

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DANIELLA ALVES SILVA PIMENTEL BARBOZA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO +874 T/A DO GENE INTERFERON GAMMA EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

RECIFE

2018

DANIELLA ALVES SILVA PIMENTEL BARBOZA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO +874 T/A DO GENE INTERFERON GAMMA EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Mascena Diniz Maia.
Co-orientadora: M^a Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva.

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

B239e Barboza, Daniella Alves Silva Pimentel
Estudo do polimorfismo +874 T/A do gene interferon gamma em
pacientes com artrite reumatoide do estado de Pernambuco / Daniella
Alves Silva Pimentel Barboza. – 2018.
50 f. : il.

Orientadora: Maria de Mascena Diniz Maia.

Coorientadoras: Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife,
BR-PE, 2018.

Inclui referências.

1. Artrite reumatóide 2. Doenças autoimunes 3. Polimorfismo
(Genética) 4. Marcadores genéticos I. Maia, Maria de Mascena
Diniz, orient. II. Silva, Isaura Isabelle Fonseca Gomes da, coorient.
III. Título

CDD 574

DANIELLA ALVES SILVA PIMENTEL BARBOZA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO +874 T/A DO GENE INTERFERON GAMMA EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO**

APROVADO EM:

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Mascena Diniz Maia (Orientadora e Presidente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª Nara Suzy Aguiar de Freitas (Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

M^ª Géssica Dayane Cordeiro de Lima (Titular)
Doutoranda em Biologia Celular e Molecular Aplicada
Universidade de Pernambuco

Bióloga Maria Luiza Lyra Barreto (Suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram
nesta caminhada, especialmente aos meus
familiares, Marido e Professores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Senhor Jesus Cristo, por abençoar-me nesta jornada cheia de obstáculos. Toda honra e glória seja dada a ti, oh filho de Davi, Príncipe da Paz, Deus Emanuel. Meu coração transborda de tanta emoção, pois tu és e sempre será o autor da minha vida.

Aos meus familiares muita gratidão em especial a minha mãe, Dona Léa, meu pai, Renê, minha irmã, Renata e Tio Marcos. O que dizer de David? Que marido maravilhoso! Obrigada por toda ajuda e compreensão nos momentos de estresse.

Aos meus amigos da turma SB3 Pollyana Rubem, Amanda Vieira, Lorena Nunes, Fagna Renata, Lucas Carvalho, Érique Ricardo e Arthur Felipe, muito obrigada por compartilhar momentos incríveis, brincadeiras, conversas, estudos e muito estresse devido às avaliações.

A minha querida orientadora professora Mana, te agradeço pelos conselhos e por ter compartilhado tanto conhecimento. Isaura minha co-orientadora te agradeço pela paciência, pelo carinho e amizade, realmente você é uma estrelinha (como professora Mana diz). Não poderia esquecer o professor Martín Alejandro que me ajudou a conhecer minha orientadora, obrigada por aulas maravilhosas, saiba que és um excelente professor.

“Combati o bom combate, acabei a carreira,
guardei a fé.” (Paulo de Tarso – Apóstolo de
Cristo).

RESUMO

Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune com prevalência entre 0.5% a 1% da população mundial adulta. A etiologia ainda não está completamente esclarecida, porém é sabido que fatores hormonais, ambientais e imunológicos atuam conjuntamente em indivíduos com predisposição genética. Dentre os fatores genéticos o polimorfismo +874 T/A do gene Interferon gamma (*IFNG*) é citado como atuante em diversas doenças autoimunes. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é analisar a relação do polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* na AR, em uma população do Estado de Pernambuco. A presente pesquisa foi composta por 127 pacientes e 127 controles saudáveis, dos quais as amostras de sangue coletadas foram utilizadas para extração do DNA. Posteriormente, foi realizada a amplificação do DNA extraído, através da Reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AS). O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o teste Qui-quadrado e Análise de Variância. Os resultados apresentados indicaram que o polimorfismo + 874 T/A do gene *IFNG* não está associado ao desenvolvimento da AR, com distribuição genotípica (TA x AA: $p = 0.530$ e TT x AA: $p = 0.416$) e frequência alélica ($p = 0.851$). Entretanto, os indivíduos com genótipos TT e TA apresentaram índices de atividade da doença significativamente mais elevados em comparação com os portadores do genótipo AA (DAS28: $p=0.017$; CDAI: $p=0.021$). Sugerindo que o polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* pode ser considerado como um marcador para atividade da doença AR.

Palavras - chave: Autoimune, polimorfismo, marcador.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease with prevalence between 0.5% and 1% of the adult population worldwide. The etiology is still not fully understood, but it is known that hormonal, environmental and immunological factors act together in individuals with genetic predisposition. Among the genetic factors, Interferon Gamma (IFNG) +874 T/A gene polymorphism is cited as acting in several autoimmune diseases. In this sense, the objective of this work is to analyze the relation of the +874 T / A polymorphism of the IFNG gene in RA, in a population of the State of Pernambuco. The present study was composed of 127 patients and 127 healthy controls, from which the blood samples collected were used for DNA extraction. Subsequently, amplification of the extracted DNA was performed, using the allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR). The amplified material was subjected to 2% agarose gel electrophoresis. Statistical calculations were applied using Chi-square and Analysis of Variance. The results indicated that the + 874 T / A polymorphism of the IFNG gene is not associated to the development of RA, with genotypic distribution (TA x AA: $p = 0.530$ and TT x AA: $p = 0.416$) and allelic frequency ($p = 0.851$). However, individuals with TT and TA genotypes had significantly higher rates of disease activity compared to the AA genotype (DAS28: $p = 0.017$; CDAI: $p = 0.021$). Suggesting that the +874 T/A polymorphism of the IFNG gene can be considered as a marker for RA disease activity.

Key words: Autoimmune, polymorphism, marker.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1- Processo inflamatório ocorrido na Artrite Reumatoide.....	17
Figura 2- Deformidades nas mãos (aumento do volume) conhecidas como “Pescoço de Cisne” e nódulo reumatóide na articulação do cotovelo.....	17
Figura 3- Processo evolutivo da Artrite Reumatoide e formação do <i>pannus</i>	19
Figura 4 - Fatores que norteiam a Artrite Reumatoide.....	24
Figura 5- Síntese de algumas funções da citocina Interferon gamma.....	27
Figura 6- Modelo esquematizado do gene Interferon gamma.....	28
Figura 7- Esquema mostrando a localização dos principais polimorfismos do gene Interferon gamma.....	28
Figura 8- Resultado da amplificação da região + 874 do gene Interferon gamma com os padrões de genótipos TA e AA.....	34
Gráfico 1 - Distribuição do genótipo do polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma em relação ao índice de atividade da doença 28.....	36
Gráfico 2 - Distribuição do genótipo do polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma em relação ao índice clínico de atividade de doença.....	36
Gráfico 3 - Distribuição do genótipo do polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma em relação ao questionário de avaliação de saúde.....	37

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Critérios elaborados pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1987.....	20
Quadro 2- Critérios elaborados pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) em 2010.....	21
Tabela 1- Dados clínicos e sócios demográficos da população de pacientes com Artrite Reumatoide e controles saudáveis.	33
Tabela 2- Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma em pacientes com Artrite Reumatoide e controles saudáveis.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
ANOVA	Análise de variância
Anti - TNF-α	Anti - Fator de Necrose Tumoral α
Anti-CCP	Anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos
AR	Artrite Reumatóide
CCL21	Ligante de Quimiocina do Motivo 21
CDAI	Índice clínico de atividade de doença
CEAF	Componente Especializado da Assistência Farmacêutica
DAS28	Índice de atividade da doença
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENOX1	Permutador de Dissulfeto-tiol Ecto-NOX 1
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo
Fc	Fragmento cristalizável
FR	Fator Reumatoide
GWAS	Associação genômica ampla
HAQ -DI	Índice de incapacidade do questionário de avaliação de saúde
HAQ	Questionário de avaliação de saúde
HLA-DR4	Antígeno Leucocitário Humano DR 4
HLA-DRB	Antígeno Leucocitário Humano DR beta
HLA-DRB1	Antígeno Leucocitário Humano DR beta 1
HW	Hardy Weinberg
IC	Intervalo de confiança
IFNG	Gene Interferon gamma
IFN-γ	Citocina Interferon gamma
IgG	Imunoglobulina G
IL 2	Interleucina 2
IL-1	Interleucina 1
IL2RA	Subunidade Alfa do receptor de Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6

ILs	Interleucinas
IRF5	Fator Regulador de Interferon 5
Mhaq	Questionário de avaliação de saúde modificado
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
MOS SF-36	Questionário de medidas genéricas de qualidade de vida
MTX	Metotrexato
NA	Não aplicável
NAA25	Gene N-Alfa Acetiltransferase 25, subunidade Auxiliar NatB
NFK –B	Fator nuclear Kappa B
OR	<i>Odds Ratio</i>
Pb	Pares de base
PCR	PCR Proteína C reativa
PCR-AS	Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específica
PHW	Valor de P do teste de Hardy–Weinberg
PTPN22	Tirosina Fosfatase não Receptora 22
PX²	Valor de P do teste Qui–Quadrado.
SDAI	Índice simplificado de atividade da doença
SES –PE	Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco
SISMEDEX	Gerenciamento e Acompanhamento dos Medicamentos Excepcionais
SPRED2	Domínio EVH1 Relacionado ao Sprouty contendo 2
STAT4	Transdutor de Sinal e Ativador Transcricional 4
TBE	Tris-Borato-EDTA
Th1	Células T <i>helper</i> tipo 1
TNF –α	Fator de Necrose Tumoral α
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. OBJETIVOS.....	16
1.1.1. Objetivo geral	16
1.1.2. Objetivos específicos	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1. ARTRITE REUMATOIDE.....	17
2.1.1. Aspectos gerais da patologia	17
2.1.2. Epidemiologia e dados sócios demográficos	18
2.2. FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE	19
2.3. DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO.....	20
2.3.1. Critérios para o diagnóstico	20
2.3.2. Exames laboratoriais	22
2.3.3. Índices de avaliação da doença	23
2.4. ETIOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE	24
2.4.1. Fatores hormonais	24
2.4.2. Fatores ambientais	24
2.4.3. Fatores genéticos	25
2.4.4. Fatores imunológicos	26
2.5. POLIMORFISMO +874 T/A DO GENE INTERFERON GAMMA	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. POPULAÇÃO ESTUDADA E QUESTÕES ÉTICAS	30
3.2. CRITÉRIOS PARA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA	30
3.3. AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E DADOS SÓCIOS DEMOGRÁFICOS... 30	
3.4. COLETA SANGUÍNEA E EXTRAÇÃO DO DNA.....	31
3.5. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO +874 T/A DO GENE INTERFERON GAMMA	

3.6.	ELETROFORESE E GENOTIPAGEM	31
3.7.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
4.	RESULTADOS	33
4.1.	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO.....	33
4.2.	GENOTIPAGEM	34
4.3.	DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA E FREQUÊNCIA ALÉLICA	34
4.4.	ATIVIDADE DA DOENÇA.....	35
5.	DISCUSSÃO	38
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
	REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

Doenças Reumáticas autoimunes são distúrbios raros, sistêmicos e heterogêneos associados com alta morbidade e mortalidade. Estas patologias são causadas por diversos fatores, dentre eles, encontra-se uma base genética extremamente complexa que, em conjunto com fatores não genéticos, atuam em diferentes graus em cada indivíduo acometido (GOLDBLATT; ONEILL, 2013).

A Artrite Reumatóide (AR) é uma das doenças reumáticas autoimunes mais estudadas. Esta patologia apresenta transtornos sistêmicos com uma amplitude de manifestações clínicas de grande espectro (GOLDBLATT; ONEILL, 2013; WAHRENHERLENIUS; DÖRNER, 2013). A AR gera grande impacto socioeconômico em seus portadores, pois, o caráter progressivo da doença leva a perda na produtividade, a ausências habituais ao trabalho e a pagamentos de aposentadorias por invalidez para aqueles que perdem a capacidade total para o trabalho (DE AZEVEDO; FERRAZ; CICONELLI, 2008; LOPEZ-OLIVO *et al.*, 2012).

Com relação ao processo inflamatório na AR, as citocinas possuem um papel fundamental e são indicadas como as principais atuantes na destruição articular (ASTRY; HARBERTS; MOUDGIL, 2011), que é característico da AR. O valor das citocinas na patogênese da AR foi ressaltado através do sucesso no tratamento com anticorpos Anti-fator de Necrose Tumoral α (Anti-TNF- α) em pacientes. O êxito deste inibidor abriu portas para o uso de outros inibidores de citocinas pró-inflamatórias (TANEJA, 2015).

Diversas citocinas são encontradas em níveis séricos no líquido sinovial de pacientes com AR, porém, uma delas chamou atenção, a citocina Interferon gamma (IFN- γ) (BACCALA; KONO; THEOFILOPOULOS, 2005; MEYER *et al.*, 2005; AZIZIEH *et al.*, 2017), devido a seu papel na regulação e manutenção da resposta inflamatória. Além do mais, a expressão alterada desta citocina pode influenciar a susceptibilidade e gravidade em doenças autoimunes (YOUNG; HARDYT, 1995). Em razão disso, polimorfismos no gene desta citocina vêm sendo indicado como candidato plausível para influenciar na incidência e gravidade da AR (POKORNY *et al.*, 2001).

Dentre eles, o polimorfismo +874 T/A do gene Interferon gamma (*IFNG*) vêm ganhando destaque por ter uma sequência específica no alelo T que fornece um local de ligação com fator de transcrição, Fator nuclear Kappa B (NFK-B) (PRAVICA, 1999), levando a uma indução na expressão da citocina. Por esta razão, os alelos T e A

correlacionam-se com alta e baixa expressão da citocina IFN- γ , respectivamente (TIAN *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012).

Este polimorfismo está relacionado com diversas patologias, tais como, Diabetes Mellitus tipo 2 (A TSIAVOU *et al.*, 2005), Lúpus Eritematoso (SILVA, 2014), Síndrome Respiratória aguda grave (CHONG *et al.*, 2006), Câncer Cervical (LIU; SONG; SHI, 2015) e Tuberculose (WEI *et al.*, 2017). No entanto, poucos estudos analisaram a associação do polimorfismo + 874 T/A do gene *IFNG* com a AR (GARCÍA-BERMÚDEZ *et al.*, 2012; ANGELO *et al.*, 2015; MAHMOUD *et al.*, 2016).

Devido ao fato da AR ser uma doença crônica inflamatória de caráter progressivo, o seu impacto afeta níveis, não só individuais do paciente, mas o familiar, profissional, social e econômico. Portanto, se faz necessário investigar novos marcadores biológicos para esta patologia. Neste contexto, um bom candidato a marcador molecular, seria o polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG*, considerando que este polimorfismo altera a expressão da citocina IFN- γ , resultando em altos níveis desta proteína no líquido sinovial de pacientes com AR.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

- Estudar a relação entre o polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma (*IFNG*) e a Artrite Reumatoide (AR).

1.1.2. Objetivos específicos

- Investigar a contribuição do polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* no desenvolvimento da AR.
- Analisar a associação entre o polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* e a atividade da doença na AR.

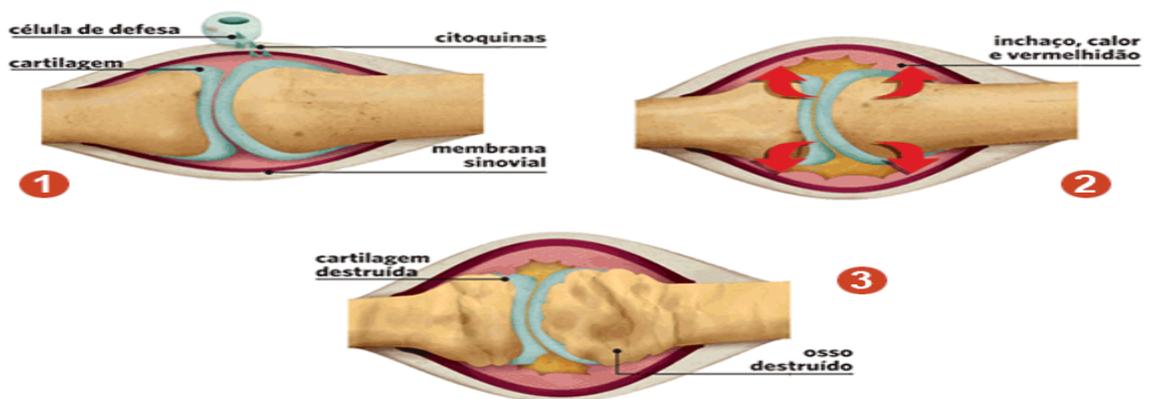
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. ARTRITE REUMATOIDE

2.1.1. Aspectos gerais da patologia

Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, crônica e progressiva, que atinge preferencialmente a membrana sinovial das articulações, podendo levar a um processo de destruição óssea e cartilaginosa (Figura 1) (LEE; WEIBLAND, 2001).

Figura 1- Processo inflamatório ocorrido na Artrite Reumatoide.



Fonte: <http://dicionariosaude.com/artrite-reumatoide/>

As articulações mais atingidas são as sinoviais periféricas, como mãos, pés, tornozelos e punhos. No entanto, joelhos, ombros, cotovelos e quadris também podem ser acometidos por meio do processo inflamatório. Ocasionalmente, as articulações temporomandibular, articulações sinoviais da coluna e laringe também podem ser afetadas o que pode dificultar o diagnóstico (HELLMANN; STONE, 2004) (Figura 2).

Figura 2- Deformidades nas mãos (aumento do volume) conhecidas como “Pescoço de Cisne” e nódulo reumatóide na articulação do cotovelo.



Fonte: Silva *et al.* (2003)

A patologia pode apresentar-se de forma mais branda, de menor duração, até uma poliartrite progressiva e destrutiva associada à vasculite e a outras manifestações extra-articulares (TEHLIRIAN; BATHON, 2008). Os principais sintomas são dores e inchaços nas articulações, rigidez e fadiga, resultando na perda na qualidade de vida. Distúrbios relacionados ao sono também são frequentes e agravam ainda mais o problema (SARIYILDIZ *et al.*, 2014). Estudos sugerem que os riscos relacionados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e Diabetes Mellitus tipo 2 entre os portadores de AR são maiores, quando comparados com a população saudável (AMAYA-AMAYA *et al.*, 2013; MAHMOUD *et al.*, 2016). Estas comorbidades indicam que portadores de AR tem sua expectativa de vida reduzida em comparação com a população em geral (SHINOMIYA *et al.*, 2008).

Com relação ao tratamento da AR os custos são bastantes elevados, devido aos diversos tipos de medicamentos utilizados, que muitas vezes, em alguns pacientes, não respondem de forma efetiva. Além das despesas médicas e hospitalares que contribuem elevando os custos. O caráter progressivo da patologia leva a perda na produtividade, a ausências habituais ao trabalho e a pagamentos de aposentadorias por invalidez, para aqueles que perdem a capacidade total para o trabalho (DE AZEVEDO; FERRAZ; CICONELLI, 2008; LOPEZ-OLIVO *et al.*, 2012).

2.1.2. Epidemiologia e dados sócios demográficos

Do ponto de vista epidemiológico, a AR tem prevalência entre 0.5% a 1% da população mundial adulta, sendo verificada em todos os grupos étnicos. No Brasil a prevalência da AR é estimada em 0,46% da população. As mulheres são mais atingidas que os homens e sua ocorrência é observada entre a quarta e sexta década de vida, no entanto, há registros em todas as faixas etárias (MARQUES-NETO *et al.*, 1993; ALARCÓN, 1995; SENNA *et al.*, 2004).

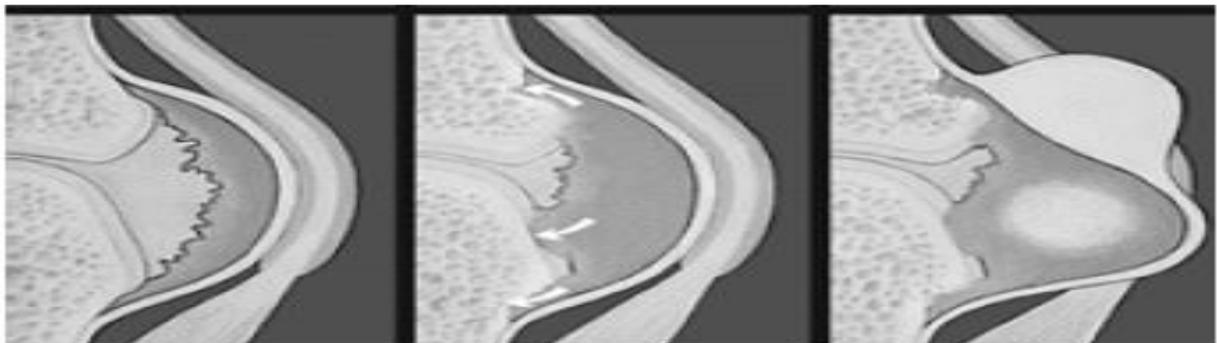
Em 2012, através de buscas na base de dados do Sistema Informatizado de Gerenciamento e Acompanhamento dos Medicamentos Excepcionais (SISMEDEX) foram detectados 1.653 pacientes com AR, cadastrados no Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF) da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (SES-PE), o que corresponde a 0,02%, (ZANGHELINI *et al.*, 2014) de um total de 8.796.448 habitantes do Estado de Pernambuco (IBGE, 2010). O percentual de pessoas atingidas pela AR no Estado de Pernambuco, possivelmente está subestimado, uma vez que muitas pessoas utilizam redes particulares de saúde e não são cadastradas na assistência farmacêutica.

2.2. FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE

Uma análise mais detalhada da membrana sinovial dos pacientes com AR foi feita e pôde-se verificar um intenso processo inflamatório, caracterizado por hiperplasia do tecido e modificação das células componentes desta membrana, os sinoviócitos. Normalmente a membrana sinovial é composta por apenas uma camada de tecido, no entanto, quando inflamada ela pode atingir cerca de dez camadas celulares devido aos macrófagos (sinoviócitos tipo A), fibroblastos transformados (sinoviócitos tipo B) e aos produtores de uma série de mediadores inflamatórios denominados de Interleucinas (ILs). Os principais mediadores do processo inflamatório são as Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) (SILVA, *et al.*, 2003).

Além destas alterações, projeções do tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o *pannus* que é característico da patologia (FIRESTEIN, 2003). Entre os processos inflamatórios normais, que em sua forma exacerbada leva a formação do *pannus*, ocorre a formação de três moléculas: a molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHC), uma proteína e um receptor do linfócito. A formação de três moléculas leva o linfócito auxiliar a modificar suas características fenotípicas, começando assim a propelir ILs estimuladoras da proliferação de macrófagos, tais como Interleucina 2 (IL 2) e Interferon gamma (IFN- γ), passando a ser intitulado de Células T *helper* tipo 1 (Th1). Em seguida os processos inflamatórios ocorrem em várias etapas, com participação de vários mediadores, resultando no aparecimento do *pannus* (Figura 3) (BRENNAN; MAINI; FELDMANN, 1998).

Figura 3 - Processo evolutivo da Artrite Reumatoide e formação do *pannus*.



Fonte: Fellet e Scotton (2001)

O processo inflamatório que leva ao desenvolvimento do *pannus* assemelha-se a apresentação de uma proteína, previamente processada e ligada à molécula superficial do sistema Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II, Antígeno Leucocitário Humano DR beta 1 (HLA-DRB1), onde através de um macrófago ou célula dendrítica, está

apresentação é realizada para o linfócito T auxiliar por meio de seu receptor específico (SILVA, *et al.*, 2003).

2.3. DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

2.3.1. Critérios para o diagnóstico

A classificação da AR foi baseada especialmente nos critérios elaborados pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) criado em 1987 (Quadro 1), este método classificatório apresenta sensibilidade de 91% a 94% e especificidade de 89% para doença já estabelecida. No entanto, este critério da ACR apresenta limitações, referente ao diagnóstico inicial da AR, indicando sensibilidade de 40% a 90% e especificidade de 50% a 90%, pois tais critérios incluem alterações pouco frequentes em indivíduos com a patologia em fase inicial, como erosões e nódulos reumatoides (SARAUX *et al.*, 2001; BANAL *et al.*, 2009).

Quadro 1- Critérios elaborados pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1987.

Critérios	Manifestações Clínicas
1) Rigidez Matinal	Rigidez articular com duração de pelo menos 1 hora.
2) Artrite em três ou mais áreas articulares	Pelo menos três áreas articulares com edema de partes moles ou derrame articular, observado pelo médico.
3) Artrite de Articulações das mãos	Acometimento em punhos, interfalângicas proximais e metacarpofalângicas.
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) Fator Reumatoide Sérico Positivo	Presença de quantidades anormais do Fator Reumatoide.
7) Alterações Radiográficas	Erosões ou descalcificações localizadas em de mãos e punhos.
Observações: Para classificação como Artrite Reumatoide, o indivíduo deve satisfazer a pelo menos a 4 dos 7 critérios; Os critérios 1 ao 4 devem estar presentes por, no mínimo, 6 semanas; Indivíduos com 2 ou 3 não são excluídos da possibilidade de desenvolver Artrite Reumatoide no futuro, porém, não serão considerados para inclusão neste protocolo.	

Fonte: Adaptado de Mota *et al.* (2011) e Bértolo *et al.* (2009)

Atualmente os reumatologistas reconhecem que com tratamento precoce da AR os pacientes conseguem bons prognósticos. Por este motivo, há a necessidade de identificação da patologia em fase inicial. Neste contexto, foi criado em 2010 um novo protocolo, realizado pela ACR em conjunto com a Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) (Quadro 2), a nova abordagem permite a classificação da AR em fase inicial (ALETAHA *et al.*, 2010; FULLER, 2010).

Quadro 2- Critérios elaborados pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) em 2010.

Critérios	Pontuação
A) Acometimento articular (0-5) - Edema ou sensibilidade a palpação, podendo ser confirmado por exames médicos. Excluem-se: Interfangianas distais, primeira carpometacarpiana e primeira tarsometatarsiana.	
1 Grande articulação (Joelhos, ombros, cotovelos, coxofemorais e tornozelos).	0
2-10 Grandes articulações (Joelhos, ombros, cotovelos, coxofemorais e tornozelos).	1
1-3 Articulações pequenas (Metacarpofalângicas, interfalângicas proximais, segunda a quinta metatarsofalangeanas, interfalângica do hálux e punhos). Com ou sem envolvimento de articulações grandes.	2
4-10 Articulações pequenas (Metacarpofalângicas, interfalângicas proximais, segunda a quinta metatarsofalangeanas, interfalângica do hálux e punhos). Com ou sem envolvimento de articulações grandes.	3
>10 Articulações (Com pelo menos uma articulação pequena incluída).	5
B) Sorologia (0-3) - O resultado de pelo menos um teste é necessário para classificação	
Fator Reumatoide negativo e anticorpo anti-peptídeo citrulinado negativo (Com valores inferiores ou iguais ao limite fornecido pelo laboratório).	0
Fator Reumatoide positivo fraco ou anticorpo anti-peptídeo citrulinado positivo fraco (Valores positivos fracos = Até três vezes o limite positivo fornecido pelo laboratório).	2
Fator Reumatoide fortemente positivo ou anticorpo anti-peptídeo citrulinado fortemente positivo (Valores fortemente positivos = três vezes acima do limite positivo fornecido pelo laboratório)	3
C) Reagentes de fase aguda (0-1) - O resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação	
Proteína C reativa e Velocidade de Hemossedimentação – normal	0
Proteína C reativa ou Velocidade de Hemossedimentação – alterado	1
D) Duração dos Sintomas (0-1) – Refere-se ao relato dos pacientes quanto à duração dos sintomas ou sinais de sinovite (por exemplo, dor, inchaço) nas articulações que estão clinicamente envolvidas no momento da avaliação, independentemente do status do tratamento.	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

Fonte: Adaptado de Goeldner *et al.*, (2011) e Villeneuve.; Nam.; Emery, (2010)

O novo protocolo tem como objetivo identificar dentre os pacientes, os que apresentam um quadro recente de Artrite inflamatória, os fatores que melhor diferenciam indivíduos com alto risco para evolução de doença persistente e erosiva em comparação com aqueles que não apresentam tais riscos, desta forma, identifica-se pacientes que precisam de tratamento precoce. Os novos critérios de classificação do ACR/EULAR proporcionam uma melhor identificação dos pacientes com AR inicial, podendo também ser visualizada a evolução da doença. O ramo da reumatologia vem crescendo e descobertas de novos marcadores moleculares podem contribuir para identificação da patologia, resultando em um diagnóstico mais satisfatório e tratamento mais eficaz (VILLENEUVE; NAM; EMERY, 2010).

2.3.2. Exames laboratoriais

A diagnose da AR é concretizada por meio de achados clínicos e exames complementares. No entanto, é necessário salientar que nenhum teste isoladamente tem capacidade de confirmar o diagnóstico para patologia (MOTA *et al.*, 2011). As provas de atividade inflamatória como a Velocidade de Hemossedimentação (VHS) e a dosagem de Proteína C reativa (PCR), são os marcadores laboratoriais mais aplicados para mensurar a atividade da AR. Entretanto, a VHS e a PCR apresentam baixa especificidade e variam de acordo com a idade e sexo. Além disso, a VHS pode sofrer influências de diversos fatores, tais como, os níveis de hemoglobina, gravidez, hipoalbuminemia e hipofibrinogenemia. (DEVLIN, 1997).

Existem alguns autoanticorpos que atuam como possíveis marcadores para o diagnóstico da AR, um deles é o Fator Reumatoide (FR) (VISSER, 2005), que possui a capacidade de reagir com determinados epítomos da porção fragmento cristalizável (Fc) da Imunoglobulina G (IgG), o FR atua intensamente na patogênese da AR e sua presença em níveis altos é associado a doença agressiva, com nódulos reumatoides e manifestações extra-articulares, sugerindo prognóstico desfavorável para os pacientes (VISSER, 2005; GOODSON; FARRAGHER; SYMMONS, 2008; NELL-DUXNEUNER *et al.*, 2009).

Embora o FR seja amplamente solicitado para o diagnóstico da AR, seus resultados devem ser analisados cuidadosamente (GOELDNER *et al.*, 2011). Uma vez que, no início do quadro patológico cerca de 30% a 50% dos pacientes podem ser diagnosticados como soronegativos para este autoanticorpo, indicando assim sua baixa sensibilidade (RENAUDINEAU *et al.*, 2005). Sua especificidade também é limitada, já que o FR também pode estar presente em pessoas sem artrites (VITTECOQ *et al.*, 2003) e ainda pode ser encontrado em diversas outras condições, sendo elas reumatológicas ou não (WOLFE; CATHEY; ROBERTS, 1991; VISSER *et al.*, 1996).

Outro marcador muito utilizado são os Anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos (Anti-CCP), estes anticorpos são produzidos localmente na membrana sinovial inflamada e no líquido sinovial de pacientes com AR (REPARON-SCHUIJT *et al.*, 2001; KINLOCH *et al.*, 2008). Sendo capaz de reagir com vários tipos de proteínas, tais como, filagrina, profilagrina, fibrina e vimentina (ALESSANDRI *et al.*, 2008). Este exame possui sensibilidade entre 70% - 75% e especificidade de 95%, sendo bastante utilizado no grupo de pacientes com AR inicial e FR negativos (RAZA *et al.*, 2005). Visto que, o Anti-CCP pode ser identificado muito precocemente em pacientes com AR, sua utilidade para o diagnóstico e prognóstico é bastante visível (NISHIMURA *et al.*, 2007).

2.3.3. Índices de avaliação da doença

O índice de atividade da doença (DAS28) utiliza 28 articulações para contagem das juntas com edemas e dor (PREVOO *et al.*, 1995). Este índice é o mais utilizado para avaliação da atividade inflamatória em pacientes com AR, ele é empregado tanto nos ensaios clínicos como também na prática diária. Entretanto, o DAS28 exige uma fórmula bastante complexa que inclui raiz quadrada de logaritmo neperiano onde é necessária a utilização de ferramentas tecnológicas para realizar os cálculos. Por essa razão, foram criados índices mais compreensíveis, tais como o índice simplificado de atividade da doença (SDAI) (SMOLEN *et al.*, 2003) e o índice clínico de atividade de doença (CDAI) (ALETAHA *et al.*, 2005).

O CDAI apresenta um cálculo mais simples, pois não é incluído a PCR como ocorre com o cálculo do SDAI, sendo apenas utilizada a soma do número de juntas dolorosas (28 articulações), o número de juntas edemaciadas (28 articulações), a avaliação da atividade da doença realizada pelo paciente (usando uma escala visual analógica de 0 - 10 cm) e a avaliação da atividade da doença realizada pelo médico. No entanto, estes índices apresentam boa correlação entre si (SMOLEN *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2012).

É necessário destacar que a origem étnica dos pacientes pode influenciar nos índices de avaliação atividade da doença, visto que polimorfismos genéticos podem influenciar os níveis de PCR. Além disso, outros fatores genéticos e culturais podem atuar nas medidas de atividade da doença, sendo necessário que estudos referentes ao tema sejam realizados em populações distintas com o objetivo de estabelecer o índice de atividade da doença mais adequado para cada população (MEDEIROS *et al.*, 2015).

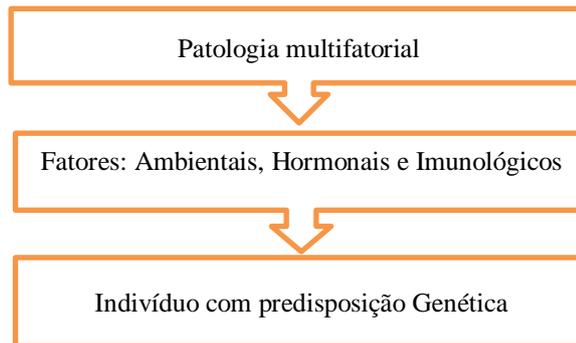
A investigação da qualidade de vida e incapacidade na AR é indispensável para uma melhor compreensão da progressão da patologia (BRANDAO; FERRAZ; ZERBINI, 1997). Mesmo em fase inicial a AR pode acarretar impactos significativos na qualidade de vida relacionada à saúde (KOSINSKI *et al.*, 2002).

Diversos instrumentos vêm sendo apresentados com o objetivo de avaliar a qualidade de vida dos pacientes com AR, neles são observadas mudanças relacionadas à saúde, averiguação do prognóstico e os riscos ou benefícios de determinadas intervenções terapêuticas (MASON *et al.*, 1992; WALKER; LITTLEJOHN, 2007). O questionário mais utilizado para analisar estes aspectos é o questionário de avaliação de saúde (HAQ) que também pode incluir o questionário de avaliação de saúde modificado (mHAQ), o índice de incapacidade do questionário de avaliação de saúde (HAQ -DI) e o questionário de medidas genéricas de qualidade de vida (MOS SF-36) (MOTA *et al.*, 2011)

2.4. ETIOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE

É uma patologia autoimune multifatorial de etiologia ainda não esclarecida completamente (MACGREGOR *et al.*, 2000), porém é sabido que fatores hormonais, ambientais e imunológicos atuam conjuntamente em indivíduos com predisposição genética (Figura 4).

Figura 4- Fatores que norteiam a Artrite Reumatoide



O AUTOR (2018)

Estudos realizados ao longo do tempo vêm demonstrando que a superposição desses fatores determina o desenvolvimento da doença, uma vez que o efeito isolado de apenas um deles não é capaz de causar AR (KLARESKOG; WEDREN; ALFREDSSON, 2009).

2.4.1. Fatores hormonais

Estudos demonstram que há um desequilíbrio hormonal entre os sexos onde as mulheres são mais acometidas por doenças autoimunes do que homens, tais como, tireoide, esclerose múltipla e lúpus, este fato também é verdadeiro para AR onde as mulheres são mais atingidas numa proporção de 3:1 em relação aos homens. A explicação para este fato ainda não é bem esclarecida, porém é sugerido que fatores genéticos ligados ao x e fatores hormonais podem estar atuando (SOKKA *et al.*, 2009; VAN VOLLENHOVEN, 2009).

2.4.2. Fatores ambientais

Dentre os fatores ambientais alguns estudos sugerem a influência de infecções por microrganismo no aparecimento da AR, os mais estudados são os parvovírus, o vírus da rubéola, o vírus *Epstein-Barr* e as bactérias *Proteus mirabilis* e a *Borrelia Burgdorferi* (ALAMANOS; DROSOS, 2005; TOUSSIROU, ROUDIER, 2008). O tabagismo e possivelmente outros fatores ambientais estão envolvidos na produção de Anti-CCP e ao desenvolvimento da AR soropositiva (SZODORAY *et al.*, 2010; AREND; FIRESTEIN,

2012). O estresse também é relatado como fator ambiental e pode promover modificações pós-traducionais de proteínas incluindo citrulinização via peptidilarginina deiminases (MCINNES; SCHETT, 2011).

2.4.3. Fatores genéticos

Os fatores genéticos estão relacionados com a ocorrência e severidade da patologia, calcula-se em 60% a contribuição genética para o desenvolvimento da AR (NEPOM; BYERS; SEYFRIED, 1989; TURESSON, MATTESON, 2006; TAN, *et al.*, 2010). Estes dados podem ser comprovados através de estudos realizados em gêmeos monozigóticos onde os riscos para desenvolver a doença são de 50%, quando um dos gêmeos é acometido pela patologia. A ocorrência de AR em grupamentos familiares é bastante comum. Estima-se que o risco de familiares de pacientes com AR desenvolver a doença é de 4% para irmãos (não gêmeos), 4,7% para pais e filhos, 1,9% para familiares de segundo grau. Outro dado é que familiares de primeiro grau de pacientes com AR na sua forma erosiva possuem mais de 15% de chances de desenvolver a patologia (NEPOM, BYERS, SEYFRIED, 1989; MACGREGOR *et al.*, 2000; HARNEY, WORDSWORTH, 2002).

Ao longo do tempo houve um aumento na quantidade de genes associados ao desenvolvimento da AR, os alelos do Antígeno Leucocitário Humano DR beta 1 (HLA-DRB1) são apontados como a principal associação com a doença, inclusive possuem relação com a forma mais grave da AR (BALSA *et al.*, 2010; STAHL *et al.*, 2010). Outro alelo descrito pela primeira vez por Stastny (1978) é o Antígeno Leucocitário Humano DR4 (HLA-DR4), estudos sugerem que ele contribui para susceptibilidade da AR, no entanto, os mecanismos pelo qual este alelo determina a predisposição para AR ainda não foram bem esclarecidos (CASTRO-SANTOS; DÍAZ-PEÑA, 2015). Além dos locus (Antígeno Leucocitário Humano DR beta) HLA-DRB, mais de 46 loci de risco para AR não HLA surgiram a partir de pesquisas de associação genômica ampla (GWAS) e posteriormente metanálises de conjunto de dados GWAS (STAHL *et al.*, 2010; EYRE *et al.*, 2012).

Estudos realizados em indivíduos da América Latina investigaram vários loci ligados à susceptibilidade AR, já relatadas, em GWAS nas populações asiáticas e europeias, com valores significativamente moderados, incluindo os genes Transdutor de Sinal e Ativador Transcricional 4 (STAT4), Fator Regulador de Interferon 5 (IRF5), Subunidade Alfa do receptor de Interleucina 2 (IL2RA), Domínio EVH1 Relacionado ao Sprouty contendo 2 (SPRED2), Ligante de Quimiocina do Motivo 21 (CCL21) e Tirosina Fosfatase não Receptora 22 (PTPN22). Além disso, descobriram dois novos genes associados com AR, os

genes Permutador de Disulfeto-tiol Ecto-NOX 1 (ENOX1) e o gene N-Alfa Acetiltransferase 25, subunidade Auxiliar NatB (NAA25) (LÓPEZ *et al.*, 2013).

2.4.4. Fatores imunológicos

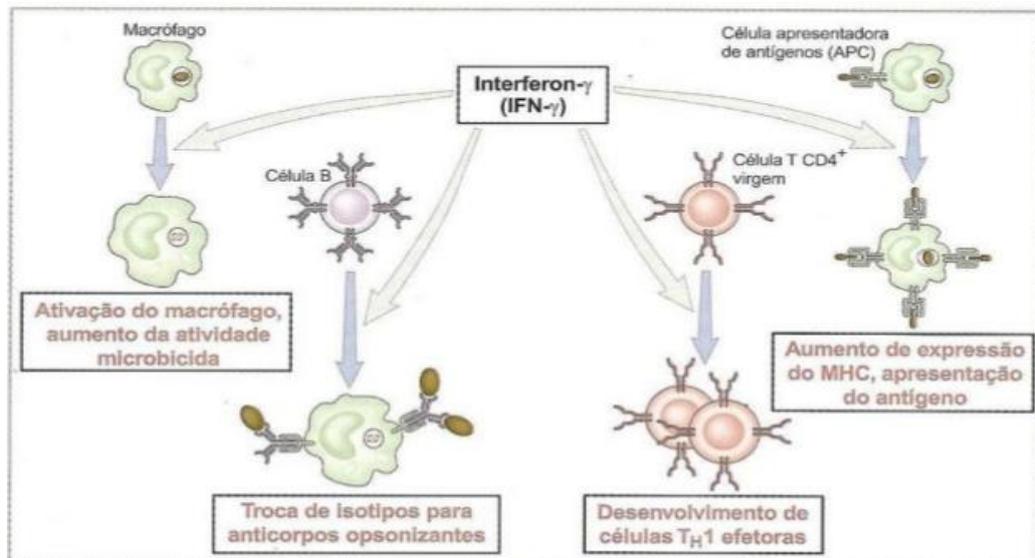
A patologia da Artrite Reumatoide (AR) como toda doença autoimune recebe influências de citocinas que são proteínas envolvidas em vários processos imunológicos tais como, estimular a proliferação, diferenciação e migração celular, controla a inflamação local e sistêmica, ativação ou desativação das respostas inflamatórias e comunicação celular (SILVA, 2016). Estudos sugerem que um desequilíbrio de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, estão envolvidos no desenvolvimento de doenças autoimunes (BIEDERMANN; ROCKEN; CARBALLIDO, 2004).

Com relação a AR, muitas citocinas são peças chaves no processo inflamatório da patologia. Dentre elas, podemos citar o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), a Interleucina 6 (IL 6), a Interleucina 17 (IL 17) e o Interferon gamma (IFN- γ) (FIRESTEIN, 2005; GABER *et al.*, 2013; GHEITA *et al.*, 2015). O IFN- γ é uma citocina pleitrópica e pró-inflamatória com propriedades antiviral e antitumoral, que possui papel importante na AR. Esta proteína é encontrada no líquido sinovial de pacientes com AR e serve como um marcador de ativação de Th1 que promovem e amplificam doenças autoimunes (XU *et al.*, 2003; BACCALA; KONO; THEOFILOPOULOS, 2005; GABER *et al.*, 2013)

Além disso, o IFN- γ é a principal ativadora de macrófagos e exerce funções significativas tanto na imunidade inata e adquirida, ativando fagócitos mononucleares e células *natural Killer* (NK) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Também tem efeito direto sobre a inflamação aumentando a expressão de genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, assim como, à produção de mediadores prejudiciais ao tecido, como o TNF- α , proteases, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (FIRESTEIN, 2005) (Figura 5).

A expressão alterada desta citocina pode influenciar na susceptibilidade e gravidade de doenças autoimunes (YOUNG; HARDYT, 1995). Além do mais, macrófagos ativados pela citocina IFN- γ são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias que atuam na inflamação da articulação de pacientes com AR (VANDOOREN *et al.*, 2009).

Figura 5-Síntese de algumas funções da citocina Interferon gamma.



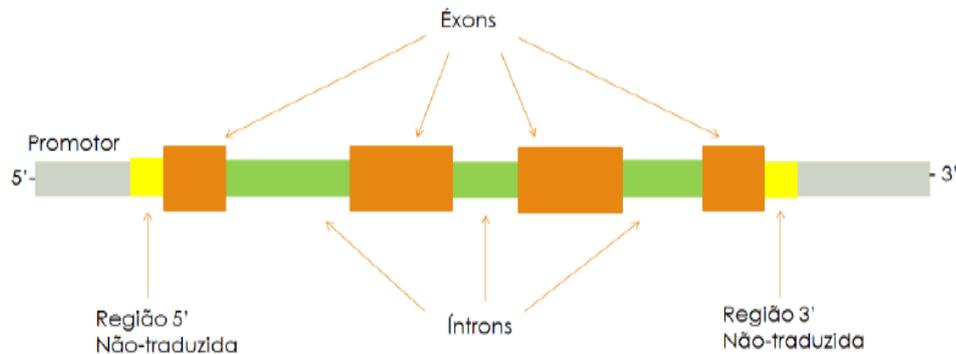
Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2012).

2.5. POLIMORFISMO +874 T/A DO GENE INTERFERON GAMMA

Podemos definir polimorfismo como a coexistência de mais de uma variante genética em uma população, sendo denominadas como variante selvagem (sua forma ancestral) e variante mutante. Os polimorfismos são resultantes da herança de mutações genéticas que assumem genótipos estáveis em determinadas populações e passam a ser denominados desta forma quando a frequência da variante atinge mais de 1% da população (GRIFFITHS, 2008). A maior parte dos polimorfismos encontrados em citocinas estão localizados em regiões não transcritas dos genes (KEEN, 2002). Assim, polimorfismos nestas regiões podem alterar a expressão do gene, estimulando ou inibindo sua transcrição, este fato irá depender dos elementos regulatórios e do nível de regulação envolvido (HOPKINS, 2003).

O gene Interferon gamma (*IFNG*) é o responsável por codificar a citocina IFN- γ , este gene está localizado no braço longo do cromossomo 12 na posição q24.1, possuindo aproximadamente 5.961 pares de base sendo composto por 4 éxons e 3 íntrons; contendo um estimulador não específico dentro do primeiro íntron (Figura 6) (YIM ;SELVARAJ, 2010) e polimorfismos neste gene vêm sendo indicado como candidatos plausíveis para influenciar na incidência e gravidade da AR (POKORNY *et al.*, 2001).

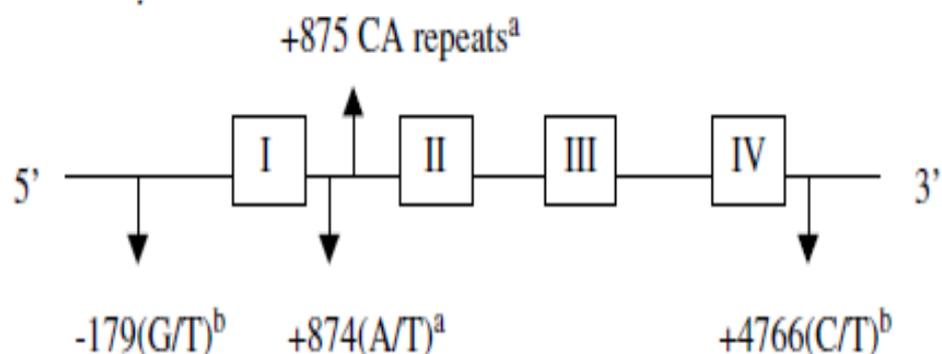
Figura 6- Modelo esquematizado do gene Interferon gamma.



Fonte: SILVA (2014)

Com relação a isso, o polimorfismo +874 T/A do gene Interferon gamma (*IFNG*) (Figura 7) tem atraído a atenção, pois este polimorfismo está relacionado com a abundância na produção da citocina IFN- γ . Uma vez que, está localizado dentro de um sítio de ligação com o Fator nuclear Kappa B (NFk-B), o que induz sua expressão, o NFk -B liga-se especificamente a sequência de DNA que contém o alelo T (PRAVICA *et al.*, 2000). Estudos demonstram que o Alelo T é associado com alta expressão e o alelo A correlaciona-se com baixa produção de IFN- γ (ROSSOUW *et al.*, 2003). Conseqüentemente os genótipos TT, TA e AA estão relacionados com alta, intermediária e baixa expressão da citocina IFN- γ , respectivamente (POPADIC *et al.*, 2012).

Figura 7- Esquema mostrando a localização dos principais polimorfismos do gene Interferon gamma.



Fonte: Tso *et al.* (2005)

Dentre as doenças autoimunes, estudos indicam uma forte associação entre o polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* e o desenvolvimento do Lúpus Eritematoso (LES) e da

Púrpura Trombocitopênica Idiopática, também foi mencionado que este polimorfismo pode estar atuando na gravidade destas patologias (THEOFILOPOULOS *et al.*, 2001; SILVA 2014; LEE; BAE, 2015). Com relação à associação deste polimorfismo e o desenvolvimento da AR, no Brasil, apenas um estudo foi realizado no estado de São Paulo, e os autores não analisaram a relação deste polimorfismo e atividade da doença (ANGELO *et al.*, 2015).

Além disso, um estudo demonstrou que pacientes com AR possuem maior risco em desenvolver Diabetes Mellitus tipo 2, esta comorbidade está intimamente relacionada com o polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG*. Neste estudo, também foi sugerido que o aumento da expressão da citocina IFN- γ , correlaciona-se com o Alelo T do polimorfismo +874 do gene *IFNG* (MAHMOUD *et al.*, 2016). Outras patologias também foram descritas em outros estudos e indicou uma associação do polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* e o desenvolvimento de tais doenças. Dentre elas, podemos citar a Síndrome respiratória aguda grave (CHONG *et al.*, 2006), Doenças cardiovasculares (GARCÍA-BERMÚDEZ *et al.*, 2012), Câncer cervical (LIU; SONG; SHI, 2015), Tuberculose (ASGHARZADEH *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2017), Infecção Intra - Uterina por Hepatite B, Gastrite por *Helicobacter pylori* (YU *et al.*, 2006) e infecções causadas por *Toxoplasma gondii* (PEIXE *et al.*, 2014).

Diante do exposto, observa-se a importância da citocina IFN- γ em diversas patologias, inclusive em doenças autoimunes. É sabido também que polimorfismos nesta citocina podem alterar sua expressão. Sabendo disso, é necessária uma investigação do polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* na AR. Poucos estudos analisaram este polimorfismo como marcador biomolecular para desenvolvimento e gravidade da doença. Portanto, este trabalho visa estudar a relação do polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* e a AR em uma população do estado de Pernambuco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO ESTUDADA E QUESTÕES ÉTICAS

A pesquisa foi composta por um total de 127 pacientes com Artrite Reumatoide (AR) e 127 controles saudáveis, todos oriundos do Sistema Único de Saúde, no qual realizavam atendimento no Ambulatório Geral de Reumatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco (UPE). Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), mediante o protocolo CAAE 43318215.9.0000.5208. Todos os participantes da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, porém, apenas os pacientes com AR responderam a um questionário a fim de avaliar o desenvolvimento da patologia.

3.2. CRITÉRIOS PARA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

Todos os pacientes com AR foram diagnosticados por Médicos Reumatologistas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz–UPE, conforme os critérios exigidos pela Associação Americana de Reumatologia e da Liga Europeia Contra o Reumatismo (ACR/EULAR) (ARNETT *et al.*, 1988;SMOLEN *et al.*, 2010). No que se refere aos critérios de exclusão de doenças autoimunes, todos os controles saudáveis passaram por uma triagem a fim de diagnosticar qualquer patologia que pudesse influenciar na análise. Também foi questionado o histórico quanto a doenças autoimunes e infecciosas, além de testes bioquímicos como a velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa (PCR).

3.3. AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS E DADOS SÓCIOS DEMOGRÁFICOS

Os pacientes foram submetidos a avaliações clínicas recomendadas pela ACR/EULAR (ARNETT *et al.*, 1988;SMOLEN *et al.*, 2010), tais como a VHS, PCR, Fator Reumatoide (FR), índice de atividade da doença (DAS28), índice clínico de atividade de doença (CDAI), questionário de avaliação de saúde (HAQ) e erosão óssea. Os dados sócios demográficos coletados indicaram a quantidade e percentual de mulheres e homens, pacientes e controles, idade média dos pacientes e controles, idade de início da AR, quantidade e percentual de usuários de tabaco, pacientes que usam medicamentos biológicos ou biológicos mais metotrexato (MTX) e o tempo de duração da patologia.

3.4. COLETA SANGUÍNEA E EXTRAÇÃO DO DNA

Foram coletados de cada participante da pesquisa 4 ml de sangue venoso, em tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para evitar a coagulação sanguínea. A extração do DNA foi realizada com 500µl (microlitros) do material biológico, sendo efetuada por meio do *Kit Wizard Genomic Purification* (PROMEGA®), seguindo-se todas as instruções do fabricante. Posteriormente o DNA extraído das amostras biológicas, foi acondicionado em um freezer a - 20 °C e o restante do sangue armazenado a 4 °C.

3.5. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO +874 T/A DO GENE INTERFERON GAMMA

A amplificação ocorreu através da Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específica (PCR-AS). Onde os primers utilizados foram o *Forward* T 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3', A 5'-TTCTTACAACACAAAATC AAATCT-3' e *Reverse* 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3,'com fragmentos esperados na altura de 261 pares de base (Pb). Os reagentes aplicados foram 2x Master Mix PCR (PROMEGA ®), 0,5mM (milimolar) de cada primer e água Milli-Q para um volume final de 10 µl (microlitros). A reação ocorreu em um termociclador (BIOCYCLER®), cujo, programa da PCRc (Reação em cadeia da polimerase convencional), ocorreu com as seguintes características de temperatura, tempo e ciclagem: 95 °C durante 5 minutos desnaturação inicial, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos, anelamento a 62 °C por 50 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos, com subsequente 20 ciclos de desnaturação a 95°C durante 20 segundos, anelamento a 56° C por 50 segundos, extensão a 72°C durante 50 segundos e extensão final a 72° C por 5 minutos (CARVALHO *et al.*,2012).

3.6. ELETROFORESE E GENOTIPAGEM

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a uma concentração de 2,0 % em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) com pH=8. Foram adicionados um corante fluorescente *Gel Red* (UNISCIENCE®) e um marcador de peso molecular-*Ladder* (PROMEGA ®) com fragmentos estimados em 100 pares de altura. As bandas foram visualizadas em um transluminador com luz ultravioleta, onde os fragmentos possuíam 261 Pb e foram interpretados com os seguintes perfis genéticos: TT, TA e AA.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A distribuição genotípica e a frequência alélica foram realizadas por meio do teste Qui-quadrado, observando se as populações estão estatisticamente diferentes. O princípio de equilíbrio de Hardy Weinberg (HW) também foi aplicado para todos os grupos. O grau de associação entre o polimorfismo e o desenvolvimento da AR foi calculado através do *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95%. Para estas análises aplicamos o programa BioEstat 5.0® e Statistica 8. Em relação à gravidade da doença, utilizamos a análise de variância (ANOVA) para investigar a associação dos genótipos com a atividade da AR (DAS28, CDAI e HAQ). Para todos os cálculos consideramos $p < 0,05$ para indicar significância.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

A pesquisa foi composta por 96.06% (122) mulheres e 3.94% (5) homens com Artrite Reumatoide, com média de idade 52.86 ± 10.33 anos. Com relação à idade de início da AR os pacientes indicaram média de 41.85 ± 10.18 anos e tempo de duração da doença 11 ± 7.88 anos. Cerca de 48,03% (61) estavam utilizando drogas biológicas ou biológicas mais metotrexato (MTX). A erosão óssea estava presente em 85.03% (108) dos pacientes e apenas 13,38% (17) eram usuários de tabaco. Os controles saudáveis foram constituídos por 88.97% (113) mulheres e 11.02 % (14) homens, com média de idade 47.94 ± 11.84 anos.

A atividade inflamatória dos pacientes foi mensurada pelos índices velocidade de hemossedimentação (VHS) 22.48 ± 12.79 , proteína C reativa (PCR) 5.08 ± 10.43 , fator reumatoide (FR) positivo em 44,88% (57), índice de atividade da doença (DAS28) 3.83 ± 1.15 , índice clínico de atividade de doença (CDAI) 20.33 ± 10.01 e o questionário de avaliação de saúde (HAQ) 1.43 ± 0.65 , por outro lado, os controles saudáveis apresentaram PCR 1.17 ± 2.45 . A tabela 1 apresenta de forma resumida os dados clínicos e sócios demográficos de pacientes com AR e controles saudáveis.

Tabela 1-Dados clínicos e sócios demográficos da população de pacientes com Artrite Reumatoide e controles saudáveis.

Índices clínicos e sócios demográficos	Pacientes (n =127)	Controles (n =127)
F/M % (n)	96,06(122) / 3,93(5)	88,97(113) /11,02(14)
Idade Média \pm DP anos	52.86 ± 10.33	47.94 ± 11.84
Idade de Início da AR Média \pm DP anos	41.85 ± 10.18	N/A
Tempo de duração da AR Média \pm DP	11 ± 7.88 anos	N/A
Medicamentos Biológicos ou Biológicos + MTX % (n)	48,03 (61)	N/A
Erosão% (n)	85,03 (108)	N/A
Tabagismo % (n)	13,38 (17)	0
VHS Média \pm DP	22.48 ± 12.79	N/A
PCR Média \pm DP	5.08 ± 10.43	1.17 ± 2.45
FR positivo % (n)	44,88 (57)	0
DAS28 Média \pm DP	3.83 ± 1.15	N/A
CDAI Média \pm DP	20.33 ± 10.01	N/A
HAQ Média \pm DP	1.43 ± 0.65	N/A

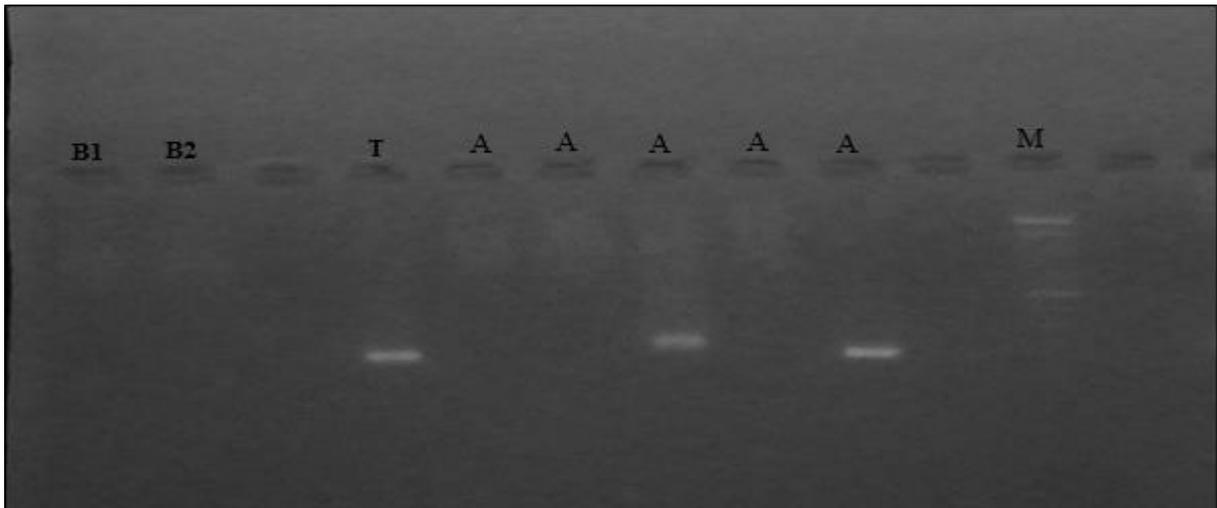
F/M=Feminino/Masculino;DP=Desvio Padrão; NA= Não aplicável; MTX=Metotrexato;VHS=Velocidade de hemossedimentação; PCR= Proteína C reativa; FR= Fator Reumatoide; DAS28=Índice de atividade da doença 28; CDAI= Índice clínico de atividade de doença; HAQ= Questionário de avaliação de saúde.

Fonte: O AUTOR (2018)

4.2. GENOTIPAGEM

A figura 8 apresenta o resultado da amplificação em gel de agarose da região +874 T/A do gene Interferon gamma (*IFNG*).

Figura 8- Resultado da amplificação da região + 874 do gene Interferon gamma com os padrões de genótipos TA e AA.



B1= BRANCO1; B2=BRANCO 2;M=MARCADOR MOLECULAR DE 100pb

Fonte: O AUTOR (2018)

4.3. DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA E FREQUÊNCIA ALÉLICA

Dentre os 127 pacientes com AR, 43.31% apresentavam o genótipo AA, enquanto que, 45.67% o genótipo TA e 11.02% possuíam o genótipo TT. Em contrapartida, 40.94% dos 127 controles saudáveis possuíam o genótipo AA, 52.76% o genótipo TA e 6.30% o genótipo TT. Segundo a lei Hardy-Weinberg (HWE) o grupo de pacientes estava em equilíbrio com ($p=0.824$). Entretanto, o grupo de controles não estava em equilíbrio de acordo com os princípios de HWE com ($p=0.024$). De acordo com o teste Qui-quadrado a população de pacientes e controles não apresentaram distribuição genotípicas estatisticamente diferentes com $p=0.306$. Referente à associação do polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* e o desenvolvimento da AR, não foram observadas diferenças estatísticas para o genótipo AA quando comparados com genótipo TA ($p=0.530$) e genótipo TT ($p=0.416$). O mesmo foi constatado para frequência alélica com $p = 0.851$. A tabela 2 apresenta os resultados de forma resumida.

Tabela 2- Distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma em pacientes com Artrite Reumatoide e controles saudáveis.

+874 T/A do gene <i>IFNG</i>	Pacientes n = 127	PHW	Controles n = 127	PHW	OR (IC 95%)	P	PX ²
Genótipos							0.306
AA	43.31 % (55)		40.94% (52)				
TA	45.67% (58)		52.76% (67)		1.22 (0.73 -2.05)		
TT	11.02% (14)	0.824	6.30% (8)	0.024	0.60 (0.23-1.56)		
Codominante							
TA x AA						0.530	
TT x AA						0.416	
Alelos							
T	0.66% (168)		0.67 % (171)				
A	0.34% (86)		0.33 % (83)		0.95 (0.65-1.37)	0.851	

PHW = Valor de P do teste de Hardy–Weinberg; OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de Confiança; PX² = Valor de P do teste Qui–Quadrado.

Fonte: O AUTOR (2018)

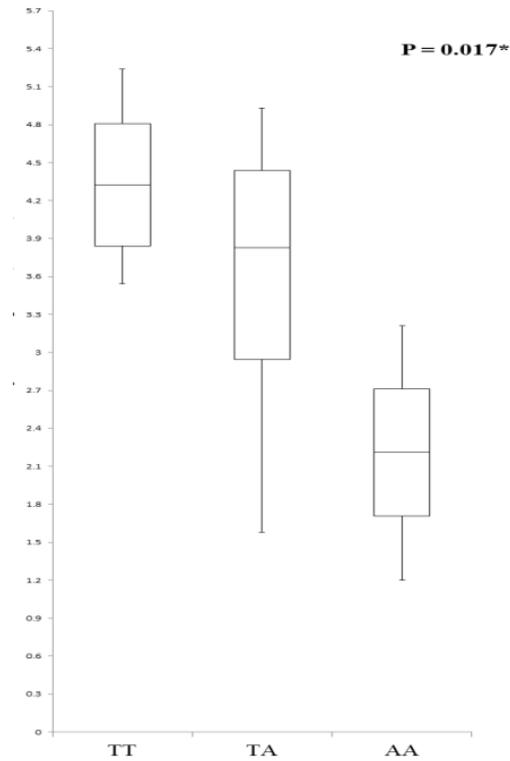
4.4. ATIVIDADE DA DOENÇA

Referente ao índice DAS28 os resultados apontaram média de 4.17 ± 0.89 para os portadores do genótipo TT, já os pacientes do genótipo TA indicaram média de 4.09 ± 0.92 e os portadores do genótipo AA apresentaram média de 3.58 ± 1.07 . O presente estudo indicou um aumento significativo na atividade da doença para os pacientes portadores do genótipo TT e TA em comparação com o genótipo AA ($F=4.418$; $p=0.017$).

Com relação ao CDAI as médias apresentadas foram 22.92 ± 11.63 , 22.55 ± 9.33 e 17.71 ± 9.59 para os genótipos TT, TA e AA, respectivamente. De acordo com os resultados apresentados houve diferenças significativas entre os genótipos estudados ($F=3.98$; $p=0.021$), onde TT e TA determinaram índices de atividade da doença mais elevados, quando comparados com indivíduos do genótipo AA.

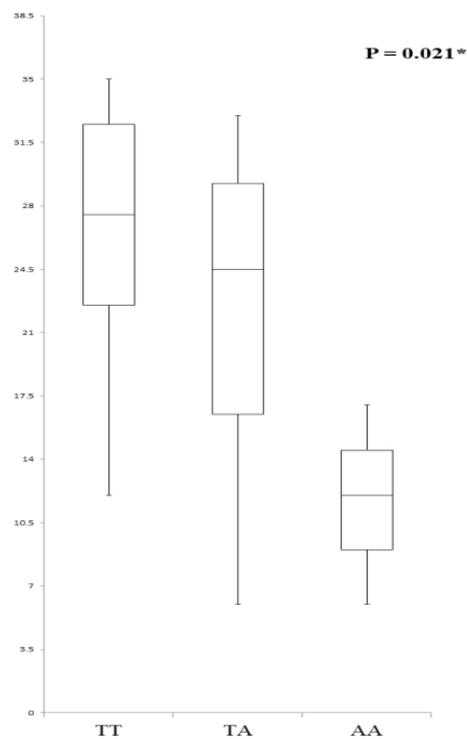
O HAQ não indicou diferenças estatísticas entre os genótipos ($F=2.84$; $p=0.062$) indicando uma média para o genótipo TT de 1.51 ± 0.50 , TA média de 1.57 ± 0.64 e o genótipo AA média de 1.29 ± 0.66 . Os gráficos 1, 2 e 3 apresentam a distribuição genotípica do polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* em relação aos índices de atividade da doença (DAS28, CDAI e HAQ), respectivamente.

Gráfico 1 - Distribuição do genótipo do polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma em relação ao Índice de atividade da doença 28.



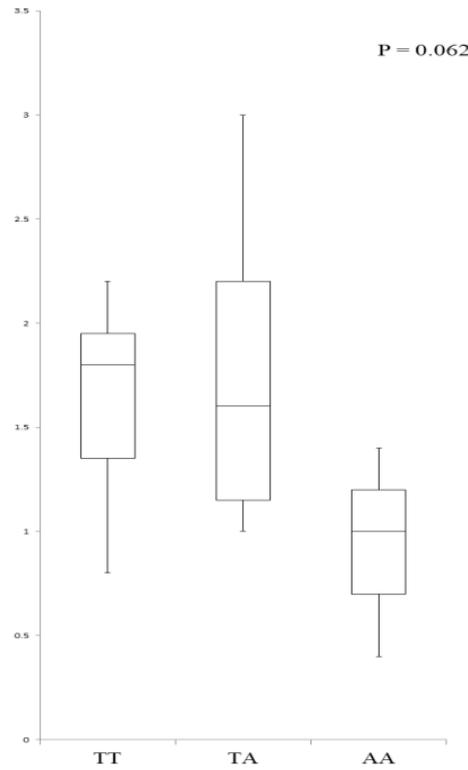
O AUTOR (2018)

Gráfico 2 - Distribuição do genótipo do polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma em relação ao índice clínico de atividade de doença.



O AUTOR (2018)

Gráfico 3 - Distribuição do genótipo do polimorfismo + 874 T/A do gene Interferon gamma em relação ao questionário de avaliação de saúde.



O AUTOR (2018)

5. DISCUSSÃO

No presente estudo tipo caso controle, foi avaliada a relação entre polimorfismo +874 T/A do gene Interferon gamma (*IFNG*) e a Artrite Reumatoide (AR), em pacientes do Estado de Pernambuco. A citocina Interferon gamma ($IFN-\gamma$) é encontrada no líquido sinovial de pacientes com AR (BACCALA; KONO; THEOFILOPOULOS, 2005) e polimorfismos em seus genes podem ser candidatos plausíveis para influenciar a incidência e gravidade da doença (POKORNY *et al.*, 2001).

Nesta pesquisa foi analisada a associação do polimorfismo + 874 T/A do gene *IFNG* no desenvolvimento da AR. Os dados examinados indicaram que não houve nenhuma diferença estatística entre o grupo de pacientes e controles saudáveis. Diante disso, podemos sugerir que este polimorfismo não atua na susceptibilidade da patologia, em nosso grupo de estudo. Até o momento, apenas uma pesquisa foi realizada com este tema no Brasil (ANGELO *et al.*, 2015) e os resultados apresentados foram similares ao nosso. Entretanto, um estudo realizado por Lee e Bae (2015), indicou uma associação do polimorfismo + 874 T/A do gene *IFNG* e desenvolvimento de duas doenças autoimunes, Lúpus Eritematoso e Púrpura Trombocitopênica Idiopática. Além disso, outros estudos demonstraram uma relação deste polimorfismo no desenvolvimento de comorbidades, tais como, Diabetes Mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares, em pacientes com AR (GARCÍA-BERMÚDEZ *et al.*, 2012; MAHMOUD *et al.*, 2016).

Com relação à atividade da doença na AR, o índice de atividade da doença (DAS28) e o índice clínico de atividade da doença (CDAI) apontaram que os pacientes com os genótipos TT e TA apresentaram índices de atividade da doença superiores, o que indica que os genótipos TT e TA expressam quantidades mais elevadas da proteína $IFN-\gamma$, quando comparados com indivíduos com o genótipo AA. Sugerindo que os portadores do genótipo AA expressam baixas quantidades da citocina $IFN-\gamma$. Já a análise do Questionário de avaliação de saúde (HAQ) não apontou resultados estatisticamente significativos. Os resultados encontrados nesta pesquisa estão de acordo com os achados em outros estudos, onde é relatado que o alelo A possui correlação com menores taxas de expressão da citocina $IFN-\gamma$ e o alelo T com maiores taxas de expressão desta citocina (PRAVICA *et al.*, 1999; BREAM *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2017).

Ainda com relação à atividade da doença, um estudo conduzido por Mahmoud *et al.* (2016) indicou altos níveis da citocina $IFN-\gamma$ em pacientes com AR e significativamente correlacionados com o índice Proteína C reativa (PCR). Por outro lado, relatos de pesquisas anteriores demonstraram uma correlação entre os níveis elevados da citocina $IFN-\gamma$ e o índice

DAS28 e o índice simplificado da atividade da doença (SDAI) (MILMAN; KARSH; BOOTH, 2010; PAVLOVIC *et al.*, 2014). Estes resultados são semelhantes aos apontados neste estudo, pois indicam que o polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* está associado a gravidade da patologia AR.

Através destes resultados, podemos presumir que o polimorfismo +874 T/A do gene *IFNG* pode está correlacionado com atividade da doença na AR. Visto que, altos níveis de IFN- γ pode aumentar a ativação de macrófagos, elevando o processo inflamatório e consequentemente ampliando a gravidade da doença. No entanto, devido às diferenças étnicas das populações estudadas é necessária a realização de estudos populacionais com o intuito de estabelecer índices de atividade da doença mais adequando para cada população.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, a presente pesquisa sugere que o polimorfismo +874 T/A do gene Interferon gamma (*IFNG*) não está relacionado com o desenvolvimento da Artrite Reumatoide (AR), em pacientes do Estado de Pernambuco. Entretanto, é observado que este polimorfismo pode exercer um papel como marcador biológico para atividade da doença. Porém, é necessário que mais estudos sejam realizados com a finalidade de comprovar estes resultados.

REFERÊNCIAS

- A TSIAVOU, *et al.* Correlation between intracellular interferon- γ (IFN- γ) production by CD4+ and CD8+ lymphocytes and IFN- γ gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). **Cytokine**, v. 31, n. 2, p.135-141,2005.
- ABBAS, K. A.; LICHTMAN, H. A.; PILLAI S. *Imunologia celular e molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2012.
- ALAMANOS, y.; DROSOS, A.D. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 3, p.130-136, 2005.
- ALARCÓN G.S. Epidemiology of rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, p.589-604, 1995.
- ALBUQUERQUE, A. C. *et al.* Association of polymorphism +874 A/T of interferon- γ and susceptibility to the development of tuberculosis: meta-analysis. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 11, p.2887-2895, 2012.
- ALESSANDRI, C. *et al.* The role of anti-cyclic cytrullinate antibodies testing in rheumatoid arthritis. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 34, p. 45-9, 2008.
- ALETAHA, D. *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 9, p.1580-1588, 2010.
- ALETAHA, D. *et al.* Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 4, p.796-806, 2005.
- AMAYA-AMAYA, J. *et al.* Novel risk factors for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. **Immunologic Research**, Bogotá, v. 56, p.267-286, 2013.
- ANGELO, H. D. *et al.* Interleukin-18, interleukin-12B and interferon- γ gene polymorphisms in Brazilian patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. **Tissue Antigens**, v. 86, n. 4, p.276-278, 2015.
- AREND W.P., FIRESTEIN G.S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. **Nat Rev Rheumatol**, v.8, p.573-586, 2012.
- ARNETT, F. C. *et al.* The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 31, n. 3, p.315-324, 1988.
- ASGHARZADEH, M. *et al.* Association of Promoter Polymorphisms of Interleukin-10 and Interferon-Gamma Genes with Tuberculosis in Azeri Population of Iran. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 15, n. 3, p.167-173, 2016.

ASTRY, B.; HARBERTS, E.; MOUDGIL, K.D. A Cytokine-Centric View of the Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Arthritis. **Journal Of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 12, p.927-940, 2011.

AZIZIEH, F. *et al.* Patterns of circulatory and peripheral blood mononuclear cytokines in rheumatoid arthritis. **Rheumatol. Rheumatol Int.**, p.1727-1734, 2017.

BACCALA, R.; KONO, D. H.; THEOFILOPOULOS, A. N. Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. **Immunological Reviews**, v. 204, n. 1, p.9-26, abr. 2005.

BALSA, A. *et al.* Influence of HLA DRb1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 2, p. 62, 2010.

BANAL, F. *et al.* Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to Disease duration: a systematic literature review and meta-analysis. **Ann Rheum Dis**, v.68, p.1184-1191, 2009.

BÉRTOLO, M. B. *et al.* Consenso Brasileiro de Doenças Reumáticas: Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatoide. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 10, n. 1, p.1-9, 2009.

BIEDERMANN, T.; RÖCKEN, M.; CARBALLIDO, J. M. TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell-Mediated Immune Responses of the Skin. **Journal Of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 9, n. 1, p.5-14, jan. 2004.

BRANDAO L.; FERRAZ M.B.; ZERBINI C.A.F. Evaluation of quality of life in rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v.37, p.275-281, 1997.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo demográfico**: Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão. Brasília, 2010.

BREAM, J.H. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN γ promoter alters control of gene transcription. **Nature**, v. 3, p.165-169, 2002.

BRENNAN, F M; MAINI, R N; FELDMANN, M. Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Springer Semin Immunopathol**, v. 20, n. 2, p.133-147, 1998.

CARVALHO, V. C. V. *et al.* IFN-gamma and IL-12B polymorphisms in women with cervical intraepithelial neoplasia caused by human papillomavirus. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 7, p.7627-7634, 2012.

CASTRO-SANTOS, P.; DÍAZ-PEÑA, R. Genética da artrite reumatoide: é necessário um novo impulso em populações latino-americanas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p.171-177, 2015.

CHONG, W. P. *et al.* The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. **Bmc Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p.1-4, 2006.

DE AZEVEDO, A.B.C.; FERRAZ, M.B.; CICONELLI, R.M. Indirect Costs of Rheumatoid Arthritis in Brazil. **Value In Health**, São Paulo, v. 11, n. 5, p.869-877, 2008.

DEVLIN J. The acute phase and function in early rheumatoid arthritis. C-reactive protein levels correlate with functional outcome. **J Rheumatol**, v.24, p.9-13, 1997.

Disponível em:<<http://dicionariosaude.com/artrite-reumatoide/>> Acessado em 30 de junho de 2018.

EYRE, S. *et al.* High-density genetic mapping identifies new susceptibility *loci* for rheumatoid arthritis. **Nat Genet**, v.44, p.1336-1340, 2012.

FELLET, A.J.; SCOTTON, A. S. Artrite Reumatóide. **RBM - Rev. Bras. Med**, v. 61, n. 12, p.39-48, 2001.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 5, n. 423, p. 356-361, 2003.

FIRESTEIN, G. S. Immunologic Mechanisms in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Jcr: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 11, p.39-44, 2005.

FULLER, R. Critério de classificação da artrite reumatoide ACR-EULAR 2010. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 5, p.481-486, 2010.

GABER, W. *et al.*, Clinical significance of serum interleukin-6 and -174 G/C promoter polymorphism in rheumatoid arthritis patients. **Egypt Rheumatol**, v. 35, n. 2, p.107-113, 2013.

GARCÍA-BERMÚDEZ, M. *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**, v. 7, n. 10, p.1-6, 2012.

GHEITA, T.A. *et al.* Clinical significance of serum TNF α and -308 G/A promoter polymorphism in rheumatoid arthritis. **Egypt Rheumatol**, v.37, n.2, p.49-54, 2015.

GOELDNER, I. *et al.* Artrite reumatoide: uma visão atual. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 5, p.495-503, 2011.

GOLDBLATT, F.; O'NEILL, S. G. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. **The Lancet**, v. 9894, n. 382, p.797-808, 2013.

GOODSON, N. J.; FARRAGHER, T. M.; SYMMONS, D.P. Rheumatoid factor, smoking, and disease severity: associations with mortality in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 35, n. 6, p. 945-949, 2008.

GRIFFITHS *et al.*, Introdução à Genética. 9 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.
HARNEY, S.; WORDSWORTH, B. P. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 6, p. 465-73, 2002.

HELLMANN, D.B.; STONE, J. H. **Arthritis & musculoskeletal disorders**. In: TIERNEY, L. M. *et al.* **Curr Med Diag Treat**. 43. Ed. New York: McGraw-Hill, p. 797-825, 2004.

- HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Legal Medicine** v. 5, p.45-57, 2003.
- KEEN, L.J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 10, n. 2-3, p.143-146, 2002.
- KINLOCH, A. *et al.* Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 8, p.2287-2295, 2008.
- KLARESKOG, L.; WEDREN, S.; ALFREDSSON, L. On the origins of complex immune-mediated disease: the example of rheumatoid arthritis. **J Mol Med**, Solna, v. 87, n. 4, p. 357-362, 2009.
- KOSINSKI, M. *et al.* Health-related quality of life in early rheumatoid arthritis: impact of disease and treatment response. **Am J Manag Care**, v.8, p.231-240, 2002.
- LEE, D. M; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 358, n. 9285, p.903-911, 2001.
- LEE, YH; BAE, S-C. Association between interferon- γ +874 T/A polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. **Lupus**, v. 25, n. 7, p.710-718,2015.
- LIU, N.; SONG, Y.; SHI, W. IFN- γ +874 T/A polymorphisms contributes to cervical cancer susceptibility: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 3, p.4008-4015, 2015.
- LÓPEZ H. D, *et al.* Rheumatoid arthritis in Latin Americans enriched for Amerindian ancestry is associated with *loci* in chromosomes 1, 12, and 13, and the HLA class II region. **Arthritis Rheum**. V.65, p.1457-1467,2013.
- LOPEZ-OLIVO, M. A. *et al.* Risk of Malignancies in Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Biologic Therapy. **Jama Dermatol**, Houston, v. 308, n. 9, p.898-908, 2012.
- MACGREGOR, A.J. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis Rheum**, London, v. 43, n. 1, p.30-37, 2000.
- MAHMOUD, A. A. *et al.* Association of interferon- γ and its (+874 T/A) gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus in rheumatoid arthritis patients. **The Egyptian Rheumatologist**, v. 38, n. 4, p.277-282, 2016.
- MARQUES-NETO, J. F. *et al.* Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 33, p. 169-73, 1993.
- MASON, J.H. *et al.* The Rapid Assessment of Disease Activity in Rheumatology (RADAR) Questionnaire: validity and sensitivity to change of a patient self-report measure of joint count and clinical status. **Arthritis Rheum**, v.35, p.56-62, 1992.
- MCINNES, I.B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **New England Journal Of Medicine**, United Kingdom, v. 365, n. 23, p.2205-2219, 2011.

MEDEIROS, M. M. C. *et al.* Correlação dos índices de atividade da artrite reumatoide (Disease Activity Score 28 medidos com VHS, PCR, Simplified Disease Activity Index e Clinical Disease Activity Index) e concordância dos estados de atividade da doença com vários pontos de corte numa população do nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 6, p.477-484, 2015.

MEYER, P. W. A. *et al.* Circulating Cytokine Profiles and Their Relationships with Autoantibodies, Acute Phase Reactants, and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Mediators Of Inflammation**, v. 2010, p.1-10, 2010.

MILMAN, Nataliya; KARSH, Jacob; BOOTH, Ronald A.. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, [s.l.], v. 43, n. 16-17, p.1309-1314, 2010.

MOTA, L. M. H. *et al.* Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 3, p.199-219, 2011.

NELL-DUXNEUNER, V. *et al.* Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis - a follow-up study. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 1, p. 169-174, 2009.

NEPOM G.T, BYERS P, SEYFRIED C. HLA genes associated with rheumatoid arthritis: Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. **Arthritis Rheum**. V.32, p.15-21, 1989.

NISHIMURA, K. *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med**, v. 146, n. 11, p. 797-808, 2007.

PAVLOVIC, V. *et al.* Serum levels of IL-17, IL-4, and INF γ in Serbian patients with early rheumatoid arthritis. **J Res Med Sci**, v. 19, n. 1, p.18-22, 2014.

PEIXE *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the interferon gamma gene are associated with distinct types of retinochoroidal scar lesions presumably caused by *Toxoplasma gondii* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p.99-107, 2014.

POKORNY, V. *et al.* Interferon-gamma microsatellite and rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 358, p.122-123, 2001.

POPADIC, D. *et al.* Distinctive Frequencies of +874T/A IFN- γ Gene Polymorphism in a Healthy Serbian Population. **Clinical And Translational Science**, v. 5, n. 6, p.461-463, 2012.

PRAVICA, V. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. **Human Immunology**, v.61, n.9, p.863-866. 2000.

PRAVICA, V. *et al.* In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. **European Journal Of Immunogenetics**, v. 26, n. 1, p.1-3,1999.

PREVOO, M. L. L. *et al.* Modified disease activity scores that include twenty eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 1, p.44-48, 1995.

RAZA, K. *et al.* Predictive Value of Antibodies to Cyclic Citrullinated Peptide in Patients with Very Early Inflammatory Arthritis. **J Rheumatol**, v. 32, n. 2, p.231-238, 2005.

RENAUDINEAU, Y. *et al.* Rheumatoid factor on a daily basis. **Autoimmunity**, v. 38, n. 1, p.11-16, 2005.

REPARON-SCHUIJT, C. C. *et al.* Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 1, p. 41-47, 2001.

ROSSOUW, M. *et al.* Association between tuberculosis and a polymorphic NF κ B binding site in the interferon γ gene. **The Lancet**, v. 361, n. 9372, p.1871-1872, 2003.

SARAUX, A. *et al.* Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. **Arthritis Rheum**, v.44, p.485-491, 2001.

SARIYILDIZ, M.A. *et al.* Sleep Quality in Rheumatoid Arthritis: Relationship Between the Disease Severity, Depression, Functional Status and the Quality of Life. **Journal Compilation: J Clin Med Res and Elmer Press Inc**, p.44-52, 2014.

SENNA, E.R. *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal Of Rheumatology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p.594-597, 2004.

SHINOMIYA, F. *et al.* Life expectancies of Japanese patients with rheumatoid arthritis: a review of deaths over a 20-year period. **Modern Rheumatology**, v. 18, n. 2, p.165-169, 2008.

SILVA, C.M.M. **Polimorfismos genéticos e associação com a produção de Interferon gama (IFN- γ) em pacientes com Tuberculose Pulmonar**. 2014.114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SILVA, H.D.A. **Análise de polimorfismos nos genes das citocinas envolvidas no desenvolvimento da Artrite Reumatoide**. 2016.147f. Tese (Doutorado em Genética)-Universidade Federal Rural de Pernambuco-Recife.

SILVA, R.G. *et al.* Como diagnosticar e tratar: Artrite Reumatoide. **RBM - Rev. Bras. Med**, São Paulo, v. 60, p.554-576, 2003.

SINGH, H. *et al.* Evaluation of disease activity in rheumatoid arthritis by Routine Assessment of Patient Index Data 3 (RAPID3) and its correlation to Disease Activity Score 28 (DAS28) and Clinical Disease Activity Index (CDAI): an Indian experience. **Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 12, p.1663-1669, 2012.

SMOLEN, J. S. *et al.* A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. **Rheumatology (oxford)**, v. 42, n. 2, p.244-257, 2003.

SMOLEN, Josef S et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. **Ann Rheum Dis**, v. 69, p.964-975, 2010.

SOKKA, T. *et al.* Women, men, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. **Arthritis Res Ther**, v. 11, p.7, 2009.

STAHL, E.A. et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk *loci*. **Nat Genet**, v.42, p.508-514, 2010.

STASTNY, P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v.298, p.869-871, 1978.

SZODORAY, P. et al. Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v.9, p.140-143, 2010.

TAN, R. J. L. *et al.* Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility genes identifies association of AFF3 and CD226 variants with response to anti-tumour necrosis factor Treatment. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 6, p. 1029-35, 2010.

TANEJA, V. Cytokines pre-determined by genetic factors are involved in pathogenesis of Rheumatoid arthritis. **Hhs Public Access**, v. 75, n. 2, p.216-221, 2015.

TEHLIRIAN, C.V.; BATHON, J. M. Rheumatoid arthritis: clinical and laboratory manifestations. In: STONE, J. H.; CROFFORD, L. J.; WHITE, P. H. **Primer on the rheumatic diseases**. 30. ed. New York: Springer, p. 114-121, 2008.

THEOFILOPOULOS, A. N. *et al.* The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. **Arthritis Research**, v. 3, n. 3, p.136-141, 2001.

TIAN, C. *et al.* The +874T/A polymorphism in the interferon- γ gene and tuberculosis risk: An update by meta-analysis. **Human Immunology**, v. 72, n. 11, p.1137-1142, 2011.

TOUSSIROT, E.; ROUDIER, J. Epstein-barr virus in autoimmune diseases. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 22, n. 5, p. 883-96, 2008.

TSO, H.W. *et al.* Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 4, p.358-363, 2005.

TURESSON, C.; MATTESON, E. L. Genetics of rheumatoid arthritis. **Mayo Clin Proc**, v. 81, n. 1, p. 94-101, 2006.

VAN VOLLENHOVEN, R. F. Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye. **BMC Med**, v. 30, n. 7, p. 12, 2009.

VANDOOREN, B. *et al.* Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 4, p.966-975, 2009.

VILLENEUVE, E.; NAM, J.; EMERY, P. Critério de classificação da artrite reumatoide ACR-EULAR 2010. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, v. 50, n. 5, p.481-486, 2010.

VISSER, H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 19, n. 1, p.55-72, 2005.

VISSER, H. *et al.* Diagnostic and prognostic characteristics of the enzyme linked immunosorbent rheumatoid factor assays in rheumatoid arthritis. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, v. 55, p.157-161, 1996.

VITTECOQ, O. *et al.* Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three-year prospective study in community-recruited patients. **Rheumatology**, v. 42, n. 8, p.939-946, 2003.

WAHREN-HERLENIUS, M.; DÖRNER, T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. **The Lancet**, v. 382, n. 9894, p.819-831, 2013.

WALKER, J.G.; LITTLEJOHN G.O. Measuring quality of life in rheumatic conditions. **Clin Rheumatol**, v.26, p.671-673, 2007.

WEI, Z. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the interferon- γ gene (IFNG +874 T/A) is associated with susceptibility to tuberculosis. **Research Paper: Immunology**, v. 8, n. 31, p.415-429, 2017.

WOLFE, F.; CATHEY, M.A.; ROBERTS, F.K. The latex test revisited. Rheumatoid factor testing in 8,287 rheumatic disease patients. **Arthritis Rheum.**, v. 34, n. 8, p.951-960, 1991.

XU, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal Of Clinical Investigation**, v.112, n. 12, p.1821-1830, 2003.

YIM, J.J.; SELVARAJ, P. Genetic susceptibility in tuberculosis. **Respirology**, v. 15, n. 2, p.241-256, 2010.

YOUNG, H.A; HARDY, K. J. Role of interferon- γ in immune cell regulation. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 58, n. 4, p.373-381, 1995.

YU, H. *et al.* Relationship between IFN- γ gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 12, n. 18, p.2928-2931, 2006.

ZANGHELINI, F. *et al.* Perfil de pacientes com artrite reumatoide em uso de inibidores do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), cadastrados no Componente Especializado da Assistência Farmacêutica de Pernambuco, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p.251-25.2014.