

CILEIDE BRASIL DA SILVA

POLIMORFISMOS DO GENE *HLA-G* EM PACIENTES
COM ARTRITE REMATOIDE E CONTROLES NO
ESTADO DE SANTA

Monografia apresentada como
requisito parcial para obtenção do
título de graduação no Curso de
Licenciatura em Ciências Biológicas-
EaD - da Universidade Federal de
Santa Catarina..

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilíada Rainha de
Souza

Coorientadora: Prof^a Dr^a Yara Costa
Netto Muniz

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Cileide Brasil
Polimorfismos do gene HLA-G em pacientes com Artrite
Reumatoide e controles no estado de Santa Catarina /
Cileide Brasil da Silva ; orientadora, Ilíada Rainha de
Souza ; co-orientadora, Yara Costa Netto Muniz. -
Florianópolis, SC, 2013.
63 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Polimorfismos Genéticos
Humanos. 3. Gene HLA-G e variantes 3' UTR. 4. Artrite
Reumatoide. 5. Doença autoimune. I. Souza, Ilíada Rainha de.
II. Muniz, Yara Costa Netto . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Aos meus pais, Walmor (saudades eterna) e Hilda,
pelos valores transmitidos.

Aos meus irmãos, Salete e Wanderlei,
por estarem comigo nessa caminhada.

Ao meu esposo, Felipe, amor da minha vida.

Aos meus sogros, Eunice e Hamilton,
pela entrega familiar e apoio incondicional.

A minha pequena flor de luz, Sofia,
por existir em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos de alegria e também nos apreensivos fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço a todos de coração.

Agradeço aos meus colegas de classe e, com certeza, futuros excelentes profissionais. Em especial a Jimena, Talita e Maici, companheiras das 120 viagens a Tubarão, das noites na creche do polo e de todos os PPCCs que fizemos nesses quatro anos.

As minhas amigas Ziliani, Marcinha, Ale, Raquel, Cris por todo apoio e cumplicidade. Porque mesmo quando distantes estavam presentes em minha vida.

Ao meu colega de trabalho Alex que nestes quatro anos foi incansável nas trocas de plantão para que eu pudesse estar em Tubarão todos os finais de semana.

Ao Laboratório Médico Santa Luzia que, além de ser meu local de trabalho, foi e continua sendo de muito aprendizado e, em especial, ao meu gerente Saulo Mello pelo apoio e muitas folgas concedidas.

Ao meu esposo, Felipe, incentivador desta graduação, pela paciência, dedicação e compreensão em minhas ausências.

Aos meus pais, Walmor e Hilda, que me conduziram a uma formação pautada na humildade, respeito, princípios morais e honestidade.

A minha irmã, Salete, fonte inspiradora de persistência, a quem tenho muito orgulho de ter como irmã.

Meu agradecimento especial às professoras Iliada Rainha e Yara Muniz, pelo exemplo de dedicação ao trabalho, conhecimento profissional e orientação nesta monografia. Obrigada pela chance de ser aluna de vocês.

A professora Andrea Marrero, a quem tenho muito orgulho de ter como amiga, pelo profissionalismo, conhecimento científico e conselhos valiosos.

Ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos – LAPOGE – por fornecer a estrutura para que eu desenvolvesse a pesquisa.

A coordenação do polo da UFSC em Tubarão, por me acolher e permitir minha estadia na creche nestes quatro anos.

Aos membros da banca, doutoras Ilíada Rainha de Souza e Yara Costa Netto Muniz, mestres Mariáh Damiani e Tiago Moreti por aceitarem participar da avaliação deste trabalho e por contribuírem na melhoria dele.

Aos médicos da divisão de reumatologia do Hospital Universitário (HU) por apoiarem o projeto de genética da autoimunidade, colaborando com a coleta de dados de pacientes.

Aos pacientes e indivíduos controles que doaram um pouco da sua história e seu tempo para a realização deste trabalho, contribuindo para pesquisa e estudo da artrite reumatoide.

A Deus, presença incontestável, pelo dom da vida e demonstração de amor infinito.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”
(Chico Xavier)

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de etiologia multifatorial desconhecida, que acomete as articulações, porém a inflamação apresenta caráter sistêmico, atingindo outras regiões do organismo, causando morbidade e elevada mortalidade. O gene *HLA-G* possui distribuição tecidual limitada e é transcrito de forma alternativa, apresentando propriedades biológicas de imuno tolerância. A região 3' não transcrita do *HLA-G* possui dois sítios polimórficos, *14pb*Ins/Del* (rs1704) e *+3142C/G* (rs1063320), relacionados com a estabilidade e expressão do gene. O objetivo desse estudo foi genotipar estes dois polimorfismos, em 31 pacientes com AR e 48 indivíduos controles, verificando a influência desses no desenvolvimento da doença. Dos indivíduos analisados o grupo casos apresentou uma média de 56,9±8,79 anos e o grupo controle 57,4±9,62 anos. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita, através da técnica de PCR-SSP, visualizada em gel de agarose 3%. As frequências gênicas foram estimadas e o *odds ratio* (OR) foi calculado para avaliar associação dos polimorfismos com o desenvolvimento da AR ($p < 0,05$ foi considerado significativo). Foi encontrada associação positiva para a presença do haplótipo **Ins/C* (OR 9,894, $p < 0,001$; IC 2,510 - 45,476) e negativa para o haplótipo **Del/C* (OR 0,351; $p=0,009$; IC 0,154-0,787). Considerando as combinações haplotípicas foi encontrada associação positiva com o genótipo homocigoto *Ins/C-Ins/C* (OR 17,716; $p=0,035$; IC 1,121-10237,681). Em conclusão, o haplótipo da 3'UTR do *HLA-G* está associado a AR e o polimorfismo *14pb*Ins/Del* deve estar relacionado com a diferença na expressão do *HLA-G* o que explicaria a associação com a doença.

Palavras-chave: Artrite reumatoide. Gene *HLA-G*. Polimorfismo. 3'UTR.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease of an unknown multifactorial etiology, affects the joints, but presents a systemic inflammation and affects other parts of the body, causing high morbidity and mortality. The HLA-G has limited tissue distribution is transcribed alternatively, displaying biological properties of immune tolerance. The region 3' not transcribed of HLA-G has two polymorphic sites, 14pb**Ins/Del*(rs1704) and +3142C/G(rs1063320), related to the stability and gene expression. The purpose of this study is to genotype these two polymorphisms in 31 RA patients and 48 control subjects, analyzing the influence of these on the development of the disease. Among the individuals genotyped the case group had a mean of 56.9 ± 8.79 years and the control group 57.4 ± 9.62 years. DNA was extracted from whole blood and genotyping performed by PCR-SSP, visualized in 3% agarose gel. The gene frequencies were estimated and the *odds ratio* (OR) was calculated to evaluate the association of polymorphisms with the development of RA ($p < 0.05$ was considered significant). Positive association was found for the presence of haplotype **Ins/C* (OR 9.894, $p < 0.001$, CI 2.510 to 45.476) and negative for haplotype **Del/C* (OR 0.351, $p = 0.009$, CI 0.154 to 0.787). Considering the haplotype combinations, it was found a positive association with the homozygous genotype *Ins/Ins-C/C* (OR 17.716, $p = 0.035$, CI 1.121 to 10237.681). In conclusion, the haplotype of the 3'UTR of HLA-G is associated with AR polymorphism and 14pb**Ins/Del* should be related to the difference in the expression of HLA-G, which would explain the association with the disease.

Keywords: Rheumatoid arthritis. *HLA-G*. Polymorphism. 3'UTR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Articulações que podem ser acometidas pela artrite reumatoide.....15
- Figura 2: O MHC humano. A localização do MHC no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes dentro das classes II, III, I.....19
- Figura 3 - Estrutura do gene HLA-G e expressão do antígeno leucocitário humano composto por 8 éxons e 7 íntrons e 3'UTR. Os seis mRNAs estão apresentados, assim como a identificação dos éxons presentes e a localização de códons de parada (stop códon). Apresenta sete isoformas proteicas geradas por processamento alternativo, sendo quatro aderidas à membrana e três solúveis.....20
- Figura 4: Sítios de variações da 3'UTR do HLA-G.....22
- Figura 5 – Mapa de Santa Catarina com a definição das mesorregiões.....28
- Figura 6: Gel de agarose a 3% após corrida eletroforética de 01h e 30 min a 80v., onde observa-se fragmentos de DNA de diferentes tamanhos: 452pb GALC (controle interno), 359pb *Ins e 345pb *Del. a presença de banda na raia anotada como +3142C ou +3142G, indica a amplificação para a reação Primer específica e, portanto, a presença do respectivo alelo. Assim, a leitura do gel digitalizado é: indivíduo 1, na raia 1 e 2, presença dos haplótipos Del/G e Ins/G; indivíduo 2, raias 3 e 4, os haplótipos Ins/C, Ins/C e indivíduo 3, raias 5 e 6, os haplótipos Ins/C e Ins/G.....32

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1- Classificação das doenças autoimunes de acordo com a sua natureza “órgão específica” ou “sistêmica”..... | 17 |
| Tabela 2 - Quantificação e distribuição por gênero e faixa etária em pacientes com artrite reumatoide (AR)..... | 35 |
| Tabela 3 – Quantificação e distribuição por mesorregião, procedência e naturalidade em pacientes com artrite reumatoide (AR)..... | 35 |
| Tabela 4 – Quantificação e distribuição por cor/etnia segundo IBGE em pacientes com artrite reumatoide (AR)..... | 36 |
| Tabela 5: Frequências alélicas para casos e controles, cálculos de associação (<i>OR</i>) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento de Artrite Reumatoide, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e <i>p</i> | 37 |
| Tabela 6: Haplótipos considerando os polimorfismos <i>14pb Ins/Del e +3142C/G</i> da 3'UTR do <i>HLA-G</i> , para as populações de casos e controles, cálculos de associação (<i>OR</i>) entre os haplótipos e o desenvolvimento de Artrite Reumatoide, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e <i>p</i> | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AR | Artrite Reumatoide |
| DEL | Deleção |
| GALC | Gene <i>GALC</i> (Galactosylceramidase) |
| HLA | Antígeno Leucocitário humano, do inglês <i>Human Leukocyte Antigens</i> |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IC | Intervalo de confiança |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleucina |
| IN | Inserção |
| KIR | Receptor de células <i>killer</i> semelhante à imunoglobulina, do inglês <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor</i> |
| LAPOGE | Laboratório de Polimorfismos Genéticos |
| MHC | Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| mRNA | RNA mensageiro |
| miRNA | Micro RNA |
| NK | Células <i>natural killer</i> |
| OR | <i>Odds Ratio</i> , Razão de Chances |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PCR-SSP | Reação em cadeia da polimerase com <i>primers</i> de sequências específicas |
| SC | Santa Catarina |
| SNP | Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| Th | Célula T <i>helper</i> |
| UTR | Região não traduzida |
| UFSC | Universidade Federal de Santa Catarina |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 | A ARTRITE REUMATOIDE | 15 |
| 1.2 | A IMUNIDADE DA ARTRITE REUMATOIDE..... | 16 |
| 1.3 | COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE | 17 |
| 1.4 | GENE <i>HLA-G</i> | 19 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 23 |
| 4 | OBJETIVOS | 25 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 25 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 5.1 | ASPECTOS ÉTICOS | 27 |
| 5.2 | CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA..... | 27 |
| 5.3 | PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS | 28 |
| 5.3.1 | Extração do DNA genômico | 28 |
| 5.3.1.1 | Reagentes e Soluções | 29 |
| 5.3.2 | Genotipagem dos polimorfismos e análise dos produtos 3'UTR: <i>14pb*Ins/Del</i> e <i>+3142*C/G</i> | 30 |
| 5.3.3 | Reação em Cadeia da Polimerase..... | 30 |
| 5.3.3.1 | Reagentes e Soluções | 30 |
| 5.3.3.2 | Procedimento..... | 31 |
| 5.3.4 | Análise do produto amplificado | 31 |
| 5.3.4.1 | Reagentes e Soluções | 31 |
| 5.3.4.2 | Procedimento..... | 31 |
| 5.3.5 | Leitura dos resultados no gel..... | 32 |
| 5.4 | TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | |
| 5.5 | PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS | 33 |
| 5.5.1 | Aderência ao Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> | 33 |
| 5.5.2 | Estimativas das Frequências Alélicas, Genotípicas e Haplotípicas..... | 33 |
| 5.5.3 | Análises de Associação | 34 |
| 6 | RESULTADOS..... | 35 |
| 6.1 | CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES ... | 35 |
| 6.2 | EQUILÍBRIO DE <i>HARDY-WEINBERG</i> | 36 |
| 6.3 | FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS, HAPLOTÍPICAS, E ASSOCIAÇÃO ENTRE CASOS E CONTROLES | 36 |
| 6.4 | ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO HAPLÓTIPOS | 38 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------|-----------|
| 7 | DISCUSSÃO..... | 41 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |
| | ANEXOS..... | 49 |
| | ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO GRUPO CONTROLE..... | 49 |
| | ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO GRUPO CASO | 57 |
| | ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E | |
| | ESCLARECIDO | 61 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica e de etiologia multifatorial desconhecida, acomete principalmente as articulações, embora a inflamação apresente caráter sistêmico, causando morbidade e elevada mortalidade (MOTA *et al.*, 2012; KLARESKOG, CATRINA, PAGET, 2009; FIRESTEIN, 2003). (FIGURA 1). É caracterizada pelo acometimento das pequenas e grandes articulações bilateralmente, com maior frequência de envolvimento das mãos e pés. Além da destruição articular, o quadro inflamatório extra-articular pode levar a manifestações em outras regiões do organismo como o desenvolvimento de nódulos reumatóides, síndrome de *Sjögren*, envolvimento pulmonar e cardíaco, sendo essa comorbidade responsável pela elevada mortalidade dos pacientes com AR (MOTA *et al.*, 2012; GABRIEL E CROWSON, 2012; LOUZADA-JÚNIOR *et al.*, 2007).

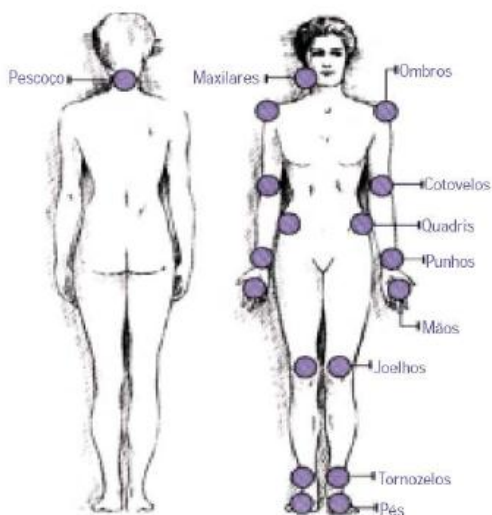


FIGURA 1 - Articulações que podem ser acometidas pela artrite reumatoide.
 FONTE: Adaptado de RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000.

A idade média dos pacientes acometidos por AR está entre 30-50 anos de idade, sendo mais frequente em mulheres, na proporção de 2 a 3 mulheres para cada homem acometido pela doença. No Brasil, estudo multicêntrico verificou prevalência de AR do adulto variando de 0,2% a

1% (MARQUES NETO JF, GONÇALVES ET, BARROS EFO, *et al.*, 1993). A prevalência do gênero feminino e o fato de mulheres apresentarem piores prognósticos de AR podem indicar que o fator hormonal seja importante no desenvolvimento da patogênese da doença (TOBÓN, YOUINOU, SARAUX, 2010; CARMONA *et al.*, 2010; ALAMANOS, VOULGARI, DROSOS, 2006; ALAMANOS E DROSOS, 2005; SYMMONS, 2002).

Os acometimentos das articulações ocorrem inicialmente nos primeiros dois anos da doença, elevando os riscos da limitação de movimentos e podendo levar à morte do paciente (ARTHRITIS FOUNDATION, 2008). A mortalidade está relacionada com a gravidade da AR que reduz a qualidade de vida, aumenta o risco de infecções, de dano radiológico e de manifestações extra articulares (SILVA *et al.*, 2003).

O tratamento da artrite reumatoide deve ser iniciado o mais rapidamente possível e difere de pessoa para pessoa, consoante a idade e a gravidade das perturbações. Embora não exista uma cura definitiva, há muitas substâncias que podem mantê-la sob controle, abrandando o processo inflamatório. Assim, as condições clínicas individuais são heterogêneas, bem como o quadro clínico inicial, a progressão e severidade da patologia e, também, a variação de respostas às terapias medicamentosas. Todas essas particularidades acredita-se estarem associadas às variações genéticas (OLIVER *et al.*, 2006).

1.2 A IMUNIDADE DA ARTRITE REUMATOIDE

O sistema imune protege os organismos de agentes externos, como microrganismos e parasitas, células cancerosas, órgãos e tecidos transplantados. Estes agentes possuem substâncias que estimulam o sistema imune, conhecidas como antígenos, moléculas localizadas no interior ou na superfície celular de bactérias, vírus ou células cancerosas (ABBAS *et al.*, 2008).

O sistema imune está constantemente exposto a antígenos do próprio organismo sem, no entanto, estimular os linfócitos, evento esse que é conhecido como “tolerância ao próprio”. Porém, em casos patológicos, os linfócitos podem reconhecer os auto-antígenos como se fossem agentes estranhos ao organismo, ocasionando doenças conhecidas como autoimunes (JANEWAY *et al.*, 2002).

Uma resposta autoimune está relacionada com o sistema imune e seus mediadores. A partir disto, observa-se que os fatores que contribuem para o desenvolvimento da autoimunidade são anomalias

nas células apresentadoras de antígenos (APCs), nos linfócitos, ou em fatores do próprio tecido-alvo (auto-antígenos), no qual há uma permanente resposta imune, podendo levar à lesão tecidual e, por fim, desenvolvendo o quadro da doença (JANEWAY *et al.*, 2002). Aproximadamente 3% da população mundial é afetada por alguma desordem autoimune conhecida (GERGERSEN & BEHRENS, 2006).

Entre as doenças autoimunes é possível distinguir dois padrões: doenças autoimunes “órgão-específicas”, nas quais a autoimunidade é restrita a órgãos específicos, e as doenças autoimunes “sistêmicas”, em que diversos tecidos do corpo são afetados pela resposta autoimune (TABELA 1).

TABELA 1: Classificação das doenças autoimunes de acordo com a sua natureza “órgão específica” ou “sistêmica”.

| Doenças autoimunes órgão-específicas | Doenças autoimunes sistêmicas |
|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| Diabete melito tipo I | Artrite reumatoide |
| Esclerose múltipla | Escleroderma |
| Anemia autoimune de <i>Addison</i> | Lúpus eritematoso sistêmico |
| Vitiligo | Síndrome de <i>Sjogrem</i> primária |
| Doença de Graves | Poliomiosite |
| Tireoidite de Hashimoto | ----- |
| Síndrome de Goodpasture | ----- |

FONTE: Adaptada de JANEWAY *et al.*, 2002.

A diversidade imune é decorrente da combinação de genes altamente polimórficos que codificam moléculas receptoras das células do sistema imune e, além disso, permitindo que o linfócito reconheça uma ampla variedade de antígenos estranhos (PARSLOW *et al.*, 2004).

1.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O primeiro sistema gênico caracterizado como Complexo Principal de Histocompatibilidade (*MHC* do inglês *Major Histocompatibility Complex*) foi descrito por George Snell em 1936, a partir de estudos em camundongos. Essa denominação foi dada em virtude da sua constatada influência no sucesso, ou não, de transplantes de tecidos nesses animais. Posteriormente complexos gênicos homólogos foram descritos em outras espécies de mamíferos, atuando de forma similar e codificando produtos moleculares envolvidos na resposta imune (CROUA-ROY *et al.*, 1994).

O Complexo de Histocompatibilidade Humano (*HLA*, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) foi descoberto na década de 1950 em pacientes politransfundidos através da detecção de anticorpos leucoaglutinantes. Assim, o *MHC* humano recebeu a denominação *HLA* e refere-se ao conjunto gênico mapeado no cromossomo 6 (6p21.3) (FIGURA 2), em uma região de 4 megabases de DNA (HVIID, 2006a). Essa porção do genoma foi subdividida em regiões I, II e III, levando em consideração a estrutura e função dos produtos moleculares produzidos (HORTON *et al.*, 2004).

Seis *loci* gênicos foram descritos na região de classe I. Os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (clássicos ou de classe Ia) com expressão constitutiva na membrana celular de quase todas as células nucleadas. Existem ainda os *loci HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (não clássicos ou de classe Ib) que são menos polimórficos que os da classe Ia e apresentam expressão celular restrita. Além destes, os *loci HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*, que são pseudogenes, isto é, sem produto proteico associado (FAINARDI *et al.*, 2003; FISCHER & MAYR, 2001).

A região de classe II está arranjada em quatro subregiões, DR, DQ, DZ/DO e DP. Nessa região também estão localizados os genes (*TAP1*, *TAP2* e *LMP2*, entre outros) que codificam produtos moleculares que não fazem parte do grupo de antígenos de histocompatibilidade (LEWIN, 2009).

A região de Classe III abriga genes atuantes no processo de ativação do sistema complemento (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*) e genes da 21-hidroxilase, da hemocromatose, *TNF* e *LTA*, que codificam as citocinas TNF- α e LT- β (antigo *TNF- β*) respectivamente, entre outros (LEWIN, 2009).

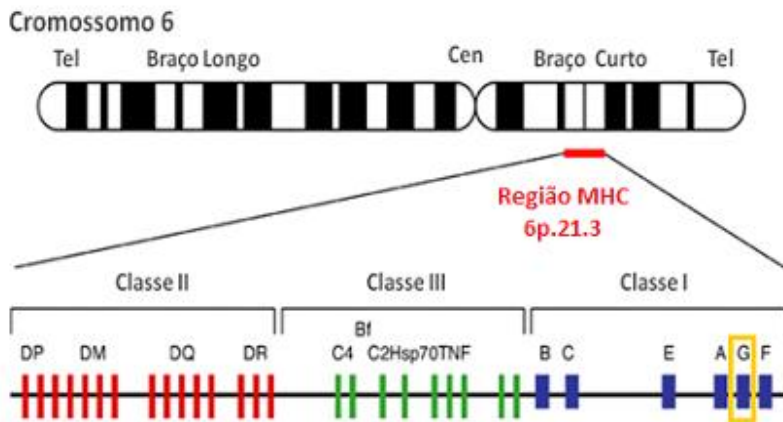


FIGURA 2: A localização do *MHC* no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes dentro das classes II, III, I. Em amarelo está destacado o locus *HLA-G*.

FONTE: Adaptado de Cambridge Journals, 2012.

1.4 GENE *HLA-G*

A molécula *HLA-G* é expressa na interface materno-fetal, na superfície de células do trofoblasto (CAROSELLA *et al.*, 2008), nas células fetais endoteliais (BLASCHITZ *et al.*, 1997) e no fluido amniótico (HAMMER *et al.*, 1997), conferindo uma proteção imunológica (LE BOUTELLIER & BLASCHITZ, 1999). Foi descrita primeiramente como ligante para receptor inibitório de células *natural killer* (NK) em células uterinas, contribuindo para tolerância materno-fetal (ROUAS-FREISS *et al.*, 1997). O gene *HLA-G*, pertencente à classe Ib, difere dos genes de classe Ia por ser pouco polimórfico, possuir distribuição limitada a certos tecidos e ser transcrito de forma alternativa, apresentando propriedades biológicas de imuno tolerância (CAROSELLA *et al.*, 2008).

Apresenta propriedades imunossupressoras com função de lise celular em células NK e T através do receptor KIR2DL4 (MENIER *et al.*, 2002), sendo que seu nível de expressão está associado a diversas condições clínicas. Em indivíduos saudáveis, um nível basal da transcrição do gene *HLA-G* é observado na maioria das células e tecidos. No entanto, a tradução em proteínas está restrita ao trofoblasto, timo, córnea, unha, pâncreas e os precursores eritroides e endoteliais.

Nos tecidos patológicos, o *HLA-G* pode ser expresso pelo tumor, pelas células enxertadas ou infectadas por vírus, sugerindo que fatores microambientais controlem a expressão de *HLA-G* nas células e tecidos lesados (CAROSELLA *et al.*, 2008). Também, a proteína HLA-G pode ser encontrada após o transplante de órgãos, transformações malignas, infecções virais, doenças inflamatórias e autoimunes.

O gene *HLA-G* (FIGURA 3) é composto por oito *éxons* e sete *íntrons*, sendo que o *éxon* sete é sempre ausente no RNA maduro e devido à presença do códon de parada (*stop* códon) no *éxon* seis, o *éxon* oito não é traduzido. Esse segmento gênico tem sido considerado a região 3' não traduzida (3'UTR) do RNA maduro (DONADI *et al.*, 2011). Os transcritos primários do gene *HLA-G* sofrem processamento alternativo, responsável pela produção de sete isoformas de proteínas distintas. Quatro destas são ligadas à membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e outras três isoformas são proteínas solúveis (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7). (CAROSELLA *et al.*, 2003). A parte externa da molécula HLA-G é composta por três domínios: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ (*éxons* 2 - 4), sendo que $\alpha 1$ e $\alpha 2$ contribuem para a fenda de ligação peptídica. O *éxon* 1 codifica o peptídeo sinal e os *éxons* 5 e 6 codificam o domínio transmembrânico e citoplasmático da cadeia pesada, respectivamente (CAROSELLA *et al.*, 2008).

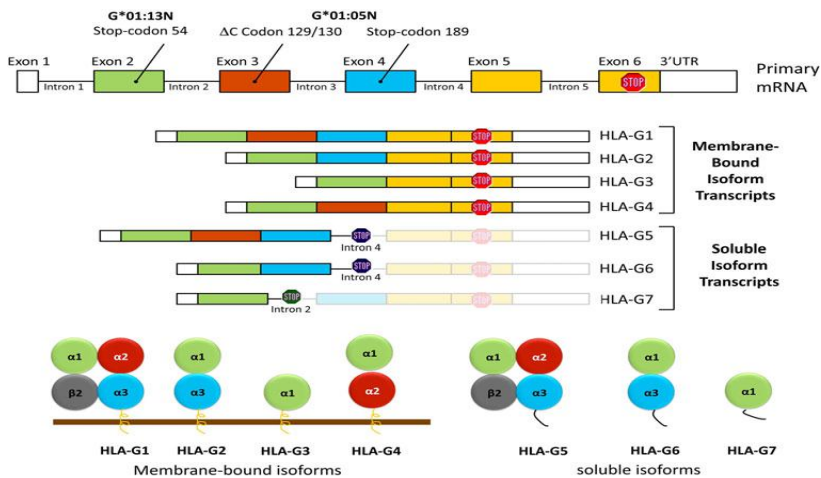


FIGURA 3 – O gene HLA-G é formado por 8 *éxons* e 7 *íntrons* e a 3'UTR, apresentando sete isoformas proteicas geradas por processamento alternativo, sendo quatro aderidas à membrana e três solúveis.

FONTE: Donadi *et al.*, 2011.

O gene *HLA-G* apresenta quarenta e quatro alelos de região codificadora, agrupados em quatorze variantes proteicas em todas as isoformas. Há ainda, polimorfismos em regiões não codificadoras com significado funcional, pois afetam a expressão gênica (ROBINSON *et al.*, 2006).

A 3'UTR do *HLA-G* contém vários elementos regulatórios, incluindo sinais de poliadenilação (KUERSTEN & GOODWIN, 2003), regiões ricas de elementos AU (ALVAREZ *et al.*, 2009) e vários sítios polimórficos que podem potencialmente influenciar a transcrição e a tradução (KUERSTEN & GOODWIN, 2003). Os polimorfismos da 3'UTR alteram a estabilidade do mRNA, bem como a expressão do *HLA-G* (HVIID *et al.*, 2006b).

Entre os elementos reguladores se destacam: (1) a inserção ou a deleção de um fragmento de 14pb (*Ins/Del*), que tem sido associado com a estabilidade de mRNA, (2) o polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP*) na posição +3142 que pode ser um alvo para determinados microRNAs (miRNAs), degradando o mRNA do *HLA-G* e (3) o *SNP* na posição +3187 que está relacionado com a estabilidade do mRNA e sua degradação (DONADI *et al.*, 2011).

A presença da sequência de 14pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') (HARRISON *et al.*, 1993) tem sido associados em amostras de trofoblasto à menor produção de mRNA, tanto para as isoformas ligadas à membrana, quanto para as solúveis (HVIID, 2006a). Os mRNA do *HLA-G* que apresentam a inserção 14pb são associados à produção de transcritos alternativos com deleções de 92pb (HVIID *et al.*, 2003), sendo mais estáveis do que a forma com a deleção 14pb (ROUSSEAU *et al.*, 2003; DONADI *et al.*, 2011).

A variação de nucleotídeos na posição +3142 influencia a expressão do *HLA-G* e foi relacionada à susceptibilidade à asma (TAN *et al.*, 2007). A presença de uma guanina na posição +3142 aumenta a afinidade dessa região com os miRNAs (miR-148a, miR-148b e miR-152), diminuindo a disponibilidade de mRNA.

A presença de uma adenina na posição +3187 está associada com pré-eclâmpsia na população canadense e esse polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP*) está associado com a diminuição da estabilidade do RNA *in vitro*, bem como, a presença do alelo +3187*A pode levar a uma expressão diminuída de *HLA-G* (YIE *et al.*, 2008).

Esses sítios polimórficos associados à produção de *HLA-G* também podem ser associados entre si. Ressalta-se que a inserção de 14pb é acompanhada pelos alelos +3142*G e +3187*A, ambos anteriormente associados com a baixa disponibilidade de mRNA

2 JUSTIFICATIVA

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica sistêmica e autoimune. O seu desenvolvimento está relacionado a deformidades e incapacitação, gerando diminuição da qualidade de vida e morte prematura.

Diversos aspectos relacionados a AR e ao polimorfismo da 3'UTR do gene *HLA-G* permanecem desconhecidos, fazendo-se necessária a complementação de estudos que auxiliem na elucidação dos mecanismos de regulação da expressão desse gene. Por isso os polimorfismos inserção/deleção de 14bp e +3142C/G, cuja relação com o padrão de expressão do gene tem sido descrita, foram escolhidos. Sabe-se que a presença da inserção parece induzir a uma deleção de 92pb do mRNA maduro, tornando-o mais estável e que o alelo +3142*G pode ligar-se com maior afinidade a miRNAs e, desta forma diminuir a capacidade de tradução deste mRNA. (TAN *et al.*, 2007; HVIID *et al.*, 2003).

A atuação imunomoduladora da molécula *HLA-G* na resposta imune, no sentido de induzir tolerância, justifica este estudo, cujos resultados poderão contribuir no prognóstico de doentes com artrite reumatoide e na predisposição genética em familiares. Além disso, poderão auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar polimorfismos da 3' UTR do gene *HLA-G* (14pb* *Ins/Del* e +3142*C/G) no grupo de pacientes com artrite reumatoide e no grupo controle, no estado de Santa Catarina, contribuindo para o entendimento da ação desse gene no desenvolvimento da doença.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as amostras de pacientes para gênero, procedência (considerando as mesorregiões do estado de Santa Catarina), cor e etnia.
- Calcular as frequências gênicas, genótípicas e haplotípicas de dois *loci* da 3'UTR do gene *HLA-G* (14pb* *Ins/Del* e +3142*C/G), tanto nas amostras de caso (pacientes com artrite reumatoide) quanto nas de controle (indivíduos sem essa patologia).
- Correlacionar os diferentes genótipos e haplótipos em pacientes e controles.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo fez parte do projeto intitulado “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), nº 172/06, de 26/06/2006 renovado até março de 2013 e cujo pedido de renovação está sendo avaliado pelo Comitê de Ética.

Os dados epidemiológicos e familiares dos pacientes e dos indivíduos controles foram obtidos através de entrevistas realizadas com questionários estruturados (Anexo 1), após a assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 2) pelos voluntários.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 181 questionários de indivíduos com artrite reumatoide (grupo caso) que pertencem ao banco de dados do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) coordenado pela Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza e 48 questionários de indivíduos sem diagnóstico de AR (grupo controle). Os indivíduos do grupo caso foram agrupados utilizando as características epidemiológicas de gênero, gênero e faixa etária (TABELA 2), procedência e naturalidade, divididos por mesorregião do estado de Santa Catarina (TABELA 3) (FIGURA 5), cor e etnia identificados pelos pesquisadores na hora da entrevista, sendo as classes consideradas as mesmas definidas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (TABELA 4).

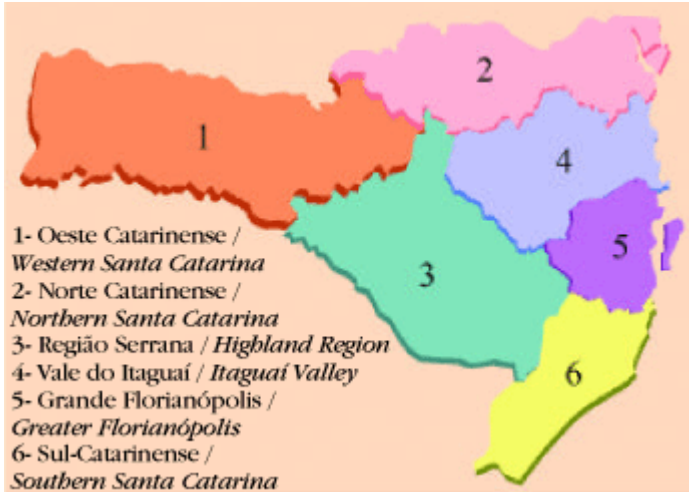


FIGURA 5 – Mapa de Santa Catarina com a definição das mesorregiões.
FONTE: Site do IBGE

Dos 181 indivíduos amostrados para dados epidemiológicos, foram selecionados 31 pacientes com AR. O grupo caso e o grupo controle foram genotipados para dois *loci* da 3^ªUTR do gene *HLA-G* (*14pb* Ins/Del* e *+3142C/G*).

As amostras de sangue periférico (cerca de 08 ml) foram coletadas através de punção venosa, armazenadas e transportadas a 4°C para posterior extração de DNA genômico e obtenção dos dados genéticos no LAPOGE. As amostras biológicas e os questionários obtidos nessa pesquisa foram catalogados e constituem um banco de dados e amostras biológicas, de pacientes com artrite reumatoide e de indivíduos-controle, armazenado no LAPOGE.

5.3 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

5.3.1 Extração do DNA genômico

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas (Centrifuge 206 BL Excelsa II®) a 3000G (1835rpm) durante 15 min a temperatura ambiente (TA), para a separação dos componentes sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos (*buffy coat*). Esses componentes sanguíneos foram aliquotados, identificados e estocados a -20°C. Os leucócitos foram utilizados para a extração do DNA

genômico. O plasma e o concentrado de hemácias não foram utilizados nesse estudo.

5.3.1.1 Reagentes e Soluções

- Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; Sacarose 0,32M, Merck®; MgCl₂ 0,0025M; Triton X 100 – 1%, Nuclear®);
- Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; KCl 0,05M, Vetec®); MgCl₂ 0,0025M, Nuclear®); Nonidet – 1%, Amresco®; TWEEN 20 – 1%, Amresco®);
- SDS 10% (Amresco®);
- Solução de Perclorato de Sódio 5,0M (Vetec®);
- Solução Saturada de NaCl 6,0M (Nuclear®);
- TE (Tris-HCl 1M, Amresco®; EDTA 0,5M, Vetec®);
- Álcool Isopropílico Absoluto, TA- Temperatura Ambiente (Merck®);
- Etanol 70%, TA (Merck®).

A extração de DNA foi realizada através do método de *Salting Out* modificado, baseado em Miller *et al.* (1988). Para cada amostra, foram colocados 100µL do concentrado de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5mL (tipo *Eppendorf*), utilizando-se uma micropipeta e ponteiros estéreis. Em seguida, adicionou-se 1,0mL de Solução de Lise I em cada um desses microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (*Centrifugue 5415D*, *Eppendorf*®) a 13400G (12000 rpm) durante 4 min à TA. O sobrenadante foi descartado e, este procedimento foi repetido (3 a 4 vezes) até que o precipitado apresentasse cor branca, indicando a ausência de glóbulos vermelhos. Posteriormente, foi acrescentado ao precipitado de leucócitos 300µL de Solução de Lise II, 10µL de SDS 10% e 75µL de Perclorato de Sódio 5M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos, do tipo *vórtex*, e a cada tubo foi acrescentado 130µL de NaCl 6M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400G por 5 min a TA. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para estes, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300µL de Álcool Isopropílico Absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 13400G por 15 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300µL de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400G por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o

precipitado foi seco, à TA, por 12 h ou *overnight*. Após a secagem dos precipitados, foi adicionado a cada tubo 100 µL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 min, homogeneizadas e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

5.3.2 Genotipagem dos polimorfismos e análise dos produtos 3'UTR: *14pb*Ins/Del* e *+3142*C/G*

A genotipagem dos polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* (ID:3135), *14pb*Ins/Del* (rs1704) e *+3142*C/G* (rs1063320), foi realizada através da amplificação desta região pela Reação em Cadeia da Polimerase com iniciador de sequência específica (PCR-SSP, do inglês *Specific Sequence Primer - Polymerase Chain Reaction*). Para tanto, foi usado um iniciador genérico que se liga imediatamente antes do polimorfismo de 14pb e dois iniciadores específicos para verificar cada um dos alelos, *+3142*C* e *+3142*G*. A reação conta ainda com um controle interno de amplificação do gene *GALC* (ID:2581), identificando assim a presença de falsos negativos.

5.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase

5.3.3.1 Reagentes e Soluções

- Água Ultrapura;
- dNTPs 0,2mM de cada (100mM, Invitrogen®);
- MgCl₂ 1,5mM (50mM, invitrogen®);
- Tampão de PCR 10X (0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; invitrogen®);
- *Primer* Forward 5pmol
(10pmol; HLAG-F;
5'TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT3'; IDT®);
- *Primer* Reverse A 5pmol
(10pmol; HLA-G+3142*G,
5'AGAAGTAAGTTATAGCTCAGT GC3'; IDT®);
- *Primer* Reverse B 5pmol
(10pmol; HLA-G+3142*C,
5'AGAAGTAAGTTATAGCTCAGTGG3'; IDT®);
- *Primer* Forward Controle 3pmol
(10pmol; GALC-Cont1-F,
5'GGCTGCACCTGAGGCTAA3'; IDT®);

- *Primer Reverse Controle* 3pmol (10pmol; *GALC-Cont1-R*, 5'GCCCAAAGAAGAACTAGTATTC3'; IDT®);
- Taq DNA Polymerase Platinum (0,5U/μL; invitrogen®).

5.3.3.2 Procedimento

Para a reação de amplificação foram feitas duas soluções de mistura (MIX) que diferem entre si pela presença do *primer reverse* A (+3142*C) ou B (+3142*G). E cada amostra foi amplificada separadamente para cada um dos MIX. Para isso foram adicionados, em tubos de 0,6μl (tipo *Eppendorf*®): 16,05μl de água; 1,00μl de dNTPs; 0,75μl de MgCl₂; 2,5μl de Tampão de PCR; 0,5μl de *Primer Forward*; 0,5μl de *Primer Reverse A* ou 0,5μl de *Primer Reverse B*; 0,3μl de *Primer Forward Controle*; 0,3μl de *Primer Reverse Controle*; 0,10μl de Taq Platinum® e 2μl de DNA (em torno de 200ng). Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min e, em seguida, a 32 ciclos de: 94°C por 45s, 58°C por 45s e 72°C por 60s; e um passo de extensão final a 72°C por 7 min.

5.3.4 Análise do produto amplificado

5.3.4.1 Reagentes e Soluções

- Água Ultrapura;
- Agarose
- Tampão TBE 10X (Tris base 0,89M, Amresco®; Ácido Bórico 0,89M, Vetec®; EDTA 0,2M, Vetec®);
- Tampão TBE 1X (100mL do Tampão TBE 10X; 900mL H₂O);

5.3.4.2 Procedimento

Os produtos amplificados (nos tamanhos de 345pb para ausência do 14pb e de 359pb para presença de 14pb) foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 3%. Estes géis foram feitos adicionando em um frasco *Erlenmeyer*: 80 ml de TBE 10% a 2,4 gramas de agarose. A solução foi aquecida no forno micro-ondas até homogeneizar, dissolvendo o soluto, evitando a fervura. Em seguida, após breve resfriamento, foi despejada no suporte de gel sem fazer bolhas, colocado o pente (peça utilizada para criar os poços de aplicação da amostra no gel) e aguardado a solidificação do gel.

As amostras para aplicação no gel foram preparadas da seguinte forma: 4,0µl de produto de PCR; 0,4µl de água ultrapura; 0,3 µl de solução carreadora e 0,3 µl de *gel red*. A corrida eletroforética foi realizada, durante 1h e 30min, e a fonte foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 80 V, Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres.

5.3.5 Leitura dos resultados no gel

O modo de visualização dos fragmentos de DNA, para a detecção e anotação do polimorfismo de *14pb*Ins/Del* e *+3142*C/G* do gene *HLA-G*, está representado na figura 5.

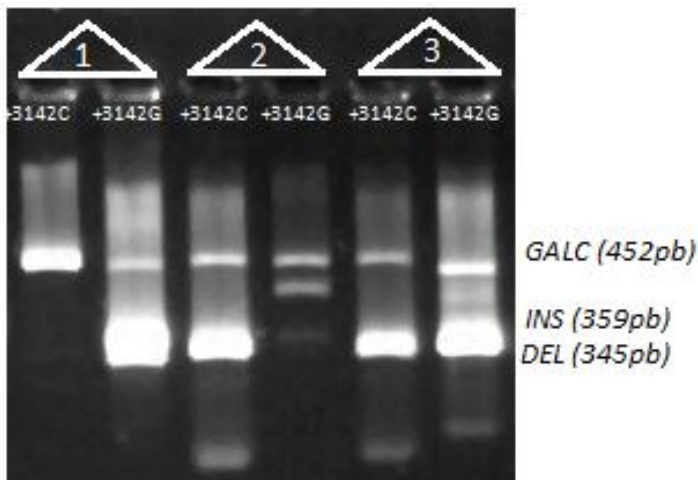


FIGURA 6: Gel de agarose a 3% após corrida eletroforética de 01h e 30 min a 80v. Observa-se fragmentos de DNA de diferentes tamanhos: 452pb *GALC* (controle interno), 359pb **INS* e 345pb **DEL*. A presença de banda na raia anotada como *+3142*C* ou *+3142*G*, indica a amplificação para a reação primer específica e, portanto, a presença do respectivo alelo. Assim, a leitura do gel digitalizado é: indivíduo 1, na raia 1 e 2, presença dos haplótipos *DEL/G* e *IN/G*; indivíduo 2, raias 3 e 4, os haplótipos *IN/C*, *IN/C* e indivíduo 3, raias 5 e 6, os haplótipos *IN/C* e *IN/G*.

5.4 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com os dados obtidos foram calculadas frequências alélicas, genotípicas e haplótipas dos polimorfismos da 3'UTR. A aderência das

frequências genotípicas observadas às proporções esperadas pelo teorema de *Hardy-Weinberg* foi verificada com o uso do programa GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET, 1995). O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando menor ou igual que 0,05. Adotou-se grau de liberdade (GL) igual a 1.

Para verificar a associação entre as variantes polimórficas e os haplótipos da 3'UTR com artrite reumatoide, foram comparadas as frequências do grupo caso com o controle, através das tabelas de contingência 2x2, pela OR através do *software* EpiMax Table Calculator disponível em <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>.

5.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

5.5.1 Aderência ao Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Segundo o teorema de *Hardy-Weinberg*, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Na qual:

x_i é a frequência esperada dos homozigotos do alelo i ;

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

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

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de *Hardy-Weinberg* foi verificada utilizando o programa GENEPOP®, versão 3.4 (disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

No teste exato de probabilidade, o valor de p corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado.

5.5.2 Estimativas das Frequências Alélicas, Genotípicas e Haplótípicas

As frequências alélicas (x_i) e genotípicas (X_{ii}) de cada *locus*, em casos e controles foram estimadas utilizando-se o programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995) versão 3.4 (disponível

em [http: – wbiomed.curtin.edu.au/genepop](http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop)), de acordo com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad \text{e} \quad X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Nas quais:

x_i é a frequência do alelo “i”;

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

n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente;

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

As frequências haplotípicas foram feitas por contagem direta, pois a técnica empregada permite a identificação da fase, descartando a necessidade de inferência dos haplótipos.

5.5.3 Análises de Associação

A associação dos genótipos e haplótipos com a susceptibilidade à artrite reumatoide foi verificada com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador de *Odds Ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se um intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se $p=0,05$ como o valor limite de significância (WOOLF, 1955). A OR foi calculada por meio da seguinte equação:

$$OR = (ad)/(bc)$$

Na qual:

a é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco e o resultado de interesse;

b é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco, mas não o resultado de interesse;

c é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco, mas apresentam o resultado de interesse;

d é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco nem o resultado de interesse.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES

A quantificação e distribuição por gênero e faixa etária das amostras de pacientes encontram-se na tabela 2. As amostras de pacientes apresentaram prevalência de mulheres, com uma média de idade para mulheres de $56,8 \pm 8,78$ e para homens de $57,5 \pm 9,19$. Dos indivíduos genotipados o grupo de casos apresentou uma média de $56,9 \pm 8,79$ anos e o grupo controle $57,4 \pm 9,62$ anos.

TABELA 2. Quantificação e distribuição por gênero e faixa etária dos pacientes com artrite reumatoide (AR).

| IDADE(ANOS) | TOTAL | FEMININO | MASCULINO |
|--------------------|--------------|-----------------|------------------|
| <30 | 6 | 6 | 0 |
| 31-40 | 19 | 19 | 0 |
| 41-50 | 40 | 37 | 3 |
| 51-60 | 65 | 55 | 10 |
| 61-70 | 35 | 31 | 4 |
| 71-80 | 15 | 12 | 3 |
| 81-90 | 1 | 1 | 0 |
| TOTAL | 181 | 161 | 20 |

A quantificação e distribuição por mesorregião, procedência e naturalidade dos pacientes estão na tabela 3. Há uma maior prevalência de indivíduos da grande Florianópolis, tanto quando se considera procedência, quanto naturalidade.

TABELA 3. Quantificação e distribuição por mesorregião, procedência e naturalidade dos pacientes com artrite reumatoide (AR).

| MESORREGIÃO | PROCEDÊNCIA | NATURALIDADE |
|--------------------------|--------------------|---------------------|
| Oeste (1) | 7 | 6 |
| Norte (2) | 2 | 6 |
| Serrana (3) | 13 | 24 |
| Planalto (4) | 12 | 10 |
| Grande Florianópolis (5) | 124 | 73 |
| Sul (6) | 16 | 23 |
| Fora do Estado | 1 | 31 |
| Não Identificado | 6 | 8 |
| TOTAL | 181 | 181 |

A tabela 4 apresenta a quantificação e distribuição por cor/etnia, 73% dos indivíduos foram classificados como eurodescendentes e os demais como afrodescendentes e ameríndios.

TABELA 4. Quantificação e distribuição por cor/etnia, dos pacientes com artrite reumatoide (AR).

| IBGE | INDIVÍDUOS | PORCENTAGEM |
|---------------|-------------------|--------------------|
| Branco | 132 | 72,93 |
| Preto | 7 | 3,87 |
| Pardo | 26 | 14,36 |
| Amarelo | 0 | 0,00 |
| Indígena | 8 | 4,42 |
| Não informado | 8 | 4,42 |
| TOTAL | 181 | 100 |

6.2 EQUILÍBRIO DE *HARDY-WEINBERG*

As distribuições das frequências alélicas dos dois sítios polimórficos da 3'UTR do gene *HLA-G* (*14pb*Ins/Del* e *+3142*C/G*) em casos e controles estavam de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

6.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS, HAPLOTÍPICAS, E ASSOCIAÇÃO ENTRE CASOS E CONTROLES

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas dos grupos casos e controles, assim como da análise de associação, estão descritos na Tabela 5. Entre os dados analisados, não houve associação significativa do alelo *14pb*Ins/Del* e do polimorfismo *+3142C/G*.

TABELA 5: Frequências alélicas para casos e controles, cálculos de associação (*OR*) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento de artrite reumatoide, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e valor de *p*.

| | Polimorfismo | Casos (n) | Frequências% | Controles (n) | Frequências% | OR | <i>p</i> | IC |
|------------------|----------------------------|-----------|--------------|---------------|--------------|-------|----------|--------------|
| 14pb | <i>Ins</i> | 34 | 54,8 | 41 | 42,7 | 1,629 | 0,184 | 0,815-3,264 |
| | <i>Del</i> | 28 | 45,2 | 55 | 57,3 | 0,614 | 0,184 | 0,306-1,227 |
| | Total de Alelos | 62 | | 96 | | | | |
| | <i>InsIns</i> | 9 | 29,0 | 6 | 12,5 | 2,864 | 0,124 | 0,794-10,611 |
| | <i>InsDel</i> | 16 | 51,6 | 29 | 60,4 | 0,699 | 0,589 | 0,254-1,917 |
| | <i>DelDel</i> | 06 | 19,4 | 13 | 27,1 | 0,646 | 0,606 | 0,187-2,166 |
| | Total de indivíduos | 31 | | 48 | | | | |
| +3142 C/G | <i>C</i> | 27 | 43,6 | 42 | 43,7 | 0,992 | 1,000 | 0,495-1,986 |
| | <i>G</i> | 35 | 56,4 | 54 | 56,3 | 1,008 | 1,000 | 0,504-2,020 |
| | Total de Alelos | 62 | | 96 | | | | |
| | <i>C/C</i> | 4 | 12,9 | 7 | 14,6 | 0,868 | 1,000 | 0,190-3,768 |
| | <i>G/C</i> | 19 | 61,3 | 28 | 58,3 | 1,131 | 0,979 | 0,407-3,154 |
| | <i>G/G</i> | 8 | 25,8 | 13 | 27,1 | 0,538 | 0,324 | 0,178-1,602 |
| | Total de indivíduos | 31 | | 48 | | | | |

6.4 ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO HAPLÓTIPOS

O estudo de associação dos haplótipos e combinações haplotípicas observados nos diferentes grupos, caso e controle, estão descritos na Tabela 6.

A análise de associação foi feita considerando os dois grupos e os haplótipos envolvendo os *loci 14pb Ins/Del* e *+3142C/G* do gene *HLA-G*. Sendo encontrada associação positiva significativa para a presença do haplótipo **Ins/C* (OR 9,894, $p < 0,001$; IC 2,510 - 45,476) e associação negativa significativa para o haplótipo **Del/C* (OR 0,351; $p=0,009$; IC 0,154-0,787).

Considerando as combinações haplotípicas foi encontrada associação positiva significativa com o genótipo homozigoto *Ins/C – Ins/C* (OR 17,716; $p=0,035$; IC 1,121-10237,681).

TABELA 6: Haplótipos considerando os polimorfismos *14PB INS/DEL E +3142C/G* da 3'UTR do *HLA-G*, para as populações de casos e controles, cálculos de associação (OR) entre os haplótipos e o desenvolvimento de artrite reumatoide, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

| Amostra | Haplótipo UTR | Casos (n) | Controles (n) | OR | <i>p</i> | IC | Genótipo haplotípico UTR | Casos (n) | Controles (n) | OR | <i>p</i> | IC |
|-------------------|---------------|-----------|---------------|-------|----------|----------------------|--------------------------|-----------|---------------|--------|-----------|-----------------|
| Casos x Controles | <i>Ins/C</i> | 15 | 3 | 9,894 | *<0,001 | 2,510-45,476 | <i>Ins/G – Ins/G</i> | 1 | 4 | 0,367 | 0,662 | 0,015-3,798 |
| | <i>Del/G</i> | 16 | 16 | 1,739 | 0,233 | 0,742-4,080 | <i>Del/G – Del/G</i> | 2 | 1 | 3,241 | 0,697 | 0,215-93,751 |
| | <i>Del/C</i> | 12 | 39 | 0,351 | *0,009 | 0,154-0,787 | <i>Del/C – Del/C</i> | 0 | 7 | 0,088 | 0,099 | 0,000-1,295 |
| | <i>Ins/G</i> | 19 | 38 | 0,674 | 0,331 | 0,324-1,399 | <i>Ins/G – Del/G</i> | 5 | 8 | 2,115 | 0,366 | 0,742-4,080 |
| | | | | | | | <i>Ins/G – Del/C</i> | 8 | 20 | 1,322 | 0,740 | 0,463-3,710 |
| | | | | | | | <i>Del/G – Del/C</i> | 4 | 5 | 1,274 | 1,000 | 0,257-6,159 |
| | | | | | | | <i>Ins/C – Ins/C</i> | 4 | 0 | 17,716 | *0,035 | 1,121-10237,681 |
| | | | | | | | <i>Ins/C – Ins/G</i> | 4 | 2 | 3,407 | 0,320 | 0,487-29,057 |
| | | | | | | | <i>Ins/C – Del/C</i> | 0 | 0 | 1,540 | 1,000 | 0,001-1616,917 |
| | | | | | | <i>Ins/C – Del/G</i> | 3 | 1 | 5,036 | 0,329 | 0,430,213 | |
| Total | | 62 | 96 | | | | | 31 | 48 | | | |

7 DISCUSSÃO

Dentre as amostras analisadas verificou-se prevalência do gênero feminino (TABELA 2), semelhante a outros estudos com a AR que corroboraram que esta doença acomete mais mulheres que homens (TOBÓN, YOUINOU, SARAUX, 2010; MOTA *et al.*, 2010; LOUZADA-JÚNIOR *et al.*, 2007; ALAMANOS e DROSOS, 2005). O motivo da prevalência de mulheres na AR ainda é incerto, embora acredita-se que o fator hormonal teria uma importante influência no desenvolvimento da patogênese.

Neste estudo houve a predominância de pacientes euro-descendentes (72,93%). É importante ressaltar que a amostra deste estudo é proveniente do Estado de Santa Catarina o qual possui um histórico de migração prevalente de euro-descendente que se diferencia de várias regiões do País (PENA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2010; SALZANO e FREIRE-MAIA, 1970).

A classificação étnica das amostras é importante, pois se acredita que alguns grupos étnicos tenham maior risco de desenvolver a AR que outros, justamente pela interação genética e ambiental que cada população está suscetível. A análise entre populações com *background* genético semelhante permite que fatores ambientais (ou estilo de vida) possam ser investigados como fatores não genéticos, os quais podem influenciar na patogênese de uma doença complexa como a AR (TOBÓN, YOUINOU, SARAUX, 2010; ALAMANOS E DROSOS, 2005).

HLA-G possui crescente importância nas doenças autoimunes e respostas inflamatórias onde sua presença está associada com estado de tolerância, contribuindo dessa forma para diminuir a antigenicidade e a resposta imunoproliferativa contra componentes próprios, fato comumente observado nessas patologias (WIENDL *et al.*, 2005; DIEPSTRA *et al.*, 2008).

Uma das regiões que tem demonstrado ter um papel importante na regulação da expressão do *HLA-G* é a 3'UTR. O polimorfismo de *14pb*Ins/Del*, analisado no presente estudo, parece ter um papel importante no *splicing* alternativo e, consequentemente alteração na estabilidade do mRNA (VEIT; CHIES, 2009). Os transcritos com a presença desses 14pb apresentam uma estabilidade maior do mRNA devido à formação de um sítio de *splicing* alternativo e assim, removendo 92pb da molécula final, quando comparados aos transcritos com ausência dos mesmos 14pb (ROUSSEAU *et al.*, 2003). Soma-se ao fato, a possibilidade de uma relação com microRNA e o polimorfismo

da 3'UTR, o +3142*C/G, também alvo deste estudo, que encontra-se a uma distância menor que 200pb do local 14pb*Ins/Del, sendo que a presença do alelo +3142*C eleva a expressão do gene *HLA-G*, pois diferentemente do alelo +3142*G, não é sítio de ligação para miRNAs (TAN *et al.*, 2007; VEIT; CHIES, 2009).

Somente quando os polimorfismos foram considerados em haplótipo houve associação significativa, sendo que uma associação positiva foi encontrada para o haplótipos *Ins/C (OR 9,894, $p < 0,001$; IC 2,510 - 45,476) e para a combinação haplotípica *Ins/C – Ins/C* (OR 17,716; $p=0,035$; IC 1,121-10237,681). E associação negativa para o haplótipo *Del/C (OR 0,351; $p=0,009$; IC 0,154-0,787). Desta forma, podemos perceber que o polimorfismo +3142C/G não interfere nesta associação, visto que, tanto na associação positiva, quanto na negativa, apresenta o mesmo alelo +3142*C. Sendo assim, é o polimorfismo *Ins ligado ao C que se associa positivamente com a doença, e este polimorfismo parece estar relacionado com uma alta expressão de *HLA-G*, como descrito anteriormente e, o polimorfismo *Del ligado ao *C relacionado com a baixa expressão.

Considerando que *HLA-G* é uma molécula imunorreguladora e inibe a ação de células do sistema imune, espera-se que alelos, genótipos e haplótipos que diminuem sua expressão estejam associados com predisposição a doenças autoimunes, contudo nossos dados de associação positiva não corroboraram com essa hipótese para o desenvolvimento da AR. Sendo assim é preciso aumentar o tamanho amostral para verificar se esta associação se mantém e, principalmente, esclarecer melhor a relação do polimorfismo 14pb*Ins/Del com a expressão da molécula, pois estes dados ainda são contraditórios na literatura.

É importante ressaltar que este foi o primeiro estudo de associação dos polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* (14pb Ins/Del e +3142pb) com artrite reumatoide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª ed. Tradução por Claudia Reali *et al.*, Elsevier, 2008.564p.

ALAMANOS Y, DROSOS AA. **Epidemiology of adult rheumatoid arthritis**. *Autoimmun Rev.* 4(3):130-6, 2005

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.* 36(3):182-8, 2006.

ALVAREZ, M.; PIEDADE, J.; BALSEIRO, S.; RIBAS, G.; REGATEIRO, F. HLA-G 3'UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. **int J Immunogenet** 36:361–366, 2009.

ARTHRITIS FOUNDATION, News from the Arthritis Foundation, Rheumatoid Arthritis Fact Sheet. Disponível em: < www.arthritis.org >. Acesso em: maio de 2012.

BLASCHITZ, A.; LENFANT, F.; MALLET, V.; HARTMANN, M.; BENSUSSAN, A.; GERAGTHY, D. E.; BOUTEILLER, P.L.; DOHR, G. Endotelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express *HLA-G*. **Eur J Immunol** 27: 3380–3388, 1997.

CARMONA L, CROSS M, WILLIAMS B, LASSERE M, MARCH L. **Rheumatoid arthritis**. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 24(6):733-45, 2010

CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. **HLA-G: from biology to clinical benefits**. *Trends in Immunology* 29 (3): 125-132, 2008.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; DEGHAIDE, N. H.; ALBUQUERQUE, R.S.; MUNIZ, Y.C. N.; SIMOES, R. T.; CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. The genetic Structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes Immun.** 70:1020-1025, 2009b.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VIANNA, de C.J.L.; DONADI, E.A. HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population. **Tissue Antigens** **72**: 149–157, 2008.

CASTELLI, E.C.; MOREAU, P.; OYA & CHIROMATZO, A.; MENDES-JUNIOR, C. T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; GIULIATTI, S.; CAROSELLA, E.D.; DONADI, E.A. in silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. **Hum Immunol**, **70**:1020–1025, 2009a.

CROUA, R.B.; AMADOU, C.; BOUISSOU, C.; CLAYTON, J.; VERENET, C.; RIBOUCHON, M. T.; PONTAROTTI, P. Localization of the OTF3 gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping Genomics. **Cell Mol Life Sci** **68**:369–395, 1994.

DONADI, E. A.; CASTELLI, E.C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cell Mol Life Sci** **68**:369–395, 2011.

FAINARDI E, R.R.; MELCHIORRI, L.; VAGHI, L.; CASTELLAZZI, M.; MARZOLA, A.; GOVONI, V.; PAOLINO, E.; TOLA, M.R.; GRANIERI, E.; BARICORDI, O.R. Presence of detectable levels of soluble *HLA-G* molecules in CSF of relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with CSF soluble *HLA-I* and *IL-10* concentrations and MRI findings. *Journal of Neuroimmunology*. **Journal of Neuroimmunology** **142 (1-2)**: 149-158, 2003.

FISCHER, G.F.; MAYR, W.R. **Molecular genetics of the HLA complex**. **Wien Klin Wochenschr** **113 (20-21)**: 814-824, 2001.

GREGERSEN, PETER, K. & BEHRENS; TIMOTHY, W. Genetics of autoimmune diseases – disorders of immune homeostasis. **Nature Reviews Genetics**, Vol. 7, p. 917-926, 2006.

HAMMER, A.; HUTTER, H.; DOHR, G. HLA class I expression on the materno-fetal interface. **Am J Reprod Immunol** **38**: 150–157, 1997.

HARRISON, G.A.; HUMPHREY, K.E.; JAKOBSEN, I.B.; COOPER, D.W. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. **Hum Mol Genet** **2** (12), 1993.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R.C.; BRUFORD, E.A.; KHODIYAR, V.K.; LUSH, M.J.; POVEY, S.; TALBOT, C.C. Jr.; WRIGHT, M.W *et al.* Gene map of the extended human MHC. **Nat Rev Genet** **5** (12): 889-899, 2004.

HVIID, T. V. *HLA-G* in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update** **12** (3): 209-232, 2006a.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; RORBYE, C.; NIELSEN, L.G. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics** **55**: 63–79, 2003.

HVIID, T.V.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; BARICORDI, O.R. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the *HLA-G* gene in relation to soluble *HLA-G* and IL-10 expression. **Hum. Immunol** **67**: 53–62, 2006b.
INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Disponível em: <[http: – www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> acesso em: novembro de 2012.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia – O sistema immune na saúde e na doença**. Tradução Cristina Bonorino *et al.* 5ª ed. ARTMED, 2002.

KUERSTEN, S.; GOODWIN, E.B. The power of the 3'UTR: translational control and development. **Nat Rev Genet.** **4**:626–637, 2003.

LE BOUTELLIER, P.; BLASCHITZ, A. **The functionality of HLA-G is emerging**. **Immunological Reviews**. Copenhagen, 1999.

LEWIN, B. **Genes IX**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MARQUES NETO J.F., GONÇALVES E.T., BARROS E.F.O., *et al*: **Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatoide do**

adulto em amostras da população brasileira. Rev Bras Reumatol 33(5):169-73, 1993.

MENIER, C.; RITEAU, B.; CAROSELLA, E.D.; ROUAS-FREISS, N. **MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal.** int J Cancer. 100: 63–70, 2002.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. **Nucl Acid Res.** 16: 12151988.

MOTA LMH, CRUZ BA , BRENOL CV, PEREIRA IA, REZENDE-FRONZA LS, BERTOLO MB, DE FREITAS MVC, DA SILVA NA, LOUZADA-JÚNIOR P, GIORGI RDN, LIMA RAC, PINHEIRO GRC. **Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide.** Rev Bras Reumatol. 52(2):135-174, 2012

PARSLOW, T. G.; STITES, D. P.; TERR, A.I.; IMBODEN, J. B. **Imunologia Médica**, 10^a ed. Guanabara Koogan, 2004.

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

RHEUMATOID ARTHRITIS. Produzida pela Arthritis Foundation 2000. Tradução para o português autorizada pela Dra. Rejane Leal Araújo. **Sociedade Brasileira de Reumatologia**. Disponível em:< www.reumatologia.com.br>. Acesso em maio de 2012.

ROBINSON, J.; WALLER, M.J.; FAIL, S.C.; MARSH, S.G. The IMGT/HLA and IPD databases. **Hum Mutat** 27:1192–1199, 2006.

ROUAS-FREISS, N.; GONÇALVES, R.M.B.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Direct evidence to support the role of *HLA-G* in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. **Proc Natl Acad Sci** 94: 11520–11525, 1997.
ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Hum Immunol** 64:1005–1010, 2003.

SILVA, R. G.; VANNUCCI, A.B.; LATORRE, L.C.; ZERBINI, C. A. F. Como diagnosticar e tratar: Artrite Reumatoide, **Revista Brasileira Médica**, Vol. 60, nº8, p. 554-576, 2003.

STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet** **68 (4)**: 978-989, 2001.

SYMMONS DP. **Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome**. Best Pract Res Clin Rheumatol. 16(5):707-22, 2002

TAN, Z.; RANDALL, G.; FAN, J.; CAMORETTI-MERCADO, B.; BROCKMAN-SCHNEIDER, R.; PAN, L.; SOLWAY, J.; GERN, J.E.; LEMANSKE, R.F.; NICOLAE, D.; OBER, C. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. **Am J Hum Genet** **81**: 829–834, 2007.

TOBÓN GJ, PERS JO, CAÑAS CA, ROJAS-VILLARRAGA A, YOUINOU P, ANAYA JM. **Are autoimmune diseases predictable?** Autoimmun Rev. 11(4):259-66, 2012

TOBÓN GJ, YOUINOU P, SARAUX A. **The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis**. J Autoimmun. 35(1):10-4, 2010

VEIT, T. D.; CHIES, J. A B. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transplant immunology**, v. 20, n. 4, p. 229-31, mar. 2009

WIENDL, H.; FEGER, U.; MITTELBRONN, M.; JACK, C.; SCHREINER, B.; STADELMANN, C.; ANTEL, J.; BRUECK, W.; MEYERMANN, R.; BAR-OR, A.; KIESEIER, B.C.; WELLER, M. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS **immunity**. **Brain** **128 (11)**: 2689-2704, 2005.

YIE, S.M.; Li, L.H.; XIAO, R.; LIBRACH, C.L. A single base-pair mutation in the 3' untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. **Mol Hum Reprod** **14**: 649–653, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1 – QUESTIONÁRIO GRUPO CONTROLE



**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas**

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG

**Laboratório de Polimorfismos Genéticos
QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE**

IDENTIFICAÇÃO

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

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

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

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: () Sim () Não

Escolaridade: () analfabeto () 1º grau incompleto

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

() 2º grau completo () superior incompleto

() superior completo () pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência:

Materna _____ Paterna _____

Etnia: () Euro descendente () Afro descendente

() Asiático descendente () Indígena descendente

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

Observação: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência _____ do pai:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____

Descendência _____ da mãe:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

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

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

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

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

() Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

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

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

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

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

Tipo: _____

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

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

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

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

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

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

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Entrevistador: _____ **Data da entrevista:** __/__/____

Nome: _____

Identificação:

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª gestação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

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

TRAT. HORMONAL:

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

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

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

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

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

() Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações

Histórico Médico

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

Tipo: _____

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

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

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

materna 1º grau () prima paterna 1º grau

() Outros _____

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

Grau de Parentesco e tipo: _____

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

Local: _____

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

Qual? _____

Tempo de diagnóstico: _____

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

Grau de Parentesco e tipo: _____

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

Qual? (s) _____

HIPERTENSÃO ARTERIAL: () Sim () Não
 HIPERCOLESTEROLEMIA: () Sim () Não
 OSTEOPOROSE: () Sim () Não
 DOENÇA REUMÁTICA: () Sim () Não
 DIABETES: () Sim () Não
 ASMA: () Sim () Não
 HIV: () Sim () Não () Nunca fez exame
 HEPATITE: () Sim () Não () Nunca fez exame
 DENGUE: () Sim () Não
 TUBERCULOSE: () Sim () Não
 DISTÚRPIO RENAL: () Sim () Não
 DISTÚRPIO PULMONAR: () Sim () Não
 DISTÚRPIO HEPÁTICO: () Sim () Não
 Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: () Sim () Não
 Grau de parentesco: _____
 Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: () Sim () Não
 Grau de parentesco: _____
 OUTRAS DOENÇAS?: _____

Alérgico a algum medicamento? _____

Alérgico a algum alimento? _____

Teve DEPRESSÃO? _____

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

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

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

Informações:

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos genéticos e da saúde de controles saudáveis e de pacientes que desenvolveram Artrite Reumatoide. Para isso pedimos sua **colaboração e permissão** para doação de 10 ml de sangue periférico, que contém

o DNA (molécula que contém os genes, que carregam as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de medicamentos e de substâncias estranhas ao organismo e, também, relacionados à resposta imunológica), e o aparecimento desta doença. O DNA extraído das amostras coletadas será armazenado no Laboratório, sob responsabilidade da coordenadora do projeto. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, não influenciando no seu atendimento e tratamento. As informações aqui coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Iliáda Rainha de Souza ou com o Prof. Dr. Ivânio Alves Pereira (no ambulatório de Reumatologia, telefone: 3721-9133).

Procedimentos:

Caso concorde em participar, você irá responder a um questionário com duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram doença autoimune, como artrite reumatoide ou outra doença reumática, etc.

Riscos:

A coleta de sangue é um procedimento normal durante o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer, não representando maiores preocupações.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto logo após participar desta pesquisa, no entanto, os resultados deste estudo poderão permitir, num futuro próximo, um tratamento mais eficaz. Num futuro posterior, poderá permitir novas alternativas para prevenção da

doença e identificação de pessoas que possuem risco em desenvolver a doença.

Assinaturas:

Pesquisador auxiliar _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu,

_____, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa “GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATOIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, _____

Assinatura: _____ RG: _____

ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO GRUPO CASO



Universidade Federal de Santa Catarina
 Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB
 Departamento de Clínica Médica/CCS
 Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Artrite
 Reumatoide

NOME _____ PRONTuário/HU _____
 IDADE: ____anos SEXO:()F ()M COR da Pele: _____
 Procedência: _____ Natural de: _____
 Estado Civil: S C D V Ocupação: _____
 Telefone:() _____ Celular:() _____
 e-mail: _____ Data de nascimento: __/__/____

DATA da coleta: ____/____/____ **AR:** _____

Médico: _____

Entrevistador: _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____

CIDADE onde nasceu: _____ Profissão: _____

ASCEndência Materna _____ Paterna _____

NOME da mãe: _____

CIDADE onde nasceu: _____ Profissão: _____

ASCEndência Materna _____ Paterna _____

Tempo de doença diagnosticada: _____

Histórico Familiar: AR S N Parentesco: _____

Outras Reumat. D. S N Parentesco: _____

Manifestações Iniciais: Febre Rigidez Matinal

Articulações acometidas

| | |
|--------------------------------------------|----------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Derrame Articular | <input type="checkbox"/> Dor Articular |
| <input type="checkbox"/> Ombro | <input type="checkbox"/> Cotovelo |
| <input type="checkbox"/> IFPM | <input type="checkbox"/> Punho |
| <input type="checkbox"/> MTF | <input type="checkbox"/> MCF |
| <input type="checkbox"/> IFPP | <input type="checkbox"/> Joelho |
| <input type="checkbox"/> IFPP | <input type="checkbox"/> Tornozelo |
| | <input type="checkbox"/> Outras _____ |

Manifestações Extra-articulares:

| | |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Pleurite | <input type="checkbox"/> Pericardite |
| <input type="checkbox"/> Vasculite Reumatóide | <input type="checkbox"/> Nódulos Reumatóides |
| <input type="checkbox"/> Acometimento Ocular | <input type="checkbox"/> Acometimento Pulmonar |
| <input type="checkbox"/> Acometimento Renal | <input type="checkbox"/> Amiloidose |
| <input type="checkbox"/> | |
| Outras _____ | |

Evolução: **Internações:** S N Informações _____

Observações: Osteoporose? Diabetes? Depressão? _____

Sintomatologia Recente:
(Nos últimos 10 dias)

| | |
|--------------------------------------------|------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Febre | <input type="checkbox"/> Rigidez Matinal |
| <input type="checkbox"/> Derrame Articular | <input type="checkbox"/> Dor Articular |
| <input type="checkbox"/> Ombro | <input type="checkbox"/> Cotovelo |
| <input type="checkbox"/> IFPM | <input type="checkbox"/> Punho |
| <input type="checkbox"/> MTF | <input type="checkbox"/> MCF |
| <input type="checkbox"/> IFPP | <input type="checkbox"/> Joelho |
| | <input type="checkbox"/> Tornozelo |
| | <input type="checkbox"/> Outras _____ |

Manifestações Extra-articulares:

| | |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Pleurite | <input type="checkbox"/> Pericardite |
| <input type="checkbox"/> Vasculite Reumatóide | <input type="checkbox"/> Nódulos Reumatóides |
| <input type="checkbox"/> Acometimento Ocular | <input type="checkbox"/> Acometimento Pulmonar |
| <input type="checkbox"/> Acometimento Renal | <input type="checkbox"/> Amiloidose |
| <input type="checkbox"/> | |
| Outras _____ | |

Envolvimento Cardiovascular: HAS Doença Coronariana
 Angina IAM Prévio

Revascularização do Miocárdio Cateterismo Prévio

Envolvimento Neurológico: AVC AIT Ateroma em Carótidas

Dislipidemia: Hipercolesterolemia Hipertrigliceridemia

Hist. Familiar de Doença Cardiovascular: S N Parentesco _____

Tratamento Atual: CORTICosteróide: S N Nome _____

Dose _____ Frequência _____

METOTrexato: S N Dose _____ Frequência _____

SULFASSALazina: S N Dose _____ Frequência _____

ANTIMALárico: S N Dose _____ Frequência _____

CICLOFosfamida: S N Dose _____ Frequência _____

INFLIXImab: S N Dose _____ Frequência _____

ETANERcept: S N Dose _____ Frequência _____

AINE: S N Dose _____ Frequência _____

ANALGésicos: S N Dose _____ Frequência _____

Outros S N Dose _____ Frequência _____

Idade MENARCA: _____ anos MENOPAU A: S N Idade _____

Histerectomia S N Idade _____

Ovariectomia S N Idade _____

FASE do Ciclo Reprodutivo Menacme Climatério

GESTAções _____ PARidade _____

Abortos? Induzido Espontâneo

Tratamento Hormoi S N Qual? AC Outro _____

Duração: _____ Parou há quanto tempo: _____

Tratamento Medicamentoso S N Qual? _____
 Antes do Diagnóstico:

História de Uso de DROGAS: Álcool: S N Qual? _____

Quantidade _____ Freqüência: _____

Cigarro: S N Cigarros/dia _____

Se fumava, qual a duração? _____

Quando parou? _____

Algum familiar ou amigo próximo é fumante? S N _____

Drogas Ilícitas: S N Qual? _____

Por quanto tempo? _____

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos de Pesquisa:

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

e

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

Informações:

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

3721-9804 e conversar com a Prof^a. Dra. Iliada Rainha de Souza ou seus orientandos.

Procedimentos:

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

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

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

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

Riscos:

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

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios

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

Pesquisador responsável

Florianópolis, ___/___/_____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu,

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

Assinatura:

RG: _____