



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

**INSERÇÃO *Alu*YG EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE**

JIMENA PEREIRA RODRIGUES KIRCHNER

FLORIANÓPOLIS
2013

JIMENA PEREIRA RODRIGUES KIRCHNER

**INSERÇÃO *Alu*HG EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Licenciatura em Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Licenciado
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ilíada Rainha de Souza
Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Yara Costa Netto Muniz

FLORIANÓPOLIS
2013

Kirchner, Jimena Pereira Rodrigues
Inserção AluyHG em Pacientes com Artrite Reumatóide /
Jimena Pereira Rodrigues Kirchner ; orientadora, Iliada
Rainha de Souza ; co-orientadora, Yara Costa Netto Muniz.
- Florianópolis, SC, 2013.
45 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. Inserção AluyHG. 3. Artrite reumatoide. I. Souza, Iliada Rainha de . II. Muniz, Yara Costa Netto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, onde realizei minha graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas na modalidade EaD.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), agências financiadoras que possibilitaram a realização de nossos projetos de pesquisa.

Agradeço à professora Dra. Ilíada Rainha de Souza, orientadora do presente trabalho, pela sua sabedoria e pela humildade nos ensinamentos dados em cada parágrafo da correção deste Trabalho de Conclusão de Curso.

À Dra. Yara Costa Netto Muniz, coorientadora do presente trabalho, pela sua dedicação, compreensão e paciência ao me auxiliar no desenvolvimento das atividades práticas e na compreensão do conteúdo teórico deste projeto de pesquisa.

À Dra. Andrea Rita Marrero, por me recepcionar, aceitar e proporcionar minha integração à equipe do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE).

Aos membros que compõem a banca, Msc. Tiago Moreti e Msc. Bibiana Sgorla de Almeida, por gentilmente aceitarem o convite para integrar esta banca e garantirem valiosas contribuições ao meu trabalho,

Aos meus colegas do LAPOGE pela receptividade, acolhimento e auxílio nos momentos corridos da bancada, pelas brincadeiras, músicas, risadas e festividades.

A todos os voluntários que aceitaram participar deste estudo, em especial aos pacientes portadores de artrite reumatoide que auxiliaram nesta pesquisa.

Aos professores da graduação, por servirem de exemplo e sem os quais eu não estaria aqui hoje.

Às minhas colegas de Florianópolis do EaD por nossas viagens e dormidas juntas em Tubarão, por lerem no carro enquanto eu dirigia estudando para as provas.

Agradeço a meus pais por me apoiarem em todos os momentos, pela educação a mim passada. Por me ensinarem a valorizar a liberdade de escolha.

À minha irmã por estar comigo nos momentos difíceis de minha vida.

Agradeço ao meu companheiro por dar suporte na educação e carinho aos nossos filhos durante minha ausência.

Aos meus filhos por serem tão amados e independentes. Por me amarem tanto a ponto de suportar a distância e o pouco tempo que tive para curtir nestes quatro anos seu crescimento. Amo vocês.

Agradeço a mim, por ser uma pessoa determinada, lutadora e por não ter desistido.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença multissistêmica, inflamatória crônica que causa erosões e deformidades nas articulações. A AR é associada, assim como outras doenças autoimunes, com genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), como os genes *HLA* de classe 1 e *HLA* de classe 2. Existem elementos móveis no DNA Humano denominados elementos de inserção, sendo classificados em *LINEs* e *SINEs*, e entre estes se destacam as inserções *Alu*. A inserção *Alu**HG* é específica de humanos e localiza-se entre os genes do MHC. O objetivo deste trabalho foi analisar uma possível associação da presença da Inserção *Alu**HG* entre pacientes portadores de artrite reumatoide, em um estudo caso-controle, contribuindo para o entendimento da ação dessa inserção no desenvolvimento da doença. Neste trabalho foram avaliados 100 pacientes com AR (casos) e 100 indivíduos sem histórico de doença autoimune (controle) para a presença/ausência da inserção *Alu**HG*, através da técnica de PCR por *primer* de sequência específica (PCR-SSP). As frequências gênicas foram estimadas e o *odds ratio* (OR) foi calculado para avaliar associação da inserção *Alu**HG* com AR ($p < 0,05$ foi considerado significativo). As amostras de pacientes e controles tiveram predominância de mulheres (86%). Dados epidemiológicos como gravidez, abortos, menarca e menopausa não mostraram associação com a doença. Neste estudo foi encontrada uma associação negativa ($OR = 0,405$ e $p = 0,003$), conferindo proteção em relação à doença, quando a ausência da Inserção *Alu**HG* está em heterozigose (*Ins/Del*), e uma associação positiva em relação à doença ($OR = 2,071$ e $p = 0,016$) em homozigotos (*Del/Del*). Mais estudos são indicados para o entendimento desta questão.

Palavras-chave: Artrite reumatoide. inserção *Alu**HG*.

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is considered a chronic inflammatory multisystem disease that causes joint erosions and deformities. RA is associated, as well as others autoimmune diseases, with genes from the Major Histocompatibility Complex - MHC, such as class 1 and class 2 HLA genes. There are specific mobile DNA elements in Human genome classified as Short Interspersed Elements (SINEs) and Long Interspersed Elements (LINEs). The *Alu* Insertions are one type of SINEs, and they are the most highlighted and well documented among SINEs' group. The *Alu**HG* Insertion is specific for human, and they are located between the two MHC genes cited above. The aim of this study was to analyze a possible association between the presence of *Alu**HG* Insertion among patients with RA, in a case-control study, contributing to the understanding of the action of this Insertion in disease development. This study evaluated 100 patients with RA (cases) and 100 individuals with no history of autoimmune disease (controls) for the presence/absence of *Alu**HG* Insertion by Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (SSP-PCR). The genes' frequencies were estimated and the *odds ratio* (*OR*) was calculated to assess the association of *Alu**HG* Insertion with RA ($p < 0.05$ was considered significant). Samples from patients and controls were predominantly women (86 %). Epidemiological data such as pregnancy, abortions, menopause and menarche showed no association with disease. In our study we found a negative association ($OR = 0.405$, $p = 0.003$), conferring protection against the illness, when the absence of insertion *Alu**HG* is in heterozygosis (*Ins/Del*), and a positive association between the disease ($OR = 2.071$ and $p = 0.016$) in *Del/Del*. More studies are indicated to the understanding of this issue.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. *Alu**HG* Insertion.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a identificação do polimorfismo inserção <i>Alu</i> yHG.	24
Tabela 2: Distribuição por gênero em pacientes com artrite reumatoide (AR).	27
Tabela 3: Distribuição por idade e gênero em pacientes com artrite reumatoide (AR).	28
Tabela 4: Distribuição por idade de menarca em pacientes com artrite reumatoide (AR) e controles e a quantificação do grau de confiabilidade (χ^2 de homogeneidade).	28
Tabela 5: Distribuição dos pacientes com artrite reumatoide (AR) e dos indivíduos do grupo controle na categorização da ocorrência ou não de gestação durante a fase reprodutiva e a quantificação do grau de confiabilidade (χ^2 de homogeneidade).	29
Tabela 6: Distribuição dos pacientes com artrite reumatoide (AR) e dos indivíduos do grupo controle na categorização da ocorrência ou não de aborto (s) durante a fase reprodutiva e a quantificação do grau de confiabilidade (χ^2 de homogeneidade).	29
Tabela 7: Distribuição dos pacientes com artrite reumatoide (AR) e dos indivíduos do grupo controle na categorização da ocorrência da menopausa e consequente finalização da fase reprodutiva e a quantificação do grau de confiabilidade (χ^2 de homogeneidade).	30
Tabela 8: Distribuição genotípica das frequências observada e esperada do polimorfismo <i>Alu</i> yHG no grupo caso e no presente estudo e quantificação do grau de confiabilidade (χ^2) nos desvios existentes.	30
Tabela 9: Distribuição genotípica das frequências observada e esperada do polimorfismo <i>Alu</i> yHG no grupo controle no presente estudo e quantificação do grau de confiabilidade (χ^2) nos desvios existentes.	31
Tabela 10: Polimorfismos da inserção <i>Alu</i> yHG, para os grupos de casos e controles, cálculos de associação (<i>OR</i>) entre a presença (Inserção) e/ou ausência (Deleção) do alelo e o desenvolvimento de AR, os valores de intervalo de confiança (IC, 95 %) e os valores de <i>p</i>	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Desenho esquemático de uma articulação normal (a) e de uma articulação com AR (b). Fonte: modificado de..... 12
- Figura 2:** Genes do sistema imune, reais e potenciais do MHC (TROWSDALE, 2011). 15
- Figura 3:** A expansão dos elementos *Alu* em primatas. A expansão das subfamílias *Alu* (YC1, Ya5a2, Yb9, Yb8, Y, Sg1, Sx e J) é sobreposto em uma árvore de evolução dos primatas. A expansão das várias subfamílias *Alu* é codificada por cores para indicar os períodos de pico de amplificação. O número de cópias aproximado de cada subfamília *Alu* também está indicado (DEININGER e BATZER, 2002). 18
- Figura 4:** Localização da inserção *Alu*yHG no bloco do MHC: (A) é um mapa do local e da distribuição de genes e pseudogenes *HLA* de classe I, incluindo os *HLA-G*; (B) é o mapa da localização do sítio de inserção *Alu*yHG em relação aos loci *HLA-H* e *-G*; (C) a sequência *Alu*yHG é representado pela caixa que é flanqueada por sequências de repetição direta (sublinhada). Adaptado de KULSKI *et al.*, 2001. 20
- Figura 5:** Imagem da sequência de uma região do cromossomo 6 humano com destaque para a inserção *Alu*yHG (negrito e realce verde). A primeira sequência (referência BV681147) contém a inserção e a segunda sequência (referência BV681146) não contém a inserção (GENBANK). 24
- Figura 6:** Imagem de eletroforese em gel de agarose 1,5 % visualizado por transiluminador UV. Fragmentos de DNA de diferentes tamanhos podem ser identificados: 218 pb e 540 pb. Nas raias 1 e 3 observa-se a presença de duas bandas (fragmentos de 218 pb e 540 pb) indicando que o indivíduo é heterozigoto, tem a presença da inserção *Alu*yHG em um dos cromossomos e a ausência em outro cromossomo (genótipo *Ins/Del*). Na raia 2 observa-se apenas uma banda (fragmento de 540 pb) indicando que o indivíduo homozigoto, com a presença da inserção *Alu*yHG nos dois cromossomos (genótipo *Ins/Ins*). Nas raias 4 e 5 observa se apenas uma banda (fragmento de 218 pb) indicando que o indivíduo é homozigoto, com a ausência da inserção *Alu*yHG nos dois cromossomos (genótipo *Del/Del*) 26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 DOENÇAS AUTOIMUNES	11
1.2 ARTRITE REUMATOIDE	11
1.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	14
1.4 MARCADORES GENÉTICOS.....	16
1.5 INSERÇÕES <i>Alu</i>	17
1.6 INSERÇÃO <i>Alu</i> NO HLA	19
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	23
4.2 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	23
4.2.1 Extração do DNA genômico	23
4.2.2 Reação em cadeia da polimerase.....	24
4.2.4 Análise do produto amplificado	25
4.3 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E GENÉTICOS	27
5.1.1 Relação de dados epidemiológicos entre pacientes de artrite reumatoide e grupo controle	27
5.1.2 Frequências alélicas, genótípicas e análises de associação	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33

REFERÊNCIAS	34
ANEXO 1	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS AUTOIMUNES

A imunidade celular é adquirida a partir do reconhecimento de um antígeno, produção de anticorpos e transferência da informação adquirida, compondo, assim o sistema imune (CALICH *et al.*, 2008). Uma resposta inadequada do sistema imune pode gerar uma reação ao próprio organismo, desencadeando as doenças autoimunes. Esta reação contra o próprio gera destruição ou disfunção de órgãos, tecidos ou células do organismo (BUENO, 1999).

As doenças autoimunes são frequentemente associadas aos genes que codificam os antígenos leucocitários humanos (HLA), do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As moléculas HLA participam da apresentação de antígenos e da resposta celular iniciada pelas células T, funções importantes na resposta imune. As células T participam da patogênese da artrite reumatoide (AR) interagindo com o sistema HLA (NISHIMURA *et al.*, 2012).

As moléculas de histocompatibilidade, além de apresentarem antígenos, são importantes para realizar o condicionamento do sistema imune. Quando o sistema imune é formado, ele possui células T que podem reagir contra os antígenos próprios e não próprios. As moléculas do HLA selecionam células com fraca reatividade contra os antígenos próprios e excluem células com alta afinidade para o próprio (ALVES *et al.*, 2005).

1.2 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica e multissistêmica de etiologia desconhecida, caracterizada por sinovite. É uma poliartrite simétrica e aditiva com potencial deformante variável, geralmente ocorrendo em articulações periféricas e coluna cervical. Ocorre em 1 % da população em geral, e é três vezes mais frequente em mulheres que em homens. A prevalência é maior com o aumento da idade e a diferença entre os gêneros passa a não ser tão grande. Seu início se dá mais comumente entre 35 e 50 anos de idade, e sabe-se que seu aparecimento está relacionado à predisposição genética e à interação de agentes ambientais (SKARE, 2007). Considerando-se a população entre 55 e 75 anos de idade, esse valor aumenta para 4,5%. Geralmente o quadro clínico melhora na gravidez e piora durante a

amamentação, sugerindo contribuição hormonal na sua patogênese (MOTA, 2012).

A artrite reumatoide (AR) é uma doença articular inflamatória, não supurativa do tecido conjuntivo. Tem caráter progressivo, acometendo difusamente a membrana sinovial, produzindo dor, edema, calor e rubor articular e acentuada limitação de movimentos (FELLET e SCOTTON, 2001). A etiologia autoimune da artrite é considerada sistêmica e inflamatória, contudo sabe-se que o sistema imune participa ativamente no desenvolvimento da inflamação e nos danos articulares (RHEUMATOID ARTHRITIS, 2000).

O início da doença se dá por uma interação entre células T, células B, macrófagos e células sinoviais nas articulações, causando inflamação e subsequente aumento na produção de líquido sinovial e a formação de *pannus* com capacidade invasiva sobre as cartilagens e ossos adjacentes. Esta inflamação da sinóvia é capaz de destruir a cápsula articular, erodir os ossos adjacentes e romper tendões e ligamentos, gerando as deformidades características da doença (LOMONTE *et al.*, 2006).

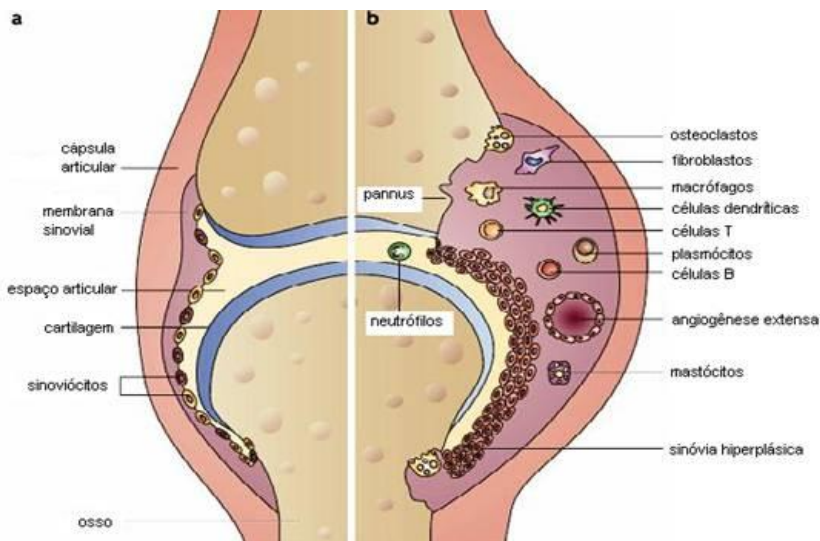


Figura 1: Desenho esquemático de uma articulação normal (a) e de uma articulação com AR (b). Fonte: modificado de

http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g9_metotrexato/artrite_reumatoide.html

O caráter crônico e destrutivo da doença pode levar a uma importante limitação funcional, com perda de capacidade laboral e de qualidade de vida, a menos que o diagnóstico seja feito em fase inicial da doença e o tratamento resulte em melhora clínica. Além de deformidade irreversível e de limitação funcional, pacientes com AR podem apresentar menor sobrevida, o que reafirma a gravidade dessa doença (MOTA *et al.*, 2011). Os pacientes com AR tornam-se incapazes de realizar suas atividades tanto de vida diária como profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (GOOLSBY e NEWSOME, 2002).

As deformidades mais comuns ocorrem em articulações periféricas como os dedos em pescoço de cisne, dedos em botoeira, desvio ulnar e hálux valgo (joanete). Afeta comumente outros órgãos ou tecidos como a pele, unhas, músculos, rins, coração, pulmão, sistema nervoso, olhos e sangue podem apresentar alterações. A AR é associada a fatores não genéticos e desencadeia um processo de inflamação da membrana sinovial com destruição progressiva da articulação. Embora seja relevante o componente genético na gênese dessa doença, muitos processos ainda são desconhecidos. Sua etiologia é controversa e se especula que fatores externos funcionem como “gatilho” para o início do processo inflamatório (GORONZY e WEYAND, 2001). Fatores ambientais específicos podem ativar reações imunes patogênicas (FARIAS, 2013) entre eles o tabagismo é o mais associado à AR, conferindo um maior risco na ocorrência, persistência e severidade da AR, provocado pelos componentes do cigarro. Outros componentes químicos podem desencadear a doença, como pó de sílica, óleos minerais ou a exposição a partículas suspensas no ar (McINNES e SCHETT, 2011; KLARESKOG *et al.*, 2011; TOBÓN, YOUINOU, SARAUX, 2010; KLARESKOG, CATRINA, PAGET, 2009).

O início da AR pode ser indicado pela produção elevada de anticorpos anti-proteína citrulinada (ACPA – do inglês anti-citrullinated protein antibodies) e fator reumatoide (FR), os quais estão relacionados a perda da auto-tolerância. Recentemente, dois subgrupos clínicos de AR foram propostos de acordo com a presença ou ausência de ACPA (KLARESKOG, CATRINA, PAGET, 2009; McINNES e SCHETT, 2007).

Estudos em famílias de gêmeos demonstram a importância do componente genético na suscetibilidade à AR (GORONZY e WEYAND, 2001). Ao que parece, o componente-chave do sistema genético é o complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Especula-se que moléculas do MHC interajam com auto-antígenos e com receptores de células T, por mecanismos ainda controversos (WALSER-KUNTZ *et al.*, 1995).

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), em uma região de 4 megabases de DNA (HVIID, 2006). Essa porção do genoma foi subdividida em regiões I, II e III, (Figura 1) levando em consideração a estrutura e função dos produtos moleculares por ela originados (HORTON *et al.*, 2004).

Oito *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. Os *loci HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (não clássicos ou de classe Ib) que são menos polimórficos que os classe Ia e apresentam expressão celular restrita. Além desses, 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 e MAYR, 2001).

A região de classe II está arranjada em quatro sub-regiões, DR, DQ, DZ/DO e DP. Nessa região também estão localizados os genes (*TAP1*, *TAP2* e *LMP2*, entre outros) que codificam para produtos moleculares os quais 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).

As moléculas de classe I são importantes no processo de rejeição de transplantes e na destruição de células infectadas por vírus. As moléculas de classe II atuam na apresentação de antígenos, na regulação da interação entre células imunocompetentes e no início da resposta imune. As moléculas de classe III participam do sistema complemento, estão envolvidas na formação

de imunocomplexos, no processo de fagocitose, em reações inflamatórias e na citotoxicidade (ALVES *et al.*, 2005).

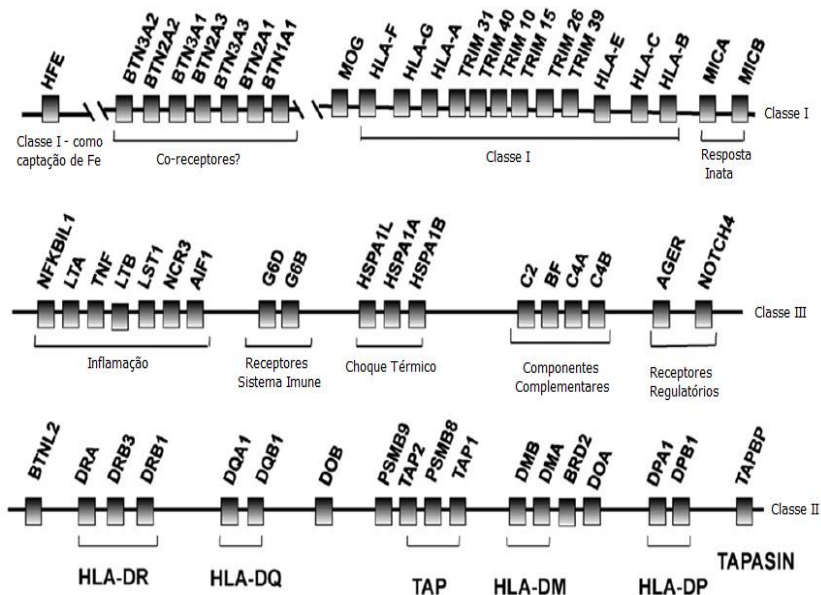


Figura 2: Genes do sistema imune, reais e potenciais do MHC (TROWSDALE, 2011).

Os produtos do complexo MHC de classe I e II estão envolvidos em vários aspectos das respostas imunes. O MHC é conhecido por sua associação com doenças autoimunes, embora existam diferenças entre a classe I e classe II em seus produtos, suas contribuições para a autoimunidade ainda não são completamente compreendidas (TROWSDALE, 2011).

As doenças autoimunes tendem a serem associados a alelos de classe I e II específicos. Autoimunidade é geralmente vista como uma consequência de uma resposta imunitária particularmente ativa. Em contraste com a complexidade das doenças infecciosas, um único auto-peptídeo em combinação com um alelo de *HLA* pode em princípio conduzir uma resposta autoimune.

1.4 MARCADORES GENÉTICOS

A diversidade e a evolução do genoma humano são de grande interesse científico no cenário genômico atual. Estima-se que 99,9% do DNA, entre os seres humanos, apresentam a mesma sequência de nucleotídeos, e apenas 0,1% do genoma, o que corresponde a cerca de três milhões de nucleotídeos, contribui para as diferenças entre indivíduos dentro da mesma população e entre populações distintas (KULSKY; DUNN, 2005).

A detecção dessas variabilidades genéticas é importante nas áreas da saúde, forense, estudos de populações, e é feita através de marcadores genéticos que podem ser um gene, um sítio de restrição ou qualquer sequência do DNA que apresente mais de uma forma alélica para o *locus* desejado. Alguns métodos são amplamente adotados, e utilizam diferentes tipos de marcadores, tais como: microssatélites, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*), inserções/deleções (indel), inserções *Alu*, entre outros (KULSKY; DUNN, 2005).

Elementos móveis de DNA, também chamados de elementos genéticos transponíveis, têm a característica incomum de se mover dentro do genoma ao longo de gerações sucessivas. São sequências de DNA moderadamente repetitivos, sob a forma de repetições dispersas em todos os genomas de mamíferos e constituem de 25% a 50% do seu genoma (no caso particular de humanos corresponde a cerca de 45%). (DEININGER e BATZER, 2002).

Os elementos móveis podem ser classificados em aqueles que transpõem diretamente como DNA (transposons do DNA), e em aqueles que transpõe através de um intermediário de RNA (retrotransposons). O último grupo pode ser dividido em virais e não virais. (DEININGER e BATZER, 2002).

Entre os retrotransposons não virais, os elementos mais abundantes em mamíferos são os que possuem repetições terminais longas (LTR, do inglês *Long Terminal Repeat*) e são divididos em duas classes: os elementos de inserção longos (LINEs, do inglês *Long Interspersed Element*) e elementos de inserção curtos (SINEs, do inglês *Short Interspersed Element*). Nos seres humanos, os LINEs têm aproximadamente 6 kb de comprimento e 300 pares de base (pb). Enquanto que os SINEs constituem 13% do genoma humano e seu comprimento varia entre 100 e 400 pb, a maior parte de 300 pb (DEININGER e BATZER, 2002).

1.5 INSERÇÕES *Alu*

O sequenciamento inicial do genoma humano revelou que 55% de sua sequência de nucleotídeos são compostos de elementos repetitivos. Entre as diferentes famílias de elementos repetitivos, os elementos *Alu* são os mais abundantes no genoma humano. Eles estão presentes em mais de um milhão de cópias, que em conjunto representam 10% de todo o genoma (HASLER e STRUB, 2006). Dos 1,6 milhões de locais no genoma humano, em que estes elementos curtos são espalhados, 1,1 milhão são elementos *Alu*, assim chamado porque a maioria deles contém um local de reconhecimento para a enzima de restrição *Alu* I. (DEININGER e BATZER, 2002).

A enzima endonuclease de restrição, *Alu* I, foi parcialmente purificada a partir da bactéria *Arthrobacter luteus*. Esta enzima cliva o DNA do bacteriófago X, do adenovírus-2 e do vírus símio 40 em muitos locais. (ROBERTS *et al.*, 1976).

As Inserções *Alu* são a classe mais abundante de elementos repetitivos móveis curtos (SINEs) do genoma humano. Estima-se que da parte do genoma humano composta por elementos repetitivos, as inserções do tipo *Alu* contribuam aproximadamente com 10% do conteúdo genômico total (HOUCK; RINEHART; SCHMID, 1979; KULSKY *et al.*, 2001, DUNN *et al.* 2007). As Inserções *Alu* são sequências com cerca de 300 pb de comprimento, derivadas do RNA ribossômico 7SL (BATZER, 1996; KULSKY; DUNN, 2005; DUNN *et al.* 2007).

The human genome contains about $\sim 10^6$ copies of *Alu* retrotransposons and they represent $\sim 10.6\%$ of nuclear DNA.

Os SINEs são inseridos em locais diferentes do DNA cromossômico por retrotransposição. Nesse processo, um DNA complementar é gerado através da transcrição reversa de um transcrito de RNA de uma sequência *Alu* mestre e é, então, inserido em uma nova posição no genoma (ROWOLD; HERRERA, 2000; DUNN *et al.*, 2007).

As sequências *Alu* ocorrem em alta frequência dentro de domínios não codificantes, por exemplo, em regiões intergênicas, íntrons, UTR3' e URR 5' (DANIELS e DEININGER, 1985; KORENBERG e RYKOWSKI, 1988 BAILEY e SHEN, 1993).

Os elementos *Alu*, bem como outros elementos repetitivos, foram considerados originalmente como parasitas do genoma, elementos que não tinham nenhum efeito significativo sobre a estabilidade e a expressão gênica. Eles foram tratados como "genes egoístas" ou "DNA lixo", mas hoje em dia,

várias evidências mostram que a presença de elementos repetitivos e, especialmente, de elementos *Alu*, tiveram uma grande influência no genoma humano, em particular, na sua evolução. Esses efeitos foram negativos e positivos. Por um lado, as integrações em regiões gênicas que causaram inativação de genes podem muitas vezes terem sido deletérias para o organismo. Por outro lado, devido à sua homologia de sequência estendida, os elementos de *Alu* induziram um número considerável de recombinações não alélicas que conduzem às duas duplicações e deleções de segmentos de DNA, acelerando, assim, a evolução. Outra função frequentemente atribuída aos elementos *Alu* é a capacidade de fornecer novos elementos reguladores de genes vizinhos (HASLER e STRUB, 2006).

As inserções *Alu* têm amplas aplicações, incluindo mapeamento do genoma, diagnóstico clínico, identificação cromossômica e a caracterização de rearranjos genômicos. Além disso, os polimorfismos *Alu* são usados para identificar a diversidade genética humana, podendo ser empregados em estudos de ancestralidade e forense. Devido à sua distribuição frequente no genoma

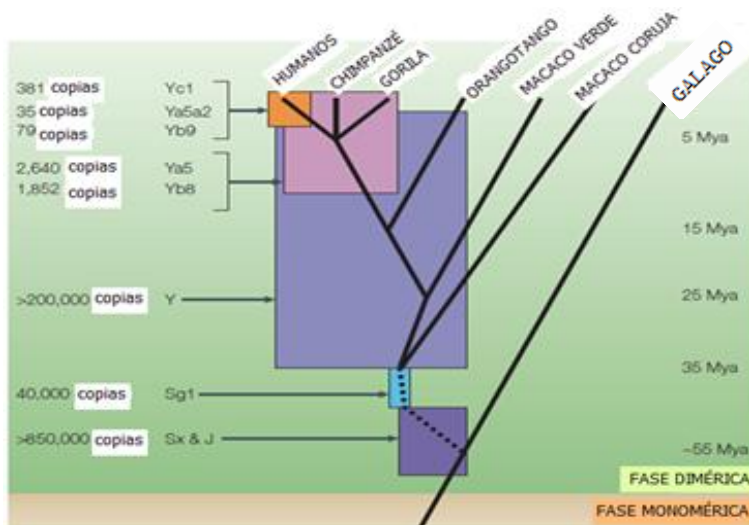


Figura 3: A expansão dos elementos *Alu* em primatas. A expansão das subfamílias *Alu* (Yc1, Ya5a2, Yb9, Yb8, Y, Sg1, Sx e J) é sobreposto em uma árvore de evolução dos primatas. A expansão das várias subfamílias *Alu* é codificada por cores para indicar os períodos de pico de amplificação. O número de cópias aproximado de cada subfamília *Alu* também está indicado (DEININGER e BATZER, 2002).

humano, as repetições *Alu* servem como eficazes marcadores genéticos (ROWOLD; HERRERA, 2000). São classificados em subfamílias, que têm inclinações diferentes para a retrotransposição, e são identificadas de acordo com as alterações de sequência. Inicialmente essas inserções foram identificadas com base no número de mutações pontuais de diagnóstico compartilhadas, e no polimorfismo de presença ou ausência em diversos genomas humanos. Quase todos os elementos recentemente integrados *Alu* humanos pertencem a uma variedade de pequenas subfamílias denominadas 'young'*Alu*, conhecidas como Y, Yc1, Yc2, Ya5, Ya5a2, Ya8, Yb8 e Yb9 (FIGURA 3, DEININGER e BATZER 2002). Várias subfamílias de *Alu Y* estão ativas e são responsáveis pela maior parte da variação de Inserções de Elementos Móveis (MEI) em *Homo sapiens*. O genoma humano de referência contém mais de 140.000 elementos *AluY* descritos (STEWART *et al.*, 2011).

1.6 INSERÇÃO *Alu* NO HLA

Todas as inserções *Alu*, em um *locus*, são idênticas por descendência, devido à improbabilidade de o fenômeno de inserção ocorrer duas vezes exatamente no mesmo *locus* (BATZER e DEININGER, 1991). Este fato torna as inserções *Alu* ferramentas úteis para a análise da reconstrução histórica de populações humanas e dos eventos demográficos pertinentes a estas (SHEDLOCK e OKADA, 2000).

Os elementos *Alu* são classificados em três famílias principais, designadas segundo o tempo de surgimento estimado: J para famílias antigas, S para intermediárias e Y para as mais novas (BATZER *et al.*, 1996). Os membros da família *AluY* são possíveis candidatos para investigar as origens dos haplótipos humanos ancestrais, grupos étnicos e associação a doenças (KULSKI *et al.*, 2002). Seis subfamílias são descritas para *AluY* no genoma humano (BATZER *et al.*, 1996), dentre elas, *AluYB8*, a subfamília em que se encontra a inserção *AluYHG*, objeto do presente trabalho (KULSKI *et al.*, 2002).

Durante uma análise comparativa da sequência genômica do bloco *HLA* de classe I, KULSKI e colaboradores localizaram *AluYHG* entre o *HLA-A* e o *HLA-G*, a aproximadamente 88Kb do gene *HLA-A* (Figura 5) (KULSKI *et al.*, 1999; 2001).

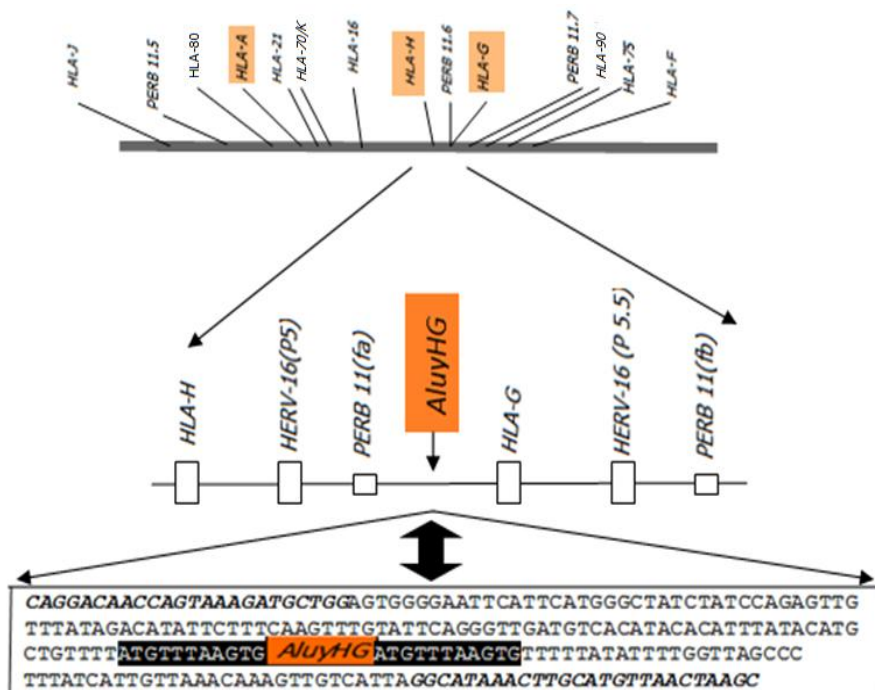


Figura 4: Localização da inserção *AluHG* no bloco do MHC: (A) é um mapa do local e da distribuição de genes e pseudogenes *HLA* de classe I, incluindo os *HLA-G*; (B) é o mapa da localização do sítio de inserção *AluHG* em relação aos *loci HLA-H* e *-G*; (C) a sequência *AluHG* é representado pela caixa que é flanqueada por sequências de repetição direta (sublinhada). Adaptado de KULSKI *et al.*, 2001.

2 JUSTIFICATIVA

A artrite reumatoide, por ser uma doença de etiologia complexa e indefinida, apresenta dificuldade de diagnóstico e prognóstico. Embora existam marcadores que auxiliam o diagnóstico e que permitem o acompanhamento da evolução da doença, a AR apresenta heterogeneidade de fatores clínicos e epidemiológicos entre os pacientes (FARIAS, 2012).

A artrite reumatoide é decorrente de uma resposta imune ao próprio organismo, onde o sistema imune ataca os condrócitos ocasionando dores articulares e deformações. A inserção *AluyHG* localiza-se entre os genes *HLA-A* e *HLA-G* do MHC, estes estão associados à ação de células NK, macrófagos, mastócitos, células dendríticas e linfócitos TCD8+. Um possível desequilíbrio de ligação entre essa região e os *loci* vizinhos pode ser um potencial marcador para essa região.

Entender essa inserção e como ocorre sua expressão é importante, pois uma vez conhecida à relação da inserção *AluyHG* com a doença, será possível uma maior compreensão a respeito da mesma. Estes resultados poderão embasar estudos com novas propostas terapêuticas que venham amenizar a gravidade das crises ocasionadas pela artrite reumatoide.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo analisar a presença da Inserção *AluyHG* entre pacientes portadores de Artrite Reumatoide, em um estudo caso-controle, contribuindo para o entendimento da ação dessa inserção no desenvolvimento da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar os diferentes genótipos em pacientes e controles.
- Inferir as frequências dos alelos referentes à Inserção *AluyHG*, tanto nas amostras de pacientes quanto nas de controles.

- Identificar se há associação dos diferentes genótipos com a artrite reumatoide através do estudo caso-controlado.
- Caracterizar as amostras de casos e controles em relação aos dados epidemiológicos: idades da menarca e da menopausa, número de abortos e gestações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras utilizadas neste trabalho pertencem ao banco de DNA do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), coordenado pela Prof^a. Dr^a. Ilíada Rainha de Souza. Foram utilizadas amostras de 100 pacientes diagnosticados com artrite reumatoide (grupo caso) e de 100 indivíduos saudáveis (grupo controle). As amostras dos pacientes diagnosticados pela equipe de Reumatologia do Hospital Universitário (HU) foram coletadas de acordo com os critérios da Comunidade Americana de Reumatologia (*American College of Rheumatology* – ACR).

Os dados epidemiológicos foram obtidos através de questionários (Anexo 1), aplicados durante a entrevista feita anteriormente à coleta de sangue periférico dos indivíduos, após o esclarecimento em relação à participação voluntária na pesquisa e consentirem em fazer parte da mesma através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a coleta de dados pessoais e familiares, os amostrados foram encaminhados para a coleta de sangue periférico, para extração de DNA utilizado em futuros estudos genéticos. O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis e sem histórico familiar para doenças autoimunes. A escolha dos indivíduos deste grupo foi equiparada com base no gênero e na idade dos pacientes, sendo esta última correspondendo a uma variação de ± 5 anos.

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.

4.2 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

4.2.1 Extração do DNA genômico

As amostras que foram utilizadas tiveram o DNA extraído a partir de células sanguíneas pelo método de *Salting out*, descrito por Miller *et al.* (1988).

4.2.2 Reação em cadeia da polimerase

O fragmento, contendo ou não a inserção *AluyHG*, foi amplificado utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) realizada em um Termociclador *Mastercycler®* (*Eppendorf*). Os *primers* empregados foram obtidos de KULSKI *et al.* (2001; Tabela 1).

Tabela 1: Sequência dos *primers* utilizados para a identificação do polimorfismo inserção *AluyHG*.

POLIMORFISMO	INICIADORES	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>AluyHG</i>	<i>Primer F</i>	5'CAGGACAACCAGTAA AGATGCTGG 3'	KULSKI <i>et al.</i> , 2001
	<i>Primer R</i>	5'GCTTCAGTTAACATG CAAGTTTATGCC 3'	

A sequência da região do cromossomo 6 contendo a inserção *AluyHG* com 322 pb está destacada na Figura 5.

Sequência do cromossomo 6 com inserção <i>AluyHG</i> (BV 681147).							
1	AGTGGGGAAT	TCATTCATGG	GCTATCTATC	CAGAGTTGTT	TATAGACATA	TTCTTTCAAG	
61	TTTGTATTCA	GGTTGATGT	CACATACACA	TTTATACATG	CTGTTTTATG	TTTAAGTGTT	
121	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TGAGACGGA	GTCTCGCTCT	GTCGCCCAGG	
181	TCGGACTGCG	GACTGCAGTG	GCGCAATCTC	GGCTCACTGC	AAGTCCGCT	TCCCGGGTTC	
241	ACGCCATTCT	CCTGCCTCAG	CCTCCCGAGT	AGCTGGGACT	ACAGGCGCCC	GCCACCGCGC	
301	CCGGCTAATT	TTTTGTATTT	TTAGTAGAGA	CGGGGTTTCA	CCTTGTTAGC	CAGGATGGTC	
361	TCGATCTCCT	GACCTCATGA	TCCACCCGCC	TCGGCCTCCC	AAAGTGCTGG	GATTACAGGC	
421	GTGAGCCACA	TGTTAAGTG	TTTATATT	TTGGTTAGCC	CTTTATCATT	GTTAAACAAA	
481	GTTGTCATTA	G					
Sequência do cromossomo 6 sem inserção <i>AluyHG</i> (BV 681146).							
1	AGTGGGGAAT	TCATTCATGG	GCTATCTATC	CAGAGTTGTT	TATAGACATA	TTCTTTCAAG	
61	TTTGTATTCA	GGTTGATGT	CACATACACA	TTTATACATG	CTGTTTTATG	TTTAAGTGTT	
421	TTTATATT	TTGGTTAGCC	CTTTATCATT	GTTAAACAAAGT	TGTCATTAG		

Figura 5: Imagem da sequência de uma região do cromossomo 6 humano com destaque para a inserção *AluyHG* (negrito e realce verde). A primeira sequência

(referência BV681147) contém a inserção e a segunda sequência (referência BV681146) não contém a inserção (GENBANK).

4.2.3. Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados, em tubos de 0,6µl (tipo *Eppendorf*): 16,70 µl de água; 0,50 µl de dNTPs (0,2 mM de cada); 0,75 µl de MgCl₂ (1,5 mM); 2,00 µl de Tampão de PCR (0,8 X); 0,30 µl de *Primer R* (3 pmol); 0,30 µl de *Primer F* (3 pmol); 0,20 µl de *Taq Platinum*® (1 U/µl) e 3,00 µl de DNA (em torno de 200 ng). Estas amostras foram colocadas no termociclador e submetidas a uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos e, em seguida, a 30 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 50 segundos; e um passo de extensão final a 72 °C por 5 minutos (adaptado de KULSKI *et al.*, 2001).

4.2.4 Análise do produto amplificado

Após a amplificação por PCR, em uma porção do produto (4 µl) foi adicionado o corante fluorescente GelRed™ (2 µl de corante). Esse produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, juntamente com uma amostra proveniente da PCR sem DNA (controle negativo), uma amostra de um indivíduo com genotipagem conhecida (controle positivo) e um padrão de peso molecular de 100 pb. Após a gelificação, o gel foi introduzido na cuba e imerso em uma solução de Tampão TBE 0,5 X. A corrida foi realizada em uma voltagem fixada em 95 V por 27 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel foi registrado pelo fotodocumentador *DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro*® e visualizado em foto. As anotações das leituras dos genótipos foram feitas considerando o tamanho dos fragmentos (218 pb para produtos com a ausência da inserção *AluyHG* e 540 pb para produtos com a presença da inserção *AluyHG*) (Figura 7). Os resultados genéticos dos indivíduos foram classificados de acordo com os resultados das análises do produto amplificado em: genótipo *Ins/Ins* (indivíduos com a presença da inserção *AluyHG* nos dois cromossomos), genótipo *Ins/Del* (indivíduos com a presença da inserção *AluyHG* em um dos cromossomos e a ausência no outro) e *Del/Del* (indivíduos com a ausência da inserção *AluyHG* nos dois cromossomos).

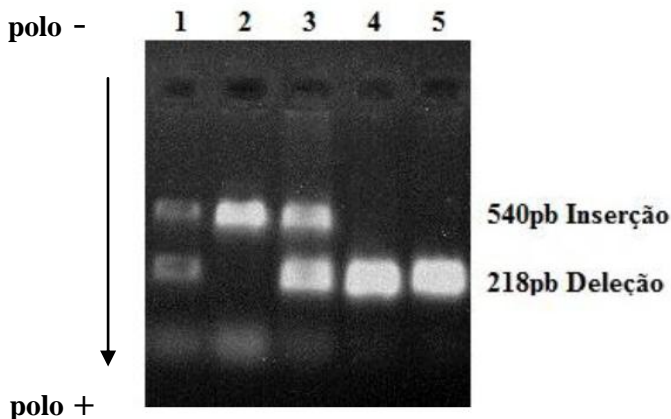


Figura 6: Imagem de eletroforese em gel de agarose 1,5 % visualizado por transiluminador UV. Fragmentos de DNA de diferentes tamanhos podem ser identificados: 218 pb e 540 pb. Nas raias 1 e 3 observa-se a presença de duas bandas (fragmentos de 218 pb e 540 pb) indicando que o indivíduo é heterozigoto, tem a presença da inserção *AluyHG* em um dos cromossomos e a ausência em outro cromossomo (genótipo *Ins/Del*). Na raia 2 observa-se apenas uma banda (fragmento de 540 pb) indicando que o indivíduo é homozigoto, com a presença da inserção *AluyHG* nos dois cromossomos (genótipo *Ins/Ins*). Nas raias 4 e 5 observa se apenas uma banda (fragmento de 218 pb) indicando que o indivíduo é homozigoto, com a ausência da inserção *AluyHG* nos dois cromossomos (genótipo *Del/Del*).

4.3 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados epidemiológicos foram tabulados e a análise estatística foi feita através de testes de homogeneidade (tabelas de contingência).

Dos dados genéticos obtidos foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas da inserção *Aluy-HG*. A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções esperadas pelo teorema de Hardy-Weinberg foi verificada com o uso do teste de qui-quadrado (BEIGUELMAN, 1991).

Para determinar a associação do polimorfismo analisado com artrite reumatoide, o cálculo do *Odds Ratio* (*OR*), segundo Woolf (1955), permitiu a observação de quantas vezes o polimorfismo estudado foi mais frequente nos indivíduos com o caráter em questão (AR) em relação aos que não o possuem (controles). O cálculo foi feito utilizando o programa *HDS EpiMax Calculator*®.

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E GENÉTICOS

5.1.1 Relação de dados epidemiológicos entre pacientes de artrite reumatoide e grupo controle

Dados familiares e epidemiológicos dos pacientes e controles foram obtidos durante entrevistas, através de questionários estruturados (Anexo 1). Alguns dos dados obtidos foram tabulados neste trabalho. Em relação ao gênero, pacientes e controles totalizam 200 indivíduos, entre eles homens e mulheres (Tabela: 2).

Tabela 2: Distribuição por gênero em pacientes com artrite reumatoide (AR).

GÊNERO	PACIENTES AMOSTRADOS	χ^2
Feminino	86	
Masculino	14	6,4533
	100	

Como observado na tabela acima a frequência de mulheres entre os pacientes é seis vezes maior que a de homens, superior ao descrito por MOTA (2012). Na literatura encontra-se a proporção de 3:1, ou seja, a quantidade de mulheres é tres vezes maior do que a de homens. A diferença dos nossos dados em relação ao da literatura mostra-se significativa ($0,01 < p < 0,02$). Tanto nossos dados como os da literatura levam a sugestão de uma possível associação da doença com a ação hormonal feminina. No entanto, cabe ressaltar que mesmo ocorrendo esta relação, as mulheres vão com mais frequência ao médico do que os homens, pois se previnem e preocupam-se mais com a saúde. Desta forma, cogitou-se que se de fato as mulheres sejam mais precavidas, aumenta a probabilidade de serem amostradas.

Os homens portadores de artrite reumatoide aqui amostrados têm em média a idade de 56 anos, variando de 45 a 72 anos e as mulheres, a média de

55 anos, variando de 21 a 75 anos (Tabela 3). Desta forma, pode-se supor que ou a doença surge nos homens mais tardiamente do que nas mulheres ou que os homens afetados pela AR procuram o médico apenas quando a doença se encontra no estado mais grave.

Tabela 3: Distribuição por idade e gênero em pacientes com artrite reumatoide (AR).

IDADE PACIENTES	NÚMERO DE INDIVÍDUOS		
	Homens	Mulheres	Total
21-30	-	3	3
31-40	-	10	10
41-50	3	17	20
51-60	7	31	38
61-70	3	20	23
71-80	1	5	6
Total	14	86	100

Observa-se na Tabela 3 uma maior incidência de artrite entre 51 a 60 anos, considerando também a diferença de gênero. Segundo MOTA (2012), habitualmente, a artrite reumatoide tem incidência entre 20 e 60 anos, corroborando com nossos dados, porém com maior incidência em torno dos 45 anos, inferior ao observado em nosso estudo.

Observada a maior incidência da doença no sexo feminino, foram selecionados dados como: idade da menarca, gestação, aborto e menopausa, demonstrados nas tabelas abaixo (Tabelas 4, 5, 6 e 7, respectivamente).

Tabela 4: Distribuição por idade de menarca em pacientes com artrite reumatoide (AR) e controles e a quantificação do grau de confiabilidade (χ^2 de homogeneidade).

IDADE MENARCA	CASO	CONTROLE	χ^2
09 a 10 anos	1	6	4,046
11 a 12 anos	20	21	0,199
13 a 14 anos	38	31	0,219
15 a 16 anos	19	16	0,058
17 a 19 anos	3	0	2,741
Total	81	74	7,263

A distribuição por idade de menarca em pacientes com artrite reumatoide (AR) e indivíduos do grupo controle não demonstrou diferença significativa, com o valor de $\chi^2_{(4)} = 7,263$, tal que $0,10 < p < 0,20$.

Tabela 5: Distribuição dos pacientes com artrite reumatoide (AR) e dos indivíduos do grupo controle na categorização da ocorrência ou não de gestação durante a fase reprodutiva e a quantificação do grau de confiabilidade (χ^2 de homogeneidade).

GESTAÇÃO	CASO	CONTROLE	χ^2
Sim	75	64	1,198
Não	5	10	1,109
TOTAL	80	74	2,307

A distribuição de pacientes com AR e grupo controle na categorização da ocorrência ou não de gestação durante a fase reprodutiva não apresentou diferenças significativas, sendo o valor de $\chi^2_{(1)} = 2,307$, tal que $0,10 < p < 0,20$. Na literatura, segundo MOTA (2012), dados relacionados à ocorrência ou não de gestação indicam que portadores da doença perceberam uma melhora no quadro da doença durante este período, ao contrário do período de amamentação, onde as crises aumentaram. No presente trabalho não foi averiguado este grau de informação entre os indivíduos amostrados.

Tabela 6: Distribuição dos pacientes com artrite reumatoide (AR) e dos indivíduos do grupo controle na categorização da ocorrência ou não de aborto (s) durante a fase reprodutiva e a quantificação do grau de confiabilidade (χ^2 de homogeneidade).

ABORTO(S)	CASO	CONTROLE	χ^2
Sim	15	19	1,529
Não	61	44	0,495
TOTAL	76	63	2,024

A distribuição dos pacientes com artrite reumatoide (AR) e dos indivíduos do grupo controle na categorização da ocorrência ou não de aborto (s) durante a fase reprodutiva demonstra um desvio não significativo, tendo em vista o valor $\chi^2_{(1)} = 2,024$, tal que $0,10 < p < 0,20$.

Tabela 7: Distribuição dos pacientes com artrite reumatoide (AR) e dos indivíduos do grupo controle na categorização da ocorrência da menopausa e consequente finalização da fase reprodutiva e a quantificação do grau de confiabilidade (χ^2 de homogeneidade).

MENOPAUSA	CASO	CONTROLE	χ^2
Sim	55	53	0,023
Não	23	208	0,058
TOTAL	78	73	0,081

As diferenças observadas na classificação dos amostrados em relação à ocorrência da menopausa não se mostrou significativo, sendo o valor de $\chi^2_{(1)} = 0,081$, tal que $0,70 < p < 0,80$.

Nas tabelas de distribuição da idade da menarca, da ocorrência de gestação (ões), aborto (s) e da menopausa os valores de mulheres pacientes e controles estão diferentes do número 86, total de mulheres amostradas em cada grupo, uma vez que alguns dados não foram informados e ou registrados nas entrevistas realizadas.

5. 1.2 Frequências alélicas, genótípicas e análises de associação:

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genótípicas da inserção *Alu*YHG nos dois grupos, casos e controles, assim como da análise de associação, estão demonstrados nas Tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8: Distribuição genotípica das frequências observada e esperada do polimorfismo *Alu*YHG no grupo caso e no presente estudo e quantificação do grau de confiabilidade (χ^2) nos desvios existentes.

ARTRITE	OBSERVADO	ESPERADO	χ^2
<i>IN/IN</i>	6	5,29	0,095
<i>IN/DEL</i>	34	35,42	0,056
<i>DEL/DEL</i>	60	59,29	0,008
TOTAL	100	100	0,159

As distribuições das frequências genótípicas do polimorfismo de presença e ausência de *Alu*YHG em pacientes com artrite reumatoide estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com o valor de $\chi^2_{(1)} = 0,161$, tal que $0,50 < p < 0,70$, mostrando que o desvio não é significativo.

Tabela 9: Distribuição genotípica das frequências observada e esperada do polimorfismo *AluYHG* no grupo controle no presente estudo e quantificação do grau de confiabilidade (χ^2) nos desvios existentes.

CONTROLE	OBSERVADO	ESPERADO	χ^2
<i>Ins/Ins</i>	2	9	5,444
<i>Ins/Del</i>	56	42	4,667
<i>Del/Del</i>	42	49	1,000
TOTAL	100	100	11,111

As distribuições das frequências genotípicas do polimorfismo *AluYHG* no grupo controle demonstraram alteração no equilíbrio de Hardy-Weinberg, com o valor de $\chi^2_{(1)} = 11,111$, tal que $p < 0,001$, portando os desvios são significativos. A disparidade deve-se à diminuição dos homocigotos e aumento de heterocigotos entre os indivíduos do grupo controle, indicando a existência de algum fator que estaria favorecendo a prevalência de heterocigotos.

Tabela 10: Polimorfismos da inserção *AluYHG*, para os grupos de casos e controles, cálculos de associação (*OR*) entre a presença (Inserção) e/ou ausência (Deleção) do alelo e o desenvolvimento de AR, os valores de intervalo de confiança (IC, 95 %) e os valores de *p*.

Alelos e Genótipos	Casos (n)	Freq.	Controles (n)	Freq.	<i>OR</i>	<i>p</i>	C (95%)
<u>Inserção <i>AluYHG</i></u>							
<i>Ins</i>	46	0,230	60	0,300	697	0,141	0,435-1,116
<i>Del</i>	154	0,770	140	0,700	435	0,141	0,896-2,300
Total de alelos	200		200				
<i>Ins/Ins</i>	6	0,060	2	0,020	128	279	0,552-23,003
<i>Ins/Del</i>	34	0,340	56	0,560	405	003	0,219-0,746
<i>Del/Del</i>	60	0,600	42	0,420	071	016	1,135-3,790
Total de Indivíduos	100		100				

Entre os dados analisados, ressalta-se o valor de associação significativa do genótipo heterocigoto (*Ins/Del*), com *OR* = 0,405, sendo *p* = **0,003**; IC 95 % = 0,219 - 0,746, indicando uma proteção do genótipo ao desenvolvimento da artrite reumatoide. Em relação aos homocigotos para a deleção (*Del/Del*), ou seja, a ausência da Inserção *AluYHG*, revela uma associação positiva com a doença (*OR* = 2,071, sendo *p* = **0,016**, IC 95 % =

1,135 - 3,790), em contraste com os estudos de Hausmann (2012) sobre o polimorfismo da inserção *Alu**YHG* em pacientes com o câncer de mama, que mostrou uma associação positiva da Inserção em homozigose (*Ins/Ins*) e o aparecimento da doença.

Uma vez que o polimorfismo *Alu**YHG* está localizado em uma região intergênica (entre os genes *HLA-G* e *HLA-A*) e ainda não se sabe de alguma consequência fenotípica gerada por ele, uma explicação plausível é de que este *locus* esteja em desequilíbrio de ligação com *HLA-G* e/ou *HLA-A*, estando os alelos **Ins* e **Del* segregando junto com alelos destes outros 2 *loci HLA*, que poderiam conferir proteção ao desenvolvimento da doença ao aparecerem em heterozigose. Desta forma, a combinação é benéfica, estando Inserção e Deleção, devido à localização, próximas aos genes, assim havendo um possível desequilíbrio de ligação com variantes destes genes que confeririam uma proteção em relação ao desenvolvimento de AR.

Mais estudos são indicados para o entendimento desta questão, inclusive uma padronização entre as amostras de casos e controles em relação a marcadores informativos de ancestralidade (AIMs), para um melhor pareamento entre casos e controles, minimizando o aparecimento de associações espúrias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste estudo da associação da inserção *Alu*yHG em pacientes com artrite reumatoide, e de análises epidemiológicas, foi possível observar que:

- ✓ Os dados epidemiológicos consultados através das informações dos questionários dos pacientes com AR e do grupo controle contribuíram para a caracterização das amostras identificadas neste estudo e evidenciou uma frequência seis vezes maior de mulheres entre os pacientes de que a de homens.
- ✓ Verificou-se que a idade de menarca e da menopausa e a ocorrência de gestações e de abortos não diferem significativamente entre as pacientes e o grupo controle.
- ✓ As amostras de pacientes ($n = 100$) com AR e de indivíduos do grupo controle ($n = 100$), genotipadas para a presença e ausência da inserção *Alu*yHG, revelaram uma associação positiva do genótipo *Del/Del* com a doença ($p = 0,016$ e $OR = 2,071$)
- ✓ Os dados também demonstram uma associação significativa negativa do genótipo heterozigoto *Ins/Del* com a doença ($p = 0,003$ e $OR = 0,405$), indicando uma proteção.
- ✓ Este trabalho foi o primeiro estudo que relacionou o polimorfismo *Alu*yHG com o desenvolvimento de artrite reumatoide em Santa Catarina.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C *et al.* Associação do Sistema Histocompatibilidade humano (HLA) com doenças endócrinas autoimunes. *Revista Baiana Saúde Pública*, BA, 2005
- BAILEY, A.D.; SHEN, C.K. Sequential insertion of *Alu* family repeats into specific genomic sites of higher primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.90, p. 7205-7209, 1993.
- BATZER, M. A. *et al.* Standardized nomenclature for *Alu* repeats. *Journal of Molecular Evolution*, v.42, p.3-6, 1996.
- BATZER, M. A.; *et al.* Genetic variation of recent *Alu* insertions in human populations. *Journal of Molecular Evolution*, v. 42, p. 22-29, 1996.
- BATZER, M. A.; DEININGER, P.L. A human-specific subfamily of *Alu* sequences. *Genomics*, v. 9, p. 481-487, 1991.
- BATZER, M, A; DEININGER, P, L. *Alu* repeats and human Genomic diversity. *Nature Reviews Genetics*. V. 3. P. 370-379. 2002.
- BEIGUELMAN, B. *Curso de Bioestatística*. 2. ed.rev. Ribeirão Preto:SBG, 224p., 1991.
- BUENO, V.; PACHECO-SILVA, A. Tolerância oral: uma nova perspectiva no tratamento de doenças autoimunes. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, vol.45, p.79-85, 1999.
- CALICH VL, *et al.* Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*, v.165, p.223-36. 2008
- CROUA, R.B., *et al.* Localization of the OTF3 gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping *Genomics. Cell Mol. Life Sci.*, v. 68, p. 369–395, 1994.
- DANIELS, G.R.; DEININGER, P.L. Integration site preferences of the *Alu* family and similar repetitive DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, v. 13, p. 8939-8954, 1985.

DUNN, D. S. e KULSKI, J. K. Polymorphic *Alu* insertions within the Major Histocompatibility Complex class I genomic region: a brief review. *Cytogenet Genome Res.* v. 110 p. 193–202.2005.

DUNN, D. S., *et al.*, The distribution of major histocompatibility complex class I polymorphic *Alu* insertions and their associations with HLA alleles in a Chinese population from Malaysia. *Tissue Antigens.* V.70. p. 136-143. 2007.

FAINARDI E, R.R., *et al.* 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*, v.142 p. 149-158, 2003.

FARIAS, T. D. J. *Análise Epidemiológica e de Associação dos genes KIR com Artrite Reumatoide.* Florianópolis-SC, 148p, 2012.

FARIAS, T. D. J. *et al.*, Lack of association between interleukin-18 polymorphisms and rheumatoid arthritis. *Rev. Bras. Reumatol.* v.53 p. 199–205. 2013.

FELLET, A.; SCOTTON, A. Como Diagnosticar e Tratar Artrite Reumatoide. *Revista Brasileira de Medicina*, Ed.01 dez, v. 58, 2001.

FISCHER, G.F.e MAYR, W.R. Molecular genetics of the HLA complex. *Wien Klin Wochenschr*, v.113, p. 814-824, 2001.

GENBANK. AluYG_540(with *Alu*) Human chromosome 6 STS Homo sapiens STS genomic, sequence tagged site.

Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=bv681147>> acesso em junho de 2013.

GOOLSBY, M. J. e NEWSOME, G. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2002.

GORONZY J.J., WEYAND C.M. Rheumatoid arthritis: epidemiology, pathology and pathogenesis. Primer on the Rheumatic Diseases. 12th ed. Atlanta: Arthritis Foundation; 2001.

HASLER, J. e STRUB, K. *Alu* elements as regulators of gene expression. *Oxford Journals*. v. 34. p.5491-5497. 2006.

HAUSMANN, L.D. *Análise epidemiológica e de associação de polimorfismos do Complexo Principal de Histocompatibilidade com o câncer de mama em mulheres de Santa Catarina*. Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 64p, 2012.

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

HORTON, R., *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p. 889-899, 2004.

HOUCK, C.M.; RINEHART, F.P.; SCHMID, C.W. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *Journal of Molecular Biology*, v. 132, p. 289-306, 1979.

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

KORENBERG, J. R. e RYKOWSKI, M. C. Human genome organization: *Alu*, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell*, v. 53, p. 391-400, 1988.

KULSKI, J. K., *et al.* The association between HLA-A alleles and an *Alu* dimorphism near HLA-G. *Journal of Molecular Evolution*, v.53, p.114-123, 2001.

KULSKI, J. K., *et al.* *Alu* polymorphism within the MICB gene and association with HLA-B alleles. *Immunogenetics*, v.53, p. 975-979, 2002.

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

LOMONTE, A.B.V.; *et al.* Como diagnosticar e tratar: artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 63, p. 252-262, 2006.

McINNES, I.B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.*, v. 7, p. 429-42, 2007.

McINNES IB, SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* v. 365, p.2205-19, 2011.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v.11, p. 1215, 1988.

MOTA, L.M., *et al.* Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. *Rev Bras. Reumatol.*, vol.51, p. 207-219. 2011.

MOTA, L.M., *et al.* Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev. Bras. Reumatol*, vol.52, p.152-174, 2012.

NISHIMURA, O., *et al.* Associação do HLA-DRB5*01 com proteção contra manifestação cutânea da vasculite reumatoide em pacientes brasileiros. *Rev. Bras. Reumatol.* vol.52, p.366-374, 2012.

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 junho de 2013.

ROBERTS, *et. al.*, A Specific Endonuclease from *Arthrobacter luteus*. *J. Mol Biol.* V.102. p. 157-165. 1976.

ROWOLD, D. J. E HERRERA, R. J. *Alu* Elements and the Human Genome. *Genetica.* v.108. p. 57-72. 2000

SHEDLOCK, A.M.; OKADA, N. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays*, v. 22, p.148-160, 2000.

SKARE TL. *Reumatologia: principios e prática*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

STEWART, C., *et al.*, A Comprehensive Map of Mobile Element Insertion Polymorphisms in Humans. *PLoS Genetics*. v. 7. p. 1-19. 2011.

TOBÓN G.J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.*, v. 35, p. 10-4, 2010.

TROWSDALE, J. The MHC, disease and selection. *Immunology Letters* V.137 p. 1-8. 2011.

WALSER-KUNTZ D.R., *et al.* Mechanisms underlying the formation of the T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Immunity*, 1995.

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

ANEXO 1

- Questionário – Grupo Controle;
 Questionário – Pacientes



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

desangue: _____

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? 83

() 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 (n° de cigarros pordia): _____

Tempo que fuma ou fumou:

Há quanto tempo

parou: _____



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas



Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

QUESTIONÁRIO – PACIENTE

IDENTIFICAÇÃO

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

Nome: _____

Identificação: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () Sim () Não

PARIDADE: 84

Nº de gestações _____ Idade da 1ª
estação _____

Nº de filhos () nulípara N: _____

Abortos () P () E N: _____

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

TRAT. HORMONAL:

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

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do

AC: _____

Tempo que usa ou usou

AC: _____

Há quanto tempo

parou? _____

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

Nome do

Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez

TRH: _____

Há quanto tempo

parou? _____

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO
PACIENTE**

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. Ilíada 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: _____