

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISE DO POLIMORFISMO -607 C/A (RS1946518) DO GENE IL-18 EM PACIENTES
COM ARTRITE REUMATÓIDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

MAÍSA MARIA DE MORAES

RECIFE

2019

MAÍSA MARIA DE MORAES

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO -607 C/A (RS1946518) DO GENE IL-18 EM PACIENTES
COM ARTRITE REUMATÓIDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria de Mascena Diniz Maia

Coorientadora: Msc. Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação Universidade Federal Rural
de Pernambuco Sistema Integrado de
Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

- M827a Moraes, Maísa Maria de
ANÁLISE DO POLIMORFISMO -607 C/A (RS1946518) DO GENE IL-18 EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO / Maísa
Maria de Moraes. - 2019.
44 f. : il.
- Orientadora: Maria de Mascena diniz Maia.
Coorientadora: Isaura Isabelle Fonseca
Gomes da Silva. Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2019.
1. Autoimune. 2. Citocina. 3. Genótipos. I. Maia, Maria de Mascena diniz, orient. II. Silva,
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da, coorient. III. Título

CDD 574

MAÍSA MARIA DE MORAES

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO -607 C/A (RS1946518) DO GENE IL-18 EM PACIENTES
COM ARTRITE REUMATÓIDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Comissão Avaliadora:

Orientador: Prof^a Dr^a Maria de Mascena diniz Maia – UFRPE
ORIENTADORA E PRESIDENTE

Ma. Luciana Amaral de Mascena Costa – UFRPE
TITULAR

Me. Erinaldo Ubirajara Damasceno dos Santos – UPE
TITULAR

Ma. Iêda Ferreira de Oliveira– UFRPE
SUPLENTE

RECIFE

2019

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, energia maior criadora de todas as coisas, a minha Mãe Oyá e a toda espiritualidade por tornarem-me capaz de realizar este trabalho.

A minha família, em especial meu pai, minha mãe, minha tia Francisca e meu tio Amaro, que sempre se mostraram dispostos a me ajudar e tornaram possível a minha permanência na universidade. Aos meus primos, João e Leonardo, que foram de grande exemplo no meu crescimento, e a minha irmã Lorena que também me ofertou grande apoio nesta jornada.

Aos amigos da Rural, Francisco, Lucas, Ricardo Nagô, Adsson, por todos os momentos de aprendizado compartilhados e aos momentos de lazer que nos rederam boas risadas e histórias.

A minha lalorixá Elaine de Oyá por cuidar de mim em momentos de dificuldades e pelos conselhos que ajudaram a construir esta jornada.

Aos meus irmãos, Nairam, Beatriz, Odon, Omer, José Raimundo, Jéssica, Rodrigo e Vinicius, por tornarem-se minha família no Recife, por toda ajuda concedida nos momentos de angústia e por toda alegria compartilhada.

A minhas companheiras de casa, Myllena e Hortência, por dividirem a casa e o carinho de vocês comigo.

A minha companheira de estágio, Letícia Júlia, que conheci já no fim da graduação, mas teve uma grande importância neste caminho. Que sua vida seja iluminada sempre.

Ao meu companheiro Matheus Moraes, por viver comigo toda essa jornada e oferecer todo apoio necessário para o meu desenvolvimento profissional, espiritual e emocional.

Ao corpo orientador, Prof^a Dra. Maria de Mascena (Mana) e Ms. Isaura Gomes, por me receberem de braços abertos e proporcionarem grandes aprendizados.

Dedico este trabalho a minha mãe,
que sempre lutou para tornar meus sonhos possíveis.

SUMÁRIO

1. LISTA DE TABELAS.....	8
2. LISTA DE FIGURAS	9
3. RESUMO	10
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
4.1 AUTOIMUNIDADE.....	14
4.2 ARTRITE REUMATOIDE	14
4.3 DIAGNOSTICO	16
4.4 TRATAMENTO	20
5. INTRODUÇÃO	23
6. OBJETIVOS	24
7. METODOLOGIA	25
7.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO	25
7.2 COLETA DAS AMOSTRAS	25
7.3 EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS	25
7.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO	26
7.5 ELETROFORESE DOS PRODUTOS DA PCR	26
7.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
8. RESULTADOS	28
9. DISCUSSÃO	33
10. CONCLUSÃO	35
11. REFERÊNCIAS	36

1. LISTA DE TABELAS

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

Tabela 2. Frequência genotípica do SNP -607 C/A do gene da IL-18 em indivíduos com Artrite Reumatoide;

Tabela 3. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 e a atividade da Artrite Reumatoide mensurada pelos índices DAS28, HAQ e CDAI;

Tabela 4. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 e a presença de erosão e fator reumatoide em pacientes com Artrite Reumatoide.

2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Figura 1. Membrana sinovial inflamada. Processo de inflamação que ocorre na AR, responsável pela dor, vermelhidão, inchaço e deformidade. Disponível em: http://fizzioterapia.zip.net/arch2009-10-25_2009-10-31.html.

Acessado em: 25/10/2019

Gráfico 1. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 com DAS28;

Gráfico 2. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 com HAQ;

Gráfico 3. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 com CDAI.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, que atinge cerca de 1% da população mundial, afetando ambos os sexos, entretanto, existe maior proporção de casos para mulheres do que para homens. Ainda não existe clareza em relação a etiologia da doença, porém sabe-se que inclui fatores genéticos e ambientais. A IL-18 é uma citocina pro-inflamatória e seu alto nível está relacionada com a severidade de doenças inflamatórias, crônicas e destrutivas. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar o polimorfismo -607 C/A do gene IL-18 em pacientes diagnosticados com AR e sua relação com a gravidade da doença. A pesquisa foi realizada com 114 pacientes, sendo 111 mulheres e 3 homens moradores da cidade de Recife-PE. Foi realizada a coleta sanguínea dos pacientes e depois foi feita a extração de DNA seguida pela amplificação pela Reação em Cadeia da polimerase convencional (PCRc). Após a PCR, as amostras foram corridas em gel de agarose a 2% (p/v) coradas com blue Green loading dye (LGC) e o resultado visualizado em luz UV. As análises estatísticas foram realizadas usando análise univariada, com nível de significância $p < 0,05$, aplicando o teste ANOVA one-way. Para a frequência genotípica, as amostras foram submetidas ao teste Qui-quadrado, considerando significativo $p < 0,05$. Os pacientes que apresentaram o genótipo AA, mostram uma média significativa maior para *Clinical Disease Activity Index* (CDAI) ($25,15 \pm 11,06$) quando comparados com os outros genótipos CC e CA ($16,32 \pm 9,26$ e $20,49 \pm 9,76$) respectivamente. Estes resultados sugerem que a IL-18 pode estar relacionada com o aumento do CDAI quando o paciente apresenta o genótipo AA. Os valores de *Disease Activity Score 28* (DAS 28) ($p=0,096$) e *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) ($p=0,823$) não foram significativos em relação aos genótipos AA, CC e CA, mostrando que não foi encontrado associação do polimorfismo com esses índices de atividade, sugerindo que esse polimorfismo não está associado com a incapacidade do paciente. A análise do fator reumatoide (FR) não mostrou resultados estatísticos significativos ($p= 0,879$) e também os resultados da análise da erosão, não mostrou resultados estatísticos ($p= 0,529$), sugerindo que o polimorfismo da IL-18 (-607 C/A (RS1946518)) não está associada com a erosão e com o fator reumatoide. Assim, podemos dizer que a IL-18 (-607 C/A (RS1946518)) poderá estar associada com a

atividade da doença, quando relacionado ao aumento do CDAI em pacientes que apresentam o genótipo AA. Entretanto, são necessários mais estudos, para entender melhor a associação do polimorfismo de outras regiões do gene da IL-18 no desenvolvimento da AR.

palavras-chave: Autoimune, citocina, genótipos.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease that affects about 1% of the world's population, affecting both sexes. However, there is a higher incidence of cases for women than men. There is still no clarity regarding the etiology of the disease, but it knows whether it includes genetic and environmental factors. An IL-18 is a proinflammatory cytokine and its high level is qualified with a severity of inflammatory, chronic and destructive diseases. Thus, this study aimed to analyze the -607 C / A polymorphism of the IL-18 gene in patients diagnosed with RA and its relationship with disease severity. A survey was conducted with 114 patients, 111 women and 3 men resident in the city of Recife-PE. Blood collection was performed and then DNA extraction was performed, followed by amplification by conventional polymerase chain reaction (PCRc). After PCR, the samples were run on blue Green loading dye (LGC) stained 2% (w / v) agarose gel and the result visualized in UV light. Statistical analyzes were performed using univariate analysis, with significance level $p < 0.05$, applying the one-way ANOVA test. For genotypic frequency, samples were submitted to Chi-square test, considering significant $p < 0.05$. Patients with AA genotype show a significantly higher mean for Clinical Disease Activity Index (CDAI) (25.15 ± 11.06) when compared to the other CC and CA genotypes (16.32 ± 9.26 and $20, 49 \pm 9.76$) respectively. These results suggest that IL-18 may be related to increased CDAI when the patient has the AA genotype. Disease Activity Score 28 (DAS 28) ($p = 0.096$) and Health Assessment Questionnaire (HAQ) values ($p = 0.823$) were not significant in relation to AA, CC and CA genotypes, showing no association of polymorphism with these activity indices, suggesting that this polymorphism is not associated with the patient's disability. The rheumatoid factor (RF) analysis showed no statistically significant results ($p = 0.879$) and also the erosion analysis results showed no statistical significance ($p = 0.529$), suggesting that IL-18 polymorphism (-607 C / A (RS1946518)) is not associated with erosion and rheumatoid factor. Thus, we can say that IL-18 (-607 C / A (RS1946518)) may be associated with disease activity when related to increased CDAI in patients with AA genotype. However, further

studies are needed to better understand the association of polymorphism of other IL-18 gene regions in the development of RA.

Key words: Autoimmune, cytokine, genotypes.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 AUTOIMUNIDADE

A função do Sistema Imunológico (SI) é proteger os organismos de parasitas, microrganismo, células cancerosas. Os agentes externos possuem substâncias conhecidas como antígenos, que são estão localizadas na superfície ou no interior celular de células cancerosas ou bactérias, sendo esses antígenos estimuladores do SI. (ABBAS et al., 2008).

É conhecido como “tolerância ao próprio” o fato do SI está frequentemente exposto a antígenos do próprio organismo sem estimular os linfócitos. A resposta autoimune é estimulada quando os linfócitos reconhecem os auto-antígenos como se fossem agentes estranhos ao organismo (JANEWAY et al., 2002). Para o desenvolvimento da autoimunidade, é visto que os fatores relacionados são alterações nos linfócitos, nas células apresentadoras de antígenos (APCs) ou fatores envolvendo o tecido-alvo (auto-antígenos) (JANEWAY et al., 2002).

4.2 ARTRITE REUMATOIDE

Em 1591, o médico Guillaume de Baillou, o pai da Reumatologia, trouxe as primeiras descrições modernas do reumatismo e da artrite, onde fez uso desses termos para descrever patologia que tem como sintomas dor e inflamações nas articulações. (Martins, 1989). Alguns pesquisadores sustentavam a teoria de que AR era uma doença predominante entre os egípcios, baseados no tratado médico do papiro Ebers. Nele, era descrito uma patologia com sintomas equivalentes a AR (Martins, 1989).

No entanto, apenas no ano de 1858 surgiu o termo “Artrite Reumatoide’ (AR) através do médico Sir Alfred Garrod ao referir-se a uma doença crônica que atinge articulações periféricas causando o desuso dos termos até então utilizados: artrite deformadora ou gota reumática. Por mais que o termo passou a ser utilizado nos registros médicos a partir deste ano, há achados de 4500 a.C que indicam os primeiros casos de AR (Short, 1974).

A AR atinge principalmente a membrana sinovial (Figura 1), o que pode levar a destruição óssea e cartilaginosa. No início da doença, o desenvolvimento inflamatório na membrana sinovial pode provocar dor, inchaço, vermelhidão e surgimento de erosões da cartilagem e osso, o que pode provocar deformidade da articulação (McCain, 2009).

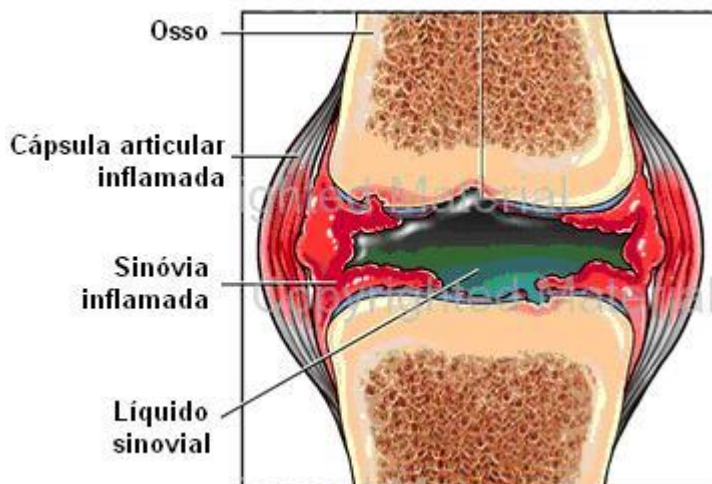


Figura 1. Membrana sinovial inflamada. Processo de inflamação que ocorre na AR, responsável por provocar dor, vermelhidão, inchaço e até deformidade. Disponível em: http://fizioterapia.zip.net/arch2009-10-25_2009-10-31.html. Acessado em: 25/10/2019

A AR é uma doença multifatorial, na qual é possível anotar a existência de fatores genéticos que contribuem para o seu desenvolvimento (SILMAN AJ, 2002). É possível observar estes fatores em estudos com gêmeos onde houve um índice de concordância quatro vezes no surgimento de AR em gêmeos idênticos (monozigóticos) comparados a não-idênticos (dizigóticos) (Svendsen *et al.*, 2014; Terao *et al.*, 2016).

A associação de alelos do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) com a autoimunidade é bem estabelecida (PIARCE & MERRIMAN, 2006). É sugerido, pela localização do epítipo suscetível na molécula de MHC, que o polimorfismo da molécula HLA-DR (antígeno leucocitário humano-DR), altere a habilidade da molécula de ligar e apresentar peptídeos específicos das articulações envolvidas no desenvolvimento da AR (FIRESTEIN, 2003; PARSLOW, 2004).

Os antígenos leucocitários humanos (HLA) originam moléculas HLA-A, B e C (classe I) HLA-DR, DQ e DP (classe II). Estudos apontam a associação do HLA

com a AR. Um dos fatores genéticos mais estudado é a relação do HLA-DR4 com AR, em pacientes HLA-DR4 positivos a AR é mais grave do que em pacientes HLA-DR4 negativos.

O gene *TNFAIP3*, também é um gene importante pertencente a região HLA, que tem a função de codificar a proteína A20, e esta por sua vez, participa da sinalização efetuada pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Kool *et al.*, 2011), que é relevante na regulação da ação do fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), sendo uma citocina importante na patogênese da AR e encontrada nos pacientes em grande quantidade (Wei *et al.*, 2015).

Para além da região do HLA existem outros genes que estão associados a AR, como o gene responsável para produção da proteína Tirosina fosfatase 22 (PTPN22), que apresenta associação para susceptibilidade a AR em populações caucasianas (Kurko *et al.*, 2013), já nas populações asiáticas, a peptidil arginina desaminase 4 (PAD4) mostra associação com AR (Coenen e Gregersen, 2009).

Estudos também comprovam a presença de fatores ambientais no desenvolvimento da AR. Os fatores que estão associados com a AR são as doenças infecciosas, tabagismo, poeira de sílica, óleos minerais e outros (SVERDRUP B *et al.*, 2005; KLOCKARS M *et al.*, 1987; OLSSON AR *et al.*, 2004). O tabagismo é um fator que possui forte associação com o desenvolvimento da doença, tendo em vista que altera o sistema imune (George *et al.*, 1997)

Outros fatores como, obesidade, estilo de vida e perfil hormonal são indicados no desenvolvimento ou progressão da AR (Jorgensen *et al.*, 1996; Kallberg *et al.*, 2009; Karlson *et al.*, 2013).

4.3 DIAGNÓSTICO

Exames laboratoriais, radiológicos e histológicos não são o suficiente para diagnosticar a AR (McInnes e Schett, 2011). Os critérios de classificação estabelecidos em 1987 pelo Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology – ACR) contemplam indivíduos com quadro clínico bem estabelecido para AR, mas é insuficiente para casos com fator reumatoides

negativo, com inflamações menos evidentes e quando as alterações radiológicas são ausentes (Aletaha et al., 2010).

Para melhor diagnóstico, em 2010, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) juntamente com a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) divulgaram os novos critérios para o diagnóstico precoce da AR em pacientes que apresentam sintomas de curta duração. Nesses critérios, é realizado um sistema de graduação de sintomas de acordo com a Tabela 1. Estes critérios foram desenvolvidos para facilitar no diagnóstico de pessoas nos estágios iniciais da AR, e assim, começar o tratamento indicado. (Aletaha et al., 2010).

Quando o resultado da soma dos itens de A à D é ≥ 6 , os achados estão relacionados à AR definida. Apesar dos pacientes com somatório < 6 não sejam considerados com AR, os mesmos podem ser reavaliados nos critérios, onde pode ser completado de maneira cumulativa no decorrer do tempo.

Achados clínicos, como quantidades de região afetadas, velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR) e medidas da qualidade de vida, são informações de comprovação inflamatória indispensáveis na avaliação do avanço da doença (Silva et al., 2003).

É recomendado que o paciente diagnosticado com AR seja avaliado regularmente, principalmente no que se refere a atividade da doença, sendo esta analisada através de questionários médicos e dados clínicos que avaliam a intensidade da dor, presença de edema nas articulações, quantidade de articulações afetadas, capacidade funcional da articulação e indicadores sorológico de inflamação (VHS e PCR) (Kwoh, 2002).

Tabela 1. critérios para o diagnóstico precoce da AR.

Critérios		Pontuação
A	Envolvimento articular – compreende-se edema ou sensibilidade à exame , sendo confirmado por exames de imagem da sinovite. Não fazendo parte da avaliação: interfalangianas distais, primeira carpometacarpiana e primeira tarsometatarsiana	

	1 articulação grande -compreende-se a ombros, joelhos, cotovelos, quadris e tornozelos.	0
	2-10 articulações grandes (cotovelos,joelhos, ombros, coxofemorais e tornozelos)	1
	1-3 articulações pequenas- considera-se as regiões com ou sem envolvimento de articulações grandes. São articulações pequenas: segunda a quinta metatarsofalangianas metacarpofalangianas, interfalangianas proximais , interfalangianas do hálux e punhos	2
	4-10 articulações pequenas- Sendo com ou sem envolvimento de articulações grandes. São articulações pequenas: metacarpofalangianas, interfalangianas proximais, segunda a quinta metatarsofalangianas, interfalangianas do hálux e punhos	3
	Mais que 10 articulações (necessário uma articulação pequena incluída)	5
B	Sorologia – No mínimo um resultado de teste para a classificação	
	Negativo FR e anti-CCP	0
	Positivo fraco para FR ou anti-CCP	2
	Fortemente positivo para FR ou anti-CCP	3
C	Reagentes de fase aguda – No mínimo um teste é necessário para a classificação	
	Normais para PCR e VHS	0
	Alterados para PCR ou VHS alterados	1

D	Duração dos sintomas	
	< 6 semanas	0
	≥ 6 semanas	1

Adaptado de Aletaha et al. (2010)

AR: artrite reumatoide; ACR: Colégio Americano de Reumatologia; EULAR: Liga Europeia contra o Reumatismo; FR: fator reumatoide; anti-CCP: anti-peptídeo cíclico citrulinado; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação.

Desta forma, questionários foram criados para fazer a avaliação dos pacientes com AR. O Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ) foi criado na década de 80 e até hoje se mostra necessário em estudos epidemiológicos (FRIES *et al.*, 1980). O HAQ é formado por cinco componentes, eles são, custo para o paciente, incapacidade, desconforto efeitos adversos dos medicamentos e morte. Nos estudos, tem sido utilizado um dos seus componentes que é o índice de capacidade do HAQ, ao invés do questionário mais longo (LILLEGRAVEN *et al.*, 2007).

O DAS (do inglês *Disease Activity Score*) (van der Heidje *et al.*, 1992) é o índice mais utilizado, pois foi criado com base nos critérios adotados pela EULAR. Posteriormente, foi divulgado o DAS28 (Prevoo *et al.*, 1996,) que analisa 28 articulações dolorosas e edemaciadas. Em 2003, começou a ser utilizado também o Índice Simplificado de Atividade de Doença (SDAI) que é aplicado na análise de grandes bases de dados compilados para avaliação do agente anti-reumático modificador de doença (DMARD) (SMOLEN *et al.*, 2003; SMOLEN *et al.*, 1999). O SDAI teve como objetivo tornar mais simples o cálculo do índice, tratando-se da soma direta das variáveis (ALETAHA *et al.*, 2007). É utilizado para o SDAI as contagens articulares (SJC e TJC) e, 28 articulações, PCR, avaliação global da doença e também inclui a Avaliação da Atividade Global da Doença pelo Médico (ALETAHA *et al.*, 2005). O CDAI (Clinical Disease Activity Index) é um índice clínico de atividade de doença que utiliza quatro parâmetros, sendo eles, número de articulações dolorosas, número de articulações edemaciadas, avaliação da atividade de doença-paciente, avaliação da atividade de doença-médico/ pesquisador (ALETAHA *et al.*, 2005).

Na AR, a atividade da doença é vista como o desenvolvimento da inflamação, a qual debilita alguns órgãos e articulações (GUILLEMIN *et al.*, 2003). Faz-se importante um estudo sobre a relação da IL-18 com a atividade da doença, tendo

em vista que, as citocinas, moléculas que atuam como mediadores da resposta imunológica, influenciam na resposta inflamatória (McInnes et al., 2007). Sabendo que a IL-18 que é uma citocina pró-inflamatória, e que seu alto nível é presente em doenças inflamatórias, sugere-se sua associação com o desenvolvimento dessas doenças (Calvani et al., 2005).

4.4 TRATAMENTO

No tratamento, são utilizados medicamentos que atuam minimizando os processos inflamatórios e o efeito da autoimunidade (Albers *et al.*, 2001), podendo também ser feito tratamento não medicamentoso ou cirurgias. Para o tratamento envolvendo fármacos, é indicado pela ACR/EULAR o uso de glicocorticoides (CGs), as drogas antirreumáticos modificadores da doença (DMARD - *Disease Modifying Anti-rheumatoid Drugs*) e anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (Singh et al., 2012).

Para evitar danos nas articulações, que muitas vezes são irreversíveis, é de grande importância que ocorra um diagnóstico precoce e o início da administração de DMARDs dentro de três meses (O'dell, 2004).

O tratamento com agentes biológicos é feito através da utilização de anticitocinas, onde as principais drogas utilizadas atuam como inibidoras do Fator de Necrose Tumoral alfa (anti-TNF- α), que tem sido importante no retardamento dos índices clínicos e inflamatórios da AR (KEYSTONE EC, 2004; LIPSKY PE, 2000). No Brasil, o tratamento com anticitocinas é disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (SAÚDE, 2006). Na Europa e no Estados Unidos, já é realizado o tratamento para AR com uso de um antagonista da IL-1, o anakinra (CRISCIONE et al., 2002).

Com o tratamento realizado com anticorpos anti-TNF e pela alteração nos níveis de várias citocinas no líquido sinovial em pacientes com AR, é possível

relacionar o envolvimento das citocinas com a progressão e susceptibilidade da doença (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). Várias citocinas estão envolvidas na patogênese e destruição articular dos pacientes diagnosticados com AR, tendo um papel importante no controle da inflamação (Astry e Moudgil, 2011).

IL-18

A Interleucina-18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória apontada como cofator na produção de interferon gama (IFN- γ) (NAKANISHI *et al.*, 2001). Devido a sua participação em diversos processos de ativação celular, dependendo de outras citocinas presentes no meio extracelular, a IL-18 tem sido abundantemente estudado (NAKANISHI *et al.*, 2001; KAWAKAMI, 2002; MERCADO; MARSHALL; BARTOLD, 2003; BOSSU *et al.*, 2003; JOHNSON; SERIO, 2005; MIRANDA *et al.*, 2005; CALVANI *et al.*, 2005). O gene humano está no cromossomo 11q22.2-22.3, onde apresenta seis éxons, tamanho maior que 20 quilobases, codificando um polipeptídeo de 193 aminoácidos.

A IL-18 tem um fator pleiotrópico que estimula a proliferação de células T ativadas, eleva a toxicidade de NK, aumenta o fator de crescimento de macrófagos (GM-CSF), entre outros. Além disto, também pode atuar sobre células Th2, basófilos/mastócitos, linfócitos B, isto é, também pode ser relacionado a indução de respostas alérgicas (HUNG *et al.*, 2005).

A IL-18 é produzida por macrófagos ativos (GIEDRAITIS *et al.*, 2001), por condrócitos articulares, osteoblastos, queratinócitos (GRACIE *et al.*, 1999). A IL-18 pode provocar o aumento e a regulação da expressão de IL-2R α , induz a produção de GM-CSF pelos clones de células T_{H1}, atuando nos linfócitos T e nas células *natural killers* (NK), promove também, fator de necrose tumoral (TNF)- α (GRACIE *et al.*, 1999).

A IL-18 pode estimular a produção de IL-13 e outras citocinas Th2 (Arend *et al.*, 2008), e devido a isto, esta citocina é associada a diversas patologias como,

doenças inflamatórias, aterosclerose, síndrome metabólica (Netea *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007; Dinarello, 2007) e é possível encontrar associação com doenças autoimunes como AR (Lee *et al.*, 2007).

Relacionada com AR, a IL-18 tem uma ação sobre os osteoclastos, que são utilizados na degradação de tecidos ósseos, e estes tecidos são afetados pela doença. A IL-18 é também encontrada nas placas ateroscleróticas, pois tem efeito sistêmico e pleiotrópico. Esta citocina foi relacionada à instabilidade das placas em pacientes portadores de síndromes agudas coronarianas, o que pode ocasionar à morte (TIRET *et al.*, 2004, EVANS *et al.*, 2007).

Devido a AR ser uma patologia que leva a inflamação nas articulações, é relevante o estudo da IL-18 tendo em vista que ela é encontrada no líquido sinovial e que o excesso de sua atividade pode tornar mais grave o dano na região. (GIEDRAITIS *et al.*, 2001).

5. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica comum, porém de etiologia complexa que inclui fatores genéticos e ambientais (Aguillón et al., 2006). Sua incidência é estimada em 1% na população mundial e afeta ambos os sexos, porém a proporção de casos é maior para mulheres do que para homens (Alamanos et al., 2005). A doença se caracteriza pela inflamação do tecido sinovial de diversas articulações, ocasionando a destruição tecidual, deformidades, dor e redução da qualidade de vida do paciente (Pérez et al., 2008). A morbidade e a gravidade da doença são drasticamente aumentadas quando atingem outros órgãos, podendo diminuir a expectativa de vida em cinco a dez anos (ACR, 2002). A principal causa de mortalidade em pacientes com AR são as doenças cardiovasculares (DCV), sendo sua patogênese causada por fatores de risco cardiovasculares naturais, em conjunto com processos inflamatórios e autoimunes da doença (Boyer et al., 2011). As citocinas, moléculas que atuam como mediadores da resposta imunológica, são associadas em diversos processos imunes que auxiliam na patogênese de AR, influenciando principalmente na resposta inflamatória (McInnes et al., 2007)

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória, inicialmente identificada como fator de indução de IFN- γ e pertence à superfamília da IL-1 (Nakanish et al., 2001). O processo imunológico da IL-18 tem sido muito estudado, devido a sua relação com vários processos de ativação celular em associação com outras citocinas (Nakanishi et al., 2001) e por muitos estudos demonstrarem altos níveis de IL-18, nas doenças inflamatórias, crônicas e destrutivas, o que sugere sua relação com a severidade destas doenças (Calvani et al., 2005). A transcrição do gene de IL-18 pode ser

afetada por polimorfismos na sua região promotora, sendo uma das regiões mais estudada a -607 C/A que desenvolve atividades imunológicas associadas à patogênese da Artrite Reumatoide (Giedraitis et al.,2001).

6. OBJETIVOS

6.1 Geral:

Analisar o polimorfismo -607 C/A do gene IL-18 em pacientes diagnosticados com Artrite Reumatoide e sua relação com a gravidade da doença.

6.2 Específicos:

1. Identificar a frequência do polimorfismo -607 C/A (rs1946518) do gene da IL-18 em pacientes com Artrite Reumatoide na população de Pernambuco.
2. Analisar a relação do polimorfismo -607 C/A (rs1946518) do gene da IL-18 com a atividade (remissão, leve, moderada, alta) da artrite reumatoide.
3. Verificar a relação do polimorfismo -607 C/A (rs1946518) do gene da IL-18 com o desenvolvimento de erosões nos pacientes com artrite reumatoide.

7. METODOLOGIA

7.1 População do Estudo

Foi realizado um estudo, de caráter quantitativo e qualitativo, de uma população de pacientes diagnosticados com AR pelos critérios ACR/EULAR (Arnett 1987 e Aletaha 2010) atendidos no Centro de Infusão de Imunobiológicos do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco/UPE. A coleta foi por demanda espontânea e todos os pacientes que quiseram participar voluntariamente na pesquisa no período de 01 de junho de 2015 a 30 de dezembro de 2016 foram coletados. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade de Pernambuco (CAAE 43318215.9.0000.5208). Todos os pacientes foram informados verbalmente e por escrito a respeito dos objetivos, benefícios e procedimentos da pesquisa, autorizando sua participação e a coleta foi feita mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram obtidas amostras de 114 pacientes, bem como seus dados clínicos e sociodemográficos como, sexo, idade, hábito de tabagista, Índice de Atividade da Doença (Disease Activity Score – DAS 28; CDAI, HAQ), tempo da doença, presença de erosão, presença de fator reumatoide.

7.2 Coleta das amostras

Foram coletados 4mL de sangue periférico em tubo de ensaio com e sem EDTA de cada paciente para os ensaios bioquímicos (VHS, PCR, Fator reumatoide)

e extração do DNA. As amostras biológicas coletadas foram encaminhadas para análise molecular no Laboratório de Genética Bioquímica e Sequenciamento de DNA Profa. Tânia Falcão (GENOMA) da UFRPE.

7.3 Extração do DNA das amostras clínicas

As etapas extração do DNA foi realizada utilizando 500µl de sangue total periférico coletado em tubo com EDTA através do kit Promega DNA Wizard Extraction Kit, de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram mantidas a uma temperatura de -20°C.

7.4 Análise do polimorfismo

Para análise do polimorfismo da região -607 do gene da IL-18 (rs1946518) foram utilizadas as sequências de *primers* específicos: *forward* C (5'-GTTGCAGAAAGTGTA AAAATTATTAC-3'), A (5'-GTTGCAGAAAGTGTA AAAATTATTAC-3") e *reverse* (5' – TAACGTCATTCAGGACTTCC – 3'), sendo realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polimerase Chain Reaction). Os primers utilizados na PCR amplificam um fragmento de 301pb (pares de bases) que abrangem o polimorfismo estudado. Outros reagentes aplicados foram 2x Master Mix PCR (PROMEGA ®) e água Milli-Q, formando um volume final de 9 µl (microlitros) de reagentes + 1 µl de DNA = 10 µl. A reação ocorreu em um termociclador (PTC-100®), através do seguinte protocolo, XXX

7.5 Eletroforese dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram empregados na técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando o tampão tampão Tris-Borato-EDTA TBE 0,5X, corados através do blue Green loading dye (LGC) e utilizando um marcador de peso molecular-Ladder (PROMEGA ®) . As bandas foram visualizadas com auxílio de

transiluminador de luz UV, sendo os fragmentos com 301pb e interpretados como perfis genéticos CC, CA e AA.

7.6 Análise estatística

Foi estudada a associação de características clínicas de pacientes diagnosticados com artrite reumatoide e o polimorfismo da região -607 do gene IL-18, através de uma análise univariada, com nível de significância $P < 0,05$, onde foi submetido ao teste ANOVA one-way. Para a frequência genotípica, as amostras foram submetidas ao teste χ^2 com intenção de analisar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), considerando significativo $p < 0,05$. Os cálculos estáticos foram feitos no STATISTICA V8 e os gráficos no GraphPad Prism v 6.

8. RESULTADOS

A amostra foi constituída 114 pacientes, sendo 111 mulheres (97,3%) e 3 homens (2,6%) moradores do Recife-PE. A média de idade foi 52.79 ± 10.33 anos, 14,91% deles eram tabagistas. Em relação as características clínicas, a AR foi considerada bem estabelecida uma vez que os pacientes tinham um tempo de doença médio de $10,59 \pm 7,89$. Além disto, 84,21% deles apresentavam erosão e 44,73% eram positivos para o fator reumatoide. O índice de atividade variou consideravelmente e a média de DAS28 foi de $3,81 \pm 1,08$, CDAI foi de $20,17 \pm 10,20$ e o HAQ foi de $1,44 \pm 0,65$.

Foi analisado a frequência genotípica do polimorfismo do gene IL-18 -607 (rs1946518). A amostra possui frequência genotípica em equilíbrio de Hardy-Weinberg, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Frequência genotípica do SNP *IL-18* (-607) em indivíduos caso.

GENÓTIPOS	INDIVÍDUOS (%) N=114
CA	63 (55,26)
CC	31 (27,19)
AA	20 (17,54)
EHW	$p=0,26$

EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Foi analisado a relação do polimorfismo do gene IL-18 -607 C/A (rs 1946518) com a atividade da doença (CDAI, DAS28 E HAQ) e com o surgimento de erosões: presente (1) ou ausente (2), e foi analisado o fator reumatoide (FR): positivo (1) ou negativo (2), sendo fator de risco FR1.

A análise do SNP e o CDAI mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.009$) e indicou que pacientes com o genótipo AA apresentavam uma média de CDAI significativamente maior ($25,15 \pm 11,06$) que os pacientes com genótipos CC e CA ($16,32 \pm 9,26$ e $20,49 \pm 9,76$). A relação entre o SNP e o DAS28 não foi significativa ($P=0,096$) embora foi possível observar que pacientes com genótipo AA apresentavam uma média de DAS28 maior ($4,26 \pm 0,92$) que os genótipos CC e CA ($3,60 \pm 1,04$ e $3,77 \pm 1,13$). A análise entre o SNP e HAQ indicou que pacientes com genótipo CA apresentava uma média de HAQ pouco maior ($1,47 \pm 0,70$) que os genótipos CC e AA ($1,39 \pm 0,67$ e $1,46 \pm 0,49$) embora também não foram significativos ($p=0,823$). A relação entre os genótipos e os índices de atividade (DAS28, HAQ e CDAI) estão na tabela 3.

Tabela 3. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 e a atividade da Artrite reumatoide mensurada pelos índices DAS28, HAQ e CDAI

	DAS28 Média ± DP	CDAI Média ± DP	HAQ Média ± DP
GENÓTIPO			
CA	3,77 ± 1,13	20,49 ± 9,76	1,47 ± 0,70
CC	3,60 ± 1,04	16,32 ± 9,28	1,38 ± 0,67
AA	4,26 ± 0,92	25,15 ± 11,06	1,46 ± 0,49
	p=0,096	p=0,009	p=0,823

Gráfico 1. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 com DAS28

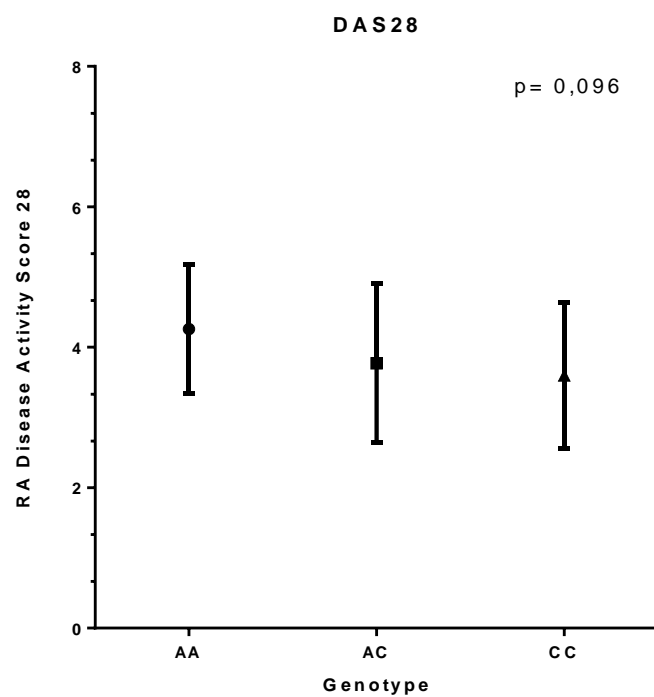
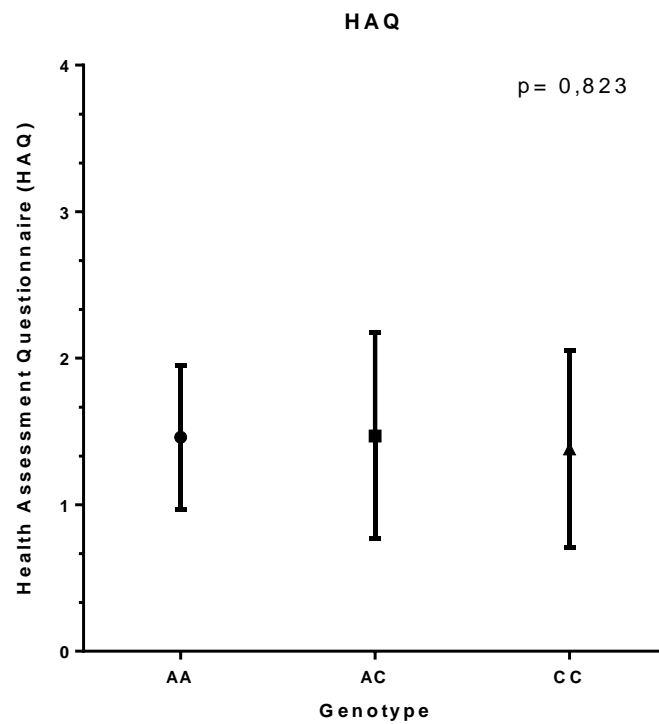
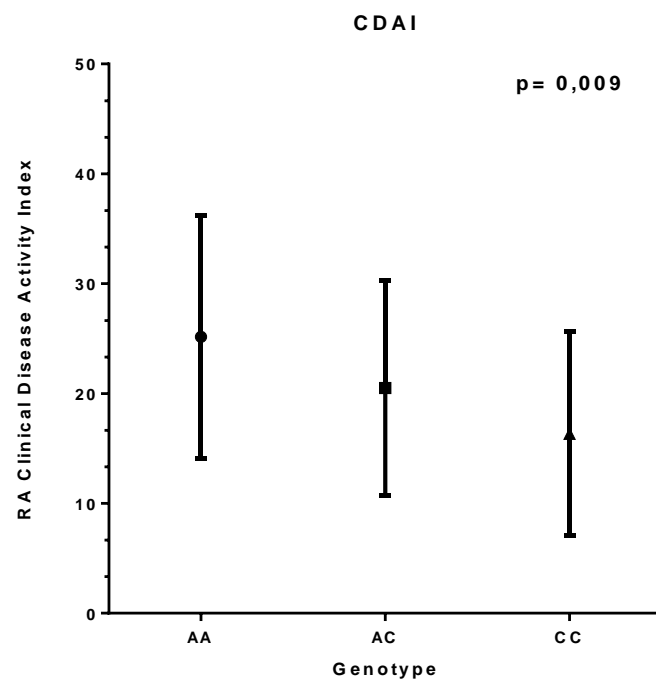


Gráfico 2. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 com HAQ**Gráfico 3.** Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 com CDAI

A análise do fator reumatoide e erosão não mostraram resultados estatísticos significativos ($p= 0,879$ e $p= 0, 529$, respectivamente). No fator reumatoide, o genótipo CA mostrou-se maior entre os pacientes com fator reumatoide positivo, sendo 45,61%, já para CC e AA os valores foram 24,56% e 14,03% respectivamente. Para a erosão, também indicou maior presença para o genótipo CA, sendo 23,68%, para CC foi 13,15% e AA 7,89%.

Tabela 4. Associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 e a presença de erosão e fator reumatoide em pacientes com Artrite Reumatoide

FATOR REUMATOIDE		
	$p= 0,879$	$X^2= 0,257$
GENOTIPO	PRESENTE (1)	AUSENTE (0)
CA	27	36
CC	15	16
AA	9	11
EROSÃO		
	$p= 0,529$	$X^2= 1,27$
GENOTIPO	PRESENTE (1)	AUSENTE (0)
CA	52	11
CC	28	3
AA	16	4

9. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi estudado a associação do polimorfismo -607 C/A do gene IL-18 em pacientes diagnosticados com AR e sua relação com a atividade da doença, tendo em vista que estudo sobre essas associações são escassos.

Não são encontrados estudos que avaliam esse polimorfismo na AR, mas esse SNP já foi associado em relação a susceptibilidade da AR em estudo de meta-análise envolvendo a população asiática e caucasiana, onde mostrou como resultado uma associação para a população asiática, mas não mostrou associação significativa para caucasianos (CAI et al., 2014). Em outro estudo de meta-análise, não foi encontrado associação entre dois SNPs de IL-18 (rs1946518 e rs187238) com AR. No entanto, o estudo sugere que outros estudos com análises mais abrangentes sejam realizados para confirmar o papel da IL-18 na AR (JI et al., 2013). No outro estudo de meta-análise com uma população asiáticas, os resultados mostraram que os polimorfismos de IL-18 estão associados com AR em alguns parâmetros, como erosão, e não indicou como fator significativo para o curso da

doença (PAWLIK et al., 2009). Já no outro estudo sobre a associação do polimorfismo IL-18-607 A/C com AR e lúpus eritematoso sistêmico (LES), mostra que o polimorfismo IL-18-607 A/C pode estar associado a AR em população chinesa, mas não em todos asiáticos (CHEN et al., 2012).

A distribuição das frequências genóticas do SNP mostrou-se de acordo com o EHW nos pacientes com AR. As frequências genóticas encontrada no estudo em relação ao SNP -607, assemelham-se as de estudo de caso-controle com pacientes brasileiros (JUSTINA FARIAS et al., 2013) e com o estudo de susceptibilidade e atividade da doença em uma população caucasiana (PAWLIK et al., 2009).

Neste trabalho, o polimorfismo -607 C/A do gene IL-18 foi associado a atividade da doença quando utilizado o índice CDAI. Não há estudos mostrando a associação do polimorfismo com CDAI em AR, mas com outras doenças inflamatórias, como por exemplo, doenças inflamatórias intestinais, onde não apresentou correlação significativa com CDAI (Haas SL et al., 2009). Quando analisamos o polimorfismo com o DAS28, não foi apresentada associação do polimorfismo com a atividade da doença, sendo este resultado semelhante ao estudo realizado com pacientes egípcios (Hashaad NI et al., 2012). Então, se faz necessário uma maior análise para estabelecer se há ou não uma relação do polimorfismo com a atividade da doença.

Além dos índices de atividade da doença, nós avaliamos o processo de incapacidade do paciente medido pelo HAQ. Não foi observado associação do polimorfismo -607 C/A do gene IL-18 com o HAQ, mostrando que o polimorfismo não está relacionado com a incapacidade dos pacientes de AR, e mesmo que o polimorfismo possa estar relacionado a severidade, não é ele que está causando a incapacidade do paciente. Não foi encontrado estudo relacionando polimorfismo -607 C/A do gene IL-18 com HAQ, mas um estudo mostrou que os polimorfismos rs10754558 NLRP3 e rs2043211 CARD8 estão associados ao desenvolvimento de AR e gravidade medida pelo HAQ (ADDOBBATI et al., 2018).

Na análise da associação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 e a presença de erosão em pacientes com AR, também foi apresentando resultados significativos. A presença de erosão em pacientes com AR já foi associada com os

genes *HLA-DR4*, *HLA-DR14* e *HLA-DR1* e é mais grave quando em homozigose (FIRESTEIN, 2003).

Para a análise da associação do polimorfismo com fator reumatoide, mostrou-se um resultado não significativo para esta associação. No começo do quadro patológico, cerca de 30% a 50% dos pacientes com AR podem ser soronegativos para fator reumatoide, mostrando sua baixa sensibilidade (RENAUDINEAU et al., 2005). Assim, seus resultados sejam analisados cautelosamente. Também não foi encontrado estudos associando o polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 com o fator reumatoide.

10. CONCLUSÃO

Com os dados apresentados neste trabalho, podemos sugerir que o polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 pode estar associado com a atividade da doença, quando relacionado ao aumento do CDAI em pacientes que apresentam o genótipo AA, mas não ficando estabelecido qual seu real envolvimento com a severidade da AR. Com isso, torna-se necessário a produção de mais estudos sobre a relação do polimorfismo -607 C/A do gene da IL-18 com AR.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H., PILLAI, Shiv, **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª edição (Tradução por Claudia Reali et al.), Editora Elsevier, 564p., 2008;

AGUILLÓN, J.C.; 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, v. 211, p. 75–84, 2006;

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

ALAMANOS, Y; VOULGARI, P V; DROSOS, A A. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*, v. 36, p. 182-8, 2006.

ALBERS, J M ; PAIMELA, L; KURKI, P; EBERHARDT, K B ; EMERY, P ; VAN'T HOF, M A ; SCHREUDER F; LEIRISALO-REPO M ; VAN RIELET P L C M. **Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 60:453-8. 2001;

ALETAHA D ; NEOGI T ; SILMAN A J ; FUNOVITS J ; Felson D T ; BINGHAM C O ; BIRNBAUM N S ; BURMESTER G R ; BYKERK V P ; COHEN M D ; et al. **Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.** *Ann Rheum Dis* 69:1580-1588. 2010;

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. **Siilbcommüte on Rhellmatoid Arthritis Gllidelines. Gllidelines for the management of rhellmatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 46:328-46, 2002;

APARICIO, J. P. et al. Association between the genetic polymorphism of interleukin-1 β (3953 T/C) and symptomatic lumbar herniated disc. *Rev esp cir ortop traumatol*, v. 54, p. 227-223, 2010;

ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA et al. **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*. 31:315-324. 1988;

BERTOLO, M.; CICCONE, R.; LAURINDO, I.; CASTELAR, G.; RADOMINSKI, S.; XAVIER, R. **Uso de agentes biológicos para o tratamento da artrite reumatóide: melhores evidências e recomendações para a prática clínica.** *Revista Brasileira de Medicina*, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 14-28, abr. 2005;

CALVANI, N. et al. Th1 cytokines in the pathogenesis of lúpus nephritis: the role of IL-18. *Autoimmun. Rev.*, Amsterdam, v.4, p.542-548, 2005;

CARVALHO JUNIOR, F. F.; SUEHIRO, R. M.; GOLMIA, R.; SCHEINBERG, M. **Agentes biológicos na artrite reumatóide**. Revista Brasileira de Medicina, São Paulo, v. 66, n. 1/2, p. 20-27, jan./fev. 2009;

CICONELLI, R. M. **Artrite reumatóide – tratamento**. Revista Sinopse, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 1-17, jun. 2005;

COENEN, MJ.; GREFFERSEN PK. **Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape**. Genes Immun. 2009;10(2):101-11;

DINARELLO, Charles A.; NOVICK, Daniela; PUREN, Adrian J.; FANTUZZI, Giamila; SHAPIRO, G Leland; MÜHL, Heiko; YOON, Do-Young; RAZNIKOV, Leonid L.; KIM, Soo-Hyun; RUBINSTEIN, Menachem. **Overview of interleukin- 18: more than interferon- γ inducing factor**. Journal of Leucocyte Biology, Vol. 63, p. 658-663, 1998;

FIRESTEIN, Gary S., Envolving concepts or rheumatoid arhtritis, **Insight Review Articles**, Nature, Vol. 423, p. 356-361, 2003;

GEORGE J ; LEVY Y ; SHOENFELD Y . **Smoking and immunity: an additional player in the mosaic of autoimmunity**. Scand J Immunol 45:1–6. 1997;

GIEDRAITIS, Vilmantas; HE, Bing; HUANG, Wen-Xin; HILLERT, Jan. **Cloning and mutation analysis of the human *IL-18* promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation**. Journal of Neuroimmunology, Vol. 112, p. 146-152, 2001;

GIEDRAITIS, V H.B.; HUANG, W.X.; HILLERT, J. **Cloning and mutation analysis of the human *IL-18* promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation**. J Neuroimmunol. 2001;112(1-2):146-52;

GRACIE, J. Alastair; FORSEY, Rosalyn J.; CHAN, Woon L.; GILMOUR, Ashley; LEUNG, Bernard P.; GREER, Morag R.; KENNEDY, Kirsty; CARTER, Robert; WEI, Xiao-Qing; XU, Damo; FIELD, Max; FOULIS, Alan; LIEW Foo Y; MCINNIS, Iain B. **A**

proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. The Journal of Clinical Investigation, Vol.104, nº10, p. 1393-1401, 1999;

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

HAAS SL et al. **Interleukin-18 serum levels in inflammatory bowel diseases: correlation with disease activity and inflammatory markers.** Swiss Med Wkly.2009 Mar 7;139(9-10):140-5;

HASHAAD N I ; et al. **Interleukin-18 promoter polymorphisms in Egyptian patients with rheumatoid arthritis.** Egypt J Immunol, 2012;19(2):13-24;

IKEDA, K.; COX, S.; EMERY, P. **Aspects of early arthritis. Biological therapy in early arthritis – overtreatment or the way to go? Arthritis Research & Therapy.** London, v. 9, n. 1, p. 211-221, Set. 2007;

JANEWAY, Charles A.; Travers, Paul; WALPORT, Mark; SHLOMCHIK, Mark. **Imunobiologia – O sistema immune na saúde e na doença.** tradução Cristina Bonorino *et al.*, 5ª edição, Editora ARTMED, p. 527-548, 2002;

JOHNSEN, A. K. et al. **A Broad Analysis of IL1 Polymorphism and Rheumatoid Arthritis.** Arthritis Rheumatism, Boston, v. 58, n. 7, p. 1947-1957, 2008;

JORGENSEN C ; PICOT M C ; BOLOGNA C ; SANY J . **Oral contraception, parity, breast feeding, and severity of rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis 55:94–8. 1996;

KALLBERG H; JACOBSEN S; Bengtsson C; PEDERSEN M; PADYUKOV L; GARRED P; FRISCH M; KARLSON E W; KLARESKOG L; ALFREDSSON L . **Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies.** Ann Rheum Dis 68:222–7. 2009;

KARLSON E W ; DING B ; KEENAN B T ; LIAO K ; COSTENBADER K H ; KLARESKOG L ; ALFREDSSON L ; CHIBNIK L B . **Association of environmental and genetic factors and gene-environment interactions with risk of developing rheumatoid arthritis.** Arthritis Care Res (Hoboken) 65:1147-1156. 2013;

KAZANTSEVA M G ; HIGHTON J ; STAMP L K ; HESSIAN P A . **Dendritic cells provide a potential link between smoking and inflammation in rheumatoid arthritis.** Arthritis Res Ther 14:R208. 2012;

KLOCKARS M, KOSKELA RS, JARVINEN E, KOLARI PJ, ROSSI A. Silica. **Exposure and rheumatoid arthritis: a follow up study of granite workers.** 1940–81. BMJ, 294:997–1000. 1987;

KWOH C K . **Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis.** American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatology 46:328-346. 2002;

MACGREGOR AJ, SNIEDER H, RIGBY AS *et al.* **Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.** Arthritis Rheum. 43:30–7. 2000;

MACHOLD, K. P.; NELL, V. P. K.; STAMM, T. A.; SMOLEN, J. S. **Traditional DMARD therapy: is it sufficient?** Arthritis Research & Therapy. London, v. 8, n. 3, p. 51-56, Feb. 2006;

MCINNES, I B ; SCHETT, G. **Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** Nat Rev Immunol. 2007;7(6):429-42;

MCINNES, I B ; SCHETT, G . **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** N Engl J Med 365:2205-2219. 2011;

NAKANISHI, K. *et al.* **Interleukine -18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu.** Cyt. Growth Fact. Rev., Oxford, v.12, p.53-72, 2001.

OLSSON AR, SKOGH T, AXELSON O, WINGREN G. **Occupations and exposures in the work environment as determinants for rheumatoid arthritis.** Occup Environ Med. 61: 233–38. 2004;

O'DELL, J R . **Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.** N Engl J Med, 350:2591-2602, 2004;

PARSLOW, Tristram G.; STITES, Daniel P.; TERR, Abba I.; IMBODEN. John B., **Imunologia Médica.** 10ª Edição, Editora Guanabara Koogan, p. 353-355, 2004;

PÉREZ I.R.; MORENO M.F.; BLANCO F.J. **Gene Polymorphisms and Pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis.** Current Genomics, 2008;

PIARCE, Simon H. S. & MERRIMAN, Tony R., **Genetic progress toward the molecular basis of autoimmunity.** Trends in Molecular Medicine, Vol. 12, nº2, p. 90-97, 2006;

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

SCHEINBERG, M. **O infliximab no tratamento da artrite reumatóide: quando e como usar.** Hospital Albert Einstein, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 138-140, fev. 2005;

SHIELS M S ; KATKI H A ; FREEDMAN N D ; PURDUE M P ; WENTZENSEN N ; TRABERT B ; KITAHARA C M ; FURR M ; LI Y ; KEMP T J ; *et al.* **Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers.** J Natl Cancer Inst 1:106-11. 2014;

SHON, Y; NAM, K. **Protective effect of Astragali radix extract on interleukin 1beta-induced inflammation in human amnion.** Phytother Research, v. 17, p. 1016-1020, 2003.

SILMAN A.J., PEARSON J.E. **Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis.** Arthritis Res. 4:265-272. 2002;

SILVA, R G ; VANNUCI A B ; LATORRE L C ; ZERBINI C A F . **Artrite reumatóide**. RBM: Revista Brasileira de Medicina 60:8. 2003;

SINGH JA; Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM, Moreland LW, O'Dell J, Winthrop KL, Beukelman T, *et al.* **Update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of 131**. 2010;

SINGH, J. A. *et al.* 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: 2012 ACR RA Treatment Recommendations. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 5, p. 625–639, maio 2012.

SOCIEDADE CHILENA DE REUMATOLOGIA. **Tratamiento com agentes biológicos de los pacientes con artritis reumatóide refractaria a tratamiento tradicional**. Revista Chilena de Reumatologia, Santiago, v. 24, n 3, p. 121-132, Sep. 2008;

SVERDRUP B, KALLBERG H, BENGTSSON C, *et al.* **Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study**. Arthritis Res Ther. 7:1296–303. 2005;

SZETO, C.C.; CHOW, K.M, POON, P.Y.; KWAN, B.C.; LI, P.K. **Association of interleukin-18 promoter polymorphism and atherosclerotic diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy**. Nephrology. 2009;14(6):606-12;

TAKADA, T.; SUZUKI, E.; MOROHASHI, K.; GEJYO F. **Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population**. Tissue Antigens.2002;60(1):36-42;

UEHBE, A. I.; PIMENTA, M. E.; GIORGI, R. D. **DMARDs (fármacos anti-artrite reumatóide modificadores da doença ou drogas anti-reumáticas modificadoras da doença)**. Revista temas de reumatologia clinica, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 57-61, Abr. 2006;

VAN DER HEIJDE D M F M ; VAN'T HOF M A ; VAN RIEL P L C M ; VAN LEEUWEN M A ; VAN RIJSWIJK M H ; VAN DE PUTTE L B A .**Validity of single variables and composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis.** Ann Rheum Dis 51:177– 81. 1992;