

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética



HILDSON DORNELAS ANGELO DA SILVA

**Análise de polimorfismos nos genes das citocinas
envolvidas no desenvolvimento da Artrite Reumatoide**

Recife
2016

Hildson Dornelas Angelo da Silva

**Análise de polimorfismos nos genes das Citocinas
envolvidas no desenvolvimento da Artrite Reumatoide**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof^a Dr^a. Paula Sandrin Garcia

Coorientador : Prof^o Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Hildson Dornelas Angelo da

Análise do polimorfismo nos genes das citocinas envolvidas no desenvolvimento da Artrite Reumatoide/ Hildson Dornelas Angelo da Silva– Recife: O Autor, 2016.

147 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Paula Sandrin Garcia

Coorientador: Paulo Roberto Eleutério de Souza

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2016.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Artrite reumatóide 2. Polimorfismo (genética) 3. Citocinas I. Garcia, Paula Sandrin (orientadora) II. Souza, Paulo Roberto Eleutério de (coorientador) III. Título**

616.7227

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-161

Hildson Dornelas Angelo da Silva

Perfil Genético de Citocinas na Artrite Reumatoide

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora:

Dra. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria De Mascena Diniz Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Jacqueline de Azevêdo Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife

2016

Dedico esse trabalho à minha esposa, pessoa que amo incondicionalmente, a qual acordo diariamente ansiando pelo seu sorriso e reconfortante abraço. Te amo Katarina

Agradecimentos

Ao Pai Celestial, fonte de toda minha força e refúgio.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Paula Sandrin Garcia, pela confiança, investimento e compreensão em todos os momentos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, pela sua dedicação, amizade, incentivo e todos os momentos de aprendizado e companheirismo que pude gozar durante todos esses anos.

A minha amiga Prof^a Dr^a. Maria de Mascena Diniz Maia, por todo o auxílio, risadas e frutos que pudemos obter em nossa parceria.

As companheiras de trabalho Géssica Lima e Isaura Gomes, incansáveis e presentes em todo o tempo. Além da compreensão e dedicação.

Aos Prof^{os} Dr^{os} Renê Donizeti Ribeiro Oliveira, Paulo Louzada Júnior e Eduardo Antônio Donadi, pelo material e ajuda sempre que requisitada.

Ao Prof. Dr. Sergio Crovella, pelo exemplo, confiança e ajuda que possibilitou o ingresso no doutorado e desenvolvimento do projeto.

Ao corpo docente do doutorado e ao programa de pós-graduação, pelos conselhos contínuos e constantes estímulos para a formação acadêmica.

Aos meus professores, a todos aqueles que me lecionaram algo nessa vida, aos quais pude me espelhar e utilizar um pouco de cada na minha vida como professor.

Aos pacientes, imprescindíveis no presente estudo, além de ser nosso motivo diário de pesquisar e fazer ciência.

“Viva, Ame, Aprenda e deixe um Legado”

Stephen Covey

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória, crônica e autoimune com manifestações articulares e sistêmicas, e atinge cerca de 1% da população mundial. Fatores genéticos, ambientais e imunológicos estão envolvidos na sua patogênese. Assim, investigamos a possível associação entre polimorfismos de base única (SNP): IL-6 (rs180079518), IL-12B (rs3212227) IL-17A (rs2275913), IL-17F (rs763780), IL-18 (rs549908), IL23R (rs10889677), TNF- α (rs1800629), IFN- γ (rs2430561), com características clínicas e susceptibilidade à AR. Para tal, realizamos um estudo de caso-controle com 90 pacientes e 189 controles saudáveis. A genotipagem foi realizada através da reação de polimerização em cadeia - polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Nossos resultados mostraram que a média de início da doença foi de 45 anos com predominância feminina (9:1). A atividade da doença estava aumentada em 50% dos pacientes, enquanto 71% e 65% foram positivos para o fator reumatoide (FR) e para o anticorpo contra peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP), respectivamente. Observamos associação entre o risco para AR com polimorfismos nos genes IL-18 (OR=3.77, $p<0.0001$) e IL-23R (OR=3.46, $p<0.001$). Além disso, foi observada também associação entre SNPs nos genes IL-17F com DAS28 (OR=5.44, $p=0.031$), IL-6 com FR (OR=4.47, $p=0.0038$) e anti-CCP (OR=3.91, $p=0.0057$). Nosso estudo mostrou associações entre polimorfismos em genes de importantes citocinas envolvidas na AR com a sua susceptibilidade e características clínicas desta doença na população do interior do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.

Palavras chaves: Artrite Reumatoide; Citocinas; SNPs; Inflamação.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease with articular and systemic manifestations and affects about 1% of adults worldwide. Genetic, environmental and immunological factors are observed in the pathogenesis of this disease. Thus, our study investigated the possible association between single nucleotide polymorphisms (SNP): IL-6 (rs180079518), IL-12B (rs3212227) IL-17A (rs2275913), IL-17F (rs763780), IL-18 (rs549908), IL23R (rs10889677), TNF- α (rs1800629), IFN- γ (rs2430561), with the clinical features and RA susceptibility. For this, we conducted a case-control study with 90 patients and 189 healthy controls. Genotyping was performed by Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Our results showed that the onset of RA had a mean age of 45 years with predominance of women (9:1). About 50% of RA patients had high degree of disease activity, while 71% and 65% were rheumatoid factor (RF) and anticitrullinated protein antibodies (ACPA) positive, respectively. It was observed associated between the risk of rheumatoid arthritis and the polymorphisms in genes *IL-18* (OR=3.77 (IC=2.01-7.05), $p<0.0001$) and *IL-23R* (OR=3.46 (IC=1.96-6.09), $p<0.001$). Furthermore, was observed relationship of the SNPs in genes, *IL-17F* with DAS28 (OR=5.44 (IC=1.29-22.85) and *IL-6* with RF (OR=4.47 (IC=1.69-11.79), $p=0.0038$) and ACPA (OR=3.91(IC=1.56-9.78), $p=0.0057$). Our study presents evidence of associations between polymorphisms in genes of important cytokines involved in RA with susceptibility to RA and their clinical characteristics in population in the state of São Paulo, Southeastern Brazil.

Key words: Rheumatoid Arthritis; Cytokines; SNPs; Inflammation.

Lista de Ilustrações

Item	Pág
Figura 1. Fotografia do pintor Pierre Auguste Renoir pintando um quadro. Fotografia do pintor Pierre Auguste Renoir sentado em uma cadeira de rodas. Disponível em: http://medicineisart.blogspot.com.br/2010/06/historia-da-artrite-do-artista-pierre.html. Acessado em: 28/03/2016	5
Figura 2. Fotografia do pintor Pierre Auguste Renoir sentado em uma cadeira de rodas. Disponível em: http://medicineisart.blogspot.com.br/2010/06/historia-da-artrite-do-artista-pierre.html. Acessado em: 28/03/2016	5
Figura 3. Pintura de Pierre Auguste Renoir, intitulada “As grandes banhistas”. Fotografia do pintor Pierre Auguste Renoir sentado em uma cadeira de rodas. Disponível em: http://medicineisart.blogspot.com.br/2010/06/historia-da-artrite-do-artista-pierre.html. Acessado em: 28/03/2016	5
Figura 4. Membrana sinovial inflamada. Processo inflamatório comum na AR, responsável por ocasionar edema, dor e até malformações, sinais patognomônicos da AR.	6
Figura 5. Distribuição geográfica da prevalência da AR. Disponível em: http://buyprovailencheap.org/wp-content/uploads/2013/10/Rheumatoid-arthritis-country.jpg. Acessado em: 28/03/2016	7
Gráfico 1. Distribuição da incidência por faixa etária.	8
Figura 6. Fatores envolvidos na etiopatogênese da artrite reumatoide. Destaque para a participação de fatores genéticos e ambientais que podem ocasionar a desregulação do sistema imune, e assim, desencadear a ação das diversas células que podem participar na patogênese da AR. B: Linfócito B; CD8: Linfócito T CD8; Th1: Linfócito T helper 1; Th2: Linfócito T helper 2; Th17: Linfócito T helper 17. Adaptado da fonte: http://www.medicinanet.com.br/imagens/20100703014028. Acessado em: 28/03/2016.	9
Gráfico 2. Relação dos genes que foram associados a AR ao longo dos anos. As barras em azul indicam os genes relacionados em caucasianos, enquanto as barras em laranja, os genes nas populações japonesas. Adaptado de Viatte et al., 2013.	12
Figura 7. Articulação saudável (a - esquerda) e articulação com processo	16

inflamatório desencadeado (b - direita). É observada na parte b da figura a ativação de várias células imunes, além dos processos envolvidos na resposta inflamatória. Disponível em: http://www.reumart.com.br/uploads/5/8/3/2-/58327609/1886232_orig.jpg. Acessado em: 28/03/2016.

Quadro 1. Critérios para diagnóstico da artrite reumatoide baseados no ACR/EULAR 2010. 20

Figura 8. Panorama da participação da IL-6 na AR, demonstrando a participação da IL-6 na indução de linfócitos, sinoviócitos, macrófagos, neutrófilos e células ósseas, e como consequência, o desencadeamento da produção de anticorpos, mediação da inflamação crônica, destruição da cartilagem, formação do pannus, todos esses, processos importante na AR. Adaptado de: <http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/49/1/15/F1.large-e.jpg>. Acessado em 28/03/2016. 28

Figura 9. Atuação da IL-12 e IL-23 na indução da inflamação. A IL-12 induzindo as células Th1 a produzirem e liberarem IFN- γ , e, como consequência desse processo, a IL-23 é ativada e desencadeia mais o processo inflamatório. Adaptado de: <http://jem.rupress.org/content/198/12/1951/F5.large.jpg>. Acessado em 28/03/16 30

Figura 10. Envolvimento da IL-17 na patogênese da AR, devido a secreção por células Th17 de IL-17, que induzirá a liberação em várias células de mediadores inflamatórios e citocinas, responsáveis pela inflamação, destruição da cartilagem e destruição óssea, todos esses, processos envolvidos na AR. 31
Adaptadode: <http://www.jkma.org/ArticleImage/0119-JKMA/jkma-53-85.jpg>. Acessado em 28/03/16

Figura 11. Funções da IL-18 na ativação inflamatória. Após a liberação de IL-18 por células dendrítica (CD) e macrófagos, esta interleucina desencadeia a ativação de diversas células inflamatórias, que liberaram vários mediadores e citocina, resultando em inflamação, erosão óssea e cartilaginosa. Adaptado de: <http://ard.bmj.com/content/66/11/1411/F2.large.jpg>. Acessado em: 28/03/2016. 34

Figura 12. Envolvimento do TNF no desenvolvimento da AR, por ativação de células endoteliais, monócitos/macrófagos e de fibroblasto e sinoviócitos, que liberam mediadores inflamatórios e ativam células imunes. Adaptado de: <http://media.pharmacologycorner.com/wpcontent/uploads/2009/05/tnfmacrophage.png>. 38

Acessado em: 28/03/2016

Figura 13. Genotipagem do polimorfismo IL-23R +2199 A/C. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: A/C (215, 154 e 61 pb), A/A (215 pb) e C/C (164 e 61 pb).

Figura 14. Genotipagem do polimorfismo IL-23R -308 G/A. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: G/G (87 pb), A/A (107 pb) e G/A (107 e 87 pb). Devido ao pequeno tamanho, a banda de 20 pb não é visualizada.

Figura 15. Genotipagem do polimorfismo IL-6 -174 G/C. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: G/G, G/C e C/C de acordo com a presença da banda de 103 pb.

Figura 16. Genotipagem do polimorfismo IL-17A -197 G/A. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: A/A (102 pb), G/G (68 pb) e A/G (102 e 68 pb). Devido ao pequeno tamanho, a banda de 34 pb não foi visualizada.

Figura 17. Genotipagem do polimorfismo IL-17F +7488 A/G. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: G/A (143, 80 e 63 pb), A/A (80 e 63 pb) e G/G (143 pb). Devido ao pequeno tamanho, a banda de 17 pb não é visualizada.

Lista de Tabelas

Item	Pág
Tabela 1. Diferentes ciclos da AR.	20
Tabela 2. Classificação quanto à gravidade da doença.	22

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
%	Percentual
AIC	Artrite induzida por colágeno
anti-CCP	Anticorpo contra peptídeos citrulinados cíclicos
AP	Artrite psoriásica
AR	Artrite Reumatoide
ARJ	Artrite reumatoide juvenil
DAS28	Índice de atividade da doença 28
dL	Decilitro
DMARDs	Drogas modificadoras do curso da doença
EM	Esclerose múltipla
FC	Região constante das imunoglobulinas
FR	Fator Reumatoide
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-12B	Interleucina 12B
IL-17A	Interleucina 17A
IL-17F	Interleucina 17F
IL-18	Interleucina 18
IL23R	Receptor da Interleucina 23
IL-6	Interleucina 6
JAK2	Janus Kinase

LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MG	Miastenia grave
mg	Miligrama
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MTX	Metotrexato
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Natural killer
OR	Odds ratio
PAD4	Peptidil arginina desaminase 4
PCR	Proteína C-reativa
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate (em inglês)
<i>PTPN22</i>	Gene da tirosina fosfatase 22
Qtde	Quantidade
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
SIR	Síndrome inflamatória de reconstituição imune
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
T helper 17	Célula T auxiliar 17
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFAIP3	Fator de necrose tumoral, proteína alfa induzida 3
TRAF1	Fator 1 associado ao receptor de TNF

VHS	Velocidade de hemossedimentação
α	Alfa
β	Beta
χ^2	Chi-quadrado

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Ilustrações	lii
Lista de Tabelas	lv
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	v
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1.1 Histórico da Artrite Reumatoide	3
2.1.2 Definição da AR	6
2.1.3 Prevalência	7
2.1.4 Etiologia	9
2.1.4.1 Fatores Genéticos	10
2.1.4.2 Fatores Ambientais	13
2.1.4.3 Fatores Imunológicos	13
2.1.5 Fisiopatologia	15
2.1.6 Diagnóstico	17
2.1.7 Tratamento	22
2.1.8 Qualidade de Vida e Impactos Sociais	24
2.2 Citocinas	26
2.2.1 IL-6	27
2.2.2 IL-12B	29
2.2.3 IL-17A e IL-17F	31
2.2.4 IL-18	33
2.2.5 IL-23R	35
2.2.6 TNF- α	37
2.2.7 IFN- γ	39
3. Hipótese	41
4. Objetivos	42
4.1 Geral	42
4.2 Específicos	42
5. Capítulo I	43
6. Capítulo II	53
7. Capítulo III	74
8. Discussão geral	100
9. Conclusões gerais	106
10. Referências bibliográficas	107
11. Anexos	135
12. Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso)	140

1. Introdução

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune, crônica e inflamatória, com manifestações articulares e sistêmicas, caracterizada principalmente pela presença de sinovite crônica, simétrica e erosiva. Embora de etiologia desconhecida, representa a artrite inflamatória mais encontrada, atingindo aproximadamente 1% da população mundial, enquanto no Brasil, estudos indicam uma prevalência da AR em adultos variando de 0,2% à 1%, dependendo da região geográfica. A AR ocorre com maior frequência em mulheres (três mulheres para cada homem) com idade que varia entre 40-60 anos. Sendo uma doença de patogênese multifatorial, onde vários fatores e genes estão envolvidos no seu desenvolvimento, o fator genético é muito importante, como mostrado em vários estudos de recorrência familiar da doença.

Durante o processo patológico é comum o aparecimento de edemas, hiperemia, malformações e dores, características clínicas inflamatórias, que contribuem para que os indivíduos com artrite desenvolvam incapacidade para realização de suas atividades, tanto de vida diária quanto profissional, além da redução da expectativa de vida. Deste modo, a doença representa atualmente um importante problema de saúde pública, como destacado por pesquisas que indicam que os gastos oriundos da AR ultrapassam 1 bilhão de dólares anuais nos Estados Unidos da América. Posto isso, o diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são extremamente importantes para a redução do impacto na qualidade de vida do paciente e prejuízos sociais.

Dentre os fatores genéticos e imunológicos presentes no desenvolvimento desta doença, podemos citar polimorfismos funcionais em genes de citocinas, que podem ser responsáveis por alterar a funcionalidade de tais moléculas ou seus

níveis séricos, achado clínico comum na AR. Citocinas são proteínas chave na resposta imunológica, produzidas por várias células inflamatórias e responsáveis por estimular a proliferação, diferenciação e migração celular, além de controlar a inflamação local e sistêmica, comunicação celular, ativação ou desativação da resposta inflamatória e outras funções. Deste modo, para melhor compreensão dos mecanismos que as citocinas apresentam no desenvolvimento da AR e auxílio nas pesquisas que busquem efeitos contra a AR, estudos genéticos envolvendo a participação de citocinas na sua patogênese são cada vez mais frequentes, pois essas moléculas atuam fortemente na resposta inflamatória presente na doença.

Vários estudos têm procurado compreender a participação dessas moléculas no desenvolvimento da artrite, e seus resultados são responsáveis por avanços no tratamento, como o uso de bloqueadores de TNF- α e imunomoduladores. Entretanto, raros trabalhos científicos são desenvolvidos no território nacional e a falta de informações científicas é clara e preocupante. Estudos como este, que investigue possíveis associações de citocinas e AR nas populações brasileiras, são de extrema importância e podem oferecer um destino diferente na vida de pacientes brasileiros com Artrite Reumatoide.

2. Revisão da Literatura

2.1.1 Histórico da Artrite Reumatoide

O termo “artrite reumatoide” (AR) foi introduzido em 1858 pelo médico londrino Sir Alfred Garrod, substituindo os termos utilizados até então, como: artrite deformadora ou gota reumática, e, a partir desta data, a AR passou a ser registrada nos livros de medicina e prontuários. Entretanto, achados arqueológicos, literários e artísticos indicam que os primeiros casos de AR datam anterior a 4500 a.C. [Short, 1974].

Evidências apontavam que a AR era uma doença predominante entre Egípcios, e pesquisadores que apoiavam essa teoria, baseiam-se em um dos tratados de medicina mais antigo, o papiro Ebers, no qual é descrita uma patologia com sintomas muito semelhantes à artrite reumatoide, e provavelmente a primeira referência a esta doença [Martins, 1989]. Um texto indiano de aproximadamente 300 – 200 a.C, denominado Charak Samhita, descreveu uma patologia que envolvia articulações dolorosas em ambas mãos e pés, que podia se espalhar para outras áreas do corpo, com inchaço, perda de mobilidade, e também febre ocasional e perda de apetite. Igualmente, Hipócrates descreveu a artrite em 400 a.C. sem relatar tipos específicos desta doença, mas com semelhança às descrições acima [Short, 1974; Martins, 1989].

O médico francês, Guillaume de Baillou, foi responsável em 1591 pelas primeiras descrições modernas dos termos reumatismo e artrite, que ele definiu em seu tratado *Liber de Rheumatism et pleurítica dorsali*.

"Todo o corpo dói, em algumas, o rosto está vermelho; a dor é mais grave em torno das articulações, de modo que o menor movimento do pé, mão ou dedos faz com que um grito de dor ... À noite ... a dor torna-se mais grave e o paciente não consegue dormir".

Baillou, atualmente considerado o pai da Reumatologia, usou o termo "reumatismo" para dar descrição de uma doença com inflamação, rigidez muscular e dor nas articulações [Martins, 1989].

Dentre os pacientes com AR, destaca-se o pintor impressionista francês Pierre Auguste Renoir (1841-1919), mundialmente conhecido por suas obras artísticas de grande beleza, mas também por seu exemplo de vida no combate as incapacidades geradas pela doença. Nascido em 25 de fevereiro de 1841, em Limoges (França), foi vítima de uma artrite reumatoide grave nas últimas décadas de sua vida. Não existem relatos médicos da doença, porém pelo acervo de fotografias, cartas pessoais e notas biográficas de pessoas que conviviam com o pintor, é aceito pela comunidade científica o diagnóstico de AR. Contudo, mesmo sentindo cada vez mais dificuldades para segurar os pincéis, Renoir pedia que os amarrasse nas mãos, além de iniciar a arte de esculpir. Também necessitou de auxiliares jovens que o ajudava conforme suas instruções [Louie, 1987]. Abaixo estão fotografias do pintor já debilitado e uma das suas obras de arte mais conhecidas, "as banhistas". É de sua autoria a célebre frase:

"A dor passa, mas a beleza permanece"



Figura 1. Fotografia do pintor Pierre Auguste Renoir pintando um quadro. Disponível em: <http://medicineisart.blogspot.com.br/2010/06/historia-da-artrite-do-artista-pierre.html>. Acessado em: 28/03/2016



Figura 2. Fotografia do pintor Pierre Auguste Renoir na cadeira de rodas. Disponível em: <http://medicineisart.blogspot.com.br/2010/06/historia-da-artrite-do-artista-pierre.html>. Acessado em: 28/03/2016



Figura 3. Pintura de Pierre Auguste Renoir, intitulada "As grandes banhistas". Disponível em: <http://medicineisart.blogspot.com.br/2010/06/historia-da-artrite-do-artista-pierre.html>. Acessado em: 28/03/2016

2.1.2 Definição da AR

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, progressiva, crônica e inflamatória, que atinge principalmente a membrana sinovial, podendo assim, levar à destruição cartilágnea e óssea (Figura 4), embora outros órgãos também possam ser comprometidos. Normalmente, no início do desenvolvimento da AR, os processos inflamatórios atingem primeiramente a membrana sinovial, a qual uma vez inflamada, pode levar à erosões da cartilagem e osso, e provocar dor, inchaço, vermelhidão, sendo que em vários casos chega a causar deformidade da articulação, tornando a AR a principal patologia debilitante nos idosos [McCain, 2009].

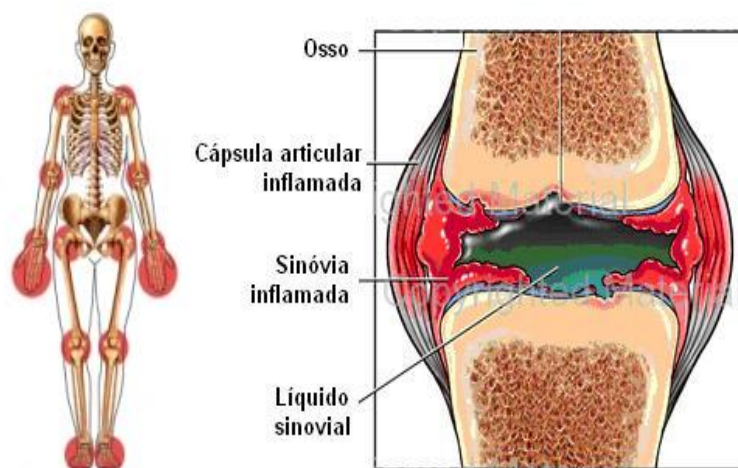


Figura 4. Membrana sinovial inflamada. Processo inflamatório comum na AR, responsável por ocasionar edema, dor e até malformações, sinais patognomônicos da AR. Disponível em: http://fizzioterapia.zip.net/arch2009-10-25_2009-10-31.html. Acessado em: 28/03/2016

As deformidades, limitações para o trabalho e o comprometimento funcional de pacientes com AR e suas consequências, afligem diversos setores sociais, direta ou indiretamente. Do ponto de vista da sociedade, as perdas associadas com a diminuição da produtividade em pacientes com AR incluem, redução do desempenho no trabalho, gastos com tratamentos e aposentadorias precoces, portanto, estando todos relacionados ao alto custo da doença [Li X *et al.*, 2006].

2.1.3 Prevalência

A distribuição do número de pacientes diverge muito quando comparamos diferentes países. A prevalência mundial da AR é cerca de 1%, variando bastante dependendo da região geográfica (Figura 5). O recente estudo de revisão meta-análise desenvolvido por Rudan e colaboradores (2015) comparou a prevalência da AR entre países em desenvolvimento, e levantou a hipótese de que a baixa notificação da doença seria a responsável pelo baixo índice de AR nessas nações. Os resultados abaixo foram obtidos deste estudo: 0,40% para o Sudeste Asiático, 0,37% para o Leste Mediterrâneo, 0,62% para Europeu, 1,25% para a América e de 0,42% para as regiões do Pacífico Ocidental [Rudan *et al.*, 2015].

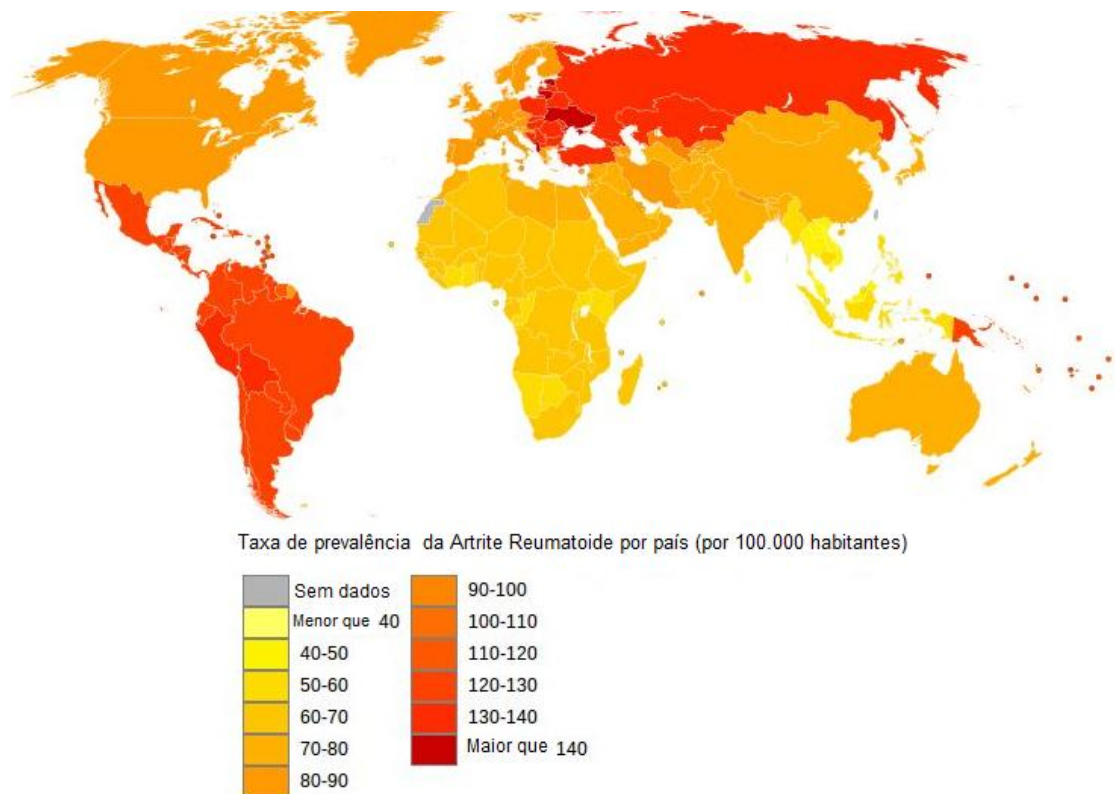


Figura 5. Distribuição geográfica da prevalência da AR. Disponível em: <http://buyprovailencheap.org/wp-content/uploads/2013/10/Rheumatoid-arthritis-country.jpg>.

Acessado em: 28/03/2016

Poucos estudos no Brasil investigaram a prevalência em sua população, podendo-se destacar o trabalho multicêntrico desenvolvido por Marques Neto e colaboradores (1993) que identificaram que os índices variavam dependendo da região brasileira de 0,2 a 1,0% entre adultos. Em outro estudo realizado por Senna e colaboradores em 2004, foi estimada uma taxa de prevalência de 0,46% na região do sudeste brasileiro.

Quanto à distribuição por gênero, fica evidente um predomínio maior do sexo feminino, atingindo normalmente proporções de cerca de três mulheres para cada homem [Roberts *et al.*, 2015]. Após o período da menopausa ocorre uma diminuição dessa diferença [MacGregor and Silman, 1998], resultado provavelmente do decréscimo dos níveis séricos de andrógenos relacionados com o aumento da idade [Wilder, 1996]. A maior incidência ocorre entre a quarta e sexta década de vida, como mostrado no gráfico abaixo (Gráfico 1) [Roberts *et al.*, 2015]. Entretanto, se a doença for diagnosticada antes dos 16 anos de idade, o quadro clínico é denominado artrite reumatoide juvenil (ARJ) [McCain, 2009].



Gráfico 1. Distribuição da incidência por faixa etária.
Adaptado de Roberts *et al.*, 2015

2.1.4 Etiologia

A complexidade da AR é refletida na sua etiologia ainda não totalmente conhecida e em ser uma patologia multifatorial. Corroborando com essa ideia, diversos fatores estão envolvidos na susceptibilidade e fisiopatologia, entre eles, fatores genéticos, fatores ambientais, estímulos antigênicos infecciosos e alterações imunológicas (Figura 6).

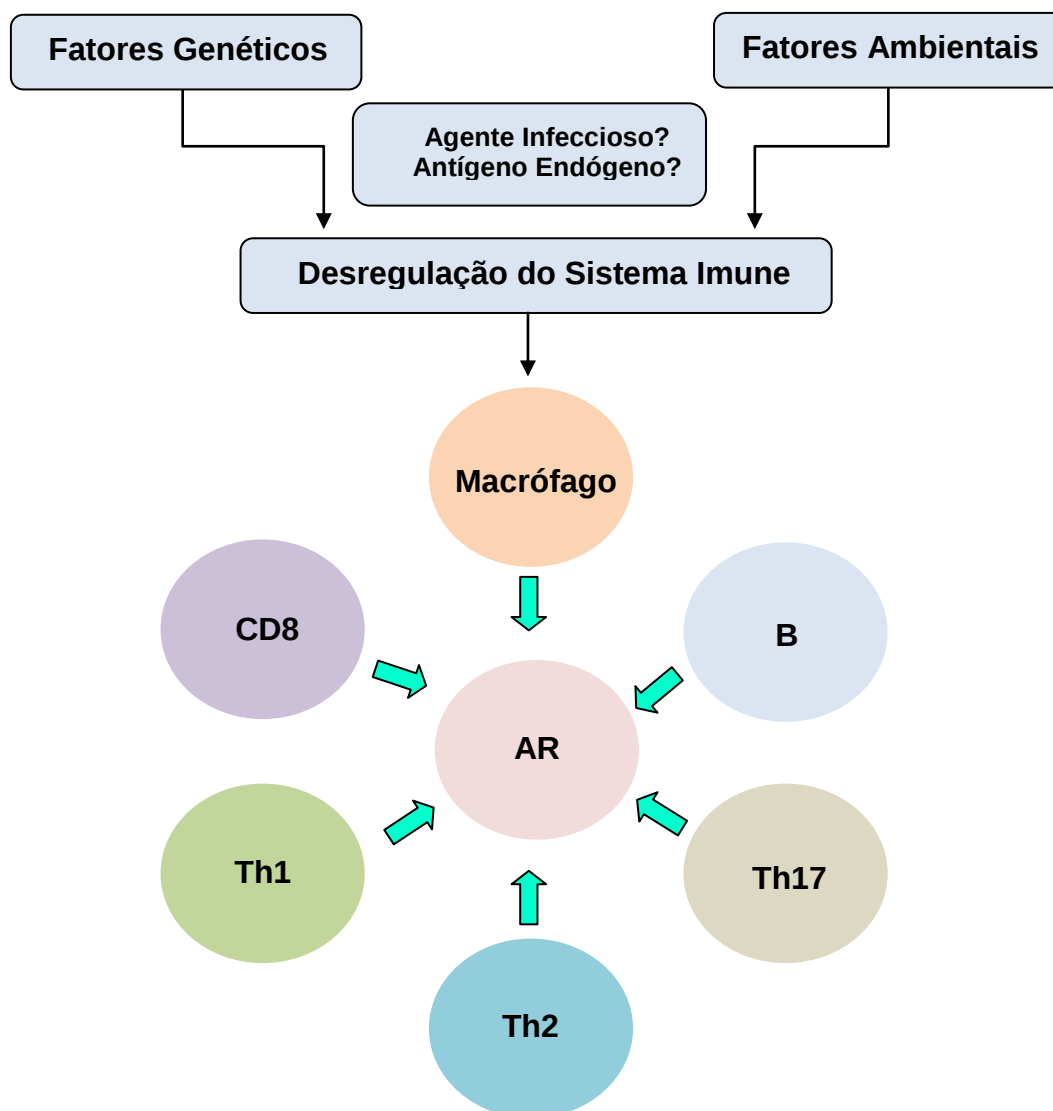


Figura 6. Fatores envolvidos na etiopatogênese da artrite reumatoide. Destaque para a participação de fatores genéticos e ambientais que podem ocasionar a desregulação do sistema imune, e assim, desencadear a ação das diversas células que podem participar na patogênese da AR. B: Linfócito B; CD8: Linfócito T CD8; Th1: Linfócito T helper 1; Th2: Linfócito T helper 2; Th17: Linfócito T helper 17. Adaptado da fonte: <http://www.medicinanet.com.br/imagens/20100703014028>. Acessado em: 28/03/2016

2.1.4.1 Fatores Genéticos

Os fatores genéticos são importantes no desenvolvimento da AR, pois podem estar relacionados com as manifestações clínicas e a gravidade da doença, podendo se apresentar como possíveis marcadores prognósticos. Estudos que analisaram composição familiar, principalmente observando o comportamento da AR em gêmeos monozigóticos e dizigóticos, indicam que o fator genético está fortemente ligado a patologia da AR [Svensen *et al.*, 2014; Terao *et al.*, 2016]. Além disso, a literatura científica defende que existe a participação de múltiplos e diferentes genes, com colaborações variadas na susceptibilidade à doença, além de efeitos genéticos interativos que poderiam contribuir para o risco individual diferenciado [Saada *et al.*, 2016].

Um desses indicativos está na grande quantidade de genes associados a AR, como os genes do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) responsáveis pela apresentação de antígenos às células T. Seus genes estão localizados no braço curto do cromossomo 6, são altamente polimórficos e estão associados a diversas outras patologias autoimunes, como, lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla (EM), artrite psoriásica (AP), e miastenia grave (MG), como indicado no estudo recente de meta-análise desenvolvido por Bettencourt e colaboradores (2015).

A região HLA contém cerca de 220 genes, muitos dos quais têm funções imunorreguladoras [Newton *et al.*, 2004], como os genes *HLA-DR4* e *HLA-DRB1*, que foram associados com a positividade para o anticorpo contra peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP), nos estudos de Zhou e colaboradores (2013) e Ding e colaboradores (2009), respectivamente.

O gene *TNFAIP3*, outro importante gene da região descrita acima, codifica a proteína A20, a qual participa da sinalização efetuada pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Kool *et al.*, 2011), importante regulador da ação do fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), citocina importante na patogênese da AR e encontrada em altos níveis nos pacientes [Wei *et al.*, 2015]. Além disso, a escassez de *TNFAIP3* em ratos resulta em inflamação crônica, indicando que esta molécula desempenha um papel dominante na autoimunidade [Saad *et al.*, 2016].

Outros genes fora da região do HLA também são associados a AR, dentre eles, o responsável para produção da Tirosina fosfatase 22 (*PTPN22*), proteína utilizada como biomarcador para a doença em populações caucasianas [Kurko *et al.*, 2013]. Outros genes como o fator 1 associado ao receptor de TNF (*TRAF1*) também mostra importante associação com AR [Plenge *et al.*, 2007], já a peptidil arginina desaminase 4 (*PAD4*) parece ter uma relação com AR em populações asiáticas, porém não em européias [Coenen e Gregersen, 2009].

Com a descoberta da relação de novos genes com a doença, está sendo possível compreender melhor a complexidade da etiologia da doença e consolida a necessidade contínua de pesquisas nesta área (Gráfico 2).

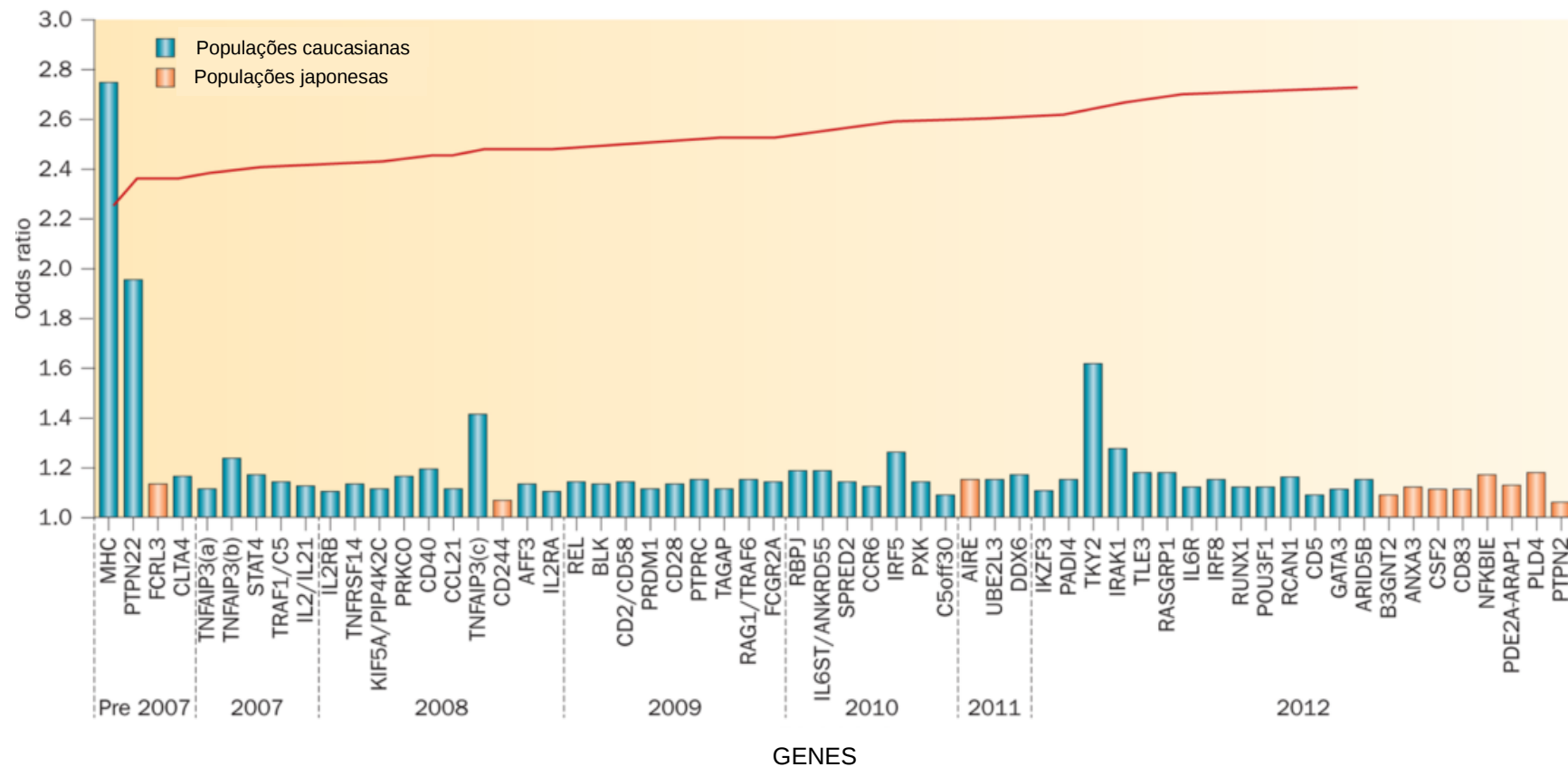


Gráfico 2. Genes foram associados a AR ao longo dos anos. As barras em azul indicam os genes relacionados em caucasianos, enquanto as barras em laranja, os genes nas populações japonesas. Adaptado de Viatte *et al.*, 2013

2.1.4.2 Fatores Ambientais

Os fatores ambientais desencadeadores atuam sinergicamente com os fatores genéticos e, determinam o desenvolvimento da AR. Dentre eles, o cigarro tem sido atribuído como um dos fatores de risco mais fortes para a AR, uma vez que, o tabagismo modula o sistema imune [George *et al.*, 1997] através da redução de células natural killer (NK), supressão de células Th17 e dendríticas [Kazantseva *et al.*, 2012], além de induzir a disfunção de linfócitos T [Shiels *et al.*, 2014]. O estudo de meta-análise publicado por Sugiyama e colaboradores (2010) obteve resultados que comprovam a associação significativa entre o tabagismo e a AR. Os resultados demonstraram que homens que fumavam ou fumaram apresentavam cerca de duas vezes mais chance de risco para AR, enquanto as mulheres que fumavam ou fumaram apresentavam um risco de 1.3 vezes maior.

A localização geográfica e perfil socioeconômico também foram apontados como fatores de risco, devido uma maior prevalência ter sido observada em países desenvolvidos (Figura 5). Contudo, como citado acima, é provável que essa disparidade seja algo relacionado ao grau de subnotificação desta doença em países em desenvolvimento [Rudan *et al.* 2015].

Além destes, o perfil hormonal, infecções, paridade, obesidade, etilismo, entre outros, já são indicados como fatores ambientais envolvidos no desenvolvimento ou progressão da AR [Jorgensen *et al.*, 1996; Kallberg *et al.*, 2009; Karlson *et al.*, 2013].

2.1.4.3. Fatores Imunológicos

O processo inflamatório presente na sinóvia ocorre a partir da interação de um antígeno com algum linfócito do fluido sinovial, induzindo a produção de

moléculas mediadoras da inflamação, como citocinas e interleucinas. Uma vez ativados, os linfócitos T CD4 (presentes em grande quantidade na membrana sinovial), produzem citocinas, as quais irão desencadear a ativação de macrófagos, responsáveis pela produção de outras moléculas que auxiliarão na manutenção da inflamação [Roberts *et al.*, 2015].

A formação de imunocomplexos induzirá a ativação das proteínas do sistema complemento e de processos de fagocitose, resultando normalmente tanto em inflamação articular, quanto nas manifestações extra-articulares. Dentre os possíveis anticorpos formados, podemos destacar o Fator Reumatoide (FR), presente em boa parte dos pacientes com AR e que apresenta uma peculiaridade: atua se ligando na porção FC (região constante) de outras imunoglobulinas [Goldbach-Mansky *et al.*, 2000]. A positividade para o FR é utilizada como critério para diagnóstico da AR e pode estar presente em até 90% dos pacientes. Entretanto, também é encontrado em pessoas saudáveis, principalmente idosos, e portadores de outras patologias autoimunes e infecciosas [Silveira *et al.*, 2007].

O anti-CCP é outro importante achado clínico no diagnóstico da AR, apresentando maior especificidade quando comparado ao FR, além de também ser considerado por muitos um marcador de prognóstico para maior gravidade da AR [Schellekens *et al.*, 2000; Andrade e Leser, 2004]. Este anticorpo é produzido para interagir com proteínas que sofreram citrulinização, modificação pós-traducional de conversão de arginina em citrulina, processo comum durante a resposta inflamatória [Schellekens *et al.*, 2000].

Diversas proteínas citrulinadas estão presentes na sinóvia de pacientes com AR [Vincent *et al.*, 2002]. Baseados nisso, uma proteína citrulinada cíclica (CCP no inglês) que é facilmente detectada por teste ELISA foi desenvolvida no

ano 2000 para o reconhecimento de anti-CCPs no soro de pacientes [Schellekens *et al.*, 2000]. Após os anos seguintes, outras proteínas citrulinadas foram desenvolvidas com o objetivo de aprimorar a detecção desses anticorpos nos testes laboratoriais. Entretanto, mesmo apresentando uma especificidade de até 96% [Schellekens *et al.*, 2000], o papel dessas imunoglobulinas na patogênese da AR permanece pouco compreendido [Aggarwal *et al.*, 2009].

2.1.5 Fisiopatologia

No início da resposta inflamatória são observadas alterações na membrana sinovial, como hiperplasia de suas células e extensiva angiogênese. Posteriormente, moléculas de adesão são ativadas nas células endoteliais e inicia-se a liberação de várias citocinas, as quais induzem a migração de células imunológicas para a membrana sinovial, formando assim um infiltrado celular, composto principalmente de linfócitos e plasmócitos [McInnes e Schett, 2011] (Figura 7).

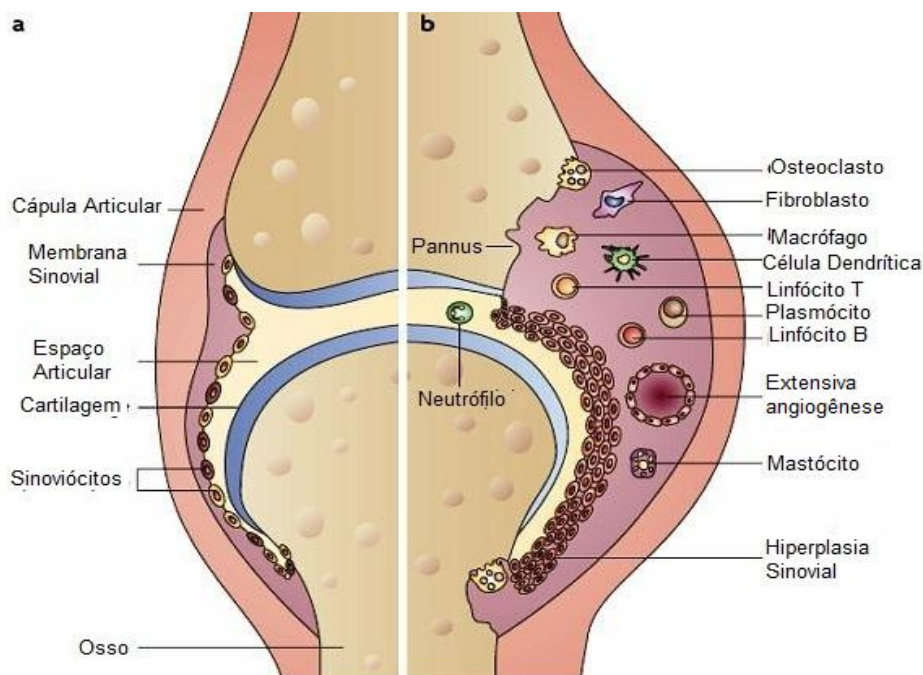


Figura 7. Articulação saudável (a - esquerda) e articulação com processo inflamatório desencadeado (b - direita). É observada na parte b da figura a ativação de várias células imunes, além dos processos envolvidos na resposta inflamatória. Disponível em: http://www.reumart.com.br/upload-s/5/8/3/2/58327609/1886232_orig.jpg. Acessado em: 28/03/2016.

Logo após, derivado da membrana sinovial surge o pannus, estrutura tecidual granulomatosa responsável pela produção de metaloproteinases de matriz e outras enzimas que são capazes de degradar colágeno e proteoglicanos, promovendo invasão e destruição das cartilagens, ossos e ampla destruição articular, característica frequente em pacientes com AR. Além disso, a migração de leucócitos atraídos pela liberação de citocinas a partir do tecido sinovial, pela ativação e expressão de moléculas de adesão tais como E-selectina, pela molécula de adesão intercelular (ICAM), e pelas moléculas de adesão celular vascular, constituem a maior parte do componente celular do líquido sinovial [Geboes *et al.*, 2009].

Para o entendimento da complexa fisiopatologia da AR é necessário o conhecimento da atuação sinérgica de fatores ambientais, genéticos e imunológicos.

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da AR não pode ser confirmado conclusivamente através de exames laboratoriais e achados histológicos ou radiológicos [McInnes e Schett, 2011]. Para isso, é necessário um conjunto de sintomas, achados clínicos e análise médica [Aletaha *et al.*, 2010].

O diagnóstico de AR inicialmente era feito baseando-se nos critérios revisados de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR no inglês) [Arnett *et al.*, 1988], no qual a confirmação da doença ocorreria quando o paciente apresentava pelo menos 4 dos 7 critérios a seguir, sendo os critérios 1-4 presentes por no mínimo 6 semanas:

- 1 - Rigidez matinal** - rigidez matinal com duração de pelo menos uma hora até a melhora máxima;
- 2 - Artrite em pelo menos três articulações** - ao menos três áreas simultaneamente afetadas, com edema de partes moles ou derrame articular, observado pelo médico;
- 3 - Artrite nas mãos** - artrite em punhos, metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais;
- 4 - Artrite simétrica** - envolvimento simultâneo de áreas de ambos os lados do corpo;
- 5 - Nódulos reumatoides** - nódulos subcutâneos sobre proeminências ósseas, superfícies extensoras ou em regiões justa-articulares;

6 - Presença do fator reumatoide – presença de quantidades anormais do fator reumatoide;

7 - Alterações radiográficas – rarefação óssea justa-articular ou erosões ósseas localizadas em radiografias de mãos e punhos.

Entretanto, devido ser comum os critérios ACR estarem ausentes nos estágios iniciais da doença [Aletaha *et al.*, 2005], como exemplo, as alterações radiológicas, os nódulos reumatoides, FR e anti-CCP, foi estabelecido novos métodos para o diagnóstico precoce na AR. Com esse objetivo, em 2010 ocorreu uma reunião do ACR e da Liga Europeia contra o Reumatismo (no inglês EULAR), na qual foi proposto um novo sistema baseado em pontuações que seria capaz de identificar possíveis pacientes que poderiam provavelmente evoluir para quadros clínicos da AR mais graves, e assim, iniciarem o tratamento mais precocemente [Aletaha *et al.*, 2010].

Essa nova classificação é dividida em quatro segmentos que possuem pontos atribuídos a cada dado clínico (Quadro 1). O primeiro segmento representa a quantidade e o local das articulações afetadas (pontuação de 0 a 5), referindo-se a articulações edemaciadas e dolorosas ao exame médico, que podem ser comprovadas com a presença de sinovite, identificada por exames de imagens. O segmento seguinte refere-se à presença e quantidade do FR e do ACPA (pontuação de 0 a 3), importantes achados clínicos no desenvolvimento de AR. Contudo, o FR normalmente é detectado em torno de 50-60% dos pacientes com AR [Schellekens *et al.*, 2000], deste modo, não sendo ideal biomarcador para o diagnóstico. O terceiro (pontuação de 0 a 1) é atribuído a achados clínicos indicativos indiretos de inflamação, a velocidade de hemossedimentação (VHS) e a proteínas C-reativa (PCR), encontrados normalmente alterados durante um

processo inflamatório. O último segmento (pontuação de 0 a 1) trata-se do tempo de duração dos sintomas, dividindo em até 6 meses e em mais de seis meses.

ACR/EULAR 2010		
Critérios para diagnóstico da Artrite Reumatoide		
Distribuição das articulações (0-5)		
1 grande articulação	0	
2-10 grandes articulações	1	
1-3 pequenas articulações (grandes articulações não contabilizadas)	2	
4-10 pequenas articulações (grandes articulações não contabilizadas)	3	≥6 = AR definida
>10 articulações (pelo menos uma pequena articulação)	5	E se o resultado for <6?
Sorologia		
FR negativo e ACPA negativo	0	Os pacientes podem preencher os critérios ...
Baixa positividade para FR ou para ACPA	2	
Alta positividade para FR ou para ACPA	3	➤ Prospectivamente ao longo do tempo (cumulativamente)
Reação na fase aguda		
PCR normal e VHS normal	0	➤ Retrospectivamente se os dados em todos os quatro domínios foram adequadamente registrados no passado
PCR anormal ou VHS anormal	1	
Duração dos Sintomas		
<6 semanas	0	
>6 semanas	1	
		
Baixo: < 3x acima do limite normal (ALN). Alto: > 3x acima o limite normal		
Adaptado de Aletaha et al. 2010		

Quadro 1. Critérios para diagnóstico da artrite reumatoide baseados no ACR/EULAR 2010

Apesar da AR ser a doença reumatológica mais comum, sua progressão variada dificulta na predictabilidade do seu ciclo, requerendo um contato frequente entre paciente e médico, principalmente nos primeiros três meses de evolução do quadro clínico, a fim de estabelecer um tratamento individualizado e mais eficaz. Estudos têm sugerido que, de uma forma geral, três tipos de evolução podem ocorrer nos pacientes com AR (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes cursos clínicos apresentados por pacientes de Artrite Reumatoide.

Tipo	Qtde	Padrão	Características clínicas
I	20%	Monocíclico	Período limitado em até um ano, apresentando dor e rigidez articular. Inicialmente os pacientes atendem aos critérios de diagnóstico de AR. Entretanto, os sintomas e sinais desaparecem mesmo sem necessidade de medicação.
II	70%	Policíclico	Ciclos intermitentes com períodos de severidade (crise inflamatória) e remissão (melhora clínica).
III	10%	Progressivo	Curso de piora contínua com acometimento articular progressivo sem ciclos de melhoras e pioras, podendo desenvolver rápida destruição das articulações.
Qtde – Quantidade; % - percentual.			Adaptado de Silva <i>et al.</i> , 2003.

Achados clínicos de comprovação inflamatória, tal como, proteína C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS), quantidade de regiões afetadas e medidas da qualidade de vida, acompanhados de uma avaliação constante da capacidade funcional das articulações e do seu acometimento, são informações imprescindíveis na avaliação da progressão da doença e no enquadramento do tipo do ciclo [Silva *et al.*, 2003].

Para uma boa assistência médica, é aconselhado que o paciente com AR seja avaliado com regularidade, focando-se no comportamento da atividade da doença, sendo esta aferida por ferramentas que se baseiam em questionários médicos e dados clínicos que analisam a quantidade de articulações afetadas, avaliação da intensidade da dor, indicadores sorológico de inflamação (VHS e PCR), capacidade funcional da articulação, entre outros [Kwoh, 2002]. Assim, foram propostos e adotados vários questionários, sendo o DAS (do inglês Disease Activity Score) [van der Heidje *et al.*, 1992] o mais utilizado devido sua facilidade de utilização e validações baseadas nos critérios adotados pela EULAR. Contudo, posteriormente foi publicado na literatura a versão simplificada, o DAS28 [Prevoo *et al.*, 1996], que baseia-se em 28 articulações, além dos parâmetros PCR e VHS.

Inicialmente a avaliação dos pacientes para classificação quanto à gravidade da doença é feita através de sintomas de atividade da doença, dentre eles, graduação da dor, rigidez matinal, capacidade funcional do paciente, quantidade de articulações afetadas e a presença de manifestações extra-articulares. Além desses, são analisados marcadores de inflamação, tais como, velocidade de hemossedimentação, proteína C reativa e a lesão articular constatada por radiografia [Kwoh, 2002]. A partir dessas informações, os pacientes são classificados em quatro grupos de atividade, como explicado na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação da atividade da doença de acordo com os critérios do DAS28.

Gravidade	Padrão	Características clínicas
Inativo		Paciente não apresenta os sintomas ativos
Leve		Na AR leve o paciente apresenta dor, em pelo menos 3 articulações com sinais de inflamação, nenhuma manifestação extra-articular, fator reumatoide costumeiramente negativo, elevação dos reatores de fase aguda e nenhuma evidência de erosão ou perda de cartilagem no estudo radiográfico
Moderado		Na AR moderada, o paciente apresenta de 6 a 20 articulações acometidas, doença comumente restrita às articulações, elevação de reatores de fase aguda, fator reumatoide positivo e evidência de inflamação no estudo
Grave		Quando a AR é grave o paciente apresenta mais de 20 articulações persistentemente acometidas, elevação dos reatores de fase aguda, anemia crônica, hipoalbuminemia 2, fator reumatoide positivo, manifestações extra-articulares e estudos radiográficos demonstrando erosões e perda de cartilagem radiográfico

Adaptado de Dorland *et al.*, 1999.

2.1.7 Tratamento

O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são imprescindíveis para a prevenção de lesões articulares irreversíveis e danos à capacidade funcional dos pacientes. Os medicamentos que são utilizados na

terapêutica são destinados a diminuir os efeitos da autoimunidade, minimizando os processos inflamatórios e suas consequências [Albers *et al.*, 2001].

A forma de como se trata a AR evoluiu com o passar dos tempos e os resultados clínicos estão conseguindo minimizar os efeitos da doença, como indicado pelas diferentes estratégias medicamentosas, as quais iniciaram com a síntese e utilização da aspirina em 1897, passando pela primeira administração de cortisona em 1949 e, finalmente, a terapia anti-TNF no início da década de 1990 [Hart, 1976; Pham *et al.*, 2011]. Com isso, a terapêutica tem conseguido uma melhor mobilidade e qualidade de vida dos pacientes com AR [McInnes e Schett, 2011].

O tratamento é composto por medidas medicamentosas, não medicamentosas ou cirúrgicas, com os objetivos de minimizar a atividade da doença, diminuir o risco de lesões irreversíveis nas articulações, aliviar a dor, e melhorar assim, a qualidade de vida dos pacientes. Na terapêutica, com uso de fármacos, a ACR/EULAR indica as classes de drogas a seguir: os anti-inflamatórios não esteroides, os glicocorticoides, as drogas antirreumáticos modificadores da doença (no inglês, Disease Modifying Anti-rheumatoid Drugs - DMARD) e terapia alvo com imunobiológicos [Singh *et al.*, 2012]. O diagnóstico precoce e o início da administração de DMARDs em até três meses é de extrema importância para evitar danos às articulações, que ocorrem nos dois primeiros anos da doença e são muitas vezes irreversíveis [O'dell, 2004]. Também é indicada a utilização de combinações dessas drogas aos pacientes que não responderam ao tratamento, com algumas delas isoladas, como exemplificado:

"Em doentes que responderam insuficientemente a Metotrexato (MTX) e/ou outras estratégias sDMARD, com ou sem glicocorticoides, DMARD deve ser iniciada com MTX " [Singh *et al.*, 2012].

No tratamento não medicamentoso, é necessário o acompanhamento do paciente desde o início da doença, com atenção especial, a capacidade funcional do mesmo, orientando-os a programas terapêuticos indicados para prevenção ao dano articular, manutenção da mobilidade do sistema locomotor e do sistema cardiorrespiratório. Normalmente, é indicado o tratamento com fisioterapia, terapia ocupacional, atividades de alongamento e relaxamento, com o objetivo central de fortalecer a musculatura e garantir que o paciente continue a exercer as atividades rotineiras, não deixando de lado o repouso, outro fator importante na sua recuperação [Kwoh, 2002].

O paciente com AR necessita de uma avaliação contínua, que permita acompanhar os resultados no andamento do tratamento e realizar intervenções quando necessárias, além da assistência de uma equipe multidisciplinar, a qual ofereça além da medicação, a educação do paciente e de seus familiares. O acompanhamento multidisciplinar é imprescindível para a administração correta dos diferentes problemas ocasionados pela doença sobre as mais diversas dimensões da vida do paciente. Além de ampliar as diferentes manobras de intervenção, pode retardar a progressão da AR, diminuindo o impacto dos sintomas sobre a funcionalidade do paciente [Adams *et al.*, 2004; Sands e Goodacre, 2013; Almeida *et al.*, 2015].

2.1.8 Qualidade de Vida e Impactos Sociais

Em 1947, a Organização Mundial de Saúde, propôs o conceito de qualidade de vida que busca incorporar todos os aspectos da vida humana,

inclusive as dimensões física, funcional, emocional, social e espiritual, através da percepção do próprio indivíduo sobre a suas expectativas, padrões e preocupações dentro do contexto da cultura e dos sistemas de valores nos quais ele vive [WHO, 1948]. Nas últimas décadas, tem crescido o interesse na qualidade de vida dos pacientes, tanto no Brasil quanto em outros países. Uma vez que, com o aumento da prevalência das doenças crônico-degenerativas, com a diminuição nas taxas de mortalidade e, finalmente, com um aumento na expectativa de vida, o impacto social de doenças debilitantes como AR geram prejuízos em diversos setores socioeconômicos [Birnbaum *et al.*, 2010; Kawatkar *et al.*, 2012; van Vilsteren *et al.*, 2015].

Apesar dos grandes avanços no tratamento para AR, a doença ainda está associada a altos níveis de morbidade e mortalidade precoce [Abasolo *et al.*, 2015]. Embora a progressão da lesão articular venha diminuindo ao longo das últimas décadas como resultado da utilização mais eficaz dos DMARDs e a introdução de imunobiológicos, a remissão da doença ainda não é conseguida em uma proporção significativa de pacientes [Gülfe *et al.*, 2009], levando a invalidez, perda da qualidade de vida, redução da capacidade de trabalho e aumento da utilização de cuidados de saúde por pacientes com AR [van Vilsteren *et al.*, 2015].

Em termos socioeconômicos, AR é a mais comum e mais importante das doenças reumáticas inflamatórias, com uma prevalência de 1% na população mundial, estima-se que no ano de 2005 apenas nos Estados Unidos da América os gastos com a AR superaram 22,3 bilhões [Kawatkar *et al.*, 2012], enquanto outro trabalho indica o valor de 39,2 bilhões [Birnbaum *et al.*, 2010].

Portanto, baseado no movimento mundial de busca contínua de vida saudável, como também do bem-estar biopsicossocial com atenção às condições

de vida, relacionado a aspectos de saúde, de moradia, de educação, de lazer, de transporte, de liberdade, de trabalho, de autoestima, entre outras [Santos *et al.*, 2002]. Os pacientes com AR estão à margem desse movimento, na busca de uma melhor qualidade de vida, principalmente em nações em desenvolvimento [Rudan *et al.*, 2015].

2.2 Citocinas

As citocinas são moléculas com um papel fundamental no controle da inflamação, com destaque para as várias envolvidas na patogênese e destruição articular dos pacientes com AR [Astry e Moudgil, 2011]. O envolvimento dessas moléculas na susceptibilidade e progressão da doença pode ser ressaltado pelo sucesso do tratamento com anticorpos anti-TNF e pelos níveis alterados de diversas citocinas no líquido sinovial e soro em pacientes com AR [Masui *et al.*, 2003; Petrovic-Rackov e Pejnovic, 2006; Kerekes *et al.*, 2008; Paradowska-Gorycka *et al.*, 2010; Metawi *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2015].

A produção de citocinas pró-inflamatórias tem uma participação central na iniciação e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial. Principalmente na resposta mediada por células Th1, que produzem a liberação de interferon-gama (IFN- γ), estimulando assim, a liberação de TNF- α , interleucina-1 beta (IL-1 β) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais [Klimiuk *et al.*, 1999]. Entretanto, pesquisas tem proposto a participação cada vez maior das células e moléculas do perfil Th17 na patogênese da AR [Kageyama *et al.*, 2009; Metawi *et al.*, 2011]. Outras pesquisas encontraram

também alterações nos níveis séricos de interleucinas do perfil Th2 e AR [Paradowska-Gorycka *et al.*, 2010; Gambhir *et al.*, 2010].

Diante disso, é evidente a heterogeneidade da participação das citocinas na patogênese da doença, o que poderia explicar o fato de que nem todos os indivíduos respondem a uma mesma terapia, ou das diversas manifestações observadas nos pacientes durante o curso da doença. Todas essas informações qualificam cada vez mais estudos em prol do entendimento do papel dessas moléculas na ampla e complexa etiopatogênese da AR.

2.2.1 IL-6

A interleucina 6 (IL-6), uma das citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da AR, é um importante mediador da resposta da fase aguda e seus níveis encontram-se aumentados no fluido sinovial e tecido de pacientes com AR [Wei *et al.*, 2015]. A IL-6 apresenta um papel importante na inflamação, pois regula as respostas humorais e celulares, além de promover a angiogênese por indução de moléculas de adesão intracelular [Nakahara *et al.*, 2003], além de contribuir para a indução e manutenção do processo autoimune através da modulação e diferenciação de células B e células Th17 [Navarro-Millán *et al.*, 2012].

O papel central da IL-6 na patogênese da AR ocorre através das alterações na membrana sinovial, como neovascularização, infiltração de células inflamatórias, e hiperplasia dos sinoviócitos, processos que agem em conjunto para produzir o pannus (tecido inflamatório com características tumorais). A produção de vasos sanguíneos recém-formados é necessária no desenvolvimento e manutenção da sinovite, pois suportam a infiltração de células inflamatórias e o

crescimento e sobrevivência das células sinoviais. Para isto, um número de fatores de crescimento e citocinas com atividade angiogênica são liberados, e entre eles, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), liberado a partir de sinoviócitos ativados pela IL-6. Defende-se que o VEGF é o fator angiogênico mais importante na patogênese da AR [Maruotti *et al.*, 2006]. Além disso, IL-6 pode estar envolvida na participação de outros processos no desenvolvimento da AR (Figura 8), como a erosão óssea, desencadeada pela ativação do sistema do receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante (RANKL), produção de imunocomplexos, através da indução de formação de anticorpos, ou também do processo inflamatório crônico, mantido pela participação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos.

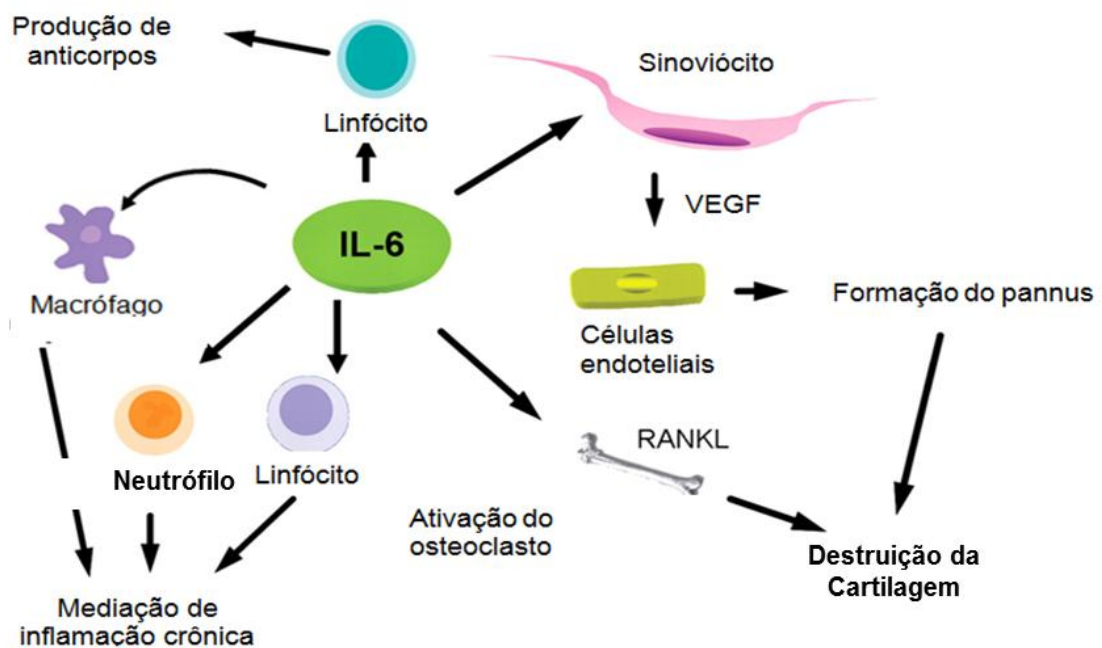


Figura 8. Panorama da participação da IL-6 na AR, demonstrando a participação da IL-6 na indução de linfócitos, sinoviócitos, macrófagos, neutrófilos e células ósseas, e como consequência, o desencadeamento da produção de anticorpos, mediação da inflamação crônica, destruição da cartilagem, formação do pannus, todos esses, processos importante na AR. Adaptado de: <http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/49/1/15/F1.large.jpg>. Acessado em 28/03/2016.

O gene da IL-6 foi mapeado no braço curto do cromossomo 7 (21p15p) organizado em cinco éxons e quatro íntrons [Chen *et al.*, 1989, May *et al.*, 1988]. Vários polimorfismos na região promotora do gene de IL-6 foram descritos [Godarzi *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011], entre eles, o polimorfismo de nucleotídeo único (no inglês SNP) na posição -174 (rs1800795), responsável por uma transversão de uma guanina por uma citosina e que afeta os níveis de IL-6 [Fishman *et al.*, 1998], sendo associado a muitas doenças, incluindo artrite juvenil sistêmica [Fishman *et al.*, 1998], síndrome de Sjögren, [Hulkkonen *et al.*, 2001], doença de Alzheimer [Papassotiropoulos *et al.*, 2001], diabetes mellitus do tipo II [Libra *et al.*, 2006], doenças cardiovasculares [Georges *et al.*, 2001], LES [Chua *et al.*, 2009; Hamdy *et al.*, 2011] e AR [Li F *et al.*, 2014; Li X *et al.*, 2014].

2.2.2 IL-12B

A IL-12, citocina constituída por dois componentes, o p35 (IL-12A) e p40 (IL-12B), é produzida por macrófagos, células dendríticas (DC) e granulócitos e está presente em tecido sinovial de pacientes com AR [Vervoordeldonk e Tak, 2002]. Esta citocina eleva o nível de IFN- γ e induz a diferenciação de células do perfil Th1. Além disso, a IL-12 ativa funções citotóxicas dos linfócitos T CD8 + e células NK (Figura 9) [Krausz *et al.*, 2012]. O gene que codifica a IL-12B está localizado no cromossomo 5 (5q31-33) e apresenta o SNP na posição -1188 A/C (rs3212227), dentro da região 3' não traduzida do gene da IL-12B, o qual é responsável por influenciar a produção de IL-12 [Stanilova e Miteva, 2005].

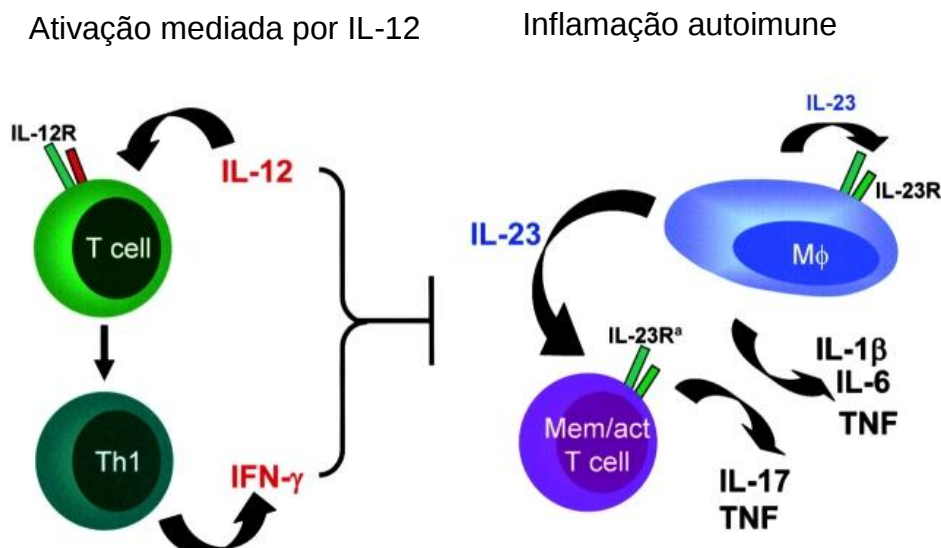


Figura 9. Atuação da IL-12 e IL-23 na indução da inflamação. A IL-12 induzindo as células Th1 a produzirem e liberarem IFN- γ , e, como consequência desse processo, a IL-23 é ativada e desencadeia mais o processo inflamatório. Adaptado de: <http://jem.rupress.org/content/198/12/1951/F5.large.jpg>. Acessado em 28/03/16.

Petrovic-Rackov e Pejnovic (2006) observaram que níveis de IL-12 estavam aumentados no soro e no fluido sinovial de pacientes com AR, quando comparados com pacientes com osteoartrite, e o nível desta citocina, correlacionada com a atividade da doença. Ademais, o importante trabalho desenvolvido por Li e colaboradores (2012), reforça a participação direta da IL-12 na AR, uma vez que, utilizando silenciamento gênico, os pesquisadores conseguiram concluir que a inativação da produção de IL-12 em células dendríticas inibia a progressão da artrite induzida por colágeno (no inglês CIA) em modelo animal da artrite reumatoide humana. Entretanto, poucos estudos investigaram a associação do polimorfismo IL-12B -1188 A/C com o desenvolvimento de AR ou suas características clínicas, e dentre eles, vale ressaltar o trabalho elaborado por Alvarez-Rodriguez e colaboradores (2009), no qual nenhuma associação foi encontrada.

2.2.3 IL-17A e IL-17F

As células Th17 são conhecidas por estarem envolvidas na patogênese de doenças autoimunes, doenças de inflamação e rejeição imunológica de tecidos transplantados, sendo classificadas dentro do novo subconjunto de células T que secretam a IL-17 (interleucina 17). A família da IL-17 é formada por várias citocinas intimamente relacionados, incluindo IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Os membros mais estudados da família, IL-17A e IL-17F, estão localizados na região cromossômica 6p12 [Iwakura *et al.*, 2008]. Estas duas citocinas mostram similaridades estruturais, se ligam ao mesmo receptor e exibem atividades biológicas semelhantes [Reynolds *et al.*, 2010]. A ligação de IL-17 ao seu receptor inicia vias de sinalização que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, além de induzir o recrutamento de neutrófilos (Figura 10) [Chang *et al.*, 2006; QianY *et al.*, 2007].

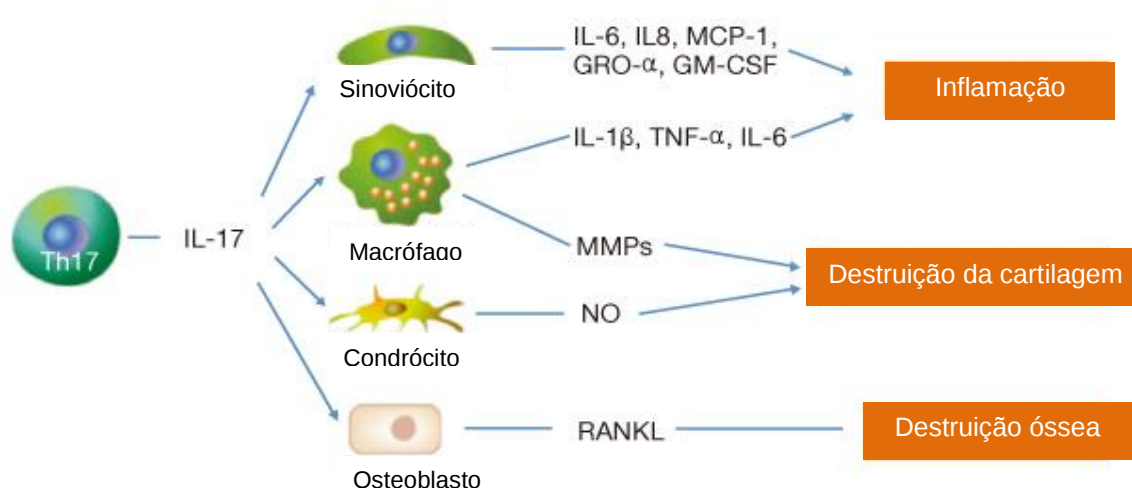


Figura 10. Envolvimento da IL-17 na patogênese da AR, devido a secreção de IL-17 por células Th17, que induzirá a liberação em várias células de mediadores inflamatórios e citocinas, responsáveis pela inflamação, destruição da cartilagem e destruição óssea, todos esses, processos envolvidos na AR. Adaptado de: <http://www.jkma.org/ArticleImage/0119-JKMA/jkma-53-853-g001-l.jpg>. Acessado em 28/03/16.

A IL-17 é uma iniciadora precoce da inflamação, uma vez que induz a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios em fibroblastos, osteoblastos,

sinoviócitos, condrócitos, macrófagos, células epiteliais e endoteliais. Está envolvida no desenvolvimento da inflamação e defesa do hospedeiro contra a infecção por induzir a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF e), quimiocinas (CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2, e CCL7), peptídeos antimicrobianos (defensinas e proteínas S100), e as metaloproteinases de matriz (MMP1, MMP3 e MMP13) [Iwakura *et al.*, 2011].

Devido à sua participação central no processo inflamatório, vários estudos em pacientes e modelos animais avaliaram a implicação de IL-17 na AR, e observaram que ela estava presente em níveis elevados no sobrenadante da membrana sinovial de pacientes com a doença [Kotake *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2013] e não de pacientes com osteoartrite (OA) [Chabaud *et al.*, 1999]. Além disso, em outro estudo altos níveis de IL-17 foram correlacionados com a gravidade da doença nos pacientes de AR [Metawi *et al.*, 2011].

Esses achados podem ser decorrentes da influência de SNPs em regiões de DNA relacionados ao controle da expressão ou da função dessas citocinas, como o polimorfismo IL-17A -197 G/A (rs2275913), que está localizado dentro do motivo de ligação para o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), um importante regulador da transcrição, e que desse modo, influencia a expressão da IL-17A [Espinoza *et al.*, 2011], ou do SNP IL-17F +7488 A/G (rs763780) resultante da substituição de uma histidina por uma arginina no aminoácido 161 (H161R), provocando uma diminuição na capacidade da IL-17F de induzir a expressão de determinadas citocinas e quimiocinas [Kawaguchi *et al.*, 2006]. Partindo desses conhecimentos, dois grupos de pesquisa buscaram identificar polimorfismos nos genes da IL-17 e possíveis associações com AR e observaram

relação com aumento de risco da doença e os SNPs IL-17A -197 G/A [Shen *et al.*, 2015] e IL-17F +7488A/G [Bogunia-Kubik *et al.*, 2015].

2.2.4 IL-18

A interleucina 18 (IL-18) atua como um cofator junto a IL-12 no estímulo da produção de interferon gama (IFN- γ) em células Th1 [Okamura *et al.*, 1995]. Vários estudos *in vivo* e *in vitro* identificaram a IL-18 como um importante elo entre as respostas imune inata e adaptativa, e um regulador de ambos na imunidade celular e humoral [Nakanishi *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2007; Dinarello, 2007; Arend *et al.*, 2008]. Essa interleucina, identificada como o fator de indução do interferon, é produzida por muitos tipos de células, em particular por macrófagos, tem atividades pró-inflamatórias e induz a ativação de diversos tipos de células, incluindo células inflamatórias e vasculares (Figura 11).

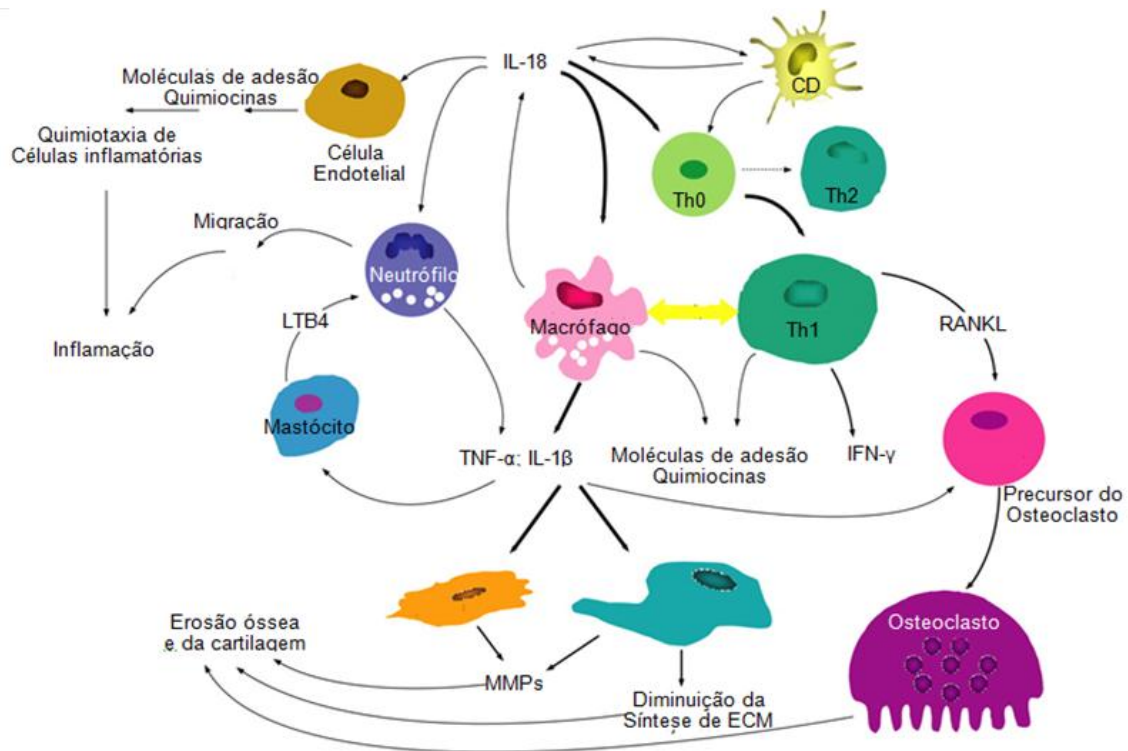


Figura 11. Funções da IL-18 na ativação inflamatória. Após a liberação de IL-18 por células dendríticas (CD) e macrófagos, esta interleucina desencadeia a ativação de diversas células inflamatórias, que liberaram vários mediadores e citocina, resultando em inflamação, erosão óssea e cartilágnea. Adaptado de: <http://ard.bmj.com/content/66/11/1411/F2.large.jpg>. Acessado em: 28/03/2016.

Juntamente com a IL-2, IL-18 também pode estimular a produção de IL-13 e de outras citocinas Th2 [Arend et al., 2008]. Assim, não é surpreendente a associação encontrada entre IL-18 com várias patologias como: infecções, doenças inflamatórias, câncer, bem como síndrome metabólica e aterosclerose [Netea et al., 2006; Park et al., 2007; Dinarello, 2007]; e também no envolvimento da patogênese de várias doenças autoimunes, incluindo a artrite reumatoide [Lee et al., 2007], doença de Crohn [Gao et al., 2015], LES [Lin et al., 2008] entre outras.

O gene da IL-18 humano, localizado no cromossomo 11 (11q22.2-q22.3), é composto por seis éxons e cinco íntrons [Kruse et al., 2003]. Além dos

polimorfismos já consolidados neste gene, o SNP na posição -105 A/C (rs549908) ainda pouco estudado, atraiu atenção por demonstrar capacidade de influenciar na produção de IL-18 em monócitos purificados. Essa conclusão foi observada pelo estudo funcional que estimulou essas células com lipopolissacarídeos (LPS) e PMA (do inglês, Phorbol 12-myristate 13-acetate) e observou que a produção de IL-18 variava de acordo com o alelo presente nessa posição [Arimitsu *et al.*, 2006]. Ademais, esse polimorfismo já foi associado a várias doenças, como AR [Lee *et al.*, 2007], LES [Lin *et al.*, 2008], doença de Kawasaki [Chen *et al.*, 2009] e Asma [Higa *et al.*, 2003].

Pesquisas demonstraram a importância da IL-18 na indução e manutenção da inflamação crônica durante a sinovite reumatoide experimental e clínica [Dai *et al.*, 2007; Volin e Koch, 2011]. Além disso, o aumento da expressão de IL-18 foi detectado nas membranas sinoviais de pacientes com AR [Masui *et al.*, 2003]. Diante disto, pesquisadores defendem o potencial de IL-18 como um alvo terapêutico na AR [McInnes *et al.*, 2005].

2.2.5 IL-23R

A IL-23, citocina pró-inflamatória composta de uma subunidade p40 em comum com a IL-12 e uma subunidade p19 exclusiva [Di Meglio *et al.*, 2011], é classificada como um mediador pró-inflamatório responsável por manter o equilíbrio entre os efetores inflamatórios e a resposta mediada por células T, apresentando-se desta forma como um fator importante no desenvolvimento de inflamação, como mostrado anteriormente na Figura 10 [Izcue *et al.*, 2008]. Além disso, estudos indicam que a IL-23 desempenha um papel chave no

desenvolvimento de células Th17, responsáveis pela produção de IL-17, interleucina envolvida na indução e produção de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6, quimiocinas, e alguns outros novos fatores adicionais responsáveis pela AR [Brentano *et al.*, 2009] e outras doenças autoimunes como: doença de Crohn (CD), psoríase, e doença inflamatória do intestino (DII) [Langrish *et al.*, 2005; Duerr *et al.*, 2006; Cargill *et al.*, 2007; Bettelli *et al.*, 2008; Di Meglio *et al.*, 2011].

Níveis aumentados da IL-23 e IL-17 foram encontrados no fluido sinovial de indivíduos com AR [Kim *et al.*, 2007], além da correlação deste achado com altas titulações de TNF- α no soro de pacientes [Wendling, 2008]. Ademais, o nível sérico de IL-23 em pacientes com AR está correlacionado com o número de articulações edemaciadas e com o DAS28; enquanto a sua redução, após tratamento com infliximab, está associada à velocidade de sedimentação de eritrócitos (VHS), sugerindo que a IL-23 pode desempenhar um papel importante na patogênese da AR [Kageyama *et al.*, 2009].

O receptor da IL-23 (IL-23R), composto por duas subunidades, incluindo uma subunidade comum com a IL-12RB1 e a subunidade comum com a família Janus Kinase (JAK2) [Di Meglio *et al.*, 2011], media a atividade da IL-23 [Taleb *et al.*, 2009]. O gene da IL-23R, localizado no cromossomo 1 (1p31.3), codifica uma proteína transmembrana de 629 aminoácidos. Sua expressão ocorre em células T ativadas ou de memória, nas células NK, e, em menor quantidade, em macrófagos e células dendríticas [Parham *et al.*, 2002]

O SNP localizado na região 3' (UTR), +2199 A/C (rs10889677), pode alterar o sítio de ligação de fatores de transcrição ou a estrutura do RNA mensageiro, e assim, influenciar tanto na expressão de IL-23R, quanto no

processo inflamatório através da atuação sinérgica entre IL-23 e IL-17 [Chen *et al.*, 2011]. Além disso, foi relatada uma associação entre o polimorfismo descrito acima no gene do receptor IL-23R com a suscetibilidade à AR [Faragó *et al.*, 2008], e entre os outros SNPs, rs11209026, rs2201841 e rs1884444, com outras patologias inflamatórias, como a Doença Inflamatória do Intestino [Venegas *et al.*, 2008], Artrite Psoriática [Popadic *et al.*, 2014] e Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imune (SIR) [Ogola *et al.*, 2014], respectivamente. Portanto, a citocinas IL-23 e o seu receptor (IL-23R) têm sido propostos como alvos terapêuticos potenciais para a AR.

2.2.6 TNF- α

O fator de necrose tumoral alpha é uma citocina pró-inflamatória potente que desempenha um papel importante nas respostas inflamatória e imune, apresentando um papel chave nos processos patológicos da AR [Vassalli, 1992]. O TNF- α estimula a produção de citocinas, aumenta a expressão de moléculas de adesão, promove ativação dos neutrófilos e da diapedese e atua como um cofator para a ativação das células T e na produção de anticorpos (Figura 12) [López *et al.*, 2010].

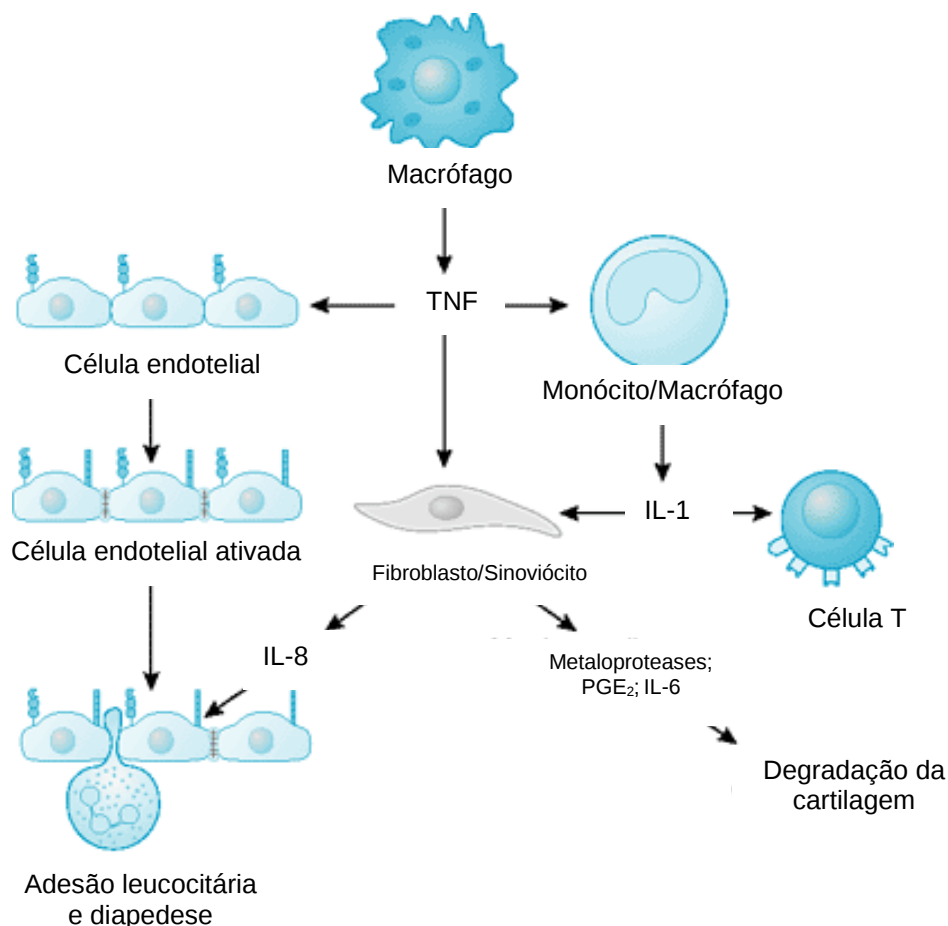


Figura 12. Envolvimento do TNF no desenvolvimento da AR, por ativação de células endoteliais, monócitos/macrófagos e de fibroblasto e sinoviócitos, que liberam mediadores inflamatórios e ativam células imunes. Adaptado de: <http://media.pharmacologycorner.com/wpcontent/uploads/2009/05/tnfmacrophage.png> Acessado em: 28/03/2016.

O TNF- α desempenha um papel fundamental na AR através da expressão de citocinas e quimiocinas, na ativação de fibroblastos e sinoviócitos, na promoção da angiogênese e na supressão de células T reguladoras, podendo assim resultar em edema nas articulações e dor, características clínicas da doença [McInnes e Schett., 2011]. Portanto, a inibição do TNF- α tem sido utilizada como uma estratégia terapêutica particularmente bem sucedida, uma vez que, a utilização de drogas antirreumáticas modificadoras do curso da doença

(DMARDs) contra o TNF- α melhorou drasticamente o tratamento da doença [McInnes e Schett, 2007; Venkateshan *et al.*, 2009].

O gene que codifica o TNF- α está localizado no cromossomo 6 (6p21.3), dentro da região de classe III do MHC [Constantini *et al.*, 2002], e as variações genéticas na região promotora desse gene têm sido associadas com uma vasta gama de doenças autoimunes [Fragoso *et al.*, 2014]. Por esta razão, o SNP localizado na posição -308 (-308 G/A), que afeta a expressão de TNF- α , pode ser utilizado como um marcador de grande interesse tanto no início do tratamento e no prognóstico e evolução da doença. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a presença de uma adenosina (alelo TNF2) em vez de uma guanosina (alelo TNF1) na posição -308 pode ser responsável pelo aumento geral da atividade de transcrição [Wilson *et al.*, 1997].

Vários estudos examinaram as potenciais contribuições do polimorfismo TNF- α -308 A/G para susceptibilidade à AR [Hussein *et al.*, 2011; Al-Rayes *et al.*, 2011; Boechat *et al.*, 2013; You *et al.*, 2013]. Além disso, concentrações elevadas de TNF- α foram encontradas no plasma, fluido sinovial, e do tecido de pacientes com AR [Wei *et al.*, 2015]. Assim, dentre as citocinas mais estudadas na AR, o TNF- α apresenta destaque na utilização da terapêutica e demonstra-se como um forte candidato a biomarcador da doença.

2.2.7 IFN- γ

O interferon gamma (IFN- γ), produzido por várias células, incluindo as células NK, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ [Billiau e Matthys, 2009], é uma citocina chave no controle das respostas imunitárias dependentes de células Th1, estando relacionada na proteção contra organismos intracelulares e no

desenvolvimento de doenças autoimunes [Kerekes *et al.*, 2008]. IFN- γ também tem um efeito direto sobre a inflamação, através do aumento da expressão do complexo MHC (Complexo de Histocompatibilidade Maior) de classe II e da ativação de macrófagos na produção de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , proteases, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico [Firestein, 2005].

O gene IFN- γ encontra-se no cromossomo 12 (12q24.1) e se estende por cerca de 5,4 kb, contendo quatro éxons. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP rs2430561) e microssatélites (rs3138557) no primeiro íntron do gene foram associados à uma quantidade alterada na produção *in vitro* de IFN- γ , uma vez que este polimorfismo pode alterar a eficiência de ligação do NF- κ B [Pravica *et al.*, 2000] e, assim, influenciar na progressão da doença autoimune. Embora pequenas quantidades de IFN- γ sejam produzidos por células T sinoviais [García-Bermúdez *et al.*, 2012], os níveis séricos de IFN- γ foram encontrados significativamente mais elevados em pacientes com AR [Kerekes *et al.*, 2008], além da diminuição da produção desta citocina por células T CD8+ durante o tratamento com bloqueadores de TNF- α [Aravena *et al.*, 2011], demonstrando assim a importância do IFN- γ no processo patológico da AR.

3. Hipótese

Polimorfismos funcionais em genes de citocinas importantes na Artrite Reumatoide poderiam influenciar na função ou expressão dessas moléculas, e assim, estarem associados com a susceptibilidade ou características clínicas desta doença, o que poderia levar a identificação de possíveis marcadores para esta patologia.

4. Objetivos

4.1 Geral

Analisar a presença de polimorfismos em genes de citocinas em pacientes com Artrite Reumatoide e indivíduos saudáveis e verificar se existe associação com a susceptibilidade à doença e suas características clínicas na população do interior do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.

4.2 Específicos

1. Determinar a frequência dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-6 (rs180079518), IL-12B (rs3212227) IL-17A (rs2275913), IL-17F (rs763780), IL-18 (rs549908), IL23R (rs10889677), TNF- α (rs1800629), IFN- γ (rs2430561) em pacientes com AR e indivíduos saudáveis.

2. Analisar as frequências das principais características clínicas da AR na população estudada.

3. Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com a susceptibilidade à doença e com suas principais manifestações clínicas da doença.

5. Capítulo I – Artigo publicado na revista Tissue Antigens

(Qualis B1) – Data: 01/10/2015

Interleukin-18, Interleukin-12B and Interferon- γ gene polymorphisms in Rheumatoid Arthritis Brazilian's patients: a pilot study.

Hildson Dornelas Angelo^{1,2}

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva³

Renê Donizeti Ribeiro Oliveira⁴

Paulo Louzada-Júnior⁴

Eduardo Antônio Donadi⁴

Sergio Crovella⁵

Maria de Mascena Diniz Maia⁶

Paulo Roberto Eleutério de Souza⁶

Paula Sandrin-Garcia⁵

Institutions:

¹ Professor MSc of Federal Institute of Pernambuco, Campus Garanhuns, PE, Brazil

² Post-graduate program in Genetics Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

³ Post-graduate program in Applied Molecular and Cellular Biology, University of Pernambuco (ICB/UPE);

⁴ Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil.

⁵ Professor Doctor of Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

⁶ Professor Doctor of Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Correspondence to: Prof. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – ZIP CODE: 52171-900 - Recife/PE-Brasil. e-mail: prsouza30@gmail.com

Abstract

Polymorphisms in *IL-18*, *IL-12* and *IFN-γ* genes are associated with different levels of cytokines expression and have been associated with Rheumatoid Arthritis (RA). *IL-18* +105 A/C, *IL-12B* +1188 A/C and *IFN-γ* +874 T/A polymorphisms were analyzed by RFLP-PCR and ARMS-PCR from 90 RA patients and 186 healthy individuals. There were significant differences to *IL-18* +105 A/C polymorphism between the RA and control groups (OR=3.77; P<0.0001). Individual carriers of the variant allele C had a 3.77-fold increased risk of for RA (p=0.0032). No association was observed for *IL-12B* and *IFN-γ* polymorphisms. Our finds suggest a possible role for *IL-18* polymorphism in the RA susceptibility in studied population.

Key words: Rheumatoid; Arthritis; Cytokines; Polymorphism.

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease that could affects multiple tissues and systems, especially promoting joints destruction. Its prevalence is about 1% in general population, and women are mostly affected, in a ratio of 3:1. The pathogenesis of the disease points out to an interaction of environmental and genetic factors, among them, the immune response mediated by cytokines [1,2].

Interleukin (IL)-18 is an important proinflammatory cytokine in the pathogenesis of autoimmune diseases, since acts as a costimulant for the production of IFN- γ , and leads to the production of IL-2, IL-12, and tumor necrosis factor- α [3]. IL-18 can improve the infiltration of inflammatory cells into the synovial tissues, increasing the manifestation of RA [4]. Among the polymorphisms in the *IL-18* gene, the SNP at position +105 A/C (rs549908) has recently attracted attention, and related with RA [5] and other diseases as Systemic Lupus Erythemathosus (SLE) [6], Kawasaki disease [7] and Asthma [8].

IL-12 is a cytokine composed by two components, the p35 (IL-12A) and p40 (IL-12B), and is a key role in the differentiation or IFN- γ production by RA synovial tissue, mainly by acting on synovial T cells. It also influences Th1 immune response and can induce the differentiation of natural killer and CD4 T cells [9]. A previous study showed that the *IL-12* +1188 A/C (rs3212227) polymorphism can decrease the IL-12 production [10].

IFN- γ are produced by synovial T cells and playing a central role of activated T cells known as Th1 helper cells. The SNP +874 T/A (rs2430561) may reduce the levels of IFN- γ , since this polymorphism alter the efficiency of binding of nuclear factor-kB and thus could influence in the progression of autoimmune disease [11]. Thus, the aim of this study was to find out whether the SNPs *IL-18*

+105 A/C, *IL-12B* +1188 A/C and *IFN-γ* +874 T/A are associated with susceptibility to RA.

The patient group consisted of 90 individuals with RA at the Division of Clinical Immunology of the Hospital of Clinicas of Ribeirão Preto of University of São Paulo, Brazil . One hundred and eighty six healthy blood donors constituted the control group with mean age 35.65 (SD ±10.14). All the participants inhabited the same geographic region and the distributions of gender between the case and control groups were identical. The diagnosis of RA was in agreement with the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) classification criteria [12]. The Ethics Committee of the Health Sciences Center of University of São Paulo approved the study (protocol 2981/2009), and informed consents were gained from all patient and control groups in the study.

The *IL-18* +105 A/C and *IL-12B* +1188 A/C polymorphisms were detected by RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction) using primers 5'- TGTTTATTGTAGAAAACCTGGAATT-3' (sense) and 5'- CCTCTACAGTCAGAATCAG-T-3' (antisense) to *IL-18* SNP and 5'- GATATCTTTGCTGTATTTGTATAGTT-3' (sense) and 5'- AATATTAAATAGCATGAAGGC-3' (antisense) to *IL-12B* SNP. After PCR, the products were digested with the *TaqI* enzyme restriction as previously described by Lee et al. [5] and Carvalho et al [13], respectively. The genotyping of the *IFN-γ* +874 T/A polymorphism was performed using ARMS-PCR (amplification refractory mutation system), using specific primers (5'-generic TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'; T-specific primer 5'- TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3' and A-specific primer 5'-TTCTTACAACACA-

AAATCAAATCA-3'), the protocols was based on Carvalho et al. [13]. The products of digestion and amplicons were stained with Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology), subjected to electrophoresis on 3% agarose gel and visualized in UV light. A total of 20% of samples were randomly chosen for sequencing to verify genotyping results.

The genotype distribution and allele frequencies between the RA patients and controls were compared using the χ^2 -test. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were used as a measure of the strength of the association between SNPs and RA. Data analysis was performed using BioEstat 5.0, which also was used to test Hardy-Weinberg equilibrium for genotype distributions in the cases and controls. $P < 0.05$ was considered significant. Power analyses in terms of effect-size calculations were assessed in all cohorts using the G*Power 3.1 software [14].

In this case-control study, we analyzed the association between the polymorphisms in the *IL-18*, *IFN- γ* and *IL-12B* genes and RA susceptibility. Genotype frequencies for both patients with RA and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium, except for SNP *IFN- γ* +874 T/A and SNP *IL-18* +105 A/C in the patient group. In a total of 90 RA patients the mean age was 56.34 (SD $\pm$ 11.67), 91.2% were women, 71.2% were rheumatoid factor positive, 81.1% and 18.9% were Caucasian-derived and African-derived, respectively, 60% had ACPA strongly positive (>60 IU/mL), 58% had the smoking habit and 64.4% had DAS28 ≥ 5.1 .

A significant difference for *IL-18* +105 A/C polymorphism between RA patients and controls was observed in this study and RA individuals carriers of the C allele (AC + CC genotypes) showed higher risk for RA (OR= 3.77) (Table 1).

Power calculations revealed that with a 5% significance level and the parameters of our study, the sample size would be able to detect an overall mean difference between the groups (Power ($1-\beta$ err prob) = 0.9955). On the other hand, Lee et al evaluating RA Asian patients showed an association with A allele [5]. Furthermore, similar findings to our results has been also described in other inflammatory diseases such as Systemic Lupus Erythematosus [6], Kawasaki Disease [7] and Asthma [8]. It is important to note, to our knowledge, no published study has attempted to indicate the relationship of the SNP *IL-18* +105 A/C with RA in Brazilian population up to now. A functional study demonstrated a significant association between *IL-18* +105 A/C polymorphism and the capability to produce IL-18 by purified monocytes [15]. Recently, is increasing the interest of IL-18 as a therapeutic target in RA [16], since the IL-18 interacts with IL-12, acts as a potent inducer of IFN- γ production from established Th1 cells and could be produced by monocytes/macrophages, articular chondrocytes, dendritic cells, synovial fibroblasts and keratinocytes [3]. Moreover, altered levels of IL-18 sometimes induce pathological effect in various organs and has been demonstrated its participation in the induction and perpetuation of chronic inflammation in RA [16].

The IL-12 and IFN- γ are proinflammatory cytokines and their levels or SNPs are associated with autoimmune disease such as RA [9,11]. The SNP *IL-12B* +1188 A/C had been associated with some inflammatory disease, as Psoriatic Arthritis [17] or Asthma [18]. Similarly, the SNP *IFN- γ* +874 T/A were statistically related with SLE [19] and Asthma [20]. However no association for both these *IL-12B* and *IFN- γ* polymorphisms and RA was observed in our analysis, moreover it is important to note the lack of studies about these associations.

In conclusion, the *IL-18* +105 CC genotype and C allele were associated with increased susceptibility to Brazilian RA patients. Although our data indicate that the *IL-18* gene polymorphism could be a possible candidate genetic marker to susceptibility for RA further functional studies are needed to clarify better the participation of this SNP in the development of disease.

Acknowledgments

We thank the patients and their families, whose collaboration and understanding have made this work possible. This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] Harris ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1277-89.
- [2] Danneskiold-Samsøe B, Bartels EM, Dreyer L. [Gender differences in autoimmune diseases illustrated by rheumatoid arthritis]. *Ugeskr Laeger* 2007; 169: 2440-2.
- [3] Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:11-24.
- [4] Leung BP, McInnes IB, Esfandiari E, Wei XQ, Liew FY. Interleukin-18 can promote synovial inflammation through activation of peripheral blood and synovial neutrophils. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1253.
- [5] Lee CC, Lin WY, Wan L et al. Interleukin-18 gene polymorphism, but not interleukin-2 gene polymorphism, is associated with rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 2007; 59: 433-9.
- [6] Lin YJ, Wan L, Sheu JJ et al. A/C polymorphism in the interleukin-18 coding region among Taiwanese systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2008; 17: 124-7.
- [7] Chen SY, Wan L, Huang YC et al. Interleukin-18 gene 105A/C genetic polymorphism is associated with the susceptibility of Kawasaki disease. *J Clin Lab Anal* 2009; 23: 71-6.
- [8] Higa S, Hirano T, Mayumi M et al. Association between interleukin-18 gene polymorphism 105A/C and asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1097-102.
- [9] Morita Y, Yamamura M, Nishida K et al. Expression of interleukin-12 in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 306-14.
- [10] Stanilova SA, Karakolev ZT, Dimov GS et al. High interleukin 12 and low interleukin 10 production after in vitro stimulation detected in sepsis survivors. *Intensive Care Med* 2005; 31: 401-7.
- [11] García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C et al. Analysis of the interferon gamma (rs2430561, +874T/A) functional gene variant in relation to the presence of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012; 7: e47166.
- [12] Britsemmer K, Ursum J, Gerritsen M, van Tuyl LH, van Schaardenburg D. Validation of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: slight improvement over the 1987 ACR criteria. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:1468–70.

- [13] Carvalho VCV, de Macêdo JL, de Lima CA et al. IFN-gamma and IL-12B polymorphisms in women with cervical intraepithelial neoplasia caused by human papillomavirus. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 7627-34.
- [14] Faul, F, Erdfelder, E, Buchner, A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 2009; 41, 1149–60.
- [15] Arimitsu J, Hirano T, Higa S et al. IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 1413-6.
- [16] McInnes IB, Liew FY, Gracie JA. Interleukin-18: a therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 38-41.
- [17] Zhu KJ, Zhu CY, Shi G, Fan YM. Meta-analysis of IL12B polymorphisms (rs3212227, rs6887695) with psoriasis and psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 2013; 33:1785–90
- [18] Chen T, Liang W, Gao L et al. Association of single nucleotide polymorphisms in interleukin 12 (IL-12A and -B) with asthma in a Chinese population. *Hum Immunol* 2011; 72: 603–6.
- [19] Silva HD, Silva AP, Silva HA, Asano NM, Maia MMD, Souza PRE. Interferon gamma and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 2493–500.
- [20] Dagan AL, Zheng T, Christopher J et al. IFNG genotype and sex interact to influence risk of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 524–31.

Table 1. Genotypic and allelic frequencies of the *IL-18* (+105 A/C), *IL-12B* (+1188A/C) and *IFN-γ* (+874T/A) polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis (RA) and controls.

<i>IL-18</i>	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95% CI)	P
Genotype				
AA	15 (16.7)	80 (43.1)		
AC	68 (75.5)	92 (49.4)		
CC	7 (7.8)	14 (7.5)	3.7736 (2.01-7.05)*	<0.0001*
Allele				
A	98 (54.5)	252 (67.7)	1	
C	82 (45.4)	120 (32.3)	1.7571 (1.21-2.53)	0.0032
<i>IL-12B</i>	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95% CI)	P
Genotype				
AA	49 (54.4)	98 (52.7)		
AC	35 (38.9)	70 (37.6)		
CC	6 (6.7)	18 (9.7)	0.9318 (0.56-1.54)*	0.8843*
Allele				
A	133 (73.9)	266 (71.5)	1	
C	47 (26.1)	106 (28.5)	0.8868 (0.59-1.32)	0.6276
<i>IFN-γ</i>	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95% CI)	P
Genotype				
TT	21 (23.4)	45 (24.2)		
TA	34 (37.8)	77 (41.4)		
AA	35 (38.8)	64 (34.4)	1.2006 (0.66-2.15)*	0.6426*
Allele				
T	76 (42.3)	167 (44.9)	1	
A	104 (57.7)	205 (55.1)	1.1148 (0.77-1.59)	0.6164

Bold means significance; OR – odds ratio; CI – confidence interval; P - P value of OR; * - dominant model.

6. Capítulo II – Artigo submetido à revista Humman Immunology

(Qualis B1) – Data: 29/12/2014

Interleukin-23 receptor and Tumor Necrosis Factor Alpha polymorphisms in Brazilian Rheumatoid Arthritis Patients: a pilot study

Hildson Dornelas Angelo ^{1, 2}

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva³

Géssica Dayane Cordeiro de Lima³

Renê Donizeti Ribeiro Oliveira ⁴

Paulo Louzada-Júnior⁴

Eduardo Antônio Donadi⁴

Sergio Crovella⁵

Paulo Roberto Eleutério de Souza⁶

Paula Sandrin-Garcia⁵

Institutions:

1 Professor MSc of Federal Institute of Pernambuco, Garanhuns, PE, Brazil

2 Post-graduate program in Genetics Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

3 Laboratory of Biochemical Genetics and DNA sequencing "Professora Tânia Falcão", Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

4 Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil.

5 Professor Doctor of Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

6 Professor Doctor of Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Correspondence to: Prof. Paulo Roberto Eleutério de Souza. Department of Genetics/ Federal Rural University of Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – ZIP CODE: 52171-900 – Recife/PE-Brasil. e-mail: prsouza30@gmail.com.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic autoimmune disease of unknown etiology. Given the fact that inflammation is related to RA onset and progression, we hypothesized that the functional polymorphism in the IL-23R (rs10889677) or TNF- α (rs1800629) genes should also be associated with the susceptibility to RA and clinical manifestations. Once the IL23R is a cytokine receptor for IL-23, important mediator of the inflammatory process by promoting the expansion of Th17 cells, which have been associated with the induction of autoimmunity, elevated levels of TNF- α are found in synovial fluid and synovial tissue of RA patients. To test our hypothesis, we performed a case-control study consisted by 90 RA cases and 189 healthy controls. Genotyping for two SNPs were performed by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism. Our results showed that individual carriers of the variant allele A (AA + AC genotypes) at position +2199 in IL23R gene had a 3.46 fold increased risk for RA. However, none statistical association was observed between TNF- α polymorphism and RA risk or when were evaluated clinical manifestation and the two studied polymorphisms. In conclusion, our study presents an evidence of association between IL-23R polymorphism and RA susceptibility in a Brazilian population.

Key words: Rheumatoid arthritis; Cytokines; IL-23R; TNF- α ; Polymorphisms

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a complex, multifactorial, inflammatory disease of unknown etiology. Epidemiological studies have demonstrated that RA affects 0.5-2% of the world's population [1], while in Brazil, the incidence is 0.2%-1.0% [2-3]. RA is characterized by inflammation and destruction of synovial joints, which can result from the interaction of both individual and environmental factors, such as sex, age, ethnicity, infectious agents, smoking, and socioeconomic conditions [4]. Epidemiological evidence indicates that genetic factors are the most important in the pathogenesis of RA [5], among them, the involvement of polymorphisms in cytokines genes have been supported, once, altered levels of cytokines are observed in the affected tissues and serum of RA patients [1,6-8].

Interleukin 23 (IL-23) is a key pro-inflammatory cytokine in the regulation of immune cells functions, e.g. the differentiation of Th17 lymphocytes, sharing with IL-12 the p19 subunit, specific and highly avid for IL-23R [9]. IL-23R, was proved to be a molecular key to the development and maintenance of this IL-23/IL-17 inflammatory signal transduction pathway [10]. The IL-23R gene is located in locus 1p31 and its product interacts with IL-23 [11]. The SNP located in the 3'-untranslated region (UTR), +2199A/C (rs10889677), that could alter the transcription factor binding sites or the structure of messenger RNA, which might influence the expression of IL-23R, and the inflammatory process by controlling the synergistic combination of IL-23 and IL-17 [12].

The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a potent immune mediator and pro-inflammatory cytokine that stimulates T cell immune response, overexpression of endothelial adhesion molecules, neutrophil activation and antibody production [6,13]. Thus, the TNF- α has been reported to be associated with several

autoimmune diseases including RA [4, 14, 15], SLE [16], and Psoriatic Arthritis [17]. The TNF- α gene is located in locus 6p21.3, within the class III region of MHC [18]. Genetic variation in the promoter region of TNF has been associated with different expression levels, and some inflammatory disorders [19-21]. An intensively studied polymorphism is the substitution of G for A at position -308 (rs1800629) [4, 14, 22-25]. Very few studies are available about the association of these genes with RA in South America populations. Besides, to our knowledge, this work is pioneer in the study of IL-23R +2199 A/C and TNF- α -308 G/A polymorphisms in Brazilian RA patients.

The knowledge on cytokines role in the development of RA does not only provide a better understanding about the RA risk but also its participation in several clinical manifestations. Some cytokines, such IL-23 and TNF- α , play an important role mediating joint inflammation and destruction in RA and may serve as biomarker of disease susceptibility and inflammation monitoring. Therefore, the aim in the current study was to investigate whether both polymorphisms, IL-23R +2199 A/C and TNF- α -308 G/A, are associated to RA susceptibility in a Southeastern Brazilian population.

MATERIALS AND METHODS

2.1 RA patients and healthy controls

Blood samples were collected from 90 RA patients from Division of Clinical Immunology of the Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (University of São Paulo, Brazil). All patients were classified according the American College of Rheumatology Criteria, 1987 [26]. One hundred eighty-nine healthy volunteers were blood donors and all were previously genotyped for HLA haplotypes (HLA-A, B, C, DR and DQ) as exclusion criterion for autoimmune diseases. The Ethics Committee of the Health Sciences Center of University of São Paulo approved the study (protocol 2981/2009), and written informed consent was obtained from all subjects.

2.2 Clinical features and disease activity

The clinical and environmental data such as sex, age, age at disease onset, disease duration, ethnicity, Anti-Citrullinated Proteins Antibody (ACPA), Rheumatoid Factor (RF), Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR), C-reactive protein and smoking habit were obtained. Disease activity was assessed using the Disease Activity Score 28 joints (DAS28) [27].

2.3 Autoantibody analyses

RF was detected by nephelometry, and the test was considered positive at concentrations > 10 IU/mL. ACPA immunoglobulin G detection was performed using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions (Quanta

Lite anti-CCP 2; Inova, San Diego, CA, USA) and was considered positive at concentrations > 20 IU/mL.

2.4 Genotyping

IL-23R

IL-23R genotyping was performed by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Primers sequences for IL-23R +2199A/C gene are as follows: sense 5'-AGGGGATTGCTGGGCCATAT-3', anti-sense 5'- TGTGCCTGTATGTGTGACCA-3'. The conditions of the PCR were based on Bin Chen and cols. [12]. To digest the PCR product, 1 U of MnlI (Jena Bioscience) was incubated for 15 minutes as of manufacturer's instructions. The digested PCR product was fractionated on 3% Agarose gel and visualized after staining by ethidium bromide. The fragments to A/A, A/C and C/C genotypes were, 215 pb, 215, 154 and 61 and 154 and 61, respectively (Anexo I).

TNF- α

To genotyping the TNF- α -308 G/A polymorphism was carried out a PCR-RFLP. Based on Cabrera and cols. [28], were used the following primer sequences (forward primer 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'; and reverse primer: 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'). After digestion with NcoI (Fermentas), the PCR product with G allele was digested to 2 fragments of 87 and 20 bp, while the A allele was digested in 1 fragments of 107 bp. The digested PCR product was fractionated on 3% Agarose gel and visualized after staining by ethidium bromide (Anexo II).

2.3 Statistical Analysis

The genotype distributions and allelic frequencies for the IL-23R and TNF- α genes polymorphisms for AR patients and controls were compared using the chi-squared test or exact Fisher's exact test. Results were considered statistically significant when the probability of findings occurring by chance was less than 5% ($P < 0.05$). The odds ratios (OR) were calculated from genotypic frequency and allelic frequency with a 95% confidence interval (CI) for the IL-23R and TNF genes polymorphisms. All data were statistically analyzed with the BioEstat 5.0 software.

RESULT

Clinical Characteristics of Patients

The demographic and clinical characteristics of the 90 RA patients are shown in the Table 1. The female:male ratio was 10:1 and the mean age was 56.3 years. For the healthy controls, the female:male ratio was 4:3 and the mean age was 51.2 years. The positivity to ACPA was 65.6%, result similar to RF. According to the DAS 28, 64.4% of patients presented at least moderate disease activity ($DAS28 > 3.2$). About 50% of patients had a current or past smoking habit.

Association between polymorphism and RA

As summarized in Table 2, to evaluate the influence of IL-23R and TNF- α polymorphisms in RA susceptibility, genotypic and allelic frequencies of SNPs among patients and controls were compared. Individuals carrying the IL-23R +2199 A allele (A/A+A/C genotypes) were significantly more frequent in patients than controls groups (76.58% vs 48.67%, respectively), conferring a 3.46-fold (95% CI: 1.96-6.09; $p < 0.001$) increased risk for RA. Similarly, a 1.63-fold increased risk for RA was found for A allele (95% CI: 1.13-2.35; $p = 0.01$).

Furthermore, we examined the association between each SNP and clinic or laboratorial aspects, such as disease activity and presence of RF or ACPA (Table 3 and 4). However, none significant association was observed.

DISCUSSION

In this case-control study, we firstly investigated the association of IL-23R +2199A/C genetic polymorphism on influencing RA in 90 Brazilian subjects by association analysis. The major finding of our study was that individuals with the A/A and A/C genotypes might be more susceptible to RA compared to those with the C/C genotype, suggesting that the A allele of the IL-23R +2199A/C polymorphism may increase the risk of developing RA, in addition the OR test showed that the A allele confer increased risk to RA. To the same polymorphism, a higher frequency of A/A genotype in patients with RA were demonstrated by Faragó and cols in 2008 [30] studying Hungarians. Other polymorphisms (rs1343151, rs10489629, rs7517847) located in IL-23R gene have been related with RA, as described by Chen-Xu and cols in 2012 [31], in a study with Caucasian.

To our knowledge, our results show for the first time a risk effect of A allele of the IL23R +2199A/C polymorphism to RA susceptibility in Brazilian RA population. It's important to note, few studies are available to compare our findings with other populations. However, IL-23R polymorphisms have currently received an increased number of researches investigating the influence of these SNPs in inflammatory disease, as inflammatory bowel disease [32], psoriatic arthritis [33] and Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome [34]. This SNP, which could alter the expression of IL-23R, may be a biomarker of early diagnosis or the progression of RA. We hypothesized that the IL23R +2199A/C polymorphism may be associated with the absence or presence of RF or ACPA, but our results did not show any significant association. Although this is a preliminary conclusion,

validation by a larger prospective study from a more diverse ethnic population is needed to confirm these findings.

Several SNPs have currently been identified for the human TNF- α gene and many of them have been linked to the development of inflammatory disease in many populations [4, 16, 17]. Understanding how these SNPs impact TNF- α level in human serum would be important for exploiting this pathway clinically, once the use of TNF- α inhibitors has improved significantly the RA treatment and the effects of a TNF- α blockade are influenced by the expression of TNF on synovial tissue and the synovia infiltration by TNF- α producing cells [35].

In our study, we selected a functional polymorphism, the TNF- α -308G/A, to identify possible associations between the polymorphism and clinical features or an elevated risk to RA. The comparison of the TNF SNP allelic and genotypic distribution in AR patients and controls groups showed no difference. By the same way, there was no statistical difference in TNF- α -308G/A polymorphism genotypic and allelic frequencies among AR patients regarding clinical characteristics.

Our results to TNF- α -308G/A polymorphism is in according with the results of Boechat and cols [22], which found that this SNP in the TNF- α gene was not significantly associated with RA in the Brazilian Amazon population. The same in other populations, as Caucasian [23], Turkish [36], Chilean [37], Macedonian was observed [24]. Furthermore, a meta-analysis by Gwan Gyu Song and cols [38] showed lack of association between the studied SNP and RA in European, Arab and Asian ethnic groups. On the other hand, previous studies have been examined the significant contribution of TNF- α -308 G/A polymorphism to susceptibility or clinical features of RA in different populations, such as Chinese

[14], Saudi [4], Mexican [15], Egyptian [25]. The genetic heterogeneity among those populations may explain the controversial results.

In conclusion, the present study provides first evidence that the IL-23R +2199A/C polymorphism is associated with RA susceptibility, but not with clinical features, such as disease activity, presence of RF or ACPA, while no association was found for the TNF- α -308 polymorphism in this Brazilian RA population. Further functional studies are needed to better elucidate the relationships between the IL-23R +2199A/C polymorphism and RA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients and their families, whose collaboration and understanding have made this work possible. This study was supported by FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

- [1]. Gambhir D, Lawrence A, Aggarwal A, Misra R, Mandal SK, Naik S. Association of tumor necrosis factor alpha and IL-10 promoter polymorphisms with rheumatoid arthritis in North Indian population. *Rheumatol Int* 2010; 30:1211-17.
- [2]. Sato H, Fujii H, Takada H, Yamada N. The temporomandibular joint in rheumatoid arthritis-a comparative clinical and tomographic study pre- and post-prosthesis. *J Oral Rehabil* 1990; 17:165-72.
- [3]. Marques Neto JF, Gonçalves ET, Barros EFO, Cunha MFL, Radominski R, Oliveira SM, et al. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. *Rev Bras Reumatol* 1993; 33(5): 169-73.
- [4]. Al-Rayes H, Al-Swailem R, Albelawi M, Arfin M, Al-Asmari A, Tariq M. TNF- α and TNF- β Gene Polymorphism in Saudi Rheumatoid Arthritis Patients. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 2011; 4:55-63.
- [5]. Aguilón JC, Cruzat A, Aravena O, Salazar L, Llanos C, Cuchacovich M. Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution?. *Immunobiology* 2006; 211:75-84.
- [6]. Nemec P, Pavkova-Goldbergova M, Stouracova M, Vasku A, Soucek M, Gatterova J. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population. *Clin Rheumatol* 2008; 27:59-65.

- [7]. Yamaura M, Yao M, Yaroslavsky I, Cohen R, Smotrich M, Kochevar IE. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *Lasers Surg Med* 2009; 41:282-90.
- [8]. Park MC, Chung SJ, Jung SJ, Park YB, Lee SK. Relationship of serum TWEAK level to cytokine level, disease activity, and response to anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2008; 37:173-78.
- [9]. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13:715-25.
- [10]. Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 133:1327-39.
- [11]. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 2002; 168:5699-708.
- [12]. Chen B, Zeng Z, Xu L, Wu X, Yu J, Xue L, et al. IL-23R +2199A/C polymorphism is associated with decreased risk of certain subtypes of gastric cancer in Chinese: a case-control study. *Cancer Epidemiol* 2011; 35:165-9.
- [13]. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-52.
- [14]. You CG, Li XJ, Li YM, Wang LP, Li FF, Guo XL, et al. Association analysis of single nucleotide polymorphisms of proinflammatory cytokine and their receptors genes with rheumatoid arthritis in northwest Chinese Han population. *Cytokine* 2013; 61:133-8.

- [15]. Rodríguez-Carreón A/A, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Montes de Oca JV, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun* 2005; 24:63-8.
- [16]. Angelo HD, da Silva HA, Asano NM, Muniz MT, de Mascena Diniz Maia M, de Souza PR. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism -308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2012; 73:1166-70.
- [17]. Filer C, Ho P, Smith RL, Griffiths C, Young HS, Worthington J, et al. Investigation of association of the IL12B and IL-23R genes with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58:3705-09.
- [18]. Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarska A, McFarlane IG, Cramp ME, et al. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 2002; 22:404-12.
- [19]. López P, Gutiérrez C, Suárez A. IL-10 and TNFalpha genotypes in SLE. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:838390.
- [20]. Mourão AF, Caetano-Lopes J, Costa P, Canhão H, Santos MJ, Pinto P, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 genotypes influence inflammatory activity and TNF-alpha serum concentrations in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2009; 36:837-42.
- [21]. Luo M, Shen DX, Zhang HB, Wang J, Zong LL, Guan T, et al. Effect of gene polymorphism of TNF-beta on the concentration of TNF in serum of patient with endometriosis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 32:656-59.

- [22]. Boechat AL, Boechat NEO, Ogusku MM, Alencar MR, Abensur TaC, Cardoso Neto J, et al. The influence of a TNF gene polymorphism on the severity of rheumatoid arthritis in the Brazilian Amazon. *Cytokine* 2013; 61:406-12.
- [23]. Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, et al. Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study. *BMC Med Genet* 2011; 12:36.
- [24]. Trajkov D, Mishevskia-Perchinkova S, Karadzova-Stojanoska A, Petlichkovski A, Strezova A, Spiroski M. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. *Clin Rheumatol* 2009; 28:1291-1300.
- [25]. Hussein YM, Mohamed RH, Pasha HF, El-Shahawy EE, Alzahrani SS. Association of tumor necrosis factor alpha and its receptor polymorphisms with rheumatoid arthritis in female patients. *Cell Immunol* 2011; 271:192-6.
- [26]. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315–24.
- [27]. van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum* 1998;41:1845-50.
- [28]. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; 182:1259-64.

- [29]. Chung SJ, Kwon YJ, Park MC, Park YB, Lee SK. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Yonsei Med J* 2011;52:113-20.
- [30]. Faragó B, Magyari L, Sáfrány E, Csöngéi V, Járomi L, Horvatovich K, et al. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:248-250.
- [31]. Chen-Xu M, Topless R, McKinney C, Merriman ME, Phipps-Green A, Dalbeth N, et al. Replication of association of the interleukin 23 receptor rs1343151 variant with rheumatoid arthritis in Caucasian sample sets. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:155-157.
- [32]. Venegas M, Beltrán CJ, Alvarez L, Castro A, Torres T, Leal AD, et al. IL-23R Arg381Gln polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 2008; 19:190-195.
- [33]. Popadic S, Ramic Z, Medenica L, Pravica V, Popadic D. IL-23R gene polymorphism rs2201841 is associated with psoriatic arthritis. *Int J Immunogenet* 2014.
- [34]. Ogola GO, Ouma C, Jura WG, Muok EO, Colebunders R, Mwinzi PN. A non-synonymous polymorphism in IL-23R Gene (rs1884444) is associated with reduced risk to schistosomiasis-associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in a Kenyan population. *BMC Infect Dis* 2014; 14:316.
- [35]. Wijbrandts CA, Dijkgraaf MG, Kraan MC, Vinkenoog M, Smeets TJ, Dinant H, et al. The clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis is in part dependent on pretreatment tumour necrosis factor alpha expression in the synovium. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1139-1144.

- [36]. Ates O, Hatemi G, Hamuryudan V, Topal-Sarikaya A. Tumor necrosis factor- α and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol* 2008; 27:1243-1248.
- [37]. Cuenca J, Cuchacovich M, Pérez C, Ferreira L, Aguirre A, Schiattino I, et al. The -308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42:308-313.
- [38]. Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. Association between TNF- α promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2014; 34:465-471.

Table 1. Demographic and clinical features of RA patients

Number of patients	90 (F = 82, M = 8)
Age (years)	56 ± 11.6 (27–87)
Age at onset (years)	45 ± 13.1 (19–83)
Disease duration (years)	9 ± 4.5 (2–34)
Ethnicity	
Caucasian-derived	73 (81.1%)
African-derived	17 (18.9%)
RF	599 IU/mL (14–8380 IU/mL)
RF	
Positive (>10 IU/mL)	64 (71.2%)
Negative	26 (28.8%)
ACPA	183 IU/mL (24–798 IU/mL)
ACPA	
Negative (<20 IU/ml)	31
Moderately positive (20 – 60 IU/mL)	5
Strongly positive (>60 IU/mL)	54
DAS 28	
Remission (<2.6)	0
Low/moderate (2.6-5.1)	31 (34.5%)
High (≥5.1)	59 (64.4%)
Smoking	
Yes	52 (58%)
No	38 (42%)

Parameters are presented as mean, standard deviation (±) range (min-max) or number; RF= Rheumatoid factor; ACPA= Anti-Citrullinated; DAS28=disease activity score 28 joints.

Table 2. Genotypic distribution and allelic frequencies of the IL23R gene (+2199 A/C) and TNF- α promoter (-308 G/A) polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis (AR) and controls.

IL23R	AR patients		Controls		<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i> *
	N = 90	%	N = 189	%			
Genotype							
AA	12	13.3	34	18.0			
AC	57	63.3	58	30.7			
CC	21	23.3	97	51.3			
AA + AC x CC	69/21		92/97		0.0001*	3.46 (1.96-6.09)*	<0.001*
Allele							
A	81	45.0	126	33.3	0.007	1.63 (1.13-2.35)	0.01
C	99	55.0	252	66.7		1	
TNF	AR patients		Controls		<i>P</i> ⁺	OR (95% CI)	<i>P</i> *
	N = 90	%	N = 184	%			
Genotype							
GG	65	72.2	142	77.2			
GA	23	25.5	40	21.7			
AA	2	2.2	2	1.1			
GG + GA x AA	88/2		182/2		0.50 ⁺	0.48 (0.06-3.48) ⁺	0.84 ⁺
Allele							
G	153	85.0	324	88.0	0.34	0.7695(0.45-1.28)	0.38
A	27	15.0	44	12.0		1	

P- *P* value of exact fisher test; *P*⁺ - *P* value of χ^2 test; OR – odds ratio; CI – confidence interval; *P** - *P* value of odds ratio; * - AA + AC versus C/C genotypes; ⁺ - AA versus other genotypes.

Table 3. Genotypic and allelic frequencies of IL-23R (+2199A/C) polymorphism in RA patients stratified by clinical characteristics.

Genotyp e/ allele	DAS 28				P value	Rheumatoid factor				P value	ACPA				P value
	Low/modera te (N = 31)		High (N=59)			Positive (N=64)		Negative (N=26)			Positive (N=59)		Negative (N=31)		
	N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
AA	4	12.9	8	13.5	ref	9	14.1	3	11.5	ref	7	11.9	5	16.1	ref
AC	22	70.9	35	59.3	0.98	40	62.5	17	65.4	0.97	37	62.7	20	64.5	0.91
CC	5	16.2	16	27.2	0.85	15	23.4	6	23.1	0.84	15	25.4	6	19.4	0.70
A	30	48.3	51	43.2	ref	58	45.3	23	44.2	ref	51	43.2	30	48.4	ref
C	32	51.7	67	56.8	0.61	70	54.7	29	55.8	0.96	67	56.8	32	51.6	0.61

N – number of subjects; P value – P value of Odds ratio; ref – reference; ACPA= Anti-Citrullinated Proteins Antibody; DAS28=disease activity score 28 joints.

Table 4. Genotypic and allelic frequencies of TNF (-308G/A) polymorphism in RA patients stratified by clinical characteristics.

Genotyp e/ allele	DAS 28				P value	Rheumatoid factor				P value	ACPA				P value
	Low/moderat e (N = 31)		High (N=59)			Positive (N=64)		Negative (N=26)			Positive (N=59)		Negative (N=31)		
	N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
GG	21	67.8	44	74.6	ref	46	71.8	19	73.1	ref	43	72.9	22	70.9	ref
GA	9	29.0	14	23.7	0.73	16	25.0	7	26.9	0.87	15	25.4	8	25.8	0.86
AA	1	3.2	1	1.7	0.81	2	3.2	0	0	-	1	1.7	1	3.3	0.77
G	51	82.3	102	86.4	ref	108	84.4	45	86.4	ref	101	85.6	52	83.9	ref
A	11	17.7	16	13.6	0.59	20	15.6	7	14.6	0.89	17	14.4	10	16.1	0.93

N – number of subjects; P value – P value of Odds ratio; ref – reference; ACPA= Anti-Citrullinated Proteins Antibody; DAS28=disease activity score 28 joints.

7. Capítulo III - Artigo a ser submetido

Association of the *IL-6* and *IL-17F* polymorphisms with clinical features of Rheumatoid Arthritis

Hildson Dornelas Angelo^{1,2}

Géssica Dayane Cordeiro de Lima³

Renê Donizeti Ribeiro Oliveira⁴

Paulo Louzada-Júnior⁴

Eduardo Antônio Donadi⁴

Sergio Crovella⁵

Maria de Mascena Diniz Maia⁶

Paulo Roberto Eleutério de Souza⁶

Paula Sandrin Garcia⁵

Institutions:

¹ Federal Institute of Pernambuco, Campus Garanhuns (IFPE/Garanhuns), PE, Brazil;

² Post-graduate program in Genetics Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

³ Post-graduate program in Applied Molecular and Cellular Biology, University of Pernambuco (ICB/UPE);

⁴ Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil.

⁵ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil;

⁶ Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Correspondence to: Prof. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – ZIP CODE: 52171-900 - Recife/PE-Brasil

e-mail: prsouza30@gmail.com

Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease that could affects several organs and especially joints. The etiology of RA remains unknown, however, the immune responses mediated by cytokines have been shown to be important in the RA pathogenesis. Thereby, we analyzed the SNPs in IL-6, IL-17A and IL-17F genes and its participation in the RA development or clinical features. In this case-control study, was investigated the association between the *IL-6* -174 G>C, *IL-17A* -197G>A and *IL-17F* +7488 A>G polymorphisms and RA susceptibility or clinical characteristics in 90 RA patients and 188 healthy individuals Brazilian. The SNPs *IL-6* -174 G>C and *IL-17F* +7488 A>G were associated with clinical features, such as rheumatoid factor, anticitrullinated protein antibodies and DAS28. None association was observed with RA susceptibility. Our results present evidence for the first report of association between the *IL-6* and *IL-17F* polymorphisms with RA clinical features in a population from Brazil.

Key words: Rheumatoid Arthritis; Cytokines; Single Nucleotide Polymorphisms.

Introduction

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by affect primarily joint, causing pain and articular destruction [Harris, 1990]. According its progression, the risk of disability or death may be up to 30% and 50%, respectively [Mikuls *et al.*, 2002], resulting in a poor quality of life and high mortality rate [Nanke *et al.*, 2002]. RA is influenced by genetic, environmental and immunological factors, including increased expression levels of cytokines, mainly in the affected joints during the course of disease [Brennan and Beech, 2007]. Cytokines are proteins involved in immune response and play crucial roles in common pathways inflammatory. Therefore, several studies have focused on the participation of many interleukin in the pathogenesis of RA [Paradowska-Gorycka *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2014; Li F *et al.*, 2014; Li X *et al.*, 2014; Bogunia-Kubik *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015].

The interleukin-6 (IL-6) is multifunctional proinflammatory cytokine that acts as a key mediator in the acute phase of RA, and high levels are found in the synovial fluid of these patients [Chung *et al.*, 2011; Solus *et al.*, 2015]. Its gene is located in the chromosomal region 7p21p15 and organized into five exons and four introns [Chen *et al.*, 1989]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of this gene results in altered expression of IL-6 [Fishman *et al.*, 1998]. Among them, the functional polymorphism at position -174 (IL-6 -174 G>C) (rs1800795) is related with the IL-6 transcriptional activity [Wypasek *et al.*, 2010], once creates a potential binding site for the transcription factor NF-1 [Fishman *et al.*, 1998], which demonstrated be a repressor of gene expression in HeLa cells [Rein *et al.*, 1995]. Moreover, has been associated with susceptibility or

progression of autoimmune diseases [Fishman *et al.*, 1998; Libra *et al.*, 2006; Asano *et al.*, 2013]. Recent studies suggested the IL-6 -174 G>C polymorphism influence in the development of RA in Chinese populations [Li F *et al.*, 2014; Li X *et al.*, 2014].

The interleukin 17 (IL-17) is an important family of cytokines composed by six members (IL-17A to F), which play key roles in innate and adaptive immune systems. Among them, IL-17A and IL-17F are the two main effective factors produced by T-helper-17 cells (Th17) [Mchenga *et al.*, 2008] that are related in the development of allergic, autoimmune diseases and acts against bacterial and fungal infections [Liu *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2010]. *IL-17A* and *IL-17F* genes are mapped on the same chromosome at position 6p12 and presents 50% of homology [Kolls and Lindén, 2004]. Furthermore, these interleukin are related with the induction the expression of various cytokines, chemokines and adhesion molecules by human epithelial cells [Hizawa *et al.*, 2006].

High levels of IL-17A and IL-17F was observed in inflamed synovia of RA patients, showing its importance in the pathogenesis of RA [Chabaud *et al.*, 1999; Shahrara *et al.*, 2009; Li N *et al.*, 2013]. Moreover, recent studies found *IL-17* polymorphisms associated with RA. SNPs IL-17A -197G>A (rs2275913) and IL-17F +7488 A>G (rs763780) have been related with development and its clinical features of disease [Bogunia-Kubik *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015] due the participations of these SNPs in the expression or function of those cytokines. The IL-17A polymorphism is located in the upstream region of the *IL-17A* gene in the binding motif for the nuclear factor activated T cells (NFAT), an important regulator of the IL-17 promoter, and thereby influences in the IL-17A transcription [Espinoza *et al.*, 2011]. While the IL17-F SNP causes a His-to-Arg substitution at amino acid

161 (H161R), which promote a decrease in the ability of IL-17F to induce expression of certain cytokines and chemokines [Kawaguchi *et al.*, 2006].

Thus, we evaluated of *IL-6*, *IL-17A* and *IL-17F* genes as candidates for RA and the possible association with disease susceptibility, disease progression and clinical features.

Materials and Methods

Study subjects and samples

A case-control study was conducted to analyze *IL6*, *IL-17A* and *IL-17F* polymorphisms in patients with RA recruited at the Division of Clinical Immunology of the Clinical Hospital of Ribeirão Preto of University of São Paulo, Brazil, and healthy individuals blood donors from Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. The RA group was comprised of ninety patients with diagnosis of RA in agreement with the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) classification criteria [Britsemmer *et al.*, 2011], while the control group was composed of 188 healthy subjects without RA that were previously genotyped for HLA haplotypes (HLA-A, B, C, DR and DQ) as exclusion criterion for autoimmune diseases. All the study subjects share the same geographic region, and there are no significant variations in the gender distribution between the cases and controls.

The genetics analyses were conducted at the Laboratory of Genetics, Biochemistry and DNA sequencing, Professor Tânia Falcão of the Rural Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil). Each subject gave informed consent for the participation and the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center of University of São Paulo (protocol 2981/2009) approved the study.

Clinical characteristics

Demographic and clinical data as sex, age, smoking habit, age at disease onset, disease duration, erosion presence, anti-citrullinated proteins antibody (ACPA), rheumatoid factor (RF), erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-

reactive protein were obtained from all patients by interview or review in the medical records by medical staff. Disease activity was assessed using the Disease Activity Score 28 joints (DAS28) [van Gestel *et al.*, 1998].

Autoantibody analyses

RF was assayed by nephelometry and value >10 IU/ml was considered positive. According to the manufacturer's instructions, ELISA was performed to detect the ACPA immunoglobulin G (Quanta Lite anti-CCP 2; Inova, San Diego, CA, USA) and was considered positive at concentrations >20 IU/ml.

IL6, IL-17A and IL-17F polymorphisms analysis

The genomic DNA was prepared from peripheral blood collected in EDTA-anticoagulated tubes and DNA was extracted using standard methods. Genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and amplification-refractory mutation system (PCR -ARMS) using Gotaq® ColorLess Master Mix (PROMEGA). Primer sequences 5'-TCCCCCTAGTTGTGTCTGGCG-3' (G allele), 5'-CTGCACTTTATCCCCTAGTTGTGTCATGCC-3' (C allele) and 5'-TGAGGGTGGGGCCAGAGC-3' (reverse) to IL-6 SNP (Anexo III), 5'-AACAAGTAAGAATG-AAAAGAGGACATGGT-3' (sense) and 5'-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3' (antisense) to IL-17A SNP, 5'-ACCAAGGCTGCTCTGTTTCT-3' (sense) and 5'-GGTAAGGAGTGGCATTCTA-3' (antisense) to IL-17F SNP were used.

PCR products were digested with the restriction enzyme *EcoNI* to IL-17A SNP (Anexo IV) and *NlaIII* to IL-17F SNP (Anexo V) (New England Biolabs,

Beverly, MA, USA) at 37°C overnight, separated on 3% agarose gel and detected by Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology). The condition of PCR and digestion to IL-6 SNP was based on Unfried et al. (2003), while to IL-17A and IL-17F SNPs on WU et al. (2010).

Statistical analysis

Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested in cases and controls separately using a χ^2 test with one degree of freedom and a threshold of $p < 0.05$. Allele frequencies were estimated by direct counting. The associations between the polymorphisms and risk of development of RA were estimated by odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals (CIs) calculated. Associations of RF, DAS 28 and ACPA with genotype were analyzed using the OR. All analyses were done using BioEstat software 5.0.

Results

3.1 Clinical characteristics of RA patients

The RA cohort included patients with mean age of 56 (19-87) years and predominance of women (9:1). Based on clinical history the mean of age at onset of the disease was 45 (19-83) years and the mean duration for our sample was 13 (3-39) years. Patients were classified as per ACR/EULAR criteria into those with remission (<2.6), low/moderate (2.6-5.1), and high (≥ 5.1) disease activity using DAS28 score. In our study 50% of the patients presented high degree of disease activity and the serological results indicated that 71% and 65% were positive to RF and ACPA present, respectively. The demographic, clinical and laboratory features of the RA patients are presented in Table 1.

3.2 Association of SNPs with AR and/or clinical characteristics

The genotypic distribution of polymorphisms studied between both groups were in agreement with the prediction under the condition of Hardy–Weinberg equilibrium, except to patients group to SNPs IL-6 -174 G>C and IL-17F +7488 A>G.

We compared the genotype distribution and allele frequencies of each SNP between RA patients and normal subjects using χ^2 and Odds Ratio test to examine the potential influence of the polymorphism on susceptibility to RA, as shown in Table 2. However, the presence of the polymorphic variant did not differ significantly between patients and controls to SNPs studied.

We verify the possible association between the clinical features of RA and each polymorphism. To this analyze, the patients were stratified by genotypes and compared with DAS28, RF and ACPA.

Regarding to *IL-6* gene, when compared the high-producer genotype (G/G) versus low-producers genotypes (G/C + C/C) with the positivity to RF and ACPA, was observed a significant association. The G/G patients had 4.47-fold risk to presence of RF (CI = 1.6964-11.7982; p = 0.0038) and 3.91-fold risk to ACPA (CI = 1.5646- 9.7804; p = 0.0057), but not relation was observed with DAS28.

On the other hand, we found that individuals with A/A genotype to SNP *IL-17F* +7488 A>G showed a 5.44-fold increased risk (CI = 1.2970-22.8550; p = 0.031) for high activity, measure by DAS28. Although none association was observed to SNP *IL-17A* -197G>A and clinical features.

Discussion

RA has been shown to be an important public health problem due the significant impacts on life the patient related to disability of the disease and high mortality rate. Besides its complex etiology composed for several genetic and environmental factors that difficult an earlier diagnosis or treatment.

Several studies have shown that cytokine gene polymorphisms could be associated with gene expression alteration and autoimmune diseases. Among the interleukins studied, IL-6 is one of the major, because, acts as an important mediator of systemic and local manifestations of RA [Nishimoto and Kishimoto, 2006], and also the successful therapeutic use of inhibitors of this cytokine in RA inflammation and tissue damage [Smolen *et al.*, 2008]. Moreover, a recent research showed that the SNP *IL-6* -174 G>C were associated with serum IL-6 levels significantly higher in RA patients compared to control [Wei *et al.*, 2015]. Therefore, we investigated the relationship between -174 SNP polymorphisms in *IL-6* gene promoter in RA patients from Southeast Brazilian.

Regarding to clinical features, we compare the genotype distribution with activity, RF and ACPA. Ours analyzes showed that individuals with G/G genotypes had a 3.91-fold risk increased of present positivity to ACPA ($p = 0.0057$) and 3.91-fold risk increased to RF positivity ($p = 0.0038$). A previous functional study found the effect of G/G genotype in the higher expression of IL-6 [Fishman *et al.*, 1998]. Due to this, it is interesting to speculate the increased prevalence of the high-response allele, -174G, suggests that a genetically determined high IL-6 response may have a role in the production of autoantibodies altered. Unfortunately, due to lack of studies, additional studies are necessary to evaluate the relevance of these *IL-6* polymorphisms to the autoantibodies production. Pawlik *et al.* (2005)

demonstrated that in G/G patients the active form of RA was more frequently diagnosed compared with homozygous C/C or G/C patients. Moreover, in carriers of two G alleles the parameters of erythrocyte sedimentation rate (ESR), number of swollen and tender joints were significantly increased. However, Marinou *et al.* (2007) did not found association with the presence of RF or ACPA.

Our results showed that there was no significant difference in the SNP IL-6 -174 G>C between both subgroups of patients and control. A recent work developed in an American population also analyzed the possible influence of SNP IL-6 -174 G>C in the RA susceptibility, but the outcomes showed no association [Zavaleta-Muñiz *et al.*, 2013]. Similar results was demonstrated by Arman *et al.* (2011), Trajkov *et al.* (2009), Panoulas *et al.* (2009) and Palomino-Morales *et al.* (2009) that found the polymorphisms at positions -174 was no related with the occurrence of RA among Turkish, Macedonian, UK and Caucasians patients, respectively. On the other hand, IL-6 -174C-allele carrier status was found to be increased the susceptibility of RA in Chinese population [Li X *et al.*, 2014; Li F *et al.*, 2014]. Differences of genetic and environmental factors in the ethnic groups may be the probable reasons for contradictory results among different populations.

In addition, was investigated the possible influence of polymorphisms in the IL-17A and IL-17F genes in the RA risk and clinical features. These cytokines participate in Th17 response and are associated with inflammatory and autoimmune diseases, such as RA [Shen *et al.*, 2015], systemic lupus erythematosus [Rauen *et al.*, 2011], inflammatory bowel disease [Liu *et al.*, 2009]. Moreover, IL-17A and IL-17F may play an important role in inflammation by upregulating some cytokines and chemokines that are crucial in regulating the inflammatory response and elevated levels of IL-17A have been detected in the

inflamed synovia of RA patients [Chabaud *et al.*, 1999], thereby indicating a possible functional role during RA pathogenesis.

We found the association between A/A genotype to SNP IL-17F +7488 A>G and activity of RA, once the carriers of two A alleles had 5.44-fold risk increased to active disease form (the highest DAS28 score >5.1). Since a study development by Kawaguchi *et al.* (2006) demonstrated that the IL17-F SNP (+7488 A>G) causes a His-to-Arg substitution at amino acid 161 (H161R) which promote a decrease in the ability of IL-17F to induce expression of certain cytokines and chemokines, the A/A genotype could results in an intense inflammatory process and higher activity of RA, as observed in this study. Although, any association was found to SNP IL-17A -197 G>A and clinical features. There are, however, a few reports that showed the correlation of the IL-17A -197 G>A and IL-17F +7488 A>G polymorphisms with the presence of clinical characteristics of RA. It is important to note that RA appears to be a multifactorial disease and different genes may influence its susceptibility [Orozco *et al.*, 2006]. Therefore, further studies in populations with different genetic backgrounds are needs to confirm the potential role of the polymorphisms studied as well as other inflammatory factors implicated in the development of RA. However, the statistical analyzes did not show difference between the SNPs studied and the susceptibility to RA when compared patients and control groups in ours population. These are results in accordance with Bogunia-Kubik *et al.* (2015), that in a very recent study observed that in Polish patients the genotype distribution did not differ when compared with controls to SNP IL-17A -197G>A and with Paradowska-Gorycka *et al.* 2010 analyzing the same population were unable to prove association between the SNP IL-17F +7488 A>G and RA. In contrast, a research recently published by Shen *et*

al. (2015) suggest that individuals with A/A genotype to the SNP IL-17A -197 G>A had a decreased risk to RA and that other polymorphisms in IL-17A gene also were correlate with influence in the susceptibility to RA in a Chinese population, while Nordang *et al.* (2009) found association with this SNP and the risk to RA in Caucasian patients.

In conclusion, in this work we have assessed for the first time in a Brazilian population the potential genetic contribution of IL-6 and IL-17F gene polymorphisms to clinical features of RA, but not to its susceptibility.

References

- [1] Arman A, Coker A, Sarioz O, Inanc N, Direskeneli H. Lack of association between IL-6 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Turkish population. *Rheumatol Int.* 2012;32:2199-201.
- [2] Asano NM, Angelo HD, da Silva HA, Maia MM, Lins OG, Souza PE. Interleukin-6 promoter polymorphisms -174 G/C in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2013;74:1153-6.
- [3] Bogunia-Kubik K, Świerkot J, Malak A, Wysoczańska B, Nowak B, Białowąs K, et al. IL-17A, IL-17F and IL-23R Gene Polymorphisms in Polish Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015;63:215-21.
- [4] Brennan F, Beech J. Update on cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19:296-301.
- [5] Britsemmer K, Ursum J, Gerritsen M, van Tuyl LH, van Tuyl L, van Schaardenburg D. Validation of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: slight improvement over the 1987 ACR criteria. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:1468-70.
- [6] Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 1999;42:963-70.

[7] Chung SJ, Kwon YJ, Park MC, Park YB, Lee SK. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Yonsei Med J.* 2011;52:113-20.

[8] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102:1369-76.

[10] Harris ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med.* 1990;322:1277-89.

[11] Hizawa N, Kawaguchi M, Huang SK, Nishimura M. Role of interleukin-17F in chronic inflammatory and allergic lung disease. *Clin Exp Allergy.* 2006;36:1109-14.

[12] Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21:467-76.

[13] Li F, Xu J, Zheng J, Sokolove J, Zhu K, Zhang Y, et al. Association between interleukin-6 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Chinese Han population: a case-control study and a meta-analysis. *Sci Rep.* 2014;4:5714.

[14] Li N, Wang JC, Liang TH, Zhu MH, Wang JY, Fu XL, et al. Pathologic finding of increased expression of interleukin-17 in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6:1375-9.

[15] Li X, Chai W, Ni M, Xu M, Lian Z, Shi L, et al. The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Biomed Res Int*. 2014;2014:265435.

[16] Libra M, Signorelli SS, Bevelacqua Y, Navolanic PM, Bevelacqua V, Polesel J, et al. Analysis of G(-174)C IL-6 polymorphism and plasma concentrations of inflammatory markers in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *J Clin Pathol*. 2006;59:211-5.

[17] Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, Wang JS, Fei K. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2009;15:5784-8.

[18] Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, et al. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2549-56.

[19] May LT, Santhanam U, Tatter SB, Bhardwaj N, Ghrayeb J, Sehgal PB. Phosphorylation of secreted forms of human beta 2-interferon/hepatocyte

stimulating factor/interleukin-6. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152:1144-50.

[20] Mchenga SS, Wang D, Li C, Shan F, Lu C. Inhibitory effect of recombinant IL-25 on the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice. *Cell Mol Immunol.* 2008;5:425-31.

[21] Mikuls TR, Saag KG, Criswell LA, Merlino LA, Kaslow RA, Shelton BJ, et al. Mortality risk associated with rheumatoid arthritis in a prospective cohort of older women: results from the Iowa Women's Health Study. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:994-9.

[22] Nanke Y, Kotake S, Akama H, Kamatani N. Alkaline phosphatase in rheumatoid arthritis patients: possible contribution of bone-type ALP to the raised activities of ALP in rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol.* 2002;21:198-202.

[23] Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2:619-26.

[24] Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Førre Ø, Helgetveit K, et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48:367-70.

[25] Orozco G, Rueda B, Martin J. Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother.* 2006;60:656-62.

[26] Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Filloo JA, Llorca J, Martin J, et al. Interleukin-6 gene -174 promoter polymorphism is associated with endothelial dysfunction but not with disease susceptibility in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27:964-70.

[27] Panoulas VF, Douglas KM, Smith JP, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Nightingale P, et al. Transforming growth factor-beta1 869T/C, but not interleukin-6 -174G/C, polymorphism associates with hypertension in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48:113-8.

[28] Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J, Wojciechowska B, Lacki JK, Maslinski S. Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RA). *Scand J Immunol.* 2010;72:134-41.

[29] Pascual M, Nieto A, Matarán L, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Martín J. IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2000;1:338-40.

[30] Pawlik A, Wrzesniewska J, Florczak M, Gawronska-Szklarz B, Herczynska M. IL-6 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2005;34:109-13.

- [31] Qian Y, Kang Z, Liu C, Li X. IL-17 signaling in host defense and inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol*. 2010;7:328-33.
- [32] Rauen T, Hedrich CM, Juang YT, Tenbrock K, Tsokos GC. cAMP-responsive element modulator (CREM) α protein induces interleukin 17A expression and mediates epigenetic alterations at the interleukin-17A gene locus in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem*. 2011;286:43437-46.
- [33] Shahrara S, Pickens SR, Dorfleitner A, Pope RM. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2009;182:3884-91.
- [34] Shen L, Zhang H, Yan T, Zhou G, Liu R. Association between interleukin 17A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Gene*. 2015;566:18-22.
- [35] Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet*. 2008;371:987-97.
- [36] Trajkov D, Mishevskia-Perchinkova S, Karadzova-Stojanoska A, Petlichkovski A, Strezova A, Spiroski M. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. *Clin Rheumatol*. 2009;28:1291-300.

[37] Unfried G, Böcskör S, Endler G, Nagele F, Huber JC, Tempfer CB. A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2003;18:267-70.

[38] van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1845-50.

[39] Wu X, Zeng Z, Chen B, Yu J, Xue L, Hao Y, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *Int J Cancer.* 2010;127:86-92.

[40] Wypasek E, Undas A, Snizek-Maciejewska M, Kapelak B, Plicner D, Stepień E, et al. The increased plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery are associated with the interleukin-6-174G > C gene polymorphism. *Ann Clin Biochem.* 2010;47:343-9.

[41]. Solus JF, Chung CP, Oeser A, et al. Genetics of serum concentration of IL-6 and TNF α in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a candidate gene analysis. *Clin Rheumatol.* 2015;34:1375-82.

- [42]. Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N et al (2006) IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol* 117:795–801.
- [43]. Espinoza JL, Takami A, Nakata K et al (2011) A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft- versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One* 6:e26229
- [44]. Wei ST, Sun YH, Zong SH and Xiang YB (2015) Serum Levels of IL-6 and TNF- α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. *Med Sci Monit* 21:4030-4038.
- [45]. Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. Association between TNF- α promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2014; 34:465-471.
- [46]. Chen WF, Fischer M, Frank G, Zlotnik A. Distinct patterns of lymphokine requirement for the proliferation of various subpopulations of activated thymocytes in a single cell assay. *J Immunol* 1989;143:1598
- [47]. Rein T, Forster R, Krause A, Winnacker EL, Zorbas H. Organization of the alpha-globin promoter and possible role of nuclear factor I in an alpha-globin-inducible and a noninducible cell line. *J Biol Chem* 1995;270:19643–
- [48]. Zavaleta-Muñiz SA, Martín-Márquez BT, Gonzalez-Lopez L, Gonzalez-Montoya NG, Díaz-Toscano ML, Ponce-Guarneros JM, et al. The -174G/C

and -572G/C interleukin 6 promoter gene polymorphisms in Mexican patients with rheumatoid arthritis: a case-control study. Clin Dev Immunol. 2013;2013:959084

Table 1. Characteristics of RA patients

Variable	RA patients (N = 90)
Sex (Female/male); n(%)	82 (91.1%)/ 8 (8.9%)
Age, mean (SD) years	56 (11.6)
Age at onset, mean (range) years	45 (19–83)
Disease duration, mean (range) years	13 (3–39)
Rhemathoid factor positive (>10 IU/ml), n (%)	64 (71 %)
ACPA present, mean (range)	183 (24-798) IU/ml
Negative (<20 IU/ml), n (%)	31 (35%)
Moderately positive (20 – 60 IU/ml), n (%)	5 (6%)
Strongly positive (>60 IU/mL), n (%)	54 (59%)
DAS28	
Remission (<2.6), n (%)	0 (0%)
Low/moderate (2.6 - 5.1), n (%)	31 (34.5%)
High (≥5.1), n (%)	59 (64.4%)
Erosion present, n (%)	80 (89%)
Erythrocyte sedimentation rate high, n (%)	43 (48%)
C-reactive protein, mean (range)	2.14 (0.1–17.5) mg/dl
Smoking, n(%)	52 (58 %)

SD - standard deviation; DAS28 - disease activity score 28 joints

Table 2. Genotypic and allelic frequencies of the *IL-6* -174 G>C, *IL-17A* -197G>A and *IL-17F* +7488A>G polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis (RA) and controls.

IL-6	RA patients		Controls		<i>HWE</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
	N = 90	%	N =186	%			
Genotype							
GG	54	60.0	104	55.9			
GC	36	40.0	76	40.8			
CC	0	0.0	6	3.3	0.5201	0.8455 (0.507-1.410)	1.4102
Allele							
G	144	80.0	284	76.3		1	
C	36	20.0	88	23.7	0.3346	0.8068 (0.521-1.248)	0.3920

IL-17A	RA patients		Controls		<i>-HWE</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
	N = 90	%	N = 188	%			
Genotype							
GG	40	44.5	84	44.7			
GA	43	47.8	89	47.3			
AA	7	7.7	15	8.0	0.9704	1.0096 (0.609-1.673)	0.9268
Allele							
G	123	68.4	257	68.4		1	
A	57	31.6	119	31.6	0.9966	1.0008 (0.683-1.466)	0.9257

IL-17F	RA patients		Controls		<i>HWE</i>	OR (95% CI)	<i>p</i> *
	N = 90	%	N =186	%			
Genotype							
AA	80	88.9	163	87.6			
AG	8	8.9	22	11.8			
GG	2	2.2	1	0.6	0.7633	0.8859 (0.402-1.950)	0.9178
Allele							
A	168	93.4	348	93.5		1	
G	12	6.6	24	6.5	0.9236	1.0357(0.505-2.121)	0.9299

Model dominant was used in all cases; N – number of subjects; *P*- *P* value of χ^2 test; OR – odds ratio; CI – confidence interval; *P** - *P* value of odds ratio.

Table 3. Genotypic and allelic frequencies of *IL-6* -174 G>C, *IL-17A* -197G>A and *IL-17F* +7488A>G polymorphisms in RA patients stratified by clinical features.

Features	DAS 28				OR (p value)	Rheumatoid factor				OR (p value)	ACPA				OR (p value)
	Low/moderate e (N=31)		High (N=59)			Negative (N=26)		Positive (N=64)			Negative (N=31)		Positive (N=59)		
	N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
IL-6															
GG	17	54.8	37	62.7	1.38 (0.618)	9	34.6	45	70.3	4.47 (0.0038)	12	38.7	42	71.2	3.91 (0.0057)
GC+CC	14	45.2	22	37.3	ref	17	65.4	19	29.7	ref	19	61.3	17	28.8	ref
IL-17A															
GG	15	48.7	25	42.4	0.78 (0.747)	9	34.6	31	48.4	1.77 (0.3360)	14	45.2	26	44.1	0.95 (0.9013)
GA+AA	16	51.6	34	57.6	ref	17	65.4	33	51.6	ref	17	54.8	33	55.9	ref
IL-17F															
AA	24	77.4	56	94.9	5.44 (0.031)	21	80.8	59	92.2	2.80 (0.2332)	26	83.9	54	91.5	2.07 (0.4562)
AG+GG	7	22.6	3	5.1	ref	5	19.2	5	7.8	ref	5	16.1	5	8.5	ref

N – number of subjects; ref - reference; p value – p value of Odds ratio; ref – reference; ACPA= Anti-Citrullinated Proteins Antibody; DAS28=disease activity score 28 joints.

8. Discussão geral

Este trabalho investigou características clínicas e o risco para o desenvolvimento de AR em associação com polimorfismos em genes de citocinas. A AR é uma patologia que acomete um grande número de indivíduos, que é responsável por um número expressivo de incapacitados e óbitos, e, que infelizmente não é devidamente estudada na população brasileira.

Quanto às características clínicas estudadas, em relação ao sexo, idade e idade ao início da doença, os pacientes deste estudo estiveram de acordo com os dados da literatura, com um predomínio do sexo feminino (90% das amostras) e a média da idade ao início da doença em torno de 45 anos. Resultados semelhantes ao estudo dirigido por Senna e colaboradores em 2004, o qual analisou a prevalência de algumas patologias inflamatórias na população brasileira, dentre elas a AR. Esses pesquisadores aplicaram o questionário “COPCORD” em 3038 brasileiros, e, dos indivíduos que apresentavam AR, 70% deles afirmavam que possuíam ou possuíram limitações devido à doença e todos relataram sintomatologia dolorosa. Outro dado importante do trabalho de Senna e cols (2004) indica que 35% dos pacientes de AR declaravam sofrer de dores intensas e que em uma escala de 0-10, a média indicada pelas repostas estava em torno de 6.14.

Sobre a idade ao início da doença, vale ressaltar que o declínio observado com o aumento da idade foi encontrado em nossos dados, corroborando as hipóteses que os níveis séricos de hormônios estariam relacionados diretamente com o maior aparecimento em mulheres e com a idade de desenvolvimento [MacGregor and Silman, 1998; Wilder, 1996]. Portanto, existe a necessidade de

pesquisas focadas na participação de hormônios na patogênese de algumas doenças autoimunes como a AR.

A presença do FR e do anti-CCP foi diagnóstica em 71.2% e 65.6%, respectivamente. Esses achados também não destoaram dos encontrados em pesquisas em outras populações [Paradowska-Gorycka *et al.*, 2010; Metawi *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2015]. Esses dois anticorpos possuem importantes papéis no diagnóstico e na predictabilidade do curso da doença. Entretanto, FR mesmo sendo o teste sorológico mais aceito e amplamente utilizado para a AR, não é nem muito sensível e nem específico para o diagnóstico de AR inicial [Goldbach-Mansky *et al.*, 2000], pois, é comum idosos e pacientes de outras patologias autoimunes apresentarem positividade para este anticorpo. Já os anti-CCP são reconhecidos como sendo mais específicos na AR e são defendidos como a escolha mais apropriada para o diagnóstico da doença [Silveira *et al.*, 2007]. Esses dois anticorpos foram também observados em relação à possíveis associações com polimorfismos nos genes de citocinas estudados. O SNP -174 G/C no gene da IL-6 demonstrou associação significativa, sendo que o genótipo G/G que determina a maior produção de IL-6 conferiu um risco aumentado de 4.47 ($p=0.0038$) e 3.91 ($p=0.0057$) vezes para positividade para FR e anti-CCP, respectivamente. Esse resultado é contraditório aos apresentados no estudo de Marinou e colaboradores (2007), contudo, a pequena literatura disponível que investigou essa associação dificulta que hipóteses científicas sejam defendidas e apontam para a necessidade de mais estudos a esse respeito.

Outro dado clínico preocupante encontrado em nosso trabalho refere-se à atividade da doença. Foi utilizado o questionário amplamente aceito, DAS28, o

qual indicou que 64.4% dos pacientes estavam no período de atividade grave da AR, e apenas 1.1% encontravam-se em remissão. Nossos resultados indicaram a relação do polimorfismo IL-17F +7488A/G com o DAS28 (OR=5.44 (IC=1.29-22.85), $p=0.031$), na qual, pacientes que apresentavam o genótipo A/A (selvagem) possuíam uma chance maior de progredirem para uma atividade maior da doença, enquanto os indivíduos portadores do alelo “C”, responsável pela alteração na funcionalidade desta citocina [Kawaguchi *et al.*, 2006], demonstraram uma tendência de atividade mais leve, provavelmente pela menor ativação e função desta citocina. Entretanto, foi observada uma precariedade de estudos que investigassem essa interação para melhor entendimento dessa associação. Porém, ressaltamos que os altos níveis de atividade da doença encontrados em nossa amostra são preocupantes, visto que, é nesse estágio clínico que normalmente os pacientes apresentam maiores níveis de morbidade e mortalidade [Mikuls *et al.*, 2002].

Em relação aos indicativos indiretos de inflamação, VHS e PCR, nossos resultados constataram que ambos estavam aumentados quando comparados aos níveis encontrados na população controle. Esses dois achados clínicos são utilizados tanto no diagnóstico, quanto no DAS28. Cerca de 48% dos nossos pacientes apresentam VHS alto, indicando que uma grande quantidade de mediadores inflamatórios estavam presentes no sangue dos indivíduos analisados. A média da PCR ficou em torno de 2.14 mg/dL, no qual é indicado que valores acima de 1.0 mg/dL são compatíveis com processos infecciosos ou inflamatórios mais complexos.

Contudo, estudos tem investigado a confiabilidade de se usar esses dois parâmetros associados ao DAS28. Dentre eles, o recente estudo desenvolvido

por Sengul e colaboradores (2015) aponta que há diferenças significativas quando comparados o DAS28 relacionado ao VHS ou a PCR. Dado que, ao se basear no VHS para se calcular o DAS28, esse parâmetro poderia estar alterado por diversas outras causas, como idade, sexo, anemia, proteínas plasmáticas, enquanto, a PCR seria mais sensível para alterações inflamatórias, mesmo que em um curto espaço de tempo [Sengul *et al.*, 2015].

Em relação às associações entre os polimorfismos estudados e a susceptibilidade a AR, os indivíduos carreadores do alelo A (genótipos A/A + A/C) no SNP IL-23R +2199 A/C se mostraram mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença, quando comparados a portadores do genótipo C/C (OR=3.46, $p<0.001$), portanto, o alelo A conferiria aumento de risco para o desenvolvimento da doença. Resultados semelhantes também foram obtidos por Faragó e colaboradores em 2008 estudando húngaros. Enquanto, outros polimorfismos (rs1343151, rs10489629, rs7517847) localizados no gene da IL-23R foram relacionados com AR, como descrito por Chen-Xu e colaboradores em 2012, em um estudo com caucasianos. É importante destacar que poucos estudos estão disponíveis para comparar os nossos resultados com outras populações. Entretanto, os polimorfismos no gene da IL-23R tem recebido um aumento no número de pesquisas que investigam a influência desses SNPs em doença inflamatória, como a doença inflamatória intestinal [Venegas *et al.*, 2008], artrite psoriática [Popadic *et al.*, 2014] e síndrome de reconstituição imune [Ogola *et al.*, 2014].

Polimorfismos no gene da IL-18 têm sido descritos e associados a diversas patologias, dentre estes, o SNP funcional presente na posição -105 (IL-18 -105A/C). Arimitsu e colaboradores (2006) demonstraram a relação deste

polimorfismo com alterações na produção de IL-18 em monócitos. Ressaltamos também que a IL-18 estaria atrelada ao aumento da infiltração de células inflamatórias no tecido sinovial, e assim, influenciaria nas manifestações clínicas da AR [Leung *et al.*, 2000].

Nossos resultados demonstraram que a distribuição genotípica diferiu significativamente entre pacientes e controles, indicando que os portadores do alelo C (genótipos A/C + C/C) apresentavam risco aumentado em 3.77 vezes ($p < 0.0001$). Por outro lado, estudando uma população asiática, Lee e colaboradores (2007), encontraram associação entre o alelo A e a susceptibilidade para AR. Contudo, em outras patologias inflamatórias como Lúpus Eritematoso Sistêmico [Lin *et al.*, 2008], doença de Kawasaki [Chen *et al.*, 2009], e asma [Higa *et al.*, 2003], foi observado a mesma relação do nosso estudo. A interação entre IL-18 e IL-12 atua como um indutor potente da produção de IFN- γ a partir de células Th1, processo que poder ser desencadeado em diversos tipos celulares, como: monócitos/macrófagos, condrócitos, células dendríticas, fibroblastos sinoviais e queratinócitos [Danneskiold-Samsøe *et al.*, 2007]. Além disso, níveis alterados de IL-18, por vezes, podem induzir efeitos patológicos em vários órgãos, como já foi demonstrada a sua participação na indução e perpetuação da inflamação crônica na AR [McInnes e Schett, 2005].

Além das associações significativas indicadas acima pelo nosso estudo, as análises estatísticas demonstraram não relação entre polimorfismos nos genes da IL-12B, IL-17A, TNF- α e IFN- γ com o risco para AR ou com suas principais características clínicas. Contudo, reforçamos a necessidade de mais estudos que investiguem a participação dessas citocinas e a patogênese da AR na população brasileira.

Para nosso conhecimento, os resultados descritos acima são os primeiros achados da associação com os polimorfismos estudados na população Brasileira com a AR. Até o presente, o único trabalho publicado encontrado foi o desenvolvido por Boechat e colaboradores (2013), o qual associou o SNP TNF- α - 308 G/A com algumas características clínicas da AR, mas não com a susceptibilidade.

Portanto, destacamos a importância deste trabalho na investigação desta doença que afeta uma grande parcela da população mundial, que caso não tratada precocemente e eficazmente, conduz seus pacientes a quadros de baixa qualidade de vida ou altas taxas de mortalidade.

9. Conclusões gerais

Os dados apresentados nesse trabalho mostraram que as características clínicas da Artrite Reumatoide na população brasileira não diferem em grande parte da literatura científica em outras populações. Além de que, aponta para a composição preocupante do quadro clínico de pacientes.

Em relação às associações entre os polimorfismos estudados com as características clínicas analisadas, observou-se uma associação significativa entre o DAS28 e SNP IL-17F +7488 A/G, e entre o SNP IL-6 -174 G/C com FR e anti-CCP.

As análises entre polimorfismos e o risco para AR, demonstraram que SNPs presentes nos genes da IL-23R e IL-18 estariam associados na população estudada.

Por fim, o presente estudo aponta para associações não estudadas anteriormente na população brasileira. Com isso, surge a necessidade de mais estudos que envolva essa patologia tão complexa nas populações do Brasil.

10. Referências Bibliográficas

Abasolo L, Ivorra-Cortes J, Leon L, Jover JA, Fernandez-Gutierrez B and Rodriguez-Rodriguez L (2015) Influence of demographic and clinical factors on the mortality rate of a rheumatoid arthritis cohort: A 20-year survival study. *Semin Arthritis Rheum*. doi:10.1016/j.semarthrit.2015.10.016

Adams J, Burridge J, Mullee M, Hammond A and Cooper C (2004) Correlation between upper limb functional ability and structural hand impairment in an early rheumatoid population. *Clin Rehabil* 18:405-13.

Aggarwal R, Liao K, Nair R, Ringold S, Costenbader KH (2009) Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 61:1472-83.

Albers JM, Paimela L, Kurki P, Eberhardt KB, Emery P, van't Hof MA, Schreuder F, Leirisalo-Repo M and van Rielet P L C M (2001) Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60:453-8.

Aletaha D, Breedveld FC and Smolen JS (2005) The need for new classification criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52:3333-3336.

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum

NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, et al. (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69:1580-1588.

Almeida PHTQ, Pontes TB, Matheus JPC, Muniz LF and Mota LMH (2015) Terapia ocupacional na artrite reumatoide: o que o reumatologista precisa saber?. *Rev. Bras. Reumatol* 55: 272-80.

Al-Rayes HR, Al-Swailem M, Albelawi M, Arfin A, Al-Asmari and M. Tariq (2011) TNF- α and TNF- β Gene Polymorphism in Saudi Rheumatoid Arthritis Patients. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord* 4:55-63.

Alvarez-Rodriguez L, Martínez-Taboada VM, López-Hoyos M, Mata C, Fernandez Prieto L, Agudo-Bilbao M, Calvo J, Ruiz Soto M, Rodriguez-Valverde V, Ruiz T, et al. (2009) Interleukin-12 gene polymorphisim in patients with giant cell arteritis, polymyalgia rheumatica and elderly-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 27:14–18.

Andrade LEC and Leser PG (2004) Auto-anticorpos contra o sistema filagrina-citrulina no diagnóstico de artrite reumatoide. *Revista Paulista de Reumatologia* 3:5-6.

Aravena O, Pesce B, Soto L, Orrego N, Sabugo F, Wurmman P, Molina MC, Alfaro J, Cuchacovich M, Aguillón JC, et al. (2011) Anti-TNF therapy in patients with

rheumatoid arthritis decreases Th1 and Th17 cell populations and expands IFN- γ -producing NK cell and regulatory T cell subsets. *Immunobiology* 216:1256-1263.

Arend WP, Palmer G and Gabay C (2008) IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 223:20-38.

Arimitsu J, Hirano T, Higa S, Kawai M, Naka T, Ogata A, Shima Y, Fujimoto M, Yamadori T, Hagiwara K, et al. (2006) IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 342:1413-1416.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH and Luthra HS (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-324.

Astry B, Harberts E and Moudgil KD (2011) A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis. *J Interferon Cytokine Res* 31:927-940.

Bettelli E, Korn T, Oukka M and Kuchroo VK (2008) Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453:1051-1057.

Bettencourt AC, Carvalho B, Leal S, Brás D, Lopes A, Martins da Silva E, Santos

T, Torres I, Almeida F, Farinha P, et al. (2015) The Protective Role of HLA-DRB1(*)13 in Autoimmune Diseases. J Immunol Res ID:948723.

Billiau A and Matthys P (2009) Interferon-gamma: a historical perspective. Cytokine Growth Factor Rev 20:97-113.

Birnbaum H, Pike C, Kaufman R, Marynchenko M, Kidolezi Y and Cifaldi M (2010) Societal cost of rheumatoid arthritis patients in the US. Curr Med Res Opin 26:77-90.

Boechat ALN, Boechat MM, Ogusku MR, Alencar TC, Abensur J, Cardoso Neto L, Amorim LM, de Oliveira A, Sadahiro and Dos-Santos MC (2013) The influence of a TNF gene polymorphism on the severity of rheumatoid arthritis in the Brazilian Amazon. Cytokine 61:406-412.

Bogunia-Kubik K, Świerkot J, Malak A, Wysoczańska B, Nowak B, Białowas K, Gębura K, Korman L, and Wiland P (2015) IL-17A, IL-17F and IL-23R Gene Polymorphisms in Polish Patients with Rheumatoid Arthritis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 63:215-221.

Brentano F, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S and Kyburz D (2009) Abundant expression of the interleukin (IL)23 subunit p19, but low levels of bioactive IL23 in the rheumatoid synovium: differential expression and Toll-like receptor-(TLR) dependent regulation of the IL23 subunits, p19 and p40, in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 68:143-150.

Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, et al. (2007) A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 80:273-290.

Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L and Miossec P (1999) Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42:963-970.

Chang SH, Park H and Dong C (2006) Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem* 281:35603-35607.

Chen B, Zeng Z, Xu L, Wu X, Yu J, Xue L, Hao Y, Wang Y, Sung JJ, Chen M, et al. (2011) IL23R +2199A/C polymorphism is associated with decreased risk of certain subtypes of gastric cancer in Chinese: a case-control study. *Cancer Epidemiol* 35:165-169.

Chen SY, Wan L, Huang YC, Sheu JJ, Lan YC, Lai CH, Lin CW, Chang JS, Tsai Y, Liu SP, et al. (2009) Interleukin-18 gene 105A/C genetic polymorphism is associated with the susceptibility of Kawasaki disease. *J Clin Lab Anal* 23:71-76.

Chen WF, Fischer M, Frank G and Zlotnik A (1989) Distinct patterns of lymphokine

requirement for the proliferation of various subpopulations of activated thymocytes in a single cell assay. *J Immunol* 143:1598-1605.

Chen-Xu M, Topless R, McKinney C, Merriman ME, Phipps-Green A, Dalbeth N Gow PJ, Harrison AA, Highton J, Jones PB, *et al.* (2012) Replication of association of the interleukin 23 receptor rs1343151 variant with rheumatoid arthritis in Caucasian sample sets. *Ann Rheum Dis* 71:155-157

Chua KH, Kee BP, Tan SY and Lian LH (2009) Interleukin-6 promoter polymorphisms (-174 G/C) in Malaysian patients with systemic lupus erythematosus. *Braz J Med Biol Res* 42:551-555.

Coenen MJ and Gregersen PK (2009) Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape. *Genes Immun* 10:101–11.

Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME and Donaldson PT (2002) Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 22:404-12.

Costenbader KH and Karlson EW (2006) Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus* 15:737-745.

- Dai SM, Shan ZZ, Xu H and Nishioka K (2007) Cellular targets of interleukin-18 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66:1411-1418.
- Danneskiold-Samsøe B, Bartels EM and Dreyer L (2007) Gender differences in autoimmune diseases illustrated by rheumatoid arthritis. *Ugeskr Laeger* 169:2440-2442.
- Di Giuseppe D, Discacciati A, Orsini N and Wolk A (2014) Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 16:61.
- Di Meglio P, Di Cesare A, Laggner U, Chu CC, Napolitano L, Villanova F, Tosi I, Capon F, Trembath RC, Peris K, et al. (2011) The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLoS One* 6:e17160.
- Dinarello CA (2007) Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin Nephrol* 27:98-114.
- Ding B, Padyukov L, Lundstrom E, Seielstad M, Plenge RM, Oksenberg JR, Gregersen PK, Alfredsson L and Klareskog L (2009) Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum* 60:30–8.

Dorland WAN, Anderson DM, Albert DM, Behrman RE and Barash PG. Dicionário Médico Ilustrado Dorland. São Paulo. Manole. 1999.

Duerr RH, Taylor KD, Bispinorant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, et al. (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314:1461-1463.

Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, et al. (2011) A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One* 6:e26229.

Faragó B, Magyari L, Sáfrány E, Csöngéi V, Járomi L, Horvatovich K, Sipeky C, Maász A, Radics J, Gyetvai A, et al. (2008) Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 67:248-250.

Firestein GS (2005) Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 11:39-44.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S and Woo P (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369-1376.

- Fragoso JM, Vargas Alarcón S, Jiménez Morales O, Hernández R and Bello JR (2014) Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune diseases (AIDs): molecular biology and genetics. *Gac Med Mex* 150:334-344.
- Gambhir D, Lawrence A, Aggarwal A, Misra R, Mandal SK and Naik S (2010) Association of tumor necrosis factor alpha and IL-10 promoter polymorphisms with rheumatoid arthritis in North Indian population. *Rheumatol Int* 30:1211-1217.
- Gao SJ, Zhang L, Lu W, Wang L, Chen L, Zhu Z and Zhu HH (2015) Interleukin-18 genetic polymorphisms contribute differentially to the susceptibility to Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 21:8711-22.
- García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, Corrales A, Robledo G, Castañeda S, Miranda-Fillooy JA, Blanco R, Fernández-Gutiérrez B, Balsa A, *et al* (2012) Analysis of the interferon gamma (rs2430561, +874T/A) functional gene variant in relation to the presence of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 7:47166.
- Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T and Renauld JC (2009) Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 60:390–5.

George J, Levy Y and Shoenfeld Y (1997) Smoking and immunity: an additional player in the mosaic of autoimmunity. *Scand J Immunol* 45:1–6.

Georges JL, Loukaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, Ruidavets JB, Cambien F and Tiret L (2001) Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. *Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde. J Mol Med (Berl)* 79:300-305.

Godarzi EM, Sarvestani EK, Aflaki E and Amirghofran Z (2011) Interleukin-6 gene polymorphism in Iranian patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 30:179-184.

Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, Steiner G, Rosen A, Zhang C, Ménard HA, *et al.* (2000) Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res* 2:236-243.

Gülfe A, Aletaha D, Saxne T and Geborek P (2009) Disease activity level, remission and response in established rheumatoid arthritis: performance of various criteria sets in an observational cohort, treated with anti-TNF agents. *BMC Musculoskelet Disord* 10:41.

Hamdy E, Afify RAA, Kamal A, Abass D and Mahmoud M (2011) IL-6 promoter polymorphism (–174G/C) and systemic lupus erythematosus. *Comp Clin Pathol* 1:1.

Hart FD (1976) History of the treatment of rheumatoid arthritis. Br Med J. 27;763-5.

Higa S, Hirano T, Mayumi M, Hiraoka M, Ohshima Y, Nambu M, Yamaguchi E, Hizawa N, Kondo N, Matsui E, et al. (2003) Association between interleukin-18 gene polymorphism 105A/C and asthma. Clin Exp Allergy 33:1097-1102.

Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Pasternack A and Hurme M (2001) Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjögren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. Rheumatology (Oxford) 40:656-661.

Hussein YM, Mohamed H, Pasha E, El-Shahawy E and Alzahrani SS (2011) Association of tumor necrosis factor alpha and its receptor polymorphisms with rheumatoid arthritis in female patients. Cell Immunol 271:192-196.

Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S and Nakae S (2011) Functional specialization of interleukin-17 family members. Immunity 34:149-162.

Iwakura Y, Nakae S, Saijo S and Ishigame H (2008) The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. Immunol Rev 226:57-79.

- Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, and Powrie F (2008) Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 28:559-570.
- Jorgensen C, Picot MC, Bologna C and Sany J (1996) Oral contraception, parity, breast feeding, and severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 55:94–8.
- Kageyama Y, Kobayashi H and Kato N (2009) Infliximab treatment reduces the serum levels of interleukin-23 in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 19:657-662.
- Kallberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, Pedersen M, Padyukov L, Garred P, Frisch M, Karlson EW, Klareskog L and Alfredsson L (2009) Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies. *Ann Rheum Dis* 68:222–7.
- Karlson EW, Ding B, Keenan BT, Liao K, Costenbader KH, Klareskog L, Alfredsson L and Chibnik LB (2013) Association of environmental and genetic factors and gene-environment interactions with risk of developing rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 65:1147-1156.
- Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, Suzuki S, Matsukura S, Kokubu F, Maeda Y, Fukui Y, Konno S, Huang SK, et al. (2006) IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol* 117:795-801.

Kawatkar AA, Jacobsen SJ, Levy GD, Medhekar SS, Venkatasubramaniam KV, and Herrinton LJ (2012) Direct medical expenditure associated with rheumatoid arthritis in a nationally representative sample from the medical expenditure panel survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64:1649-1656.

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

Kerekes G, Szekanecz Z, Dér H, Sándor Z, Lakos G, Muszbek L, Csipö I, Sipka S, Seres I, Paragh G, *et al* (2008) Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J Rheumatol* 35:398-406.

Kim HR, Cho ML, Kim KW, Juhn JY, Hwang SY, Yoon CH, Park SH, Lee SH and Kim HY (2007) Up-regulation of IL-23p19 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by IL-17 through PI3-kinase-, NF-kappaB- and p38 MAPK-dependent signalling pathways. *Rheumatology (Oxford)* 46:57-64.

Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, Weyand CM (1999) Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol* 90:65-78.

- Kool M, van Loo G, Waelpuut W, De Prijck S, Muskens F, Sze M, van Praet J, Branco-Madeira F, Janssens S, Reizis B, et al. (2011) The ubiquitin-editing protein A20 prevents dendritic cell activation, recognition of apoptotic cells, and systemic autoimmunity. *Immunity* 35:82–96.
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, et al. (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103:1345–1352.
- Krausz S, Boumans MJ, Gerlag DM, Lufkin J, van Kuijk AW, Bakker A, de Boer M, Lodde BM, Reedquist KA, Jacobson EW, et al. (2012) Brief report: a phase IIa, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of apilimod mesylate, an interleukin-12/interleukin-23 inhibitor, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 64:1750-1755.
- Kruse S, Kuehr J, Moseler M, Kopp MV, Kurz T, Deichmann KA, Foster PS and Mattes J (2003) Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 111:117-122.
- Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z (2013) Genetics of rheumatoid arthritis – a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 45:170–9.

Kwoh CK (2002) American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatology* 46:328-346.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA and Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.

Lee CC, Lin WY, Wan L, Tsai Y, Lin YJ, Tsai CH, Huang CM and Tsai FJ (2007) Interleukin-18 gene polymorphism, but not interleukin-2 gene polymorphism, is associated with rheumatoid arthritis. *Immunogenetics* 59:433-439.

Leeb BF and Mai HT (2015) Smoking - Does It Affect Rheumatoid Arthritis Activity? Does It Matter?. *J Rheumatol* 42:1072-1074.

Leung BP, McInnes IB, Esfandiari E, Wei XQ, Liew FY (2000) Interleukin-18 can promote synovial inflammation through activation of peripheral blood and synovial neutrophils. *Arthritis Rheum* 43:1253

Li F, Xu J, Zheng J, Sokolove J, Zhu K, Zhang Y, Sun H, Evangelou E and Pan Z (2014) Association between interleukin-6 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Chinese Han population: a case-control study and a meta-analysis. *Sci Rep* 4:5714.

Li N, Wang JC, Liang TH, Zhu MH, Wang JY, Fu XL, Zhou JR, Zheng SG, Chan P and Han J (2013) Pathologic finding of increased expression of interleukin-17 in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Exp Pathol* 6:1375–1379.

Li R, Zheng X, Popov I, Zhang X, Wang H, Suzuki M, Necochea-Campion RD, French PW, Chen D and Siu L (2012) Gene silencing of IL-12 in dendritic cells inhibits autoimmune arthritis. *J Transl Med* 31:10-19.

Li X, Chai W, Ni M, Xu M, Lian Z, Shi L, Bai Y and Wang Y (2014) The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Biomed Res Int* 2014:265435.

Li X, Gignac MA and Anis AH (2006) The indirect costs of arthritis resulting from unemployment, reduced performance, and occupational changes while at work. *Med Care* 44:304-10.

Libra M, Signorelli SS, Bevelacqua Y, Navolanic PM, Bevelacqua V, Polesel J, Talamini R, Stivala F, Mazzarino MC and Malaponte G (2006) Analysis of G(-174)C IL-6 polymorphism and plasma concentrations of inflammatory markers in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *J Clin Pathol* 59:211-215.

Lin YJ, Wan L, Sheu JJ, Huang CM, Lin CW, Lan YC, Lai CH, Hung CH, Tsai Y,

Tsai CH, et al. 2008. A/C polymorphism in the interleukin-18 coding region among Taiwanese systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 17:124-127.

López P, Gutiérrez C and Suárez A (2010) IL-10 and TNFalpha genotypes in SLE. *J Biomed Biotechnol* 2010:838390.

Louie J (1987) "Renoir, his art and his arthritis." In: Appelboom T, ed. *Art, history and antiquity of rheumatic diseases*. Brussels: Elsevier, 1987:43-4.

Macgregor AJ and Silman AJ (1998) Rheumatoid arthritis: classification and epidemiology. In: *Rheumatology*. 2nd Edition. (J.H. Klippel & P. A. Dieppe). Mosby International. London. UK.

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

Marques Neto JF, Gonçalves ET, Langen, LFOB, Cunha MFL, Rominski S, Oliveira SM, Cury SE, Medeiros F and Sampaio GC (1993) *Rev Bras Reum* 33:169-73.

Martins RP (1989) The state of the art in rheumatology: several historic notes. *Acta Med Port Suppl* 2:47-55.

Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E, Vacca A, and Ribatti D (2006) Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol* 21:557-566.

Masui K, Tsutsui H and Nakanishi K (2003) Pathophysiological roles for IL-18 in inflammatory arthritis. *Expert Opin Ther Targets* 7:701–24.

May LT, Santhanam U, Tatter SB, Bhardwaj N, Ghrayeb J, and Sehgal PB (1988) Phosphorylation of secreted forms of human beta 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6. *Biochem Biophys Res Commun* 152:1144-1150.

McCain JA (2009) Unmet need in the treatment of rheumatoid arthritis. *Managed Care* 18:1-6.

McInnes IB and Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7:429-442.

McInnes IB and Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365:2205-2219.

McInnes IB, Liew FY, and Gracie JA (2005) Interleukin-18: a therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 7:38-41.

Metawi SA, Abbas D, Kamal MM and Ibrahim MK (2011) Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA.

Clin Rheumatol 30:1201-1207.

Mikuls TR, Saag KG, Criswell LA, Merlino LA, Kaslow RA, Shelton BJ and Cerhan JR (2002) Mortality risk associated with rheumatoid arthritis in a prospective cohort of older women: results from the Iowa Women's Health Study. Ann Rheum Dis 61:994-9.

Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K and Nishimoto N (2003) Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 48:1521-1529.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H and Okamura H (2001) Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. Cytokine Growth Factor Rev 12:53-72.

Navarro-Millán I, Singh JA and Curtis JR (2012) Systematic review of tocilizumab for rheumatoid arthritis: a new biologic agent targeting the interleukin-6 receptor. Clin Ther 34:788-802.

Netea MG, Joosten LA, Lewis E, Jensen DR, Voshol PJ, Kullberg BJ, Tack CJ, van Krieken H, Kim SH, Stalenhoef AF, *et al.* (2006) Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. Nat Med 12:650-656.

- Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP and Brown MA (2004) A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 5:151–7.
- O'dell JR (2004) Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 350:2591-2602.
- Ogola GO, Ouma C, Jura WG, Muok EO, Colebunders R and Mwinzi PN (2014) A non-synonymous polymorphism in IL-23R Gene (rs1884444) is associated with reduced risk to schistosomiasis-associated Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in a Kenyan population. *BMC Infect Dis* 14:316.
- Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y and Hattori K (1995) Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378:88-91.
- Papassotiropoulos A, Hock C and Nitsch RM (2001) Genetics of interleukin 6: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:863-871.
- Paradowska-Gorycka A, Trefler J, Maciejewska-Stelmach J and Łacki JK (2010) Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Polish rheumatoid arthritis patients. *Int J Immunogenet* 37:225-231.
- Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, et al. (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-

23R. J Immunol 168:5699-5708.

Park S, Cheon S and Cho D (2007) The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. Cell Mol Immunol 4:329-335.

Petrovic-Rackov L and Pejnovic N (2006) Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol 25:448-452.

Pham T, Bachelez H, Berthelot JM, Blacher J, Bouhnik Y, Claudepierre P, Constantin A, Fautrel B, Gaudin P, Goëb V, *et al.* (2011) TNF alpha antagonist therapy and safety monitoring. Joint Bone Spine 78:15–185.

Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LR, *et al.* (2007) TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. N Engl J Med 357:1199-209.

Popadic S, Ramic Z, Medenica L, Pravica V and Popadic D (2014) IL-23R gene polymorphism rs2201841 is associated with psoriatic arthritis. Int J Immunogenet 41:335-7.

Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH and Hutchinson IV (2000) A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high

IFN-gamma production. *Hum Immunol* 61:863-866.

Prevoo MLL, van Gestel AM, van't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LBA and van Riel PLCM (1996) Remission in a prospective study of patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 35:1101–5.

Qian Y, Liu C, Hartupée J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, Xiao J, Lu Y, Giltaiy N, Liu J, et al. (2007) The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol* 8:247-256.

Reynolds JM, Angkasekwinai P and Dong C (2010) IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:413-423.

Roberts CA, Dickinson AK and Taams LS (2015) The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 6:571.

Rudan I, Sidhu A, Papana SJ, Meng Y, Xin-Wei W, Wang RM, Campbell-Page AR, Demaio H, Nair D, Sridhar E, et al. (2015) Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis. *J Glob Health* 5:010409.

Saada MN, Mabrouka MS, Eldeibb AM and Shakerc OG (2016) Identification of rheumatoid arthritis biomarkers based on single nucleotide polymorphisms

and haplotype blocks: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Advanced Research* 7:1-16.

Sands A and Goodacre L (2013) Occupational therapy assessment and outcome measurement. In: Goodacre L, McArthur M, editors. *Rheumatology practice in occupational therapy*. 1 st ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013.

Santos MJ, Fernandes D, Capela S, da Silva JC and Fonseca JE (2011) Interleukin-6 promoter polymorphism -174 G/C is associated with nephritis in Portuguese Caucasian systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol* 30:409-413.

Santos SR, Fernandes IBC, Maria das Graças M and Henriques, MER (2002) Qualidade de vida do idoso na comunidade: aplicação da Escala de Flanagan. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* 10:757-764.

Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC and van Venrooij WJ (2000) The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 43:155-163.

Sengul I, Akcay-Yalbuздag S, Ince B, Goksel-Karatepe A and Kaya T (2015) Comparison of the DAS28-CRP and DAS28-ESR in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 18:640-645.

Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM and Ferraz MB (2004) Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. J Rheumatol 31:594-597.

Shen L, Zhang H, Yan T, Zhou G, and Liu R (2015) Association between interleukin 17A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Chinese population. Gene 566:18-22.

Shiels MS, Katki HA, Freedman ND, Purdue MP, Wentzensen N, Trabert B, Kitahara CM, Furr M, Li Y, Kemp TJ, *et al.* (2014) Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers. J Natl Cancer Inst 1:106-11

Short CL (1974) The antiquity of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 17:193-205.

Silva RG, Vannuci AB, Latorre LC, Zerbini CAF (2003) Artrite reumatóide. RBM: Revista Brasileira de Medicina 60:8.

Silveira IG, Burlingame RW, von Mühlen CA, Bender AL and Staub HL (2007) Anti-CCP antibodies have more diagnostic impact than rheumatoid factor (RF) in a population tested for RF. Clin Rheumatol 26:1883-1889.

Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, *et al.* (2012) 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of

disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64:625-639.

Stanilova S and Miteva L (2005) Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. *Genes Immun* 6:364–6

Svendsen AJ, Kyvik KO, Houen G, Nielsen C, Holst R, Skytthe A and Junker P (2014) Newborn infant characteristics and risk of future rheumatoid arthritis: a twin-control study. *Rheumatol Int* 34:523-528.

Taleb S, Romain M, Ramkhelawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, Van Snick J (2009) Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med* 206:2067-2077.

Terao C, Ikari K, Nakayamada S, Takahashi Y, Yamada R, Ohmura K, Hashimoto M, Furu M, Ito H, Fujii T, *et al* (2016) A twin study of rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Mod Rheumatol*:1-22.

Van der Heijde DMFM, van't Hof MA, van Riel PLCM, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH and van de Putte LBA (1992) Validity of single variables and composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 51:177– 81.

- van Vilsteren M, Boot CR, Knol DL, van Schaardenburg D, Voskuyl AE, Steenbeek R. and Anema JR (2015) Productivity at work and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 16:107.
- Vassalli P (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411-52.
- Venegas M Beltrán, CJ, Alvarez L, Castro A, Torres T, Leal AD, Lahsen FM, Hermoso MA and Quera R (2008) IL-23R Arg381Gln polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 19:190-195.
- Venkateshan SP, Sidhu S, Malhotra S and Pandhi P (2009) Efficacy of biologicals in the treatment of rheumatoid arthritis. a meta-analysis. *Pharmacology*. 83:1-9.
- Vervordeldonk MJ and Tak PP (2002) Cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 4:208-217.
- Volin MV and Koch AE (2011) Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Interferon Cytokine Res* 31:745-751.
- Wei ST, Sun YH, Zong SH and Xiang YB (2015) Serum Levels of IL-6 and TNF- α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. *Med Sci Monit* 21:4030-4038.

Wells G, Becker JC, Teng J, Dougados M, Schiff M, Smolen J, Aletaha D and van Riel PL (2009) Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann Rheum Dis* 68:954-960.

Wendling D (2008) Interleukin 23: a key cytokine in chronic inflammatory disease. *Joint Bone Spine* 75:517-519.

WHO (1948) Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference, New York, 19–22 June 1946, and entered into force on 7 April 1948.

Wilder RL (1996) Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 44:10-12.

Wilson AG, Symons TL, McDowell H, McDevitt O and Duff GW (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3195-3199.

Vincent C, Nogueira L, Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Arnaud M, Letourneur O, Rolland D, Fournié B, Cantagrel A, Jolivet M, et al. (2002) Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by enzyme-linked

immunosorbent assay: a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46:2051–8.

You CG, Li XJ, Li YM, Wang LP, Li FF, Guo XL and Gao LN (2013) Association analysis of single nucleotide polymorphisms of proinflammatory cytokine and their receptors genes with rheumatoid arthritis in northwest Chinese Han population. *Cytokine* 61:133-138.

Zhou Y, Tan L, Que Q, Li H, Cai L, Cao L, Ye Q and Xiong J (2013) Study of association between HLA-DR4 and DR53 and autoantibody detection in rheumatoid arthritis. *J Immunoassay Immunochem* 34:126-33.

11. Anexos

Anexo I

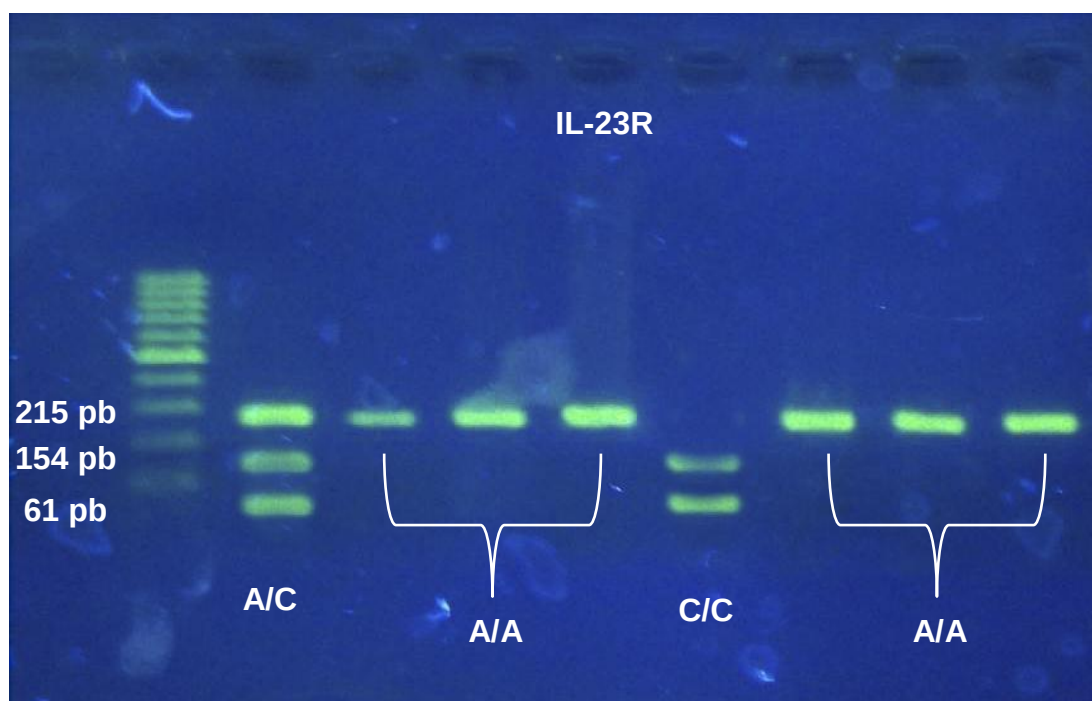


Figura 13. Genotipagem do polimorfismo IL-23R +2199 A/C. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: A/C (215, 154 e 61 pb), A/A (215 pb) e C/C (164 e 61 pb).

Anexo II

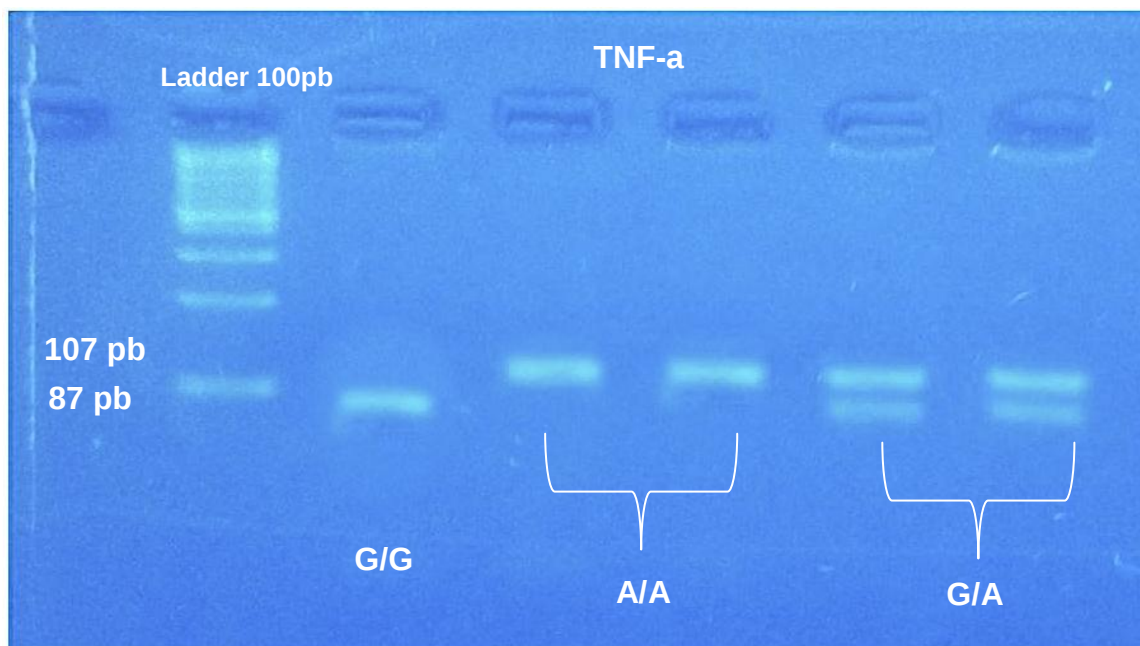


Figura 14. Genotipagem do polimorfismo IL-23R -308 G/A. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: G/G (87 pb), A/A (107 pb) e G/A (107 e 87 pb). Devido ao pequeno tamanho, a banda de 20 pb não é visualizada.

Anexo III

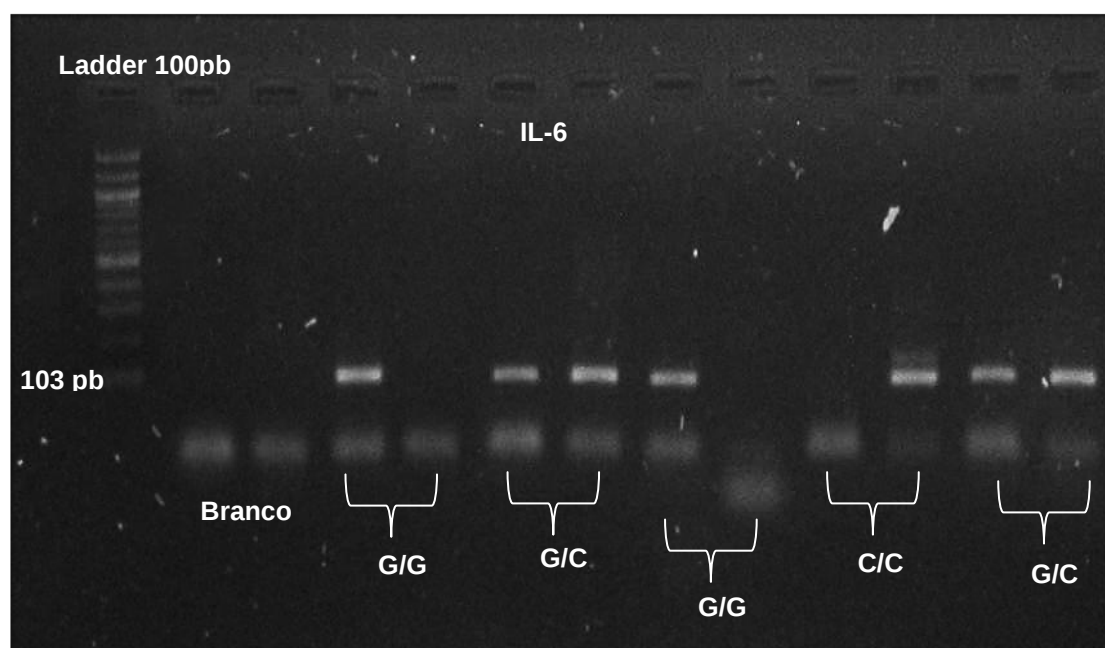


Figura 15. Genotipagem do polimorfismo IL-6 -174 G/C. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: G/G, G/C e C/C de acordo com a presença da banda de 103 pb.

Anexo IV

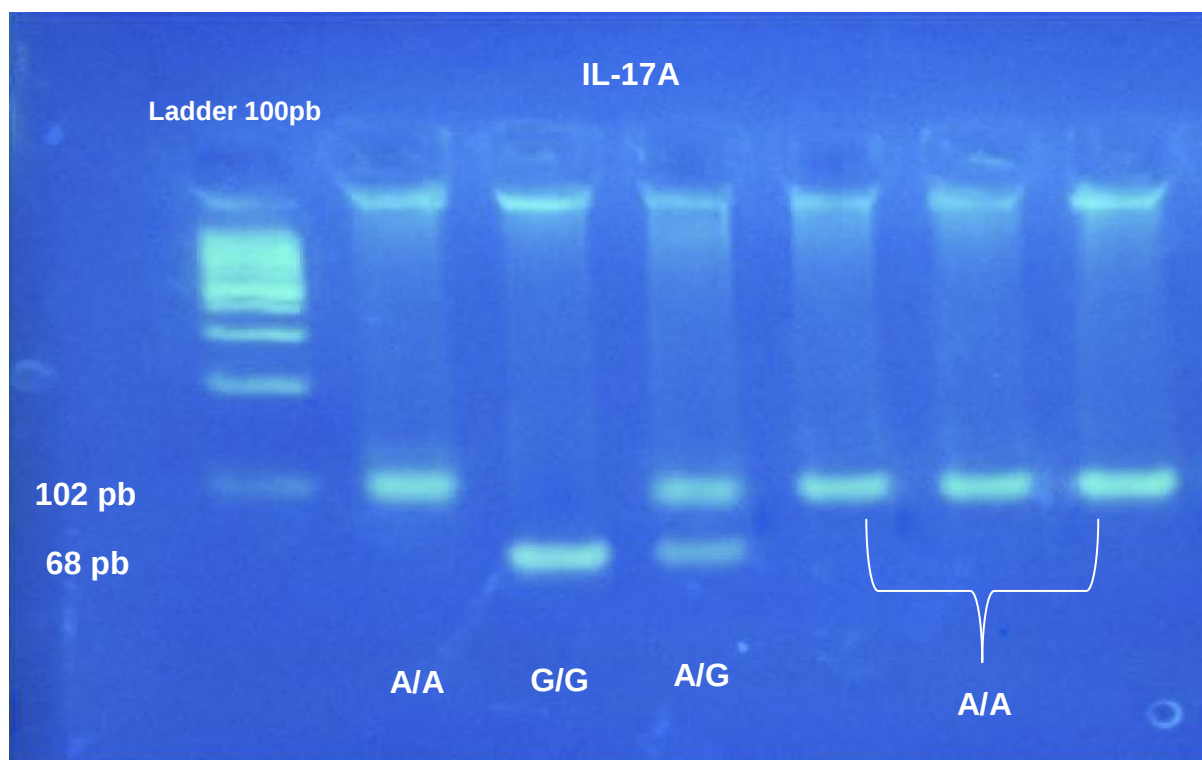


Figura 16. Genotipagem do polimorfismo IL-17A -197 G/A. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: A/A (102 pb), G/G (68 pb) e A/G (102 e 68 pb). Devido ao pequeno tamanho, a banda de 34 pb não foi visualizada.

Anexo V

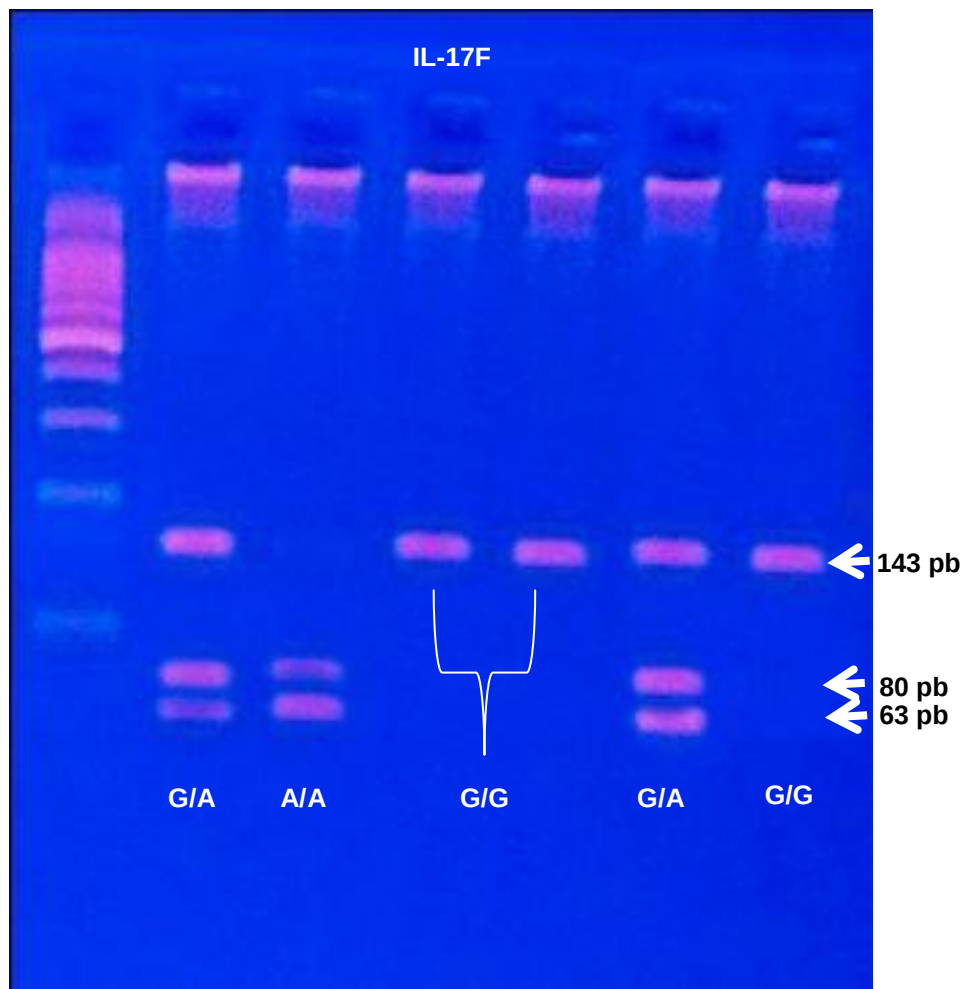


Figura 17. Genotipagem do polimorfismo IL-17F +7488 A/G. Eletroforese em gel de agarose ilustrando os genótipos: G/A (143, 80 e 63 pb), A/A (80 e 63 pb) e G/G (143 pb). Devido ao pequeno tamanho, a banda de 17 pb não é visualizada.

12. Curriculum vitae (Lattes)

Hildson Dornelas Angelo da Silva

Curriculum Vitae

Período:

Março 2012 - Janeiro 2016

Janeiro/2016

Hildson Dornelas Angelo da Silva

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Hildson Dornelas Angelo da Silva
Filiação Jose Angelo da Silva e Katia Maria da Silva Dornelas
Nascimento 04/11/1987 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 6837918 SDS - PE - 15/07/2004
CPF 065.378.574-73

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Perfil Genético de Citocinas na Artrite Reumatoide

Orientador: Paula Sandrin Garcia

2010 - 2012 Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada.

Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

Título: Investigação de polimorfismos em genes de interleucinas e associação com a susceptibilidade ao Lupus Eritematoso Sistêmico, Ano de obtenção: 2012

Orientador: Paulo Roberto Eleutério de Souza

Co-orientador: Maria Tereza Cartaxo Muniz

2006 - 2009 Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

2006 - 2009 Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.

Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

Título: Avaliação da infecção pelo HPV e os polimorfismos C677T e A1298C do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) no retinoblastoma

Orientador: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Formação complementar

2007 - 2009 Extensão universitária em Vestibular Cidadão. (Carga horária: 360h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Introdução a Cronobiologia. (Carga horária: 9h).

Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Inst.Federal de Educação,Ciência e Tecnologia PE - IFPE

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor de Biologia , Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba - IFPB

Vínculo institucional

2012 - 2013 Enquadramento funcional: Professor de Biologia , Carga horária: 40, Regime: Integral

3. Colégio Decisão Imbiribeira - CDI

Vínculo institucional

2010 - 2014 Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor de Biologia , Carga horária: 6, Regime: Parcial

4. Colégio Decisão Cabo - CDC

Vínculo institucional

2010 - 2014 Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor de Biologia , Carga horária: 7, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa **2015 - Atual**

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DE CITOCINAS E DE GENES CODIFICANTES DE ENZIMAS PARTICIPANTES DO METABOLISMO DE DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

Descrição: Projeto investiga polimorfismos em genes de moléculas envolvidas na patogênese e tratamento da Artrite Reumatoide

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2);

Integrantes: Hildson Dornelas Angelo da Silva; Paula Sandrin Garcia; PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE SOUZA; MAIA, MARIA DE MASCENA DINIZ (Responsável); Eliezer Rushansky ; Maria Helena Queiroz de Araujo Mariano

2012 - Atual Perfil Genético de Citocinas na Artrite Reumatoide

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Hildson Dornelas Angelo da Silva; Paulo Souza; Paula Sandrin Garcia (Responsável); Sergio Crovella

Projeto de extensão **2015 - Atual** Viver Bem – Soluções estratégicas na Tecnologia Assistiva

Descrição: Projeto voltado a identificação e produção de tecnologia para melhoria da saúde de pessoas com alguma deficiência.

Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Hildson Dornelas Angelo da Silva (Responsável); ; WILKER VICTOR DA SILVA AZEVÊDO; MÁRCIO CARNEIRO ALBUQUERQUE; DALTON WILLIAMS SILVA ARANDAS

Áreas de atuação

1. Genética
 2. Genética Humana e Médica
 3. Biologia Molecular
-

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

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

Português Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Angelo, H. D.**, GOMES SILVA, I. I. F., OLIVEIRA, R. D. R., LOUZADA-JÚNIOR, P., DONADI, E. A., CROVELLA, S., MAIA, M. M. D., DE SOUZA, P. R. E., SANDRIN-GARCIA, P. Interleukin-18, interleukin-12B and interferon- γ gene polymorphisms in Brazilian patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. Tissue Antigens. , v.86, p.n/a - n/a, 2015.

2. **SILVA, HILDSON DORNELAS ANGELO**, SILVA, ALEX PAULINO, SILVA, HELKER ALBUQUERQUE, ASANO, NADJA MARIA JORGE, MAIA, MARIA DE MASCENA DINIZ, SOUZA, PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO. Interferon gamma

and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Molecular Biology Reports.* , v.41, p.2493 - 24500, 2014.

3. **ANGELO, HILDSON DORNELAS**, DA SILVA, HELKER ALBUQUERQUE, ASANO, NADJA MARIA JORGE, MUNIZ, MARIA TEREZA CARTAXO, DE MASCENA DINIZ MAIA, MARIA, DE SOUZA, PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism -308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Human Immunology.* , v.73, p.1166 - 1170, 2012.

4. ASANO, NADJA MARIA, **ANGELO, HILDSON DORNELAS**, DA SILVA, HELKER ALBUQUERQUE, MAIA, MARIA MASCENA, LINS, OTAVIO GOMES, SOUZA, PAULO ELEUTÉRIO. Interleukin-6 promoter polymorphisms -174 G/C in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Human Immunology.* , v.74, p.1153 - , 2013.

5. DE MASCENA DINIZ MAIA, PAULA F. C., DA SILVA, TAMIRIS M. E., **ANGELO, HILDSON D.**, E SILVA, LAÍS W., GONDIM MARTINS, DANYELLY B., MAIA, MARIA DE MASCENA DINIZ, DE LIMA FILHO, JOSÉ L. Polymorphism associated with birth weight in children of the region of Petrolina, PE, Brazil. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine (Print).* , v.26, p.316 - 317, 2013.

6. Lima, E.L.S, SILVA, V. C., **Angelo, H. D. S. ou Silva, H.D.A**, Bezerra, A.M, MORAIS, V. L. L., MORAIS, A. L., CRUZ, R. V., BARROS, M. H. M., Hassan, R, FREITAS, A. C., Muniz, M.T.C. MTR Polymorphic Variant A2756G and Retinoblastoma Risk in Brazilian Children. *Pediatric Blood & Cancer.* , v.54, p.904 - 908, 2010.

7. MAIA, PAULA, SOUZA, PAULO, **ANGELO, HILDSON DORNELAS**, SANTOS, IGOR, MARTINS, DANYELLY, FILHO, JOSE LIMA, MAIA, MARIA MASCENA Investigation of H19/RsaI Polymorphism in Children With Low Birth Weight in Pernambuco, Brazil. *IRAN J PEDIATR.* , v.25, p.1 - , 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **ANGELO, HILDSON DORNELAS**, Lima, G, GOMES, I., DE SOUZA, PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO, Sandrin GARCIA, P. Associação do polimorfismo IL-17F +7844 A>G (rs763780) com Artrite Reumatoide In: V Jornada da Pós-graduação em Genética, 2015, Recife. **V Jornada da Pós-graduação em Genética.** , 2015.

2. **Angelo, H. D.**, GOMES, I., Lima, G, DE SOUZA, PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO, Sandrin GARCIA, P. Associação do polimorfismo IL-23R +2199 A/C (rs10889677) com Artrite Reumatoide In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

Anais do XX ENGINE. , 2014.

3. **ANGELO, HILDSON DORNELAS**, GOMES, I., ASANO, NADJA MARIA JORGE, DA SILVA, HELKER ALBUQUERQUE, DE MASCENA DINIZ MAIA, MARIA, DE SOUZA, PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO. POLIMORFISMOS NO PROMOTOR DO GENE DA INTERLEUCINA-6 EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO In: XV Congresso Latinoamericano de Genética, 2012, Rosario.

Artigos em jornal de notícias

1. MAIA, MARIA DE MASCENA DINIZ, **Angelo, H. D.**, SOUZA, P. R. E. Gato branco é surdo? Gato tricolor é fêmea? Veja mitos e verdades sobre gatos. Diário de Pernambuco. , 2014.

Produção técnica

Palestras

1. **Angelo, H. D. S. ou Silva, H.D.A**

Aplicações da Biologia Molecular, 2012. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

2. **Angelo, H. D. S. ou Silva, H.D.A**

Mutações Genéticas: Conceitos e Importâncias, 2013. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

3. **Angelo, H. D. S. ou Silva, H.D.A**

Técnicas Moleculares da Biologia Molecular, 2014. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. ISAURA ISABELLE FONSECA GOMES DA SILVA. **ESTUDO DO POLIMORFISMO 3'UTR +2199 (A/C) DO GENE IL23R (rs10889677) EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**. 2014. Curso (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco