients. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014 Nov 11.pii: S1684-1182(14)00226-6.

Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 2005;52:1037-46.

Joosten LA, Radstake TR, Lubberts E, van den Bersselaar LA, van Riel PL, van Lent PL, Barrera P, van den Berg WB. Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 339-347.

Kazantseva MG, Highton J, Stamp LK, Hessian PA. Dendritic cells provide a potential link between smoking and inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012 Oct 4;14(5):R208.

Kim KW, Kim HR, Kim BM, Cho ML, Lee SH. Th17 Cytokines Regulate Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis. *Am J Pathol*. 2015 Sep 8. pii:S0002-9440(15)00445-9. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.07.017.

Kokkonen H, Söderström I, Rocklöv J, Hallmans G, Lejon K, Rantapää Dahlqvist S. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):383-91

Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, et al. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol* 2001;166:7096-103.

Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* 2001;276:2725-32.

Lagha A, Zidi S, Stayoussef M, Gazouani E, Kochkar R, Kochbati S, Almawi WY, Yacoubi-Loueslati B. Interleukin-1 β , Interleukin1-Ra, Interleukin-10, and tumor necrosis factor- α polymorphisms in Tunisian patients with rheumatoid arthritis. *Pathol Biol (Paris)*. 2015 May 20. pii: S0369-8114(15)00047-4.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40.

Laurindo Ferreira da Rocha Jr, Angela Luiza Branco Pinto, Maira Galdino da Rocha Pitta, et al. Rheumatoid Arthritis and Correlation with Disease Activity. *The Journal of Rheumatology* 2012; 39:7; doi:10.3899/jrheum.111027.

Li F, Xie X, Chen J, Gao J, Lu F. Association of TNF- α gene polymorphisms with the risk of rheumatoid arthritis in Han Chinese population from Hunan. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2015 Sep 28;40(9):945-54.

Lin H, Zhang GD, Tang HH, Wang Y, Liu Y, Zhao Y. [The change of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2014 Jul;45(4):618-22.

Liao KP, Karlson EW. Classification and epidemiology of rheumatoid arthritis. In: Hochberg MC, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, eds. *Rheumatology*. 5th ed. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2011:823-7.

Lili Magyari, Dalma Varszegi, Erzsebet Kovesdi, Patricia Sarlos, Bernadett Farago, Andras Javorhazy, Katalin Sumegi, Zsolt Banfai, Bela Melegh. Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications. *World J Orthop.* 2014 September 18; 5(4): 516–536.

Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 2008;41:84-91.

Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis, *Semin Immunopathol* 2010;32:43-53.

Magyari L, Varszegi D, Kovesdi E, Sarlos P, Farago B, Javorhazy A, Sumegi K, Banfai Z, Melegh B. Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications. *World J Orthop.* 2014(4):516-36.

Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, Montgomery DS, Walters K, Wilson AG. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radio-graphic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2549-2556.

Marinou I, Walters K, Dickson MC, Binks MH, Bax DE, Wilson AG. Evidence of epistasis between interleukin 1 and selenoprotein-S with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009 Sep;68(9):1494-7. doi: 10.1136/ard.2008.090001. Epub 2008 Aug 26

Marques-Neto JF, Gonçalves ET, Langen LFOB, Cunha MFL, Radominski S, Oliveira SM et al. Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. *Rev Bras Reumatol* 1993; 33:169–73.

Medrano LM, García-Magariños M, Dema B, Espino L, Maluenda C, Polanco I, Figueredo MÁ, Fernández-Arquero M, Núñez C. Th17-related genes and celiac disease susceptibility. *PLoS One.* 2012;7(2):e31244.

Mellado M, Martínez-Muñoz L, Cascio G, Lucas P, Pablos JL, Rodríguez-Frade JM. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2015 Jul 27;6:384. doi: 10.3389/fimmu.2015.00384. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26284069

Messemaker TC, Huizinga TW, Kurreeman F. Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications. *J Autoimmun.* 2015 Jul 24. pii: S0896-8411(15)30010-X. doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.007.

Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1951-7.

Nishimoto T, Seta N, Anan R, Yamamoto T, Kaneko Y, Takeuchi T, Kuwana M. A single nucleotide polymorphism of TRAF1 predicts the clinical response to anti-TNF treatment in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2014 Mar-Apr;32(2):211-7.

Pawlik A, Kurzawski M, Florczak M, GawronskaSzklarz B, Herczyńska M. IL1beta+3953 exon 5 and IL-2 -330 promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *ClinExpRheumatol*2005; 23: 159-164.

Pereira, I.A. ,*et al.* ; Brazilian Society of Rheumatology Consensus on the management of comorbidities in patients with rheumatoid arthritis. *Rev. Bras. Rheumatol.*2012, 52:4,474-495.

Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *AutoimmunRev*2011; 10: 599-608.

Prasad P, Kumar A, Gupta R, Juyal RC, Thelma BK. Caucasian and Asian specific rheumatoid arthritis risk loci reveal limited replication and apparent allelic heterogeneity in north Indians. *PLoS One.* 2012;7(2):e31584. doi: 10.1371/journal.pone.0031584.

Preacher, K. J. (2001, April). Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence [Computer software].

Put K, Avau A, Brisse E, Mitera T, Put S, Proost P, Bader-Meunier B, Westhovens R, Van den Eynde BJ, Orabona C, Fallarino F, De Somer L, Tousseyn T, Quartier P, Wouters C, Matthys P. Cytokines in systemic juvenile idiopathic arthritis and haemophagocytic lymphohistiocytosis: tipping the balance between interleukin-18 and

interferon- γ . *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Aug;54(8):1507-17. doi: 10.1093/rheumatology/keu524.

Queiroz M.V., *Reumatologia*, Vol. 1. Editora Lidl, 2002.

Reineke U, Schneider-Mergener J, Glaser RW, et al. Evidence for conformationally different states of interleukin-10: binding of a neutralizing antibody enhances accessibility of a hidden epitope. *J Mol Recognit* 1999;12:242-8.

Renauld JC. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10144-9.

Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today*. 2000 Oct;21(10):479-83.

Roeleveld DM, Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine*. 2015 Jul;74(1):101-7.

Ropers H-H .New Perspectives for the Elucidation of Genetic Disorders *Am. J. Hum. Genet*, v.81,p.199–207, 2007.

Ruschpler P, Stiehl P. Shift in Th1 (IL-2 and IFN- γ) and Th2 (IL-10 and IL-4) cytokine mRNA balance within two new histological main-types of rheumatoid-arthritis (RA). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2002 May;48(3):285-93.

Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, Sugaya M, Sato S, Doi S, Miyatake A, Ebe K, Noguchi E, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphisms in the IL22 gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *J Dermatol Sci*. 2013 Aug;71(2):148-50. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.002. Epub 2013 Apr 17. Erratum in: *J Dermatol Sci*. 2014 Apr;74(1):95.

Scholes M, Wong J, Scott DL, Zink A et al. Economic aspects of treatment options in rheumatoid arthritis: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69:995-1003.

Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376: 1094-1108.

Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4:S265-72.

Soemedi R, Vega H, Belmont JM, Ramachandran S, Fairbrother WG. Genetic.

variation and RNA binding proteins: tools and techniques to detect functional polymorphisms. *Adv Exp Med Biol*. 2014

Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, Li Y, Kurreeman FA, Zhernakova A, Hinks A, Guiducci C, Chen R, Alfredsson L, Amos CI, Ardlie KG, Barton A, Bowes J, Brouwer E, Burtt NP, Catanese JJ, Coblyn J, Coenen MJ, Costenbader KH, Criswell LA, Crusius JB, Cui J, de Bakker PI, De Jager PL, Ding B, Emery P, Flynn E, Harrison P, Hocking LJ, Huizinga TW, Kastner DL, Ke X, Lee AT, Liu X, Martin P, Morgan AW, Padyukov L, Posthumus MD, Radstake TR, Reid DM, Seielstad M, Seldin MF, Shadick NA, Steer S, Tak PP, Thomson W, van der Helm-van Mil AH, van der Horst-Bruinsma IE, van der Schoot CE, van Riel PL, Weinblatt ME, Wilson AG, Wolbink GJ, Wordsworth BP, Wijmenga C, Karlson EW, Toes RE, de Vries N, Begovich AB, Worthington J, Siminovitch KA, Gregersen PK, Klareskog L, Plenge RM. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 2010; 42: 508-514.

Suh JS, Cho SH, Chung JH, Moon A, Park YK, Cho BS. A polymorphism of interleukin-22 receptor alpha-1 is associated with the development of childhood IgA nephropathy. *J Interferon Cytokine Res*. 2013 Oct;33(10):571-7.

Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Takayama S, Endo T, Saruwatari T, Yagura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen SE, Giphart MJ, Kulski JK, Fukazawa T, Hashimoto H, Kimura M, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Mochida J, Minezaki T, Komai K, Shiozawa S, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T, Bahram S, Inoko H. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2305-2321.

Vandenbroucke JP, Hazevoet HM, Cats A. Survival and cause of death in rheumatoid arthritis: a 25-year prospective followup. *J Rheumatol*. 1984;11:158–161.

Van Riel P, Shumacher H. How does one assess early rheumatoid arthritis in daily clinical practice? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15(1):67-76.

Venkatesha SH, Dudics S, Weingartner E, So EC, Pedra J, Moudgil KD. Altered Th17/Treg balance and dysregulated IL-1 β response influence susceptibility/resistance to experimental autoimmune arthritis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2015 Sep;28(3):318-28. doi: 10.1177/0394632015595757.

Xia T, Zheng XF, Qian BH, Fang H, Wang JJ, Zhang LL, Pang YF, Zhang J, Wei XQ, Xia ZF, Zhao DB. Plasma Interleukin-37 Is Elevated in Patients with Rheumatoid Arthritis: Its Correlation with Disease Activity and Th1/Th2/Th17-Related Cytokines. *Dis Markers*. 2015;2015:795043. doi: 10.1155/2015/795043.

Xin N, Namaka MP, Dou C, Zhang Y. Exploring the role of interleukin-22 in neurological and autoimmune disorders. *Int Immunopharmacol*. 2015 Oct;28(2):1076-83. doi: 10.1016/j.intimp.2015.08.016.

Zhang L, Li JM, Liu XG, *et al.*. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 2011;31:606-14.

Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, Cheng R, Chen C, Lu J. The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Cytokine* 2011; 56: 351-355.

Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, *et al.* Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008;29:947-57.

Wakui M. [Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs)]. *Rinsho Byori*. 2013 Nov;61(11):1008-17. Review. Japanese.

Walter GJ, Fleskens V, Frederiksen KS, Rajasekhar M, Menon B, Gerwien JG, Evans HG, Taams LS. Phenotypic, functional and gene expression profiling of peripheral CD45RA⁺ and CD45RO⁺ CD4⁺CD25⁺CD127(low) regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Aug 28. doi: 10.1002/art.39408.

Warrington KJ, Takemura S, Goronzy JJ, et al. CD4⁺,CD28-T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptive immune systems. *Arthritis Rheum* 2001;44:13–20.

Weger W, Hofer A, Wolf P, El-Shabrawi Y, Renner W, Kerl H, Salmhofer W. Common polymorphisms in the interleukin-22 gene are not associated with chronic plaque psoriasis. *Exp Dermatol*. 2009 Sep;18(9):796-8.

Wolf A, Pflieger B. Burden of mayor musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization* 2003; 81(9).

Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002;168:5397-402.

Wolk K, Kunz S, Witte E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004;21:241-54.

Wolk K, Wittr E, Eitte K, et. al. Biology of intereukin-22. *Semin Immunopathol* 2010;32:17-31.

Zare HR, Habibagahi M, Vahdati A, Habibagahi Z. Patients with Active Rheumatoid Arthritis Have Lower Frequency of nTregs in Peripheral Blood. *Iran J Immunol*. 2015 Sep;12(3):166-75. doi: IJiv12i3A2.

Zdanov A. Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 3873-3884.

Zhang N, Pan HF, Ye DQ. Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem* 2011;353:41-6.

Zhang L, Li YG, Li YH, et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012;7:e31000.

Apêndices

Apêndice – A: Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os SNPs *IL22RA1*, pelo software disponível no site <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Sendo 1 o alelo ancestral e 2, o alelo polimórfico.

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)				
	Controls	Cases	allele freq. difference	heterozygous	homozygous	allele positivity	Armitage's trend test
SNPrs16829207	n11=23 (12.67) n12=30 (50.67) n22=61 (50.67) f _{a1} =0.33 +/-0.037 F=0.40789 p=0.000013 (Pearson) p=0.000016 (Llr) p=0.000017 (Exact)	n11=12 (5.57) n12=22 (34.86) n22=61 (54.57) f _{a1} =0.24 +/-0.036 F=0.36896 p=0.000333 (Pearson) p=0.000604 (Llr) p=0.0005580 (Exact)	[1]<->[2] Odds_ratio=1.565 C.I=[0.017-2.409] chi2=4.17 p=0.04107 (P)	[11]<->[12] Odds_ratio=1.406 C.I=[0.578-3.418] chi2=2.57 p=0.45207	Risco alelo 2 [11+]<->[22] Odds_ratio=1.917 C.I=[0.876-4.194] chi2=2.70 p=0.10037	[11]<->[12+22] Odds_ratio=1.748 C.I=[0.819-3.733] chi2=2.12 p=0.14585	common odds ratio Odds_ratio=1.382 chi2=2.98 p=0.08404
			[2]<->[1] Odds_ratio=0.639 C.I=[0.415-0.983] chi2=4.17 p=0.04107 (P)	[22]<->[12] Odds_ratio=0.733 C.I=[0.381-1.411] chi2=0.86 p=0.35240	Risco alelo 1 [22]<->[11] Odds_ratio=0.522 C.I=[0.238-1.142] chi2=2.70 p=0.10037	[11+12]<->[22] Odds_ratio=0.642 C.I=[0.367-1.121] chi2=2.44 p=0.11810	common odds ratio Odds_ratio=0.724 chi2=2.98 p=0.08404
			[1]<->[2] Odds_ratio=1.395 C.I=[0.975-1.995] chi2=3.33 p=0.06792 (P)	[11]<->[12] Odds_ratio=0.719 C.I=[0.372-1.393] chi2=0.96 p=0.32801	Risco alelo 2 [11+]<->[22] Odds_ratio=1.772 C.I=[0.849-3.699] chi2=2.34 p=0.12593	[11]<->[12+22] Odds_ratio=1.002 C.I=[0.538-1.868] chi2=0.00 p=0.99377	common odds ratio Odds_ratio=1.362 chi2=3.34 p=0.06782
SNPrs1292900	n11=24 (28.75) n12=68 (58.50) n22=25 (29.75) f _{a1} =0.50 +/-0.030 F=0.16248 p=0.078838 (Pearson) p=0.078173 (Llr) p=0.098123 (Exact)	n11=26 (21.70) n12=53 (61.59) n22=48 (43.70) f _{a1} =0.41 +/-0.033 F=0.13953 p=0.115844 (Pearson) p=0.116165 (Llr) p=0.142174 (Exact)	[2]<->[1] Odds_ratio=0.717 C.I=[0.501-1.025] chi2=3.33 p=0.06792 (P)	[22]<->[12] Odds_ratio=0.406 C.I=[0.222-0.741] chi2=8.79 p=0.00303	Risco alelo 1 [22]<->[11] Odds_ratio=0.564 C.I=[0.270-1.178] chi2=2.34 p=0.12593	[11+12]<->[22] Odds_ratio=0.447 C.I=[0.253-0.790] chi2=7.84 p=0.00512	common odds ratio Odds_ratio=0.731 chi2=3.34 p=0.06782
			[1]<->[2] Odds_ratio=0.902 C.I=[0.614-1.327] chi2=0.27 p=0.60169 (P)	[11]<->[12] Odds_ratio=0.709 C.I=[0.406-1.239] chi2=1.46 p=0.22682	Risco alelo 2 [11+]<->[22] Odds_ratio=0.995 C.I=[0.439-2.252] chi2=0.00 p=0.98984	[11]<->[12+22] Odds_ratio=0.768 C.I=[0.455-1.295] chi2=0.98 p=0.32200	common odds ratio Odds_ratio=0.944 chi2=0.26 p=0.61100
			[2]<->[1] Odds_ratio=1.108 C.I=[0.754-1.629] chi2=0.27 p=0.60169 (P)	[22]<->[12] Odds_ratio=0.713 C.I=[0.314-1.619] chi2=0.66 p=0.41787	Risco alelo 1 [22]<->[11] Odds_ratio=1.005 C.I=[0.444-2.276] chi2=0.00 p=0.98984	[11+12]<->[22] Odds_ratio=0.849 C.I=[0.393-1.832] chi2=0.17 p=0.67641	common odds ratio Odds_ratio=1.059 chi2=0.26 p=0.61100
SNPrs10794665	n11=47 (47.62) n12=54 (52.77) n22=14 (14.62) f _{a1} =0.64 +/-0.031 F=-0.02340 p=0.801851 (Pearson) p=0.801563 (Llr) p=1.000000 (Exact)	n11=54 (50.67) n12=44 (50.67) n22=16 (12.67) f _{a1} =0.67 +/-0.033 F=0.13158 p=0.160057 (Pearson) p=0.163444 (Llr) p=0.204139 (Exact)	[1]<->[2] Odds_ratio=0.902 C.I=[0.614-1.327] chi2=0.27 p=0.60169 (P)	[11]<->[12] Odds_ratio=0.709 C.I=[0.406-1.239] chi2=1.46 p=0.22682	Risco alelo 2 [11+]<->[22] Odds_ratio=0.995 C.I=[0.439-2.252] chi2=0.00 p=0.98984	[11]<->[12+22] Odds_ratio=0.768 C.I=[0.455-1.295] chi2=0.98 p=0.32200	common odds ratio Odds_ratio=0.944 chi2=0.26 p=0.61100
			[2]<->[1] Odds_ratio=1.108 C.I=[0.754-1.629] chi2=0.27 p=0.60169 (P)	[22]<->[12] Odds_ratio=0.713 C.I=[0.314-1.619] chi2=0.66 p=0.41787	Risco alelo 1 [22]<->[11] Odds_ratio=1.005 C.I=[0.444-2.276] chi2=0.00 p=0.98984	[11+12]<->[22] Odds_ratio=0.849 C.I=[0.393-1.832] chi2=0.17 p=0.67641	common odds ratio Odds_ratio=1.059 chi2=0.26 p=0.61100
			[1]<->[2] Odds_ratio=0.902 C.I=[0.614-1.327] chi2=0.27 p=0.60169 (P)	[11]<->[12] Odds_ratio=0.709 C.I=[0.406-1.239] chi2=1.46 p=0.22682	Risco alelo 2 [11+]<->[22] Odds_ratio=0.995 C.I=[0.439-2.252] chi2=0.00 p=0.98984	[11]<->[12+22] Odds_ratio=0.768 C.I=[0.455-1.295] chi2=0.98 p=0.32200	common odds ratio Odds_ratio=0.944 chi2=0.26 p=0.61100

Apêndice – B: Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os SNPs no gene *IL22RA1*, pelo software disponível no site <http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>.

rs16829207	Casos	Controles	
Genótipo T	46	76	Chi-square: 4.173
Genótipo G	144	152	Grau de Liberdade: 1
			p -value: 0.0410
			Chi-square Yates [†] : 3.743
			p -value Yates [†] : 0.0530
rs4292900	Casos	Controles	
Genótipo C	105	116	Chi-square: 3.33
Genótipo T	149	118	Grau de Liberdade: 1
			p -value: 0.067
			Chi-square Yates [†] : 3.009
			p -value Yates [†] : 0.0828
rs10794665	Casos	Controles	
Genótipo A	152	148	Chi-square: 0.272
Genótipo G	76	82	Grau de Liberdade: 1
			p -value: 0.6019
			Chi-square Yates [†] : 0.179
			p -value Yates [†] : 0.6722

Apêndice – C: Gene da Interleucina 22 (IL22)

IL-22 é um membro da família das citocinas IL-10 e está relacionada diretamente com as diferentes subpopulações de células T. Possui um papel na defesa do patógeno, cicatrização de feridas, e reorganização tecido, portanto, a IL-22 modula as respostas dos tecidos durante inflamação, participa na resposta adaptativa pela ativação de células T CD4 e na resposta inata pela por meio da ativação dos linfócitos, tais como células NK (Xie MH, et.al.,2000)

Na Artrite reumatóide a IL-22 possui a função de promover uma resposta inflamatória no tecido sinovial e a osteoclastogênese (Kazantseva MG, et.al., 2014).Em um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado queos níveis de IL-22 estão aumentados em pacientes com AR quando comparados com os controles saudáveis. Observou-se também que os níveis de IL-22 estão significativamente relacionados com a atividade da doença e atividade clínica da doença (DAS28 e CDAI). Nosso estudo foi pioneiro em associar os níveis de IL-22 com a gravidade da doença, DAS28 e CDAI. (Rocha Jr, LF. et. al., 2012).

Acreditando que estas alterações possam interferir no prognostico dos pacientes com artrite reumatóide, nosso estudo objetiva avaliar os principais polimorfismos encontrados nessa citocina.

Objetivos

Objetivo Geral: Identificar polimorfismos no gene da *IL22*, que possam estar associados com o aumento da artrite reumatóide.

Objetivos Específicos

- Quantificar IL-22 no soro de pacientes portadores de AR atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e voluntários sadios;
- Selecionar os SNPs a serem genotipados no gene *IL22*;
- Genotipar os SNPs presentes no gene *IL22* em pacientes portadores de AR e voluntários sadios;
- Correlacionar o genótipo de *IL22* com os seus níveis séricos da citocina e parâmetros clínicos de atividade da doença.

Variáveis Independentes:

- Polimorfismo gene *IL22* – (rs1182844)

Localização: Chr.12: 68247752

Tipo do SNP: Substituição de transição

Categorização do alelo *IL22*: A (alelo ancestral); T (alelo variante)

Categorização genotípica do gene *IL22*: AA (Genótipo Homozigoto Ancestral); AT (Genótipo Heterozigoto) e TT (Genótipo Homozigoto variante).

O rs1182844 está relacionado com o desenvolvimento de doenças, como psoríase crônica (Weger W. et.al., 2009).

- Polimorfismo gene *IL22* – (rs2227513)

Localização: Chr.12: 68253559

Tipo do SNP: Substituição de transição

Categorização do alelo *IL22*: A (alelo ancestral); G (alelo variante)

Categorização genotípica do gene *IL22*: AA (Genótipo Homozigoto Ancestral); AG (Genótipo Heterozigoto) e GG (Genótipo Homozigoto variante).

O rs1182844 está relacionado com o vírus da imunodeficiência humana na população chinesa (Hu J. et.al.,2014).

- Polimorfismo gene *IL22* – (rs2227478)

Localização: Chr.12: 68254842

Tipo do SNP: Substituição de transição

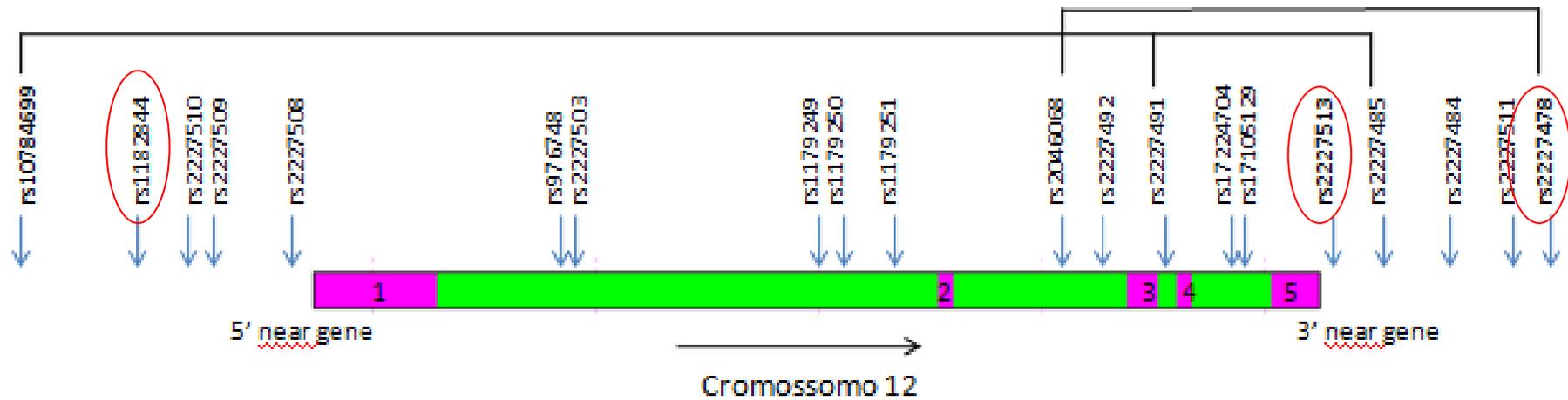
Categorização do alelo *IL22*: C (alelo ancestral); T (alelo variante)

Categorização genotípica do gene *IL22*: CC (Genótipo Homozigoto Ancestral); CT (Genótipo Heterozigoto) e TT (Genótipo Homozigoto variante).

Desenho do gene *IL22*, contendo os SNPs selecionados rs1182844, rs2227513,rs2227478.

Grupo de Correlação *IL22*

$r^2 > 0,8$
MAF $> 0,1$



Negrito – Tag SNP

Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para SNPs no gene *IL22*, pelo software disponível no site <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Sendo 1 o alelo ancestral e 2, o alelo polimórfico.

SNPs2227478	Risco alelo 2	[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11->]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio			
		Odds_ratio=1.619 C.I.=[1.127-2.325] chi2=6.82 p=0.00901 (P)	Odds_ratio=1.157 C.I.=[0.550-2.433] chi2=0.15 p=0.69981	Odds_ratio=2.800 C.I.=[1.220-6.424] chi2=6.07 p=0.01372	Odds_ratio=1.543 C.I.=[0.753-3.160] chi2=1.42 p=0.23345	Odds_ratio=1.724 chi2=8.06 p=0.00453			
		n11=21 (38.76) n12=75 (59.48) n22=23 (30.76) f_a1=0.49 +/-0.028 F=-0.26086 p=0.004432 (Pearson) p=0.004205 (Lr) p=0.006059 (Exact)	n11=15 (17.20) n12=62 (57.59) n22=46 (48.20) f_a1=0.37 +/-0.030 F=-0.07651 p=0.396136 (Pearson) p=0.394120 (Lr) p=0.446685 (Exact)						
	Risco alelo 1	[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22->]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio			
		Odds_ratio=0.618 C.I.=[0.430-0.888] chi2=6.82 p=0.00901 (P)	Odds_ratio=0.413 C.I.=[0.226-0.755] chi2=8.43 p=0.00368	Odds_ratio=0.357 C.I.=[0.156-0.819] chi2=6.07 p=0.01372	Odds_ratio=0.401 C.I.=[0.224-0.719] chi2=9.69 p=0.00185	Odds_ratio=0.574 chi2=8.06 p=0.00453			
		n11=37 (49.57) n12=77 (51.87) n22=1 (13.57) f_a1=0.66 +/-0.022 F=-0.48462 p=2.026e-07 (Pearson) p=5.511e-09 (Lr) p=2.513e-08 (Exact)	Odds_ratio=0.618 C.I.=[0.430-0.888] chi2=6.82 p=0.00901 (P)						
SNPs2227513	Risco alelo 2	[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11->]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio			
		Odds_ratio=1.107 C.I.=[0.749-1.636] chi2=0.26 p=0.61155 (P)	Odds_ratio=0.678 C.I.=[0.384-1.195] chi2=1.81 p=0.17815	Odds_ratio=10.436 C.I.=[1.283-84.877] chi2=6.88 p=0.00873	Odds_ratio=0.803 C.I.=[0.460-1.401] chi2=0.60 p=0.43884	Odds_ratio=1.663 chi2=0.37 p=0.54066			
		n11=39 (42.12) n12=55 (48.77) n22=11 (14.12) f_a1=0.63 +/-0.031 F=-0.12782 p=0.190277 (Pearson) p=0.186311 (Lr) p=0.291874 (Exact)							
	Risco alelo 1	[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22->]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio			
		Odds_ratio=0.904 C.I.=[0.611-1.336] chi2=0.26 p=0.61155 (P)	Odds_ratio=0.065 C.I.=[0.008-0.518] chi2=11.08 p=0.00087	Odds_ratio=0.096 C.I.=[0.012-0.779] chi2=6.88 p=0.00873	Odds_ratio=0.075 C.I.=[0.010-0.594] chi2=9.82 p=0.00172	Odds_ratio=0.776 chi2=0.37 p=0.54066			
		n11=49 (46.70) n12=46 (50.59) n22=16 (13.70) f_a1=0.65 +/-0.033 F=0.09081 p=0.338687 (Pearson) p=0.340927 (Lr) p=0.403681 (Exact)							
SNPs1182844	Risco alelo 2	[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11->]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio			
		Odds_ratio=0.863 C.I.=[0.577-1.292] chi2=0.51 p=0.47492 (P)	Odds_ratio=0.612 C.I.=[0.336-1.111] chi2=2.62 p=0.10570	Odds_ratio=0.964 C.I.=[0.440-2.113] chi2=0.01 p=0.92727	Odds_ratio=0.703 C.I.=[0.409-1.205] chi2=1.65 p=0.19934	Odds_ratio=0.926 chi2=0.43 p=0.51239			
		n11=54 (47.36) n12=31 (44.29) n22=17 (10.36) f_a1=0.68 +/-0.037 F=0.30006 p=0.002442 (Pearson) p=0.002837 (Lr) p=0.002912 (Exact)							
	Risco alelo 1	[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22->]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio			
		Odds_ratio=1.158 C.I.=[0.774-1.734] chi2=0.51 p=0.47492 (P)	Odds_ratio=0.634 C.I.=[0.279-1.441] chi2=1.19 p=0.27536	Odds_ratio=1.037 C.I.=[0.473-2.273] chi2=0.01 p=0.92727	Odds_ratio=0.842 C.I.=[0.401-1.770] chi2=0.21 p=0.64996	Odds_ratio=1.080 chi2=0.43 p=0.51239			
		n11=49 (46.70) n12=46 (50.59) n22=16 (13.70) f_a1=0.65 +/-0.033 F=0.09081 p=0.338687 (Pearson) p=0.340927 (Lr) p=0.403681 (Exact)							

Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para SNPs no gene *IL22*, pelo software disponível no site: <http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>

rs2227478	Casos	Controles	
Genótipo C	92	117	Chi-square: 6.82
Genótipo T	154	121	Grau de Liberdade: 1
			p -value: 0.0090
			Chi-square Yates': 6.349
			P-value Yates': 0.0117
rs1182844	Casos	Controles	
Genótipo A	139	144	Chi-square: 0.511
Genótipo T	65	78	Grau de Liberdade: 1
			p -value: 0.4747
			Chi-square Yates': 0.374
			P-value Yates': 0.540
rs2227513	Casos	Controles	
Genótipo A	133	151	Chi-square: 0.258
Genótipo G	77	79	Grau de Liberdade: 1
			p -value: 0.6114
			Chi-square Yates': 0.167
			P-value Yates': 0.6827

Apêndice –D

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CIDADÃOS ALFABETIZADOS

« Correlação de polimorfismos nos genes IL22 e IL22RA2 com os níveis séricos de IL-22 e parâmetros clínicos de pacientes portadores de artrite reumatoide »

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa descobrir diferentes alterações genéticas que podem levar a uma mudança no sistema de defesa do organismo (padrão imunológico) favorecendo o desenvolvimento da artrite reumatoide. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células sanguíneas, após este ter sido coletado por profissionais competentes.

É importante ressaltar que:

- Sua participação é inteiramente voluntária;
- Você terá ressarcimento de despesas, como transporte ou alimentação, durante a participação na pesquisa;
- Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
- Nós solicitamos novamente sua aprovação verbal no momento de coleta;
- Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais;

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória crônica que acomete, principalmente, as articulações, causando dores, deformidade e incapacidade funcional. Com o passar do tempo, os portadores de artrite desenvolvem incapacidade para realização de atividades tanto de vida diárias como profissional. A artrite reumatóide é comum e a prevalência pode chegar a 1,5 % da população em algumas regiões. É mais frequente em mulheres e costuma iniciar-se entre 30 e 50 anos de idade, mas também

acomete homens e crianças. As alterações genéticas estão relacionadas com uma resposta mais agressiva da doença, a não resposta a alguns medicamentos, como também ao desenvolvimento da própria doença.

Nosso objetivo é descobrir as possíveis causas da artrite reumatoide através da identificação dos genes e alelos que contribuam para o aumento do risco de desenvolver esta doença. Estudos como este, permite determinar a causalidade entre um “defeito” do sistema imunológico humano e a evolução da doença. Pelo fato da AR ser uma doença multifatorial, a identificação dos genes envolvidos na doença é uma tarefa árdua, mas absolutamente necessária.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você tem artrite reumatoide ou por você ser um voluntário que não tem a doença. Este estudo inclui a participação de 150 indivíduos. Entre os quais, 50 serão voluntários sadios e 100 são portadores da artrite reumatoide.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta é feita no braço e a quantidade coletada é de 4 ml (equivalente a 1 tubo pequeno). A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o braço do voluntário com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

O material coletado será processado para extração do material genético (DNA) que será armazenado adequadamente em freezers -80°C. Os ensaios de análise genética dos alelos e polimorfismos referentes as sequências do gene do receptor da citocina IL-22 será feita nestas amostras por amplificação da cadeia da polimerase (PCR) em tempo

real. O paciente e o voluntário sadio não irão fazer exames ou testes genéticos diretamente.

Nós faremos também algumas perguntas para obter informações clínicas, as quais serão importantes para nosso estudo. Os resultados serão apresentados em congressos, conferência ou em revistas médicas, mas não aparecerá nome do paciente ou voluntário sadio. Assim os participantes que quiserem ter acesso aos resultados terão o livre acesso as informações adquiridas. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais. Dados do prontuário somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos não sendo permitido o acesso a terceiros. Dado a confidencialidade dos dados, os participantes serão protegidos contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização individual ou coletiva.

Você tem alguma pergunta sobre sua participação? Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contactar:

Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N – Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife – PE. E-mail: aduarte@terra.com.br. Telefone: 55(81) 3454-0155.

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade de Pernambuco. . Av. Prof. Moraes Rego S/N – Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone: 55 (81) 2126-8346.

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CCS, o Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N – Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife – PE. Telefone: 55 (81) 2126-8588.

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP é um comitê da Universidade Federal de Pernambuco, de natureza consultiva e educativa para emissão de pareceres e protocolos de pesquisas vinculada a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Tem por finalidade o acompanhamento das pesquisas envolvendo seres humanos, preservando aspectos éticos em defesa da integridade e dignidade dos sujeitos da pesquisa. Horário de funcionamento: segunda-feira a sexta-feira (8h-12h).

Este documento terá duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e outra com o sujeito da pesquisa, de acordo com o preconizado na Resolução CNS 466/2012 item IV.3.f, IV.5. Todas as páginas deve ser obrigatoriamente rubricada pelo participante de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador responsável de acordo com a Carta Circular nº 003/2011 CONEP/CNS e com a Resolução CNS 466/2012, item IV.5.d.

Nome do responsável pela coleta de sangue: _____

Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo:

Nome: _____

RG: _____ Data: _____

Endereço: _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: _____

RG: _____ Data: _____

Testemunha 2: _____

RG: _____ Data: _____

Assinatura da Coordenação do Projeto:

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Profa. Dra. Ângela Luzia

BrancoDuarte

Pesquisador Responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CIDADÃOS NÃO ALFABETIZADOS

« Correlação de polimorfismos nos genes IL22 e IL22RA2 com os níveis séricos de IL-22 e parâmetros clínicos de pacientes portadores de artrite reumatoide »

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa descobrir diferentes alterações genéticas que podem levar a uma mudança no sistema de defesa do organismo (padrão imunológico) favorecendo o desenvolvimento da artrite reumatoide. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células sanguíneas, após este ter sido coletado por profissionais competentes.

É importante ressaltar que:

- Sua participação é inteiramente voluntária;
- Você terá ressarcimento de despesas, como transporte ou alimentação, durante a participação na pesquisa;
- Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
- Nós solicitamos novamente sua aprovação verbal no momento de coleta;
- Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais;

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória crônica que acomete, principalmente, as articulações, causando dores, deformidade e incapacidade funcional. Com o passar do tempo, os portadores de artrite desenvolvem incapacidade para realização de atividades tanto de vida diárias como profissional. A artrite reumatoide é comum e a prevalência pode chegar a 1,5 % da população em algumas regiões. É mais frequente em mulheres e costuma iniciar-se entre 30 e 50 anos de idade, mas também acomete homens e crianças. As alterações genéticas estão relacionadas com uma

resposta mais agressiva da doença, a não resposta a alguns medicamentos, como também ao desenvolvimento da própria doença.

Nosso objetivo é descobrir as possíveis causas da artrite reumatoide através da identificação dos genes e alelos que contribuam para o aumento do risco de desenvolver esta doença. Estudos como este, permite determinar a causalidade entre um “defeito” do sistema imunológico humano e a evolução da doença. Pelo fato da AR ser uma doença multifatorial, a identificação dos genes envolvidos na doença é uma tarefa árdua, mas absolutamente necessária.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você tem artrite reumatoide ou por você ser um voluntário que não tem a doença. Este estudo inclui a participação de 150 indivíduos. Entre os quais, 50 serão voluntários sadios e 100 são portadores da artrite reumatoide.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta é feita no braço e a quantidade coletada é de 4 ml (equivalente a 1 tubo pequeno). A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o braço do voluntário com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

O material coletado será processado para extração do material genético (DNA) que será armazenado adequadamente em freezers -80°C . Os ensaios de análise genética dos alelos e polimorfismos referentes as sequências do gene do receptor da citocina IL-22 será feita nestas amostras por amplificação da cadeia da polimerase (PCR) em tempo

real. O paciente e o voluntário sadio não irão fazer exames ou testes genéticos diretamente.

Nós faremos também algumas perguntas para obter informações clínicas, as quais serão importantes para nosso estudo. Os resultados serão apresentados em congressos, conferência ou em revistas médicas, mas não aparecerá nome do paciente ou voluntário sadio. Assim os participantes que quiserem ter acesso aos resultados terão o livre acesso as informações adquiridas. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais. Dados do prontuário somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos não sendo permitido o acesso a terceiros. Dado a confidencialidade dos dados, os participantes serão protegidos contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização individual ou coletiva.

Você tem alguma pergunta sobre sua participação? Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contactar:

Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N – Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife – PE. E-mail: aduarte@terra.com.br. Telefone: 55(81) 3454-0155.

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade de Pernambuco. . Av. Prof. Moraes Rego S/N – Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone: 55 (81) 2126-8346.

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CCS, o Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N – Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife – PE. Telefone: 55 (81) 2126-8588.

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP é um comitê da Universidade Federal de Pernambuco, de natureza consultiva e educativa para emissão de pareceres e protocolos de pesquisas vinculada a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Tem por finalidade o acompanhamento das pesquisas envolvendo seres humanos, preservando aspectos éticos em defesa da integridade e dignidade dos sujeitos da pesquisa. Horário de funcionamento: segunda-feira a sexta-feira (8h-12h).

Este documento terá duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e outra com o sujeito da pesquisa, de acordo com o preconizado na Resolução CNS 466/2012 item IV.3.f, IV.5. Todas as páginas deve ser obrigatoriamente rubricada pelo participante de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador responsável de acordo com a Carta Circular nº 003/2011 CONEP/CNS e com a Resolução CNS 466/2012, item IV.5.d.

Nome do responsável pela coleta de sangue:

Se você aceitar participar deste estudo, por favor responda o formulário abaixo.

Eu _____, a cargo de
_____, assino o

presente termo de consentimento.

RG: _____ Data _____

Endereço: _____

Testemunha 1: _____

Impressão digital do
paciente

RG: _____ Data: _____

Testemunha 2: _____

RG: _____ Data: _____

Assinatura da Coordenação do Projeto:

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

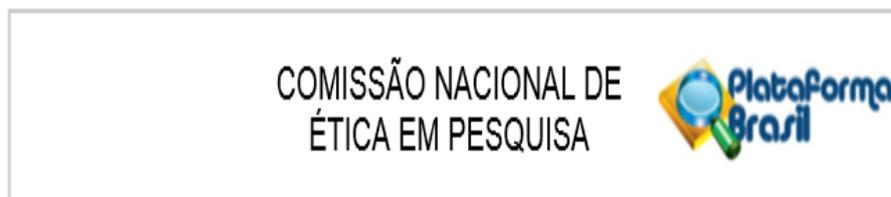
Profa. Dra. Ângela Luzia Branco

Pinto Duarte

Pesquisador Responsável

Anexos

Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa



Continuação do Parecer: 739.453

-572 G/C, em pacientes portadores de AR provenientes de diferentes populações de diferentes origens. Esses autores encontraram associação entre o polimorfismo IL6 -174 G/C e AR na população europeia.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

7. Quanto à terminologia utilizada, ao invés do termo "As SNPs", o correto é "Os SNP(s)", uma vez que a tradução para SNP é "polimorfismo de base única", sendo o "s" facultativo, uma vez que pode se flexionar (neologismo), ou não, siglas no plural. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: de acordo. As alterações foram feitas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Situação do Parecer:

Aprovado

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 de 2012 e na Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

BRASILIA, 08 de Agosto de 2014

Assinado por:
 Jorge Alves de Almeida Venancio
 (Coordenador)

