



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TNF* e *PTPN22* SOBRE
A ARTRITE REUMATOIDE E A TUBERCULOSE NO AMAZONAS,
BRASIL.**

ANTONIO LUIZ RIBEIRO BOECHAT LOPES

MANAUS – 2010



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

ANTONIO LUIZ RIBEIRO BOECHAT LOPES

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TNF* e *PTPN22* SOBRE
A ARTRITE REUMATOIDE E A TUBERCULOSE NO AMAZONAS,
BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Doutora Maria Cristina dos Santos

Co-Orientadora: Prof^a Doutora Aya Sadahiro

MANAUS – 2010

ANTONIO LUIZ RIBEIRO BOECHAT LOPES

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TNF* e *PTPN22* SOBRE
A ARTRITE REUMATOIDE E A TUBERCULOSE NO AMAZONAS,
BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovado 15 de Dezembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Doutora Maria Cristina dos Santos
Universidade Federal do Amazonas
(Presidente)

Profa. Doutora Júlia Ignez Salem
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Profa. Doutora Adriana Malheiro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Profa. Doutora Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Doutor Paulo Afonso Nogueira
Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha graciosa esposa Narjara pelo amor e entendimento sem medidas.

Ao médico amigo Aldrin Verçosa Dias, cuja morte precoce deixou-nos órfãos de sua alegria espontânea; por ter compartilhado conosco o sonho da medicina humana, livre, autônoma e universal.

Aos meus pais (Regina e Ubirajara) e irmãos (Ângelo e Alexandre) por jamais duvidarem de minha capacidade pessoal de realização.

A dor enerva a alma, torna-a mais temerosa, degenera-a... é o veneno da beleza.

Sir William Shakespeare

We wish to suggest a structure of the salt deoxyribonucleic acid (D.N.A.). *This structure has a novel features which have a considerable biological interest.*

Watson & Crick a

Três paixões simples, mas irresistivelmente fortes, governaram-me a vida: o anseio de amor, a busca incessante do conhecimento e a insuportável compaixão pelo sofrimento da humanidade. Tais paixões, como grandes vendavais, impeliram-me para aqui e acolá, em curso instável, por sobre profundo oceano de angústia, chegando às raias do desespero.

Bertrand Russell

AGREDECIMENTOS

À Deus pela inspiração continua.

Aos pacientes do Ambulatório de Artrite Reumatoide da Fundação Hospital Adriano Jorge, que compartilharam conosco na realização deste trabalho não apenas seu material genético, como também suas ricas experiências de vida e suas percepções sobre a Artrite Reumatoide como doença, bem mais complexas e profundas que os genes. As lembranças desta convivência permanecerão escritas em meu coração, pois me fazem levantar pela manhã às quartas-feiras de ambulatório, imaginando maneiras de tornar suas vidas um pouco melhor.

À Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos que me conduziu desde a iniciação científica até o doutoramento ao longo de dezessete anos, através dos caminhos do conhecimento, da amizade e da compreensão mútua.

À Profa. Dra. Aya Sadahiro, co-orientadora desta Tese, pelas incansáveis demonstrações de amizade, carinho e dedicação, parte mais que essencial na realização deste curso de doutoramento.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho que sempre acreditou em meu potencial de trabalho, sendo um dos responsáveis pela minha decisão pela Biotecnologia.

Ao Dr. Maurício Morishi Ogusku, conhecedor dos caminhos secretos da Biologia Molecular, pelas sugestões e ensinamentos.

À Profa. Dra. Júlia Ignez Salem por ceder e compartilhar seu valioso e produtivo espaço de trabalho com um desconhecido (eu). Sem isto, a realização desta Tese teria se tornado inviável.

Às alunas Leilian Amorim, Lívia Moura e Mariana Raposo, hoje médicas de futuro promissor cuja colaboração inestimável, com sacrifício muitas vezes sem medida de suas vidas pessoais, contribuíram solenemente para a realização e conclusão desta Tese.

À Profa. Maria do Socorro Albuquerque de Souza, coordenadora da Residência em Clínica Médica do Hospital Adriano Jorge e Chefe do Serviço de Reumatologia do mesmo hospital.

Como se vê, são mais felizes aqueles que decidem crescer espontaneamente na amizade e na fraternidade. Hoje sou mais rico por suas presenças em minha vida.

Obrigado.

RESUMO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta 1% da população geral, promovendo poliartrite e destruição articular com variados graus de incapacidade. Cerca de 60% dos fatores de risco da AR são relacionados a caracteres genéticos do indivíduo. Os polimorfismos funcionais dos genes *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T foram associados à AR e à Tuberculose em diversos estudos. O objetivo deste estudo foi analisar a influência do polimorfismo da região promotora do gene do Fator de Necrose Tumoral- α , *TNF* -308 G/A e do gene *PTPN22* 1858 C/T na Artrite Reumatoide (AR) e na Tuberculose pulmonar em indivíduos procedentes do Amazonas. Para isso, foram genotipados, pela técnica baseada em PCR-RFLP para o polimorfismo *TNF* 308 G/A (*TNF2*) e *PTPN22* 1858T, 545 indivíduos sendo 205 controles sem Artrite, 208 pacientes com Tuberculose e 132 portadores de AR. Não foi observado aumento da frequência dos alelos *TNF2* ou *PTPN22* 1858T em portadores de Artrite Reumatoide e Tuberculose em comparação aos controles ($p=0,218$; $p=0,376$, respectivamente). Foram identificados como fatores preditivos para manifestações sistêmicas da Artrite Reumatoide: o Fator Reumatoide positivo, a idade maior que 60 anos e o tempo de doença ($p=0001$). Quando os dados foram estratificados segundo as formas predominantemente articulares ou sistêmicas, o alelo *TNF2* esteve fortemente associado às formas sistêmicas ($p=0,001$; OR=4,75; Intervalo de confiança = 1,82 – 12,40), além de estar associado ao uso de imunobiológicos Anti-TNF ($p=0,021$; OR=2,93; Intervalo de confiança=1,15 – 7,49). O alelo *PTPN22* 1858T também está associado ao uso de imunobiológicos ($p=0,021$; OR= 4,39; Intervalo de Confiança=1,08 – 17,86), mas não está relacionado às formas sistêmicas ($p=0,071$; OR = 3,17; Intervalo de Confiança = 0,83 – 11,73). Entretanto, o polimorfismo de *PTPN22* 1858 C/T não foi associado à Artrite Reumatoide ou à Tuberculose Pulmonar. Estes resultados sugerem que o alelo *TNF2* está associado às formas mais graves da AR em indivíduos do Amazonas, mas não ao risco de desenvolver Artrite Reumatoide.

Palavras-Chave: Predisposição genética à doença; drogas Anti-TNF; artrite reumatoide; Tuberculose; *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T.

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is a autoimmune disease that affects 1% of worldwide population and promotes polyarthritis and joint destruction with work disability. About 60% of the risk factors of RA are related to genetic characteristics of individuals. The functional polymorphisms of the *TNF* gene -308 G/A and *PTPN22* 1858 C/T were associated with RA in several studies. The aim of this study was to investigate the influence of the *TNF* 308 G/A polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor- α gene and *PTPN22* 1858 C/T on rheumatoid arthritis and tuberculosis patients from the Brazilian Amazon. A total of 545 individuals — 205 healthy controls without arthritis and 132 individuals suffering from rheumatoid arthritis and 208 tuberculosis patients — were genotyped for these polymorphisms using a methodology based on PCR-RFLP. Rheumatoid factor, age more than 60 years old and more than 10 disease years, was found to be risk factors for systemic disease ($p=0,0001$). The frequency of the A allele (*TNF2*) in rheumatoid arthritis sufferers was not found to be significantly higher than in the controls ($p=0.671$; OR=1.16; confidence interval=0.59 – 2.25). However, using a logistic regression model when the patients were stratified according to whether the manifestations were preponderantly articular or systemic, there was a strong association between the *TNF2* allele and the systemic disease ($p=0.001$; OR=4.75; confidence interval=1.82 – 12.40) as well as the use of anti-TNF immunotherapy ($p=0.021$; OR 2.93; confidence interval=1.15 – 7.46). On the other hand, *PTPN22* 1858T allele was not associated with systemic disease ($p=0,071$; OR=3,17; confidence interval=0.83 – 11.73), but we found association between this allele and biologic anti-TNF immunotherapy ($p=0,021$; OR=4.39; confidence interval=1.08 – 17.86). Moreover, there was found no association between *PTPN22* 15858 C/T and rheumatoid arthritis nor tuberculosis. These results suggest that the *TNF2* allele is associated with the more serious forms of the disease in individuals from the Brazilian Amazon but not with a risk for developing RA.

Keywords: Genetic predisposition to disease; anti-TNF drugs; rheumatoid arthritis; tuberculosis; *TNF* -308 G/A and *PTPN22* 1858 C/T.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. São Pedro e São João – A Cura de um Aleijado	20
Figura 2. Artrite Reumatoide Precoce.....	24
Figura 3. Deformidades Articulares na Artrite Reumatoide Avançada.....	25
Figura 4. Manifestações Sistêmicas na Artrite Reumatoide	26
Figura 5. Radiologia da Artrite Reumatoide	26
Figura 6. Fatores de Risco para Artrite Reumatoide	31
Figura 7. Influencia da Mortalidade por Tuberculose sobre Artrite Reumatoide	32
Figura 8. O Epítopo Compartilhado	36
Figura 9. Fatores de Risco Genéticos para Artrite Reumatoide	38
Figura 10. Estrutura Tridimensional da Lyp	39
Figura 11. Isoformas de Transcritos Gênicos do Gene <i>PTPN22</i>	40
Figura 12. Estrutura Tridimensional do Complexo Lyp-Csk	40
Figura 13. Estrutura Tridimensional do TNF	42
Figura 14. Diagrama Esquemático da Região 6p21.3, Cromossomo 6.....	43
Figura 15. Sequência de Nucleotídeos do Promotor Proximal do Gene <i>TNF</i> Humano	44
Figura 16. Aparato de Transcrição do Gene <i>TNF</i> Humano	45
Figura 17. Região Distal do Promotor do Gene <i>TNF</i> Humano	47
Figura 18. O Conceito do Desequilíbrio de Citocinas	51
Figura 19. Atividades Biológicas Relevantes TNF na Artrite Reumatoide	52
Figura 20. Diferenciação das Células Th17 e sua Influência na Artrite Reumatoide	53
Figura 21. Gel de Agarose à 2% RFLP do Polimorfismo <i>TNF</i> -308 G/A	64
Figura 22. Gel de Agarose à 2% RFLP do Polimorfismo <i>PTPN22</i> 1858 C/T	65
Gráfico 1. Probabilidade de Doença Sistêmica com Polimorfismo <i>TNF</i> -308 G/A	82

Gráfico 2. Curva ROC para Modelos da Tabela 13	83
Gráfico 3. Curva ROC para o Modelo 2	83

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1.	Novos Critérios de Classificação ACR/EULAR 2010 para Artrite Reumatoide	30
Quadro 2.	Protocolos de Amplificação dos Polimorfismos <i>TNF</i> -308 G/A	61
Quadro 3.	Análise de Fragmentos de Restrição <i>TNF</i> -308 G/A	61
Quadro 4.	Protocolos de Amplificação dos Polimorfismos <i>PTPN22</i> 1858 C/T	62
Quadro 5.	Análise de Fragmentos de Restrição <i>TNF</i> -308 G/A	62
Tabela 1.	Características Clínicas e Epidemiológicas de 132 Pacientes de Artrite Reumatoide no Ambulatório de Artrite Reumatoide – Amazonas	66
Tabela 2.	Manifestações Sistêmicas Observadas em 132 pacientes com Artrite Reumatoide no Amazonas	69
Tabela 3.	Informações Previdenciárias entre 132 pacientes de Artrite Reumatoide	69
Tabela 4.	Frequência de Alelos dos Polimorfismos <i>TNF</i> e <i>PTPN22</i> em Pacientes com Artrite Reumatoide, Tuberculose e Controles	72
Tabela 5.	Distribuição dos Genótipos do Polimorfismo <i>TNF</i> -308 G/A e <i>PTPN22</i> 1858 C/T em Populações Diferentes	70
Tabela 6.	Distribuição de Alelos do polimorfismo <i>TNF</i> -308 G/A em 131 pacientes de Artrite Reumatoide com Manifestações Sistêmicas em uso de Imunobiológicos	73
Tabela 7.	Distribuição de Alelos do polimorfismo <i>PTPN22</i> 1858 C/T em 131 pacientes de Artrite Reumatoide com Manifestações Sistêmicas em uso de Imunobiológicos	77
Tabela 8.	Frequência dos Polimorfismos <i>TNF</i> -308 G/A e <i>PTPN22</i> 1858 C/T em 131 pacientes de Artrite Reumatoide com Manifestações Sistêmicas e em 208 pacientes Tuberculose	78
Tabela 9.	Fatores de Risco Associados com Manifestações Sistêmicas da Artrite Reumatoide em 131 Pacientes no Amazonas	78
Tabela 10.	Regressão Logística para Fatores de Associados ao Risco de Manifestações Sistêmicas da Artrite Reumatoide e o Alelo <i>TNF</i> -308 G/A	80
Tabela 11.	Regressão Logística para Fatores de Associado ao Risco de Manifestações Sistêmicas da Artrite Reumatoide e o Alelo <i>PTPN22</i> 1858 C/T	80

LISTA DE ABREVIATURAS

5'-UTR	"5'- Region Untranslated"
ACR	"American College of Rheumatology"
Anti-CCP	Anticorpo Anti-Peptídeo Citrulinado Cíclico
Anti-TNF	Terapêuticas Anti-fator de Necrose Tumoral
AR	Artrite Reumatoide
Arg	Aminoácido Arginina
AUC	Area Under Curve
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
CCR6	Gene " <i>Chemokine (C-C motif) receptor 6</i> "
CRE	Elemento de Resposta ao AMP-cíclico
Csk	Proteína Csk
CTAB	"Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide"
CTLA-4	Gene " <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i> "
DAS28	Escore de Atividade de Doença de 28 juntas doloridas e edemaciadas
DD	Duração da Doença
DMARDS	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DTAB	"Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide"
EBV	Epstein Barr Virus
EULAR	"The European League Against Rheumatism"
FR	Fator Reumatoide
HAQ	"Health Assessment Quality"
HLA	Antígeno Leucocitário Humano ou Human Leukocyte Antigen
HLA-DRB1	Gene "Major Histocompatibility Complex, Class II, DR beta 1"
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ID	Idade no Diagnóstico
Lck	Proteína - Lck
LTα	Linfotoxina alfa
LTβ	Linfotoxina beta
Lyp	"Tyrosine-protein Phosphatase non-receptor Type 22, Isoform 1"
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade ou "Major

	Histocompatibility Complex”
NFAT	Fator Nuclear de Célula T ativada
NF-kB	Fator Nuclear kB
nt	Nucleotídeos
OR	Odds Ratio
PADI4	Gene “ <i>Peptidildeiminase 4</i> ”
PCR	“Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia de Polimerase
PC-R	Proteína C Reativa
PTPN22	Gene “ <i>Protein Tyrosin Phosphatase non-Receptor 22</i> ”
QUALY	“Quality-Adjusted Life Year”
RANK	Gene “ <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 11a, NF-kB activator</i> ”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único ou “Single Nucleotide Polymorphism”
Sp1	Proteína Sp1 – Complexo de Transcrição TNF
STAT-4	Gene “ <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 4</i> ”
SvdH	Índice de Sharp/van der Heijde
TAGAP	Gene “ <i>T-cell activation RhoGTPase activating protein</i> ”
TB	Tuberculose
TCR	T-Cell Receptor
TNF	Gene <i>Fator de Necrose Tumoral</i>
TNF1	Alelo G do SNP -308 G/A do gene <i>TNF</i>
TNF2	Alelo A do SNP -308 G/A do gene <i>TNF</i>
TNFAIP3	Gene “ <i>Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3</i> ”
TNFR1	Gene “ <i>Tumor Necrosis Factor Receptor superfamily, member 1A</i> ”
TNFR1	Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1
TNFR2	Gene “ <i>Tumor Necrosis Factor Receptor superfamily, member 1B</i> ”
TNFR2	Receptor do Fator de Necrose Tumoral 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TRAF1-C5	Gene “ <i>TNF receptor-associated factor 1</i> ”
Tryp	Aminoácido triptofano
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
Zap70	Proteína - “Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa”

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1 Geoepidemiologia da Artrite Reumatoide	18
1.2 Aspectos Clínicos e Socioeconômicos da Artrite Reumatoide	22
1.3 Fatores de Risco	30
1.4 Influências da Tuberculose na Geoepidemiologia da Artrite Reumatoide	32
1.5 Genética da Artrite Reumatoide	34
1.6 O Gene <i>PTPN22</i> e a Artrite Reumatoide	38
1.7 O Gene <i>TNF</i> e a Artrite Reumatoide	41
1.8 Papel do TNF na Imunopatogênese da Artrite Reumatoide	50
2. OBJETIVOS	54
2.1 Gerais	54
2.2 Específicos.....	54
3. METODOLOGIA	55
3.1 Modelo de Estudo.....	55
3.2 Informações Éticas.....	55
3.3 Universo de Estudo	55
3.3.1 População de Estudo	55
3.3.2 Participantes	55
3.3.3 Critérios de Elegibilidade	56
3.3.4 Amostragem	55
3.4 Detalhamento dos Procedimentos	57
3.4.1 Obtenção de Informações de Pacientes com Artrite Reumatoide....	57
3.4.2 Obtenção de Informações de Pacientes de Tuberculose	59
3.4.3 Recrutamento de Indivíduos Controles	59
3.4.4 Coleta e Extração de DNA Genômico	59
3.4.5 Genotipagem para o Polimorfismo <i>TNF</i> -308G/A por PCR-RFLP	60
3.4.6 Genotipagem para o Polimorfismo <i>PTPN22</i> 1858C/T por PCR RFLP ..	61
3.5 Análise Estatística	62
3.5.1 Frequências Alélicas e Genotípicas	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICES	110
ANEXOS	139

INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) foi descrita pela primeira vez pelo médico francês Augustin Landrè-Beuvais em 1800 como uma variante clínica da artrite gotosa crônica (SNORRASON, 1952; LANDRE-BEAUVAIS, 2001). Trata-se de uma doença inflamatória crônica e autoimune que afeta aproximadamente 1% da população geral, estando associada a um alto índice de incapacidade para o trabalho e para atividades da vida diária (ALAMANOS; DROSOS, 2005; ALAMANOS et al., 2006; TOBON et al., 2010).

Clinicamente, a AR promove inflamação e proliferação da membrana sinovial articular com edema, dor e rubor das articulações (poliartrite) e, quando não tratada, leva a destruição e anquilose das articulações (CARVALHO et al., 2008). Por outro lado, a AR está associada à alta morbimortalidade cardiovascular (SOLOMON et al., 2010) em pessoas com longo tempo de doença e altos custos de tratamento (KOBELT; JONSSON, 2008; KOBELT, 2009). No Brasil, acredita-se que acometa cerca de 0,2 a 1% (CARVALHO et al., 2008) da população brasileira e foi observado que a doença também tem altos custos de tratamento no país (CHERMONT et al., 2008; DE AZEVEDO et al., 2008).

A etiopatogenia da AR não é completamente entendida, mas sabe-se que afeta mais mulheres que homens em idade produtiva e tem uma forte associação com o tabagismo (BANG et al., 2010). Entretanto, a AR também tem um vínculo genético forte, acreditando-se que cerca de 30 a 60% do risco para AR seja de caráter genético. Nos indivíduos portadores de *HLA-DRB1* com alelos do epítipo compartilhado o risco de desenvolver a doença é de 7 a 14 vezes maior (HOLOSHITZ, 2010; ISAACS, 2010).

A interação dos caracteres genéticos do indivíduo com fatores ambientais é um passo fundamental para quebra dos mecanismos de autotolerância. Alguma atividade autoimune,

como a produção de autoanticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico (Anti-CCP), pode preceder em muitos anos os sintomas clínicos (DEANE et al., 2010). Uma vez iniciado o processo inflamatório sinovial, progressivamente a membrana sinovial torna-se hiperplásica, infiltrando os tecidos ósseos, cartilagenosos articulares e periarticulares, levando a erosão e destruição destes tecidos. No líquido sinovial de pacientes com AR várias citocinas podem ser identificadas, inclusive àquelas anti-inflamatórias e reguladoras, porém o efeito dominante é uma alta atividade inflamatória (FIRESTEIN, 2003; IMBODEN, 2009; TAYLOR et al., 2010).

As doenças autoimunes, assim como várias outras doenças, emergem a partir de interações ambientais com fatores genéticos e epigenéticos, que resultam em perturbações das complexas redes de interação imunobiológicas do corpo (PASCUAL et al., 2010). A pesquisa em genética destas doenças, incluindo a AR, possibilita conhecer melhor seus riscos genéticos. Além disso, quando um gene de risco é identificado, pode suscitar novos *insights* na imunopatogenia destas doenças e, a partir disso, estabelecer novos alvos moleculares para futuros tratamentos. Até o presente, os estudos em genética da AR identificaram alelos que contribuem com cerca de 15 a 20% de toda a carga genética da doença (PLENGE; RAYCHAUDHURI, 2010).

O *loci* do *HLA*, situado no braço curto do cromossomo 6 (região 6p21), uma região altamente polimórfica do genoma humano, encontram-se genes de forte associação com AR. Entre eles o *HLA-DRB1*, o *TNFAIP3*, *TAGAP*, *CCR6*, entre outros (PLENGE; RAYCHAUDHURI, 2010). Situado na mesma região, está o gene *TNF* que apresenta diversos polimorfismos. O SNP *TNF* -308G/A envolve a substituição de guanina (G) por adenina (A), produzindo os alelos *TNF1* (G) e o *TNF2* (A). O alelo *TNF2* esteve associado com aumento da transcrição do gene *TNF- α* , conseqüentemente maior reação inflamatória (HAJEER;

HUTCHINSON, 2001; MENGES, THILO et al., 2008; KARIMI et al., 2009). Por outro lado, diversos estudos associaram este polimorfismo à Artrite Reumatoide (CVETKOVIC et al., 2002; MUGNIER et al., 2003; BALOG et al., 2004; PAWLIK et al., 2005; SCHIATTINO et al., 2005; REZAIEYAZDI et al., 2007; VINASCO et al., 2008; URSUM et al., 2010).

O polimorfismo do gene de uma proteína chamada *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (PTPN22)*, também conhecida como Lyp, comum em tecidos linfoides foi associado a várias condições autoimunes, inclusive a AR (BOTTINI et al., 2004; OROZCO; BARTON, 2010). Este polimorfismo ganhou notoriedade porque está situado fora do *loci* do *HLA* e os estudos de associação genética em doenças autoimunes puderam ser reproduzidos em várias populações (RAYCHAUDHURI, 2010).

O polimorfismo resulta da substituição de uma citosina por uma timina na posição 1858 do gene *PTPN22*, com substituição de uma arginina por triptofano na posição 620 da proteína. Atualmente, sabe-se que esta modificação resulta em um ganho de função, com uma Lyp de maior atividade inibidora sobre sinalização do linfócito T. Não se sabe ao certo qual a relação deste ganho de função com a imunopatogenia das doenças autoimunes, mas acredita-se que promova falha na deleção de células T autorreativas, como também por induzir atividade reguladora de células T insuficiente (TONKS, 2006).

No Brasil e, sobretudo na Amazônia, são escassos os estudos com genética da AR. De um modo geral os aspectos genéticos, epidemiológicos e clínicos da AR são bem conhecidos em populações caucasianas da América do Norte e Europa, ou ainda, em algumas populações asiáticas (ALAMANOS et al., 2006). Entretanto, a formação sociocultural e genética da população brasileira é muito diversa segundo as regiões do Brasil, com influências africanas, europeias e indígenas (CALLEGARI-JACQUES et al., 2003). Deve-se considerar ainda que coortes brasileiras e sul-americanas de pacientes com AR revelam

algumas diferenças com perfis clínicos publicados na literatura (MOTA et al., 2010). Portanto, é de importância a pesquisa clínica e imunogenética da AR na Região Amazônica a fim de determinar o seu perfil de doença na região, bem como as eventuais diferenças e particularidades regionais.

O polimorfismo *PTPN22* 1858 C/T, por exemplo, tem influência genética forte nos europeus, onde a frequência do alelo mutante é alta, mas estes achados não se reproduzem em regiões onde frequência do alelo é mais baixa (KOCHI, YUTA et al., 2010). Um estudo brasileiro demonstrou diferenças de haplótipos do *PTPN22* na América Latina (incluindo Brasil) e populações europeias (LINS et al., 2010).

Achados semelhantes, para variação populacional na frequência de polimorfismos genéticos, foram identificadas revelando grandes diferenças regionais para genes de citocinas (incluindo o *TNF* -308G/A) quando foram comparadas populações do Sul e Sudeste do Brasil com a região Nordeste (VISENTAINER et al., 2008). Estes estudos destacam que geneticamente a AR pode apresentar variações regionais e, mesmo dados de estudos brasileiros, não devem ser generalizados para a Região Amazônica.

Cabe ainda considerar a opinião de Mobley (2004). Este autor sugeriu que AR pode ter emergido por pressão seletiva em regiões onde a mortalidade por tuberculose (TB) foi reconhecidamente elevada. Para Mobley (2004) os mecanismos imunogenéticos de resistência à TB são comuns a eventos inflamatórios da AR, como a ativação de macrófagos, secreção de citocinas e de óxido nítrico.

Assim, analisando regiões onde a mortalidade por TB foi elevada entre 1780 e 1900, ele observou que há coincidência destas áreas com uma alta prevalência de AR nestas populações. Correa et al. (2005a) estudando pacientes com tuberculose e doenças autoimunes, encontraram genes (polimorfismo *TNF* -308G/A) de resistência para TB como

fatores de suscetibilidade para AR. Sabe-se que a Amazônia apresenta alta incidência e prevalência de tuberculose (MARREIRO et al., 2009; SOUZA; PINHEIRO, 2010), mas não foram encontrados trabalhos científicos, na área de imunogenética, envolvendo as duas doenças na Região da Amazônia Brasileira.

Neste contexto, no presente estudo foi investigada a influência dos polimorfismos dos genes *TNF* e *PTPN22* sobre a suscetibilidade à Artrite Reumatoide e à Tuberculose no Amazonas, bem como suas influências sobre os aspectos clínicos da AR na população selecionada.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Geoepidemiologia da Artrite Reumatoide

As doenças autoimunes são definidas como condições patológicas nas quais o sistema imune perde os mecanismos de tolerância para os antígenos próprios (MURPHY et al., 2008). Essas doenças são muito variadas quanto às manifestações clínicas, podendo acometer quaisquer órgãos ou sistemas.

Atualmente as doenças autoimunes representam importante causa de morbimortalidade entre adultos jovens e mulheres com menos de 65 anos e afetam cerca de 3% a 10% da população (SHAPIRA et al., 2010a; b; YOUINOU et al., 2010). COOPER e STROEHLA (2003) estimam que 60 a 90% das doenças autoimunes acometem o sexo feminino, sendo a Artrite Reumatoide uma das doenças autoimunes mais prevalentes em adultos. As doenças reumáticas estão entre as três doenças crônicas mais prevalentes no Brasil (BARROS et al., 2006).

A Artrite Reumatoide (AR) é uma poliartropatia inflamatória crônica, de caráter autoimune, que promove inflamação e proliferação da membrana sinovial, produzindo destruição articular. A sua primeira descrição foi atribuída ao clínico francês Augustin J. Landrè-Beauvais, em 1800. Landrè-Beauvais descreveu uma forma *diferente* da Artrite Gotosa, que denominou *Gota Astênica Crônica* (ou Gota Reumática Astênica) em sua tese de doutoramento, mais tarde conhecida como Artrite Reumatoide ou Doença Reumatoide (SNORRASON, 1952; LANDRE-BEAUVAIS, 2001; KAISER, 2004).

Ele observou mulheres internadas no asilo do Hospital de Paris, que apresentavam uma forma de doença crônica que afetava várias articulações simultaneamente e não produziam tofo gotoso. A Gota Astênica Crônica foi classificada como uma variante da artrite

gotosa crônica, na qual as deformidades decorriam do amolecimento e supuração das articulações acometidas. Entretanto, a expressão “Artrite Reumatoide” somente foi proposta anos mais tarde por Alfred Barin Garrod em 1859 (GARROD, 1859).

Embora tenha sido descrita somente no século XIX, não se sabe ao certo quando surgiu a AR. APPELBOOM et al. (1981) realizaram interessante estudo iconográfico da obra do genial pintor antuerpiano Paul Rubens (1557-1640). Nas últimas décadas de sua vida, Rubens sofria com poliartrite das mãos, numa forma muito semelhante a AR, tendo pintado diversos quadros cujos personagens têm notório edema de pequenas articulações das mãos. Appelboom (2005) sugeriu que o pintor pode ter representado em suas pinturas no século XVI os aspectos articulares da sua própria doença.

O motivo pelo qual a AR somente foi representada nas pinturas europeias a partir do século XVI e descrita no século XIX não está claro (Figura 1). Autores que estudaram múmias de índios norte-americanos entre 1200 e 4500 anos de idade, encontraram erosões peri e poliarticulares compatíveis com AR (ROTHSCHILD; WOODS, 1990b).

Foram encontradas múmias egípcias com 3000 anos de idade, que apresentavam sinais ósseos de Espondilite Anquilosante, com artrite periférica (ROGERS et al., 1985), mas não foi possível encontrar no Velho Mundo evidências de AR antes dos séculos XVI e XVIII. Esses achados levaram os pesquisadores a propor que algum agente biológico, envolvido na imunopatogênese da AR, tenha sido levado das Américas ao Velho Mundo.

Os dados arqueológicos revisados sugerem que entre 6500 e 1000 anos atrás, a AR estava restrita a uma pequena região geograficamente isolada da América do Norte. Existe, portanto, a possibilidade de um ou mais agentes biológicos ainda desconhecidos, que interagiram geneticamente com outras populações, terem sido levados ao Velho Mundo a partir das Américas após a sua colonização pelos europeus (ROTHSCHILD; WOODS, 1990a;

ROTHSCHILD et al., 1992).



Figura 1. São Pedro e São João – A cura de um aleijado. Gravura em cobre de Albrecht Dürer, datado de 1513.

Fonte: Hochberg et al. (2007).

Fato é que em menos de 1000 anos, a AR atingiu a prevalência mundial de 1% da *população geral*, para uma doença que foi somente observada há cerca de 6500 anos na América do Norte, e no Velho Mundo depois do século XVI (ALAMANOS; DROSOS, 2005).

Há grande variação geográfica na sua prevalência em diferentes regiões do Mundo, que segundo Alamanos e Drosos (2005) essa variação ocorre entre 0,5% a 1,1% em regiões do Norte da Europa, enquanto no Sul da Europa está entre 0,3 a 0,7%. Na América do Norte a prevalência varia entre 0,9 a 1,1%, porém atinge 5,3 a 6,8% em nativos norte-americanos (Indíos Pima – Arizona).

Considerando os critérios de classificação da AR do Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology – ACR*), proposto por Arnett *et al.* (2009),

Alamanos *et al.* (2006) estimaram que a incidência da AR é maior no Norte da Europa (em média 16,5 casos/10.000 habitantes/ano) e em países da América do Norte (38 casos/10.000 habitantes/ano), sendo menor no Sul da Europa (8,5 casos/10.000 habitantes/ano). Segundo esses autores, a prevalência da doença também é maior na América do Norte (10,7 casos/1000 habitantes) e menor no Sul da Europa (3,3 casos/1000 habitantes) e em Países em desenvolvimento (3,5 casos/1000 habitantes). A incidência da AR nos países em desenvolvimento é desconhecida (TOBON *et al.*, 2010).

Foi proposto ainda que, a maior prevalência e incidência de AR no norte da Europa, estejam relacionadas a fatores genéticos, pois dois terços de norte-europeus são portadores de HLA de suscetibilidade para AR. Além disso, fatores ambientais e dietéticos típicos da região mediterrânea do sul da Europa como o consumo de peixe, azeite de oliva e vinho são fatores de proteção contra AR para estas populações (CLELAND *et al.*, 2003; ALAMANOS *et al.*, 2006).

Na América do Sul, considerando Brasil e Argentina, a prevalência da AR varia entre 0,2 e 0,46% (SPINDLER *et al.*, 2002; SENNA *et al.*, 2004). Os achados dos estudos com metodologia COPCORD (*Community Oriented Program for the Control of the Rheumatic Diseases*), realizado em países em desenvolvimento, são compatíveis com a baixa prevalência da AR nestas regiões. Usando esta metodologia, Senna *et al.* (2004) encontraram prevalência de 0,46% para AR no Brasil, correspondendo ao total de 6,4% de todas as doenças reumáticas estudadas, com média de idade em torno de 53,4 anos.

Entretanto, um estudo multicêntrico realizado no Brasil propôs que prevalência da AR esteja entre 0,2 e 1% da população (MARQUES NETO *et al.*, 1993), estimando-se que existam 900.000 brasileiros com Artrite Reumatoide (MARQUES, 2005). Não foram encontrados estudos epidemiológicos amplos para Região Norte do Brasil, embora o

trabalho de Marques-Neto *et al.* (1993) tenha incluído a cidade de Belém, mostrando uma prevalência de 1% da AR nesta cidade.

Atualmente, há evidências que tanto a incidência como a prevalência da AR tem decaído durante os anos, mostrando ainda um deslocamento na faixa etária de início da doença para pessoas de mais idade, sendo este último fenômeno mais pronunciado no sexo feminino. Curiosamente, em algumas regiões do mundo há uma variação cíclica na incidência da doença (TOBON *et al.*, 2010).

A mortalidade de pacientes com AR é maior que na população geral e a expectativa de vida está reduzida de 3 a 10 anos (TOBON *et al.*, 2010). Segundo, Gabriel *et al.* (2003) o risco relativo de morte em portadores de AR é 1,27 vezes maior comparativamente à população normal, sendo maior para mulheres (1,47) que homens (1,08). Ainda segundo Gabriel *et al.* (2003), pacientes com manifestações extra-articulares (sistêmicas), bem como doença poliarticular severa, tem risco relativo de morte quatro vezes maior.

Entre as causas de morte em paciente com AR, destacam-se as cardiovasculares, particularmente a doença coronária. Acredita-se que este fenômeno esteja relacionado a fatores de risco cardiovasculares típicos como hipertensão, tabagismo, obesidade e dislipidemia, presentes também nos artríticos. Entretanto, na AR o fenômeno da aterogênese está acelerado, tendo-se demonstrado que o processo inflamatório subjacente na AR pode colaborar tanto para a formação como ruptura das placas ateroscleróticas (VAN DOORNUM *et al.*, 2002; TORIGOE; LAURINDO, 2006; GERLI *et al.*, 2007; MONTECUCCO; MACH, 2009; OZBALKAN *et al.*, 2010; RHO *et al.*, 2010).

1.2. Aspectos Clínicos e Socioeconômicos da Artrite Reumatoide

A inflamação da membrana sinovial com proliferação celular, secreção de citocinas e

metaloproteinases, resultando em um tecido hiper celular denominado *pannus* que invade as regiões articulares e periarticulares, determina erosão óssea e cartilaginosa em um processo contínuo de destruição articular. Este envolvimento das articulações é em geral poliarticular acometendo, sobretudo, as pequenas articulações das mãos e dos pés, além de grandes articulações como ombros, joelhos e quadril, determinando um padrão clínico relativamente frequente na AR: *uma poliartrite simétrica de pequenas e grandes articulações*.

De modo semelhante, a doença afeta a membrana sinovial que envolve os tendões e leva ao seu encurtamento e ruptura. Em conjunto, estes fenômenos resultarão nas deformidades típicas da AR nas pequenas articulações das mãos e dos pés (dedo em botoeira e em pescoço de cisne, desvio ulnar dos dedos, polegar em Z, síndrome da cabeça da ulna, etc. – Figura 2, 3, 4 e 5), além da perda de mobilidade e anquilose articular (CARVALHO et al., 2008).

Após o início dos fenômenos inflamatórios, o paciente pode experimentar fadiga, sensação de febre, mal estar geral e a rigidez matinal: uma sensação de rigidez e dolorimento articular que pode persistir horas após o despertar. A AR também pode afetar os órgãos e sistemas em âmbito extra-articular como pulmões, levando a inflamação e fibrose, as glândulas exócrinas deixando os olhos e a boca secos (síndrome de Sjögren), os nervos periféricos, coração, os vasos sanguíneos da pele e de órgãos (vasculites). Alguns destes fenômenos sistêmicos incluem a osteoporose, a anemia e a fadiga (TURESSON; MATTESON, 2009).

Em pouco tempo, a dor e a inflamação tornam-se fenômenos tão recalcitrantes, torturantes e persistentes que acompanhados de deformidades irreversíveis, incapacidade para realizar pequenas atividades da vida diária e laborativa, transformam a AR em uma doença devastadora para a vida pessoal e social do paciente (ISAACS, 2010). Nenhuma

expressão poderia descrever a vida destas pessoas de forma tão poética e sinistra, quanto o pensamento do dramaturgo inglês Willian Shakespeare: - “A dor enerva a alma, torna-a mais temerosa, degenera-a... é o *veneno da beleza*”.

Foi observado que expectativa de vida na AR está reduzida em 3 a 10 anos em relação à média de vida da população (TOBON et al., 2010). Portanto, se considerarmos a idade média de 45 anos (idade produtiva) para o início da doença e uma expectativa de vida de 70 anos, um paciente de AR estará sujeito a viver cerca de 25 anos com algum grau de incapacidade física e baixa qualidade de vida, que decai ao longo dos anos de doença, aumentando os custos com a AR (diretos, indiretos e custos intangíveis) (KOBELT, 2009).



Figura 2. Artrite Reumatoide precoce. A esquerda: a imagem ilustra atrofia da musculatura interóssea edema das articulações interfalangeanas proximais (seta) típicas da AR. Em geral estes sinais estão associados à rigidez matinal, fadiga, redução da força de prensão e dolorimento das articulações afetadas. A direita: Tenossinovite acentuada dos estensores do punho.
Fonte: Hochberg et al. (2007).



Foto 1



Foto 2



Foto 3

Figura 3. Deformidades Articulares da Artrite Reumatoide. Foto 1: Subluxação do punho, atrofia interóssea, artrite de metacarpofalangeanas e tenossinovite. Foto 1: polegar em Z, subluxação das metacarpofalangeanas e desvio ulnar dos dedos. Foto 1: AR evidenciando dedos em botoeira, anquilose e nódulos reumatoides.

Fonte: Hochberg et al. (2007).



Figura 4. Manifestações sistêmicas da Artrite Reumatoide. Úlceras subcutâneas, necrose de pododáctilos caracterizando vasculite reumatoide. Notar a posição em extensão dos pés decorrente de anquilose dos tornozelos.

Fonte: Hochberg et al. (2007).

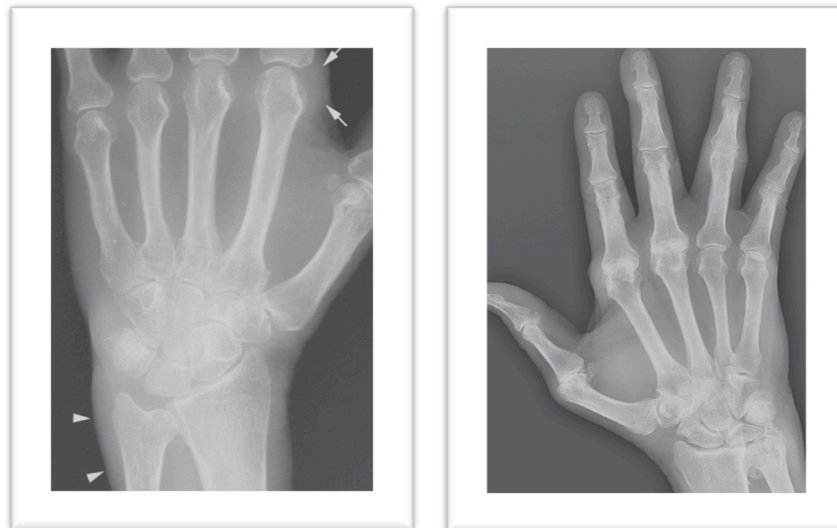


Figura 5. Radiologia da Artrite Reumatoide. À esquerda radiografia de mão e punho esquerdo na AR precoce mostrando redução de espaço articular pancarpal e aumento de partes moles (edema) de articulações metacarpofalangeanas (setas) e na região distal da ulna (pontas de seta). À direita, radiografia de mãos e punhos na AR avançada mostrando comprometimento do punho, metacarpofalangeanas e interfalangeanas proximais.

Fonte: Hochberg et al. (2007).

Estudos revelam que a qualidade de vida dos pacientes medida com índices da Organização Mundial de Saúde (OMS), tais como o QALY (*Quality-Adjusted Life Years*), corresponde a menos da metade da população normal e, esta diferença, tende a aumentar com os anos de doença (KOBELT, 2009). Quando a incapacidade funcional e qualidade de vida do paciente é medida pelo HAQ (*Health Assessment Quality*) (FRIES et al., 1980), cuja medida varia de zero (melhor) até três (pior), apenas 10% das pacientes com menos de sessenta anos e HAQ maior que 2,5 ainda estarão trabalhando (KOBELT et al., 2008).

Nestes pacientes o custo de tratamento pode atingir cerca de €18.000,00/paciente/ano (aproximadamente R\$ 54.000,00), considerando os custos diretos, indiretos e intangíveis. Os custos médios da AR foram estimados em vários países europeus em €13.000,00/paciente/ano e €21.000/paciente/ano nos Estados Unidos. Cerca de 35% destes custos em cuidados de saúde estavam associados aos medicamentos, 14% com custos não-médicos, 12% com perda de produtividade e 19% com cuidados informais (JÖNSSON et al., 2008).

Não há no Brasil estimativas amplas e atuais dos custos da AR, incluindo despesas médicas, custos relacionados a perdas de dias de trabalho e aposentadorias (CARVALHO et al., 2008). Ainda assim, estudos pioneiros que avaliaram os custos diretos (US\$ 403,04/paciente/ano) e indiretos (US\$ 2.427,04/paciente/ano) com AR consideraram altos para os padrões brasileiros (CHERMONT et al., 2008; DE AZEVEDO et al., 2008).

Tomando por base estes estudos, o custo total da AR no Brasil pode ser estimado em US\$ 2830,08/paciente/ano. Entretanto, nos estudos de Chermont *et al.* (2008) e De-Azevedo *et al.* (2008) não foram incluídas as despesas de tratamento com medicação imunobiológica, que elevam muitíssimo esses custos. Nesse sentido, dados não publicados obtidos no Ambulatório de AR da Fundação Hospital Adriano Jorge em Manaus, revelam que 38% dos

pacientes estão em uso de algum tipo de medicação imunobiológica, correspondendo a um gasto anual para o sistema público no Amazonas de R\$ 2.138.640,00 a 3.055.200,00/ano ou R\$15.960,00 a 22.800,00/paciente/ano, apenas com imunobiológicos.

O Centro Paulista de Economia da Saúde (CEPS) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) analisou dois cenários para estimativa dos custos com AR. No primeiro, 20% dos pacientes estariam recebendo tratamento no SUS. Nesse caso o custo seria de R\$ 92 milhões por ano, ou 0,2% do orçamento para uma única moléstia. Em outro cenário, o índice de pacientes recebendo tratamento chegaria a 70%. O custo, então, seria de R\$ 300 milhões anuais ou 0,63% do orçamento da saúde (MARQUES, 2005).

As medicações imunobiológicas são proteínas recombinantes capazes de bloquear seletivamente citocinas (por exemplo, anticorpos monoclonais Anti-TNF, Anti-IL-6, Anti-IL-1) ou receptores (por exemplo, anticorpos monoclonais Anti-CD20) envolvidos na resposta imune (O'DELL, 2004). O advento da terapia imunobiológica teve grande impacto no tratamento da AR, sobretudo para os pacientes que pouca resposta à terapia convencional (DMARDS), reduzindo atividade inflamatória da doença e deformidades articulares, aumentando qualidade de vida e criando novos paradigmas de tratamento e controle da doença (SMOLEN et al., 2010).

As drogas imunobiológicas, por outro lado, aumentaram muito os custos de tratamento. O estudo de Monteiro e Zanini (2008), analisou os custos de 48 meses de tratamento para AR, seguindo as Diretrizes Brasileiras de Tratamento da AR (BÉRTOLO et al., 2007). Monteiro e Zanini (2008) verificaram que, utilizando Modelagem de Decisões de Markov, o ciclo que representa o uso do methotrexate em monoterapia foi o mais custo/efetivo (R\$ 113.900,00 por paciente em 48 meses), seguido pelo paciente refratário (R\$ 1.554.483,43), aquele que utiliza a tripla terapia (três DMARDS) e depois o biológico (R\$

1.701.286,76), o paciente intolerante ao metotrexato (R\$ 2.629.919,14), e por fim o resultado daquele que iniciaria o tratamento já com o infliximabe (imunobiológico Anti-TNF) mais methotrexate (R\$ 9.292.879,31).

Com um impacto socioeconômico tão importante fica claro que a abordagem clínica, psicossocial e econômica da AR precisa ser otimizada, no sentido de reduzir o sofrimento, melhorar a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares, bem como reduzir seus custos de tratamento para a sociedade (ISAACS, 2010).

Há enorme melhoria do estado funcional dos pacientes, sua qualidade de vida, com redução do absenteísmo ao trabalho e aposentadorias, bem como nos custos diretos e indiretos ao longo prazo, quando o diagnóstico é precoce, com o uso das Drogas Modificadoras do Curso da Doença (DMARDs) para o controle rigoroso da atividade inflamatório da doença (SMOLEN; ALETAHA, 2008; FUNOVITS et al., 2010; SMOLEN et al., 2010). Está demonstrado que medicações como methotrexate, a leflunomida, os antimaláricos, azatioprina e imunobiológicos inibidores de citocinas, depletoras de células ou inibidores da coativação da célula T tem importante papel neste sentido (HOCHBERG et al., 2007; VAN VOLLENHOVEN, 2009).

O diagnóstico da AR é baseado nos sinais e sintomas clínicos característicos da doença, bem como em marcadores sorológicos como fator reumatoide e o Anti-CCP. Os achados radiológicos também são importantes, mas em geral denotam tempo de evolução maior que dois anos, estando a doença estabelecida e com algum grau de sequelas. Inicialmente, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) propôs em 1987 os critérios de classificação (revisados em 1988) e diagnóstico para AR (ARNETT et al., 1988).

Para serem aplicados estes critérios exigiam um tempo de evolução de doença maior que seis semanas, além de alterações radiológicas estabelecidas. Com a finalidade de

otimizar o diagnóstico da AR, bem como atingir as metas de tratamento e remissão precocemente (SMOLEN et al., 2010), Colégio Americano de Reumatologia e a Liga Européia de Combate ao Reumatismo (EULAR), publicaram em setembro deste ano os novos critérios de Classificação da AR (FUNOVITS et al., 2010), listados no Quadro 1.

Quadro 1. Novos Critérios ACR/EULAR de Classificação da Artrite Reumatoide (FUNOVITS et al., 2010).

Domínios	Pontos*
Envolvimento Articular	
1 articulação média-grande	1
2-10 articulações médias-grandes	2
4-10 articulações pequenas	3
> 10 articulações pequenas	5
Sorologia	
Fator Reumatoide e Anti-CCP Negativos	0
Fator Reumatoide e/ou Anti-CCP baixos títulos	2
Fator Reumatoide e/ou Anti-CCP altos títulos	3
Duração da Sinovite	
< 6 semanas	0
> 6 semanas	1
Provas Inflamatórias	
VHS e PCR normais	0
VHS e/ou PCR elevados	1

*Para o diagnóstico são necessários 6 pontos (AR estabelecida); Na presença de alterações radiológicas próprias o diagnóstico é de AR estabelecida.

1.3. Fatores de Risco

A etiologia da AR é complexa e permanece não esclarecida, mas há consenso na literatura que é uma doença multifatorial, sendo que condições ambientais, socioculturais, genéticas e agentes infecciosos (Figura 6), devem interagir de diferentes maneiras e intensidades de modo a favorecer o desenvolvimento da doença (ISAACS, 2010). Entre os fatores de risco sociais e culturais envolvidos, encontra-se o tabagismo, que influi tanto no desenvolvimento, quanto na sua evolução desfavorável (WILSON; GOLDSMITH, 1999; HARRISON, 2002; HARRISON et al., 2002; SUGIYAMA et al., 2010). O papel do tabagismo

parece estar associado à indução do fenômeno de citrulinização de proteínas nos pulmões, passo importante na imunopatogenia da AR (VITTECOQ et al., 2008). As dietas mediterrâneas ricas em peixes (óleo ômega-3) exercem influência protetora sobre o risco relativo de AR, bem como estão implicadas a um curso menos grave da doença (CLELAND et al., 2003). Os caracteres genéticos do indivíduo contribuem com cerca de 50 a 60% com o risco de desenvolver AR. A mais forte associação genética é o gene *HLADRB1* no complexo principal de histocompatibilidade (RAYCHAUDHURI, 2010). Outros fatores de risco também foram relacionados como urbanização, poluentes e alto peso ao nascer.

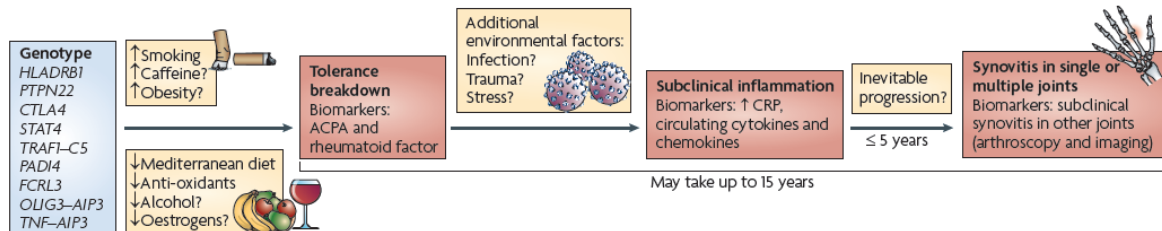


Figura 6. Fatores de risco e etiopatogenia da Artrite Reumatoide.

Fonte: Isaacs (2010).

A amamentação parece exercer efeito protetor sobre o risco de AR (TOBON et al., 2010). A nuliparidade também foi arrolada entre os fatores de risco (NELSON et al., 1993). Ainda é incerto se os contraceptivos orais constituem-se fatores de risco para AR (ROMIEU et al., 1989; SPECTOR; HOCHBERG, 1989; PLADEVALL-VILA et al., 1996).

Agentes infecciosos têm sido envolvidos no desencadeamento da doença, como gatilho imunológico, mas não existem evidências de que isoladamente sejam causadores da AR (ALAMANOS; DROSOS, 2005). Entre eles o mais estudado e com associação mais forte de risco é o vírus Epstein Barr (EBV). Tanto anticorpos anti-EBV como carga viral elevada em linfócitos do sangue periférico foram encontrados em pacientes com AR. O EBV também é encontrado no tecido sinovial de pacientes com AR (HOCHBERG et al., 2009). Além disso,

sequências peptídicas deimidadas do EBV são reconhecidas por anticorpos Anti-CCP, sugerido que o vírus pode exercer um papel na indução desses anticorpos (PRATESI et al., 2006).

1.4. Influências da Tuberculose na Geopidemiologia da Artrite Reumatoide

Mobley (2004) propôs que a variação geográfica na prevalência da AR na atualidade pode ter relação com a taxa de mortalidade por Tuberculose (TB), observando-se o período de 1750 a 1900 (Figura 7). Ele argumenta que em nativos norte-americanos em 1886 a mortalidade por TB atingia 9%, uma das maiores taxas já registradas para qualquer população. Atualmente a prevalência da AR entre nativos norte americanos atinge cerca 7%, enquanto norte americanos não-nativos e europeus tem prevalência de 0,5% a 1,5%. O autor refere ainda que, embora dados estatísticos de mortalidade por TB na Ásia neste período não estejam disponíveis, há relatos que indicam uma baixa mortalidade até o ano de 1800. Em países como Japão e China a prevalência de AR é menor que 0,3% (TOBON et al., 2010).

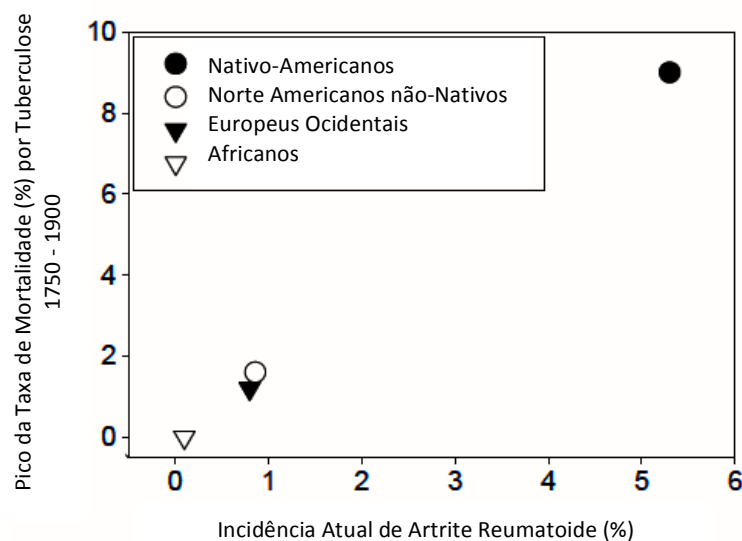


Figura 7. Correlação da Mortalidade por Tuberculose na Artrite Reumatoide.

Fonte: Mobley (2004).

Além disso, foi demonstrado que o alelo *TNF2* do polimorfismo *TNF* -308 está associado ao maior risco de autoimunidade, enquanto exerce efeito protetor contra TB (CORREA et al., 2004; CORREA et al., 2005b). Curiosamente, o alelo *TNF2* tem frequência maior em populações caucasianas em relação a outros grupos étnicos como latino-americanos, asiáticos e africanos. As estimativas de baixa prevalência e incidência da AR parecem coincidir com as populações onde a frequência do alelo *TNF2* é mais baixa (AGUILLON et al., 2006).

Por outro lado, o polimorfismo *PTPN22* 1858 C/T relacionado à autoimunidade (BOTTINI et al., 2004), foi identificado como fator de risco para TB (GOMEZ, L. M. et al., 2005; LAMSYAH et al., 2009). O gene *PTPN22* codifica uma proteína chama Lyp que exerce atividade inibitória nos linfócitos. O polimorfismo *PTPN22* 1858 C/T ocasiona um ganho de função na Lyp, o que pode se tornar uma desvantagem imunológica no combate às infecções como a TB e a brucelose (LYKOURAS et al., 2008; BRAVO et al., 2009).

Tomando estas informações em conjunto, torna-se razoável supor que, enquanto emerge nas populações afetadas pela TB a resistência genética à infecção, estas populações ficam suscetíveis às doenças inflamatórias e autoimunes como a AR (MOBLEY, 2004; CORREA et al., 2005a; AGUILLON et al., 2006; MOBLEY, 2006). Nesta linha de raciocínio, Rothschild et al. (2003) mostraram que a tuberculose era frequente em populações indígenas arcaicas na América do Norte, porém inexistente nas áreas de ocorrência da AR.

A TB está nas Américas antes da chegada dos europeus ao continente (MACKOWIAK et al., 2005). Entre 1895 e 1914, a TB era a terceira causa mais frequente de morte no Amazonas (SOUZA; PINHEIRO, 2010). O Estado do Amazonas tem a segunda maior incidência de TB (68 casos/100.000hab.), perdendo apenas para o Rio de Janeiro (86

casos/100.000hab.). Porém, a cidade de Manaus concentra 70% dos casos de TB no Estado e, quando considerada individualmente, apresenta a maior taxa de TB do Brasil com cerca de 107 casos/100.000 habitantes (MARREIRO et al., 2009). Contudo, não há informações atuais disponíveis de prevalência de AR no Amazonas para relacionar com papel da alta incidência de TB na mesma região.

1.5. Genética da Artrite Reumatoide

Após a divulgação da sequência completa de nucleotídeos do genoma humano (LANDER et al., 2001) e dos padrões de diversidade genética humana pelo Projeto HapMap, o qual procura consolidar um mapa dos haplótipos humanos (FRAZER et al., 2007), há a esperança de que o conhecimento sobre a genética possa influenciar o entendimento de doenças, bem como elevar a qualidade dos padrões de tratamento de pacientes.

Décadas de estudo sobre a AR ainda não decifraram completamente sua fisiopatologia (FIRESTEIN, 2003). Há crescente interesse nos aspectos genéticos e moleculares da AR. Primeiro, a ampla variação na sua incidência e prevalência para diferentes ambientes, características étnicas e regionais, faz supor a influência genética sobre os seus padrões clínicos (PLENGE, 2009c; PRATT et al., 2009; TAYLOR et al., 2010). Por outro lado, a contribuição genética para a susceptibilidade à doença vem sendo demonstrada nos estudos de agregação familiar e de concordância, nos quais a incidência é maior em gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos (AHO et al., 1986; SAAG et al., 1996).

Além disso, o conhecimento progressivo dos genes envolvidos com a fisiopatologia da AR, bem como sua gravidade e resposta individual ao tratamento, podem suscitar alternativas capazes de motivar o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, como

também marcadores moleculares de doença mais sofisticados, capazes de favorecer o diagnóstico rápido e preciso (PLENGE, 2009b).

Desde 1970 aproximadamente 20 loci de risco foram identificados para AR. O primeiro locus genético foi o Complexo Principal de Histocompatibilidade, notado a partir de experimentos com culturas mistas de linfócitos, quando foi observado que o subtipo DR4 era mais comum em pacientes com AR quando comparados com os controles (STASTNY, 1976). Posteriormente, a investigação da diversidade molecular das proteínas de Classe II (HLA-DR, DQ e DP) localizou o subtipo sorológico Dw4 no gene *HLA-DRB1* (GREGERSEN et al., 1986).

Quando o subtipo suscetível DR foi observado em grupo, os pesquisadores notaram uma sequência de aminoácidos compartilhados nas posições 70-74 da proteína HLA-DR. Esses resíduos formavam um sítio de ligação de peptídeos. Então formularam a hipótese que peptídeos específicos ligavam-se aos alelos de *HLA-DRB1* associados à AR, facilitando o desenvolvimento de células T autorreativas (GREGERSEN et al., 1987). Em conjunto estes alelos são conhecidos coletivamente como “epítipo compartilhado” e resultam numa sequência de aminoácidos na terceira região hipervariável da cadeia β do HLA: ⁷⁰Q/R-K/R-R-A-A⁷⁴.

Sendo assim, os alelos do *HLA-DRB1* codificam uma sequência de aminoácidos semelhantes situados na parede da α -hélice na fenda de ligação peptídica do HLA. Estudos cristalográficos do alelo *0401 mostram que a cadeia lateral da glutamina na posição 70 está fora da fenda de ligação peptídica e próxima ao Receptor de Célula T (TCR). Em contraste, cadeia lateral da Lisina 71 se estende para dentro da fenda de ligação (Figura 8) (IMBODEN, 2009).

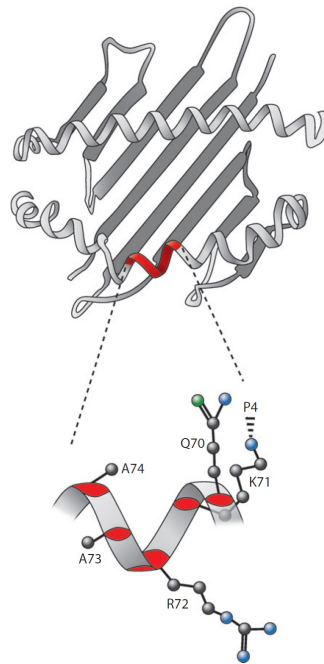


Figura 8. O Epítipo Compartilhado.

Fonte: Imboden (2008).

Ao nível do DNA os alelos de epítipo compartilhado mais comuns incluem *0101, *0401, *0404 em indivíduos de ancestralidade europeia, *0405 e *0901 em asiáticos. Alelos menos comuns incluem *0102, *0104, *0408, *0413, *0416, *1001 (PLENGE, 2009a). É digno de nota que os alelos clássicos do epítipo compartilhado podem não contribuir com risco de AR em populações afro-americanas ou hispano-americanas.

Na América do Sul, em chilenos os alelos mais comuns são semelhantes aos japoneses *0405 e *0901 (NEWTON et al., 2004). Em espanhóis e italianos *1001, em árabes *0301, na Coreia do Sul *0405 e no Brasil *0101 e *0102 (FARIAS; ANDRADE, 2007). Em brasileiros descendentes de europeus com AR estudados em São Paulo, os alelos de suscetibilidade envolvidos são *0101 e *0102, enquanto *0401 e *0404 estão relacionados à gravidade da doença (LOUZADA-JUNIOR et al., 2001). Em afro-brasileiros a associação encontrada foi *0404 e *0405 (FARIAS; ANDRADE, 2007).

Conforme revisado por Shastry (2006), 99,9% da sequência de DNA entre dois

indivíduos randomicamente selecionados é idêntica. Apenas 0,1% do genoma de duas pessoas é diferente. Essas pequenas variações são chamadas de polimorfismos e são devidas a mutações do genoma. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são as formas mais simples e comuns entre os tipos de polimorfismos, ocorrendo na frequência de 1 a cada 1000pb em todo o genoma, incluindo regiões promotoras, sequências codificadoras e íntrons (BROOKES, 1999; LIAO; LEE, 2010).

Os SNPs podem ser observados entre indivíduos de uma mesma população, podendo influenciar a atividade promotora e a estabilidade do mRNA. Com isto, os SNPs são implicados na participação direta ou indireta da expressão fenotípica. Alguns SNPs funcionalmente expressos podem ser fatores de susceptibilidade para muitas doenças, além de variações fenotípicas comuns como cor dos olhos, cabelos, etc. (AGUILLON et al., 2006).

Com novas ferramentas de investigação genômica, como os estudos *Genome Wide Association Studies* (GWAS), com a qual é possível analisar centenas de milhares de SNPs através do genoma, um enorme número de estudos de casos-e-controles tem sido realizados com grandes amostras (FEERO et al., 2010). Os GWASs identificaram mais de 20 alelos (Figura 9) de risco para AR e, coletivamente, esses alelos respondem por 15 a 20% de toda a carga genética da doença (PLENGE; RAYCHAUDHURI, 2010), entre eles alguns com associação muito forte como *PTPN22*, *STAT4*, *TRAF1-C5*, *CTLA4*, entre outros (Figura 9).

Os SNPs mais associados à AR são comuns, nos quais a forma rara de nucleotídeo está presente em mais de 5% da população. Em muitos casos o nucleotídeo alterado não é necessariamente o causador da doença por ele mesmo, porém estão próximos a outros genes dentro da mesma região e de alguma maneira estão relacionados à doença (PLENGE, 2009b; OROZCO; BARTON, 2010; RAYCHAUDHURI, 2010).

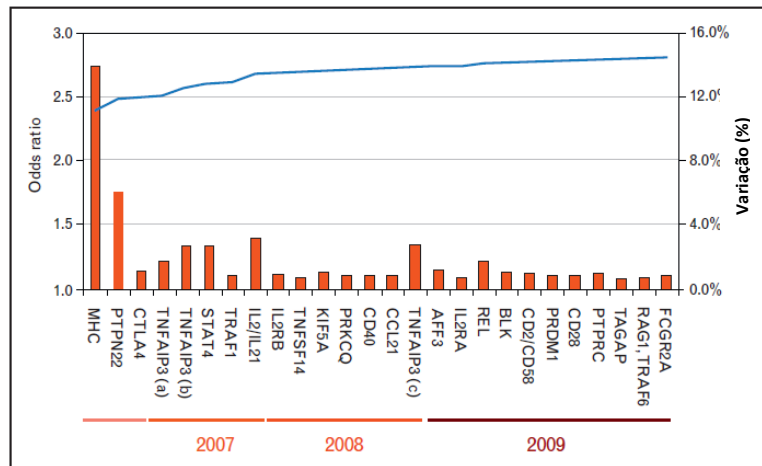


Figura 9. Distribuição dos 26 alelos de risco para AR em populações europeias.

Fonte: Raychaudhuri (2010).

1.6. O Gene *PTPN22* e a Artrite Reumatoide

Em 2004 o polimorfismo do gene *PTPN22* 1858 C/T foi associado pela primeira vez à autoimunidade em um estudo com desenho de casos-e-controles, no qual alelo mutante 1858T aumentou o risco para Diabetes Tipo 1 (BOTTINI et al., 2004). No mesmo ano, esse polimorfismo também foi associado à AR e ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (BEGOVICH et al., 2004; KYOGOKU et al., 2004).

Desde então, tornou-se o polimorfismo mais forte associado às doenças autoimunes (NAGY et al., 2010). Após estes trabalhos iniciais o polimorfismo *PTPN22* 1858 C/T foi relacionado à AR em varias populações caucasoides (PLENGE et al., 2005; SIMKINS et al., 2005; HARRISON et al., 2006; PIERER et al., 2006).

Por outro lado, diferenças geográficas importantes na frequência do alelo foram observadas: no norte da Europa (Inglaterra e Finlândia) a frequência do alelo 1858T foi de 12%; no sul da Europa (Espanha e Itália) 6%; na Ásia e em populações afro-americanas ele foi praticamente inexistente. Esses dados sugerem que a frequência do alelo 1858T influencia a suscetibilidade à AR (NAGY et al., 2010).

O gene *PTPN22* está localizado no Cromossomo 1, região 1p13 próximo ao telômero. Tem 58.989pb (*NCBI locus ID 26191*), com 24 éxons e codifica uma fosfatase linfócito-específica chamada Lyp1, uma tyrosina-fosfatase proteica (PTP) citosólica de Classe 1, restrita à células hematopoiéticas, com cerca de 807 aminoácidos (a.a.) (Figura 10) e peso molecular aproximado de 105kDa. Estruturalmente, a Lyp1 tem aproximadamente 300 resíduos de a.a. no domínio N-terminal Tyrosina fosfatase e 200a.a. no domínio C-terminal, o qual incluem 4 motivos prolina putativos (PEST-enriched) chamados P1-P4. O domínio catalítico e o domínio C-terminal são separados por uma região com cerca de 300a.a. chamada região interdomínio (STANFORD et al., 2010).

Através de *splicing* alternativo o gene *PTPN22* produz dois transcritos que codificam três isoformas diferentes (Lyp1, Lyp2 e Lyp3), porém a forma dominante em linfócitos T é a Lyp1, enquanto a Lyp2 está presente em linfócitos em repouso (MATTHEWS et al., 1992; ANDERSEN et al., 2001; ANDERSEN et al., 2004; STANFORD et al., 2010). Além disso, os dois transcritos apresentam um total de seis polimorfismos de nucleotídeo único (Figura 11).

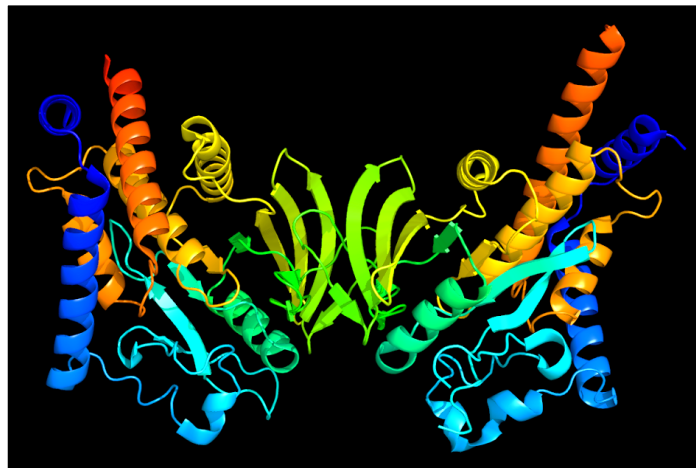


Figura 10. Estrutura tridimensional da Lyp.

Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2P6X&bionumber=1>.

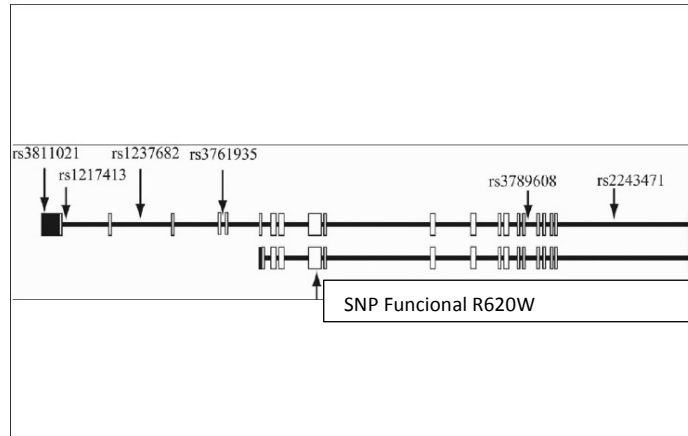


Figura 11. Estrutura das duas isoformas de transcritos do gene *PTPN22* e os seis polimorfismos de nucleotídeo único do gene.

Fonte: Pradhan *et al.* (1983).

As isoformas proteicas da Lyp1 e Lyp2 são inibidores potentes de diversos mediadores chave na transdução de sinal do Receptor de Célula T (TCR), através de defosforilação de kinases Src (Lck) e kinases Syk (Zap70). As proteínas Lyp e Lyp2 formam um complexo com a Tirosina Kinase Csk ligando-se ao seu domínio SH3, cujo efeito sinérgico é inibitório na sinalização inicial do TCR. O complexo Csk-Lyp depende da interação entre um motivo P1 N-terminal da Lyp e o domínio SH3 da Csk (Figura 12) (BOTTINI *et al.*, 2004).

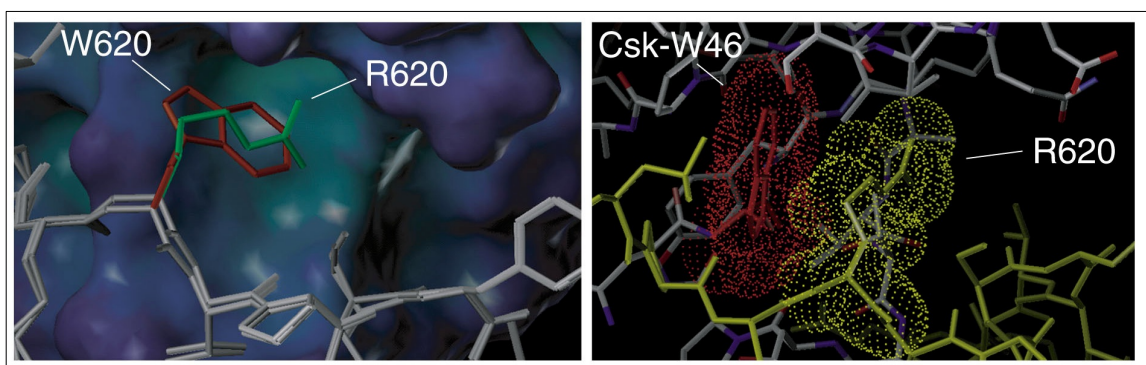


Figura 12. Estrutura tridimensional do complexo Lyp-Csk (Lyp cadeia em amarelo; Csk cadeia em cinza). A cadeia lateral com Arg-620 que encaixa em uma depressão ácida da estrutura ligante no domínio SH3, enquanto interage com o Trp46 da Csk. A substituição desta Arg620 por um Typ620 impede a formação do complexo Lyp-Csk.

Fonte: Bottini *et al.* (2004).

O principal polimorfismo do gene *PTPN22* resulta da substituição de uma citosina por uma timina na posição 1858 do gene, com substituição de uma arginina por triptofano na posição 620 da proteína Lyp (R620W). A publicação inicial de Bottini et al. (2004) dava conta de que o alelo *PTPN22* 1858T promove uma ruptura da ligação SH3 (Csk) e o motivo P1 (Lyp) em função da substituição R620W (Figura 12). A partir desta observação, os autores formularam a hipótese de que uma menor disponibilidade do complexo Csk-Lyp no citosol promoveria um *estado de hiperativação* do linfócito T (TONKS, 2006).

Entretanto, resultados de estudos posteriores demonstraram que o resultado funcional desta mutação é um *ganho de função*, com uma Lyp de maior atividade inibidora sobre sinalização do linfócito T (TONKS, 2006; STANFORD et al., 2010). Não se sabe ao certo qual a relação deste ganho de função com a imunopatogenia das doenças autoimunes, mas acredita-se atualmente que promove falha na deleção de células T autoreativas, porque o alelo *PTPN22* 1858T suprime fortemente a sinalização do receptor de célula T durante a seleção clonal no timo (NAGY et al., 2010). Por outro lado, suspeita-se também seja capaz de induzir uma atividade reguladora de células T *insuficiente* (TONKS, 2006).

O *PTPN22* 1858T também foi associado à AR soropositiva (Fator Reumatoide positivo) e à presença de anticorpos Anti-CCP (LEE et al., 2005). Conjuntamente, os alelos de epítipo compartilhado do gene *HLA-DRB1*, o polimorfismo do gene *PTPN22* 1858 C/T e o tabagismo, constituem-se a mais forte associação de risco para AR (PRATT et al., 2009).

1.7. O Gene *TNF* e a Artrite Reumatoide

O Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) é uma citocina pleiotrópica pro-inflamatória potente que exerce papel central na resposta imune inata e adquirida, além de participar da função normal de linfócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Embora seja

produzida principalmente por macrófagos, estudos posteriores mostraram que o TNF é produzido por grande variedade de células (FALVO et al., 2010). Foi inicialmente descrito como um fator envolvido na regulação de processos malignos. No entanto, hoje é mais conhecido por ser um importante mediador da resposta inflamatória (BAUGH; BUCALA, 2001; JACKSON, 2007).

O TNF- α pertence a uma superfamília com 19 membros ligantes e 30 receptores, descritos até o momento (WARE, 2003; 2008). Dessa superfamília, o TNF- α foi um dos primeiros membros a ser identificado, o qual é sintetizado como uma proteína de membrana tipo II não-glicosilada, com uma extremidade N-terminal intracelular e, outra maior, C-terminal extracelular. Na membrana, o TNF- α é expresso em sua forma homodimérica com peso molecular de 17kDa que é liberado por clivagem realizada por uma metaloproteinase, também associada à membrana (AGGARWAL, 2003; PFEFFER, 2003). Três dessas moléculas polimerizadas compõem a forma de pirâmide do TNF- α secretado, com peso molecular de 51kDa, capaz de ligar-se e ativar três receptores simultaneamente (Figura 13) (PFEFFER, 2003).

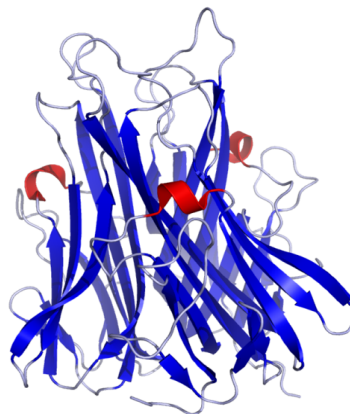


Figura 13. Estrutura Tridimensional do TNF.

Fonte: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1TNF>.

O Gene *TNF* está localizado no braço curto cromossomo 6 na região 6p21.3, uma região altamente polimórfica do genoma humano, ocupando um segmento de aproximadamente 7kb que compreende a região dos genes do MHC. Situa-se a 1,2kb do gene *LTA* que codifica a citocina Linfotoxina- α , sendo também flanqueado pelo gene da citocina Linfotoxina- β , também pertencentes à família TNF (Figura 14) (NEDWIN et al., 1985; RINK; KIRCHNER, 1996; ZANELLI et al., 2001).

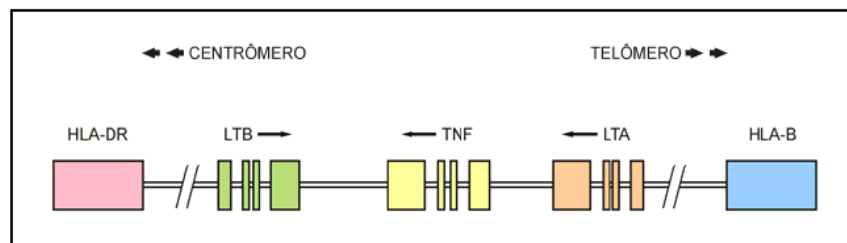


Figura 14. Diagrama Esquemático da Região 6p21 do Cromossomo 6. Locus do gene *TNF* humano entre os genes da *HLA-B* e *HLA-DR*.

Fonte: Rink e Kirchner et al. (1996).

A compreensão dos mecanismos de transcrição gênica do *TNF*, bem como a organização e estrutura do promotor são fundamentais neste trabalho. Desta forma, os níveis de TNF circulantes são regulados por um controle fino em várias etapas da expressão gênica: transcrição gênica, controle pós-transcricional na estabilidade de *mRNA*, clivagem da forma de membrana para formas solúveis e pela expressão de receptores, além da regulação epigenético (HAJEER; HUTCHINSON, 2001; FALVO et al., 2010).

Ao nível da transcrição, o gene *TNF* é ativado em resposta a uma diversidade de estímulos tipicamente relacionados à ativação celular durante infecção, inflamação ou estresse. Esses indutores de transcrição do gene *TNF* incluem ligantes para receptores de reconhecimento de padrão (PRR) como os *Toll-Like Receptors* (TLRs), para receptor da célula

T (TCR), receptores de citocinas, incluindo os dois receptores cognatos do TNF. A regulação da transcrição também varia conforme os diferentes tipos celulares envolvidos (FALVO et al., 2010).

A região promotora do *TNF* é compacta e modular (Figura 15). A região 5'-não-traduzida (5'UTR) do gene contém um promotor proximal de aproximadamente -200 nucleotídeos (nt) *upstream* do sitio cap mRNA, altamente conservada em mamíferos e totalmente conservada em primatas superiores. Embora o promotor proximal com cerca de -200nt seja suficiente para conduzir a transcrição, existem motivos de DNA espaçados no promotor que são críticos para a transcrição (Figura 15).

Assim, o promotor contém uma sequência TATA box (para RNA *Pol* Tipo II) e múltiplas regiões *cis*-acting que são motivos de ligação de fatores de transcrição. Existem seis sítios de ligação para o Fator Nuclear de Célula T ativada (NFAT), quatro para Ets/Elk, enquanto uma região NFAT se sobrepõe a um sítio de ligação Sp1 *downstream*. Também há um sítio de ligação par Egr adjacente a um sítio Sp1 mais *upstream*, além de um Elemento de Resposta ao AMP-c (CRE) (FALVO et al., 2010).

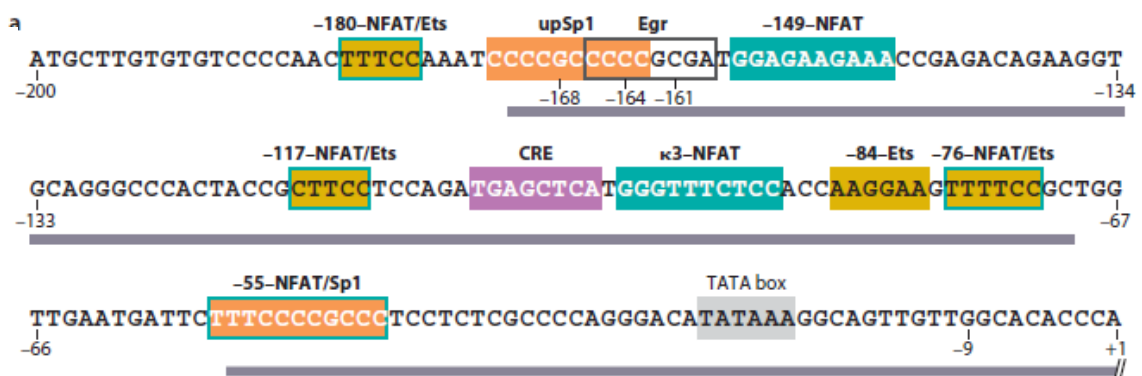


Figura 15. Promotor Proximal do *TNF* Humano. Sequência de nucleotídeos do promotor proximal do gene *TNF* humano (-200nt) mostrando as posições dos sítios de ligação dos fatores de transcrição (boxes). As barras indicam as sequências altamente conservadas de primatas, além das posições com diferenças genéticas fixas em primatas não humanos.

Fonte: Falvo *et al.* (2010).

A transcrição do gene *TNF* é regulada por um complexo de núcleo proteínas chamado *acentuassomos* (do inglês *enhanceosomes*). Os acentuassomos consistem de diferentes fatores de transcrição e coativação associados, numa estrutura altamente ordenada, com os promotores e acentuadores (*enhancers*), funcionando sinergicamente, de modo a estabilizar e aumentar a eficiência da transcrição (LEWIN, 2006).

Após a indução da transcrição do gene *TNF*, os fatores de transcrição descritos acima se ligam aos seus sítios específicos para compor, juntamente com a RNA polimerase, o aparato de transcrição. Forma-se um núcleo composto pelas proteínas ATF-2/c-jun-NFAT ou ATF-2/c-jun-NFAT-Ets/Elk, centradas no sítio CRE/ κ 3-NFAT, interagindo com um complexo âncora (CBP/p300) para o aparato de transcrição (Figura 16). O sistema de transcrição do gene *TNF* é tão eficiente que, após um estímulo indutor, os níveis séricos de *TNF* podem se elevar centenas de vezes em poucos minutos, tornando-se um modelo no estudo dos acentuassomos e promotores (FALVO et al., 2010).

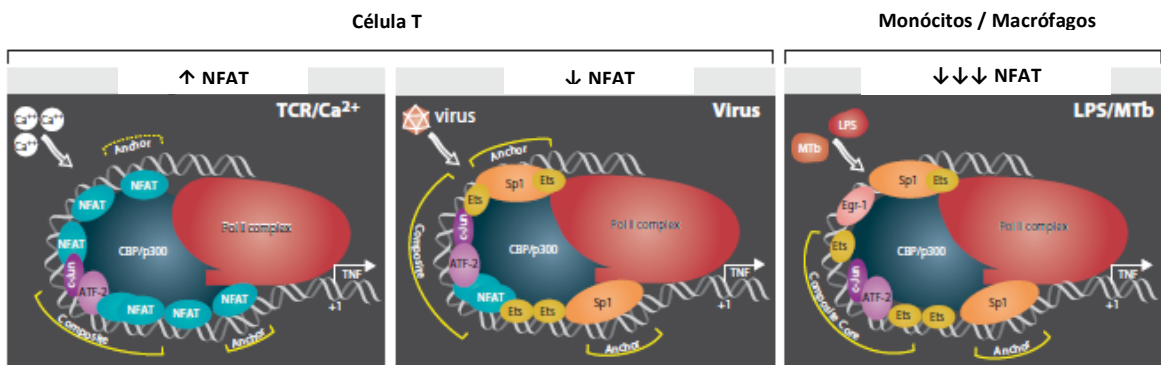


Figura 16. Aparato de Transcrição e acentuassomo do gene *TNF* humano. De acordo com o tipo celular, as concentrações de NFAT nucleares diferem e, portanto, a composição do acentuassomo. Fonte: Falvo et al. (2010).

O *TNF* é descrito na literatura como uma clássica citocina pro-inflamatória que é dependente do Fator Nuclear- κ B (NF- κ B) (MURPHY et al., 2008). As proteínas do NF- κ B são

na realidade uma grande família de fatores de transcrição gênica. Essa família inclui o p-50, p65 (RelA), c-Rel, p52, e RelB que se ligam ao DNA como homo ou heterodímeros (VLANTIS; PASPARAKIS, 2010). Nas células não ativadas, o NF- κ B está complexado com moléculas inibitórias chamadas I κ B α , em constante migração entre o núcleo e o citoplasma. A ativação do NF- κ B requer a degradação do I κ B α , permitindo a dimerização do NF- κ B e seu acúmulo no núcleo onde se liga a sequências alvo específicas do DNA para regular a transcrição (VLANTIS; PASPARAKIS, 2010).

A concepção de que o NF- κ B estava envolvido na regulação do gene *TNF* deriva da observação de que o NF- κ B liga-se a sete sítios específicos do promotor distal (κ B1, κ B2, κ B3, ζ , κ 1, κ 2, κ 3) além de diversas outras observações indiretas. Porém, a deleção ou mutação sítio-dirigida destas regiões não afetam sobremaneira a transcrição (FALVO et al., 2010; VLANTIS; PASPARAKIS, 2010).

Entretanto, no promotor distal estão situados diversos SNP que, em algum grau, têm sido relacionados à doenças, supostamente por modificarem a regulação de transcrição gênica do *TNF* (Figura 17). Nessa região mais distal foram descritos os SNPs -1031T/C, -863C/A, -857C/A, -851C/T, -419G/C, -376G/A, -308G/A, -238G/A (FALVO et al., 2010). Hoje sabe-se que, em função da contagem incorreta de pares de base em relação ao mRNA cap, a partir da adenina na posição +1, o que modifica a numeração dos SNP. Inclusive, a numeração correta do SNP -308 é -307 (UGLIALORO et al., 1998; HOLLEGAARD; BIDWELL, 2006). Apesar disto, a nomenclatura “tradicional” foi mantida neste trabalho, alinhando-se com a identificação e registro deste SNP no *National Center of Biothecnology* nos Estados Unidos (NCBI).

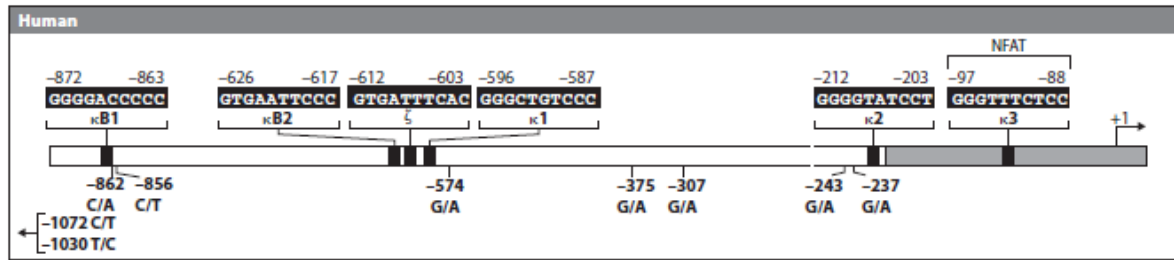


Figura 17. Região Distal do Promotor *TNF* Humano. Sítios de ligação NF-κB na região distal do promotor do gene *TNF* humano. Numa região situada aproximadamente entre -1200 e -200nt estão SNPs relacionados ao gene *TNF*.

Fonte: Falvo *et al.* (2010).

É interessante notar que, muitos destes SNP da região promotora de *TNF*, estão em desequilíbrio de ligação com genes do HLA em haplótipos estendidos, como blocos conservados de seqüências de DNA entre o HLA-B e HLA-DR, servindo inclusive como marcadores haplotípicos. Esses SNP também têm sido usados como marcadores de ancestralidade humana, como o SNP -856 comum em caucasianos e cambojanos, mas escassos em ameríndios (etnia Quéchua e Paez) e ausente em malasianos (FALVO *et al.*, 2010).

Após a descrição original de Wilson *et al.* (1992) do polimorfismo *TNF* -308 G/A, detectado usando RFLP, Danis *et al.* (1995) mostraram que este polimorfismo incomum apresentava-se em associação com doenças autoimunes como AR e Lúpus Eritematoso. Após estes trabalhos iniciais, um houve um crescente interesse pelos polimorfismos da região promotora do gene *TNF*. Isto porque estudos posteriores, usando diferentes metodologias, mostraram que o polimorfismo da posição -308 do gene *TNF* estava possivelmente envolvido na regulação da expressão de TNF- α , como um fenótipo hiperprodutor desta citocina (KROEGER *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1997; LOUIS *et al.*, 1998; KROEGER *et al.*, 2000).

Entretanto, em estudos de caso-controle o envolvimento deste polimorfismo com a AR, bem como com outras condições inflamatórias e autoimunes, não se tornou um consenso. Bayley et al. (2004) e Elahi et al. (2009) reuniram e revisaram informações de vários estudos, concluindo que a participação deste polimorfismo no risco de doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo a AR, ainda não foi estabelecida. Apesar disto, um número contínuo de evidências tem sido publicadas envolvendo de algum modo o *TNF2* e a Artrite Reumatoide.

Embora inicialmente controversa a ideia de que o polimorfismo *TNF* -308 G/A seja funcionalmente ativo, aumentando a transcrição de TNF, experimentos recentes com gene repórter confirmam esta hipótese (KARIMI et al., 2009). Este fato tem implicações fisiopatológicas, pois camundongos transgênicos TNFtg que hiperexpressam TNF desenvolvem artrite espontânea em modelos experimentais (BERG, 2009). Além disso, estudos em pacientes com síndrome de resposta inflamatória sistêmica, revelaram que os indivíduos com pelo menos um alelo mutante têm níveis elevados de TNF sérico, maior expressão de mRNA de TNF e, por fim, maior risco de sepse e choque séptico (MENGES, T. et al., 2008).

O alelo A do SNP *TNF* -308 G/A, ativo funcionalmente com hiperexpressão de TNF, foi associado à suscetibilidade para AR (CVETKOVIC et al., 2002; BAYLEY et al., 2004), bem como à maior progressão radiográfica (REZAIYAZDI et al., 2007; URSUM et al., 2010) e a variações de responsividade ao tratamento com imunobiológicos Anti-TNF como infliximabe e etanercept (MUGNIER et al., 2003; KREJSA et al., 2006). Esses resultados, entretanto, não são homogêneos em estudos que consideram diferentes populações (LEE et al., 2007).

O TNF exerce sua função biológica pela ligação aos receptores de TNF (TNFR). Existem descritos vários membros da família TNFR e os dois primeiros descritos são os mais

estudados: o TNFR1 (TNFRp55-60) e o TNFR2 (TNFRp75-80) que interagem com a forma homodimérica do TNF- α . Conforme mencionado anteriormente, devido a sua forma triangular, o TNF- α secretado pode se ligar a três receptores, simultaneamente (PFEFFER, 2003). Esses receptores ocorrem também na forma solúvel e quando se ligam ao TNF circulante neutralizam sua atividade imunológica por competição com receptores ligados à superfície de membranas de leucócitos, mas ao mesmo tempo estabiliza a molécula de TNF e impede sua degradação (HAJEER; HUTCHINSON, 2001).

O TNF- α é uma citocina produzida por fagócitos mononucleares ativado (macrófagos), embora, os linfócitos T efetores, células NK e mastócitos, também secretem essa proteína. O estímulo mais potente para desencadear a síntese de TNF- α pelos macrófagos é o lipolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias Gram-negativas. O LPS bacteriano é reconhecido por um receptor solúvel, o LBP, que permite sua ligação com o CD14. O CD14, quando ligado ao LPS, interage com o TLR-4 (receptor tipo *Toll* 4) ligado à proteína CD14, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, pela via do MyD88, como o TNF- α (AGGARWAL, 2003; PFEFFER, 2003).

O TNF- α liberado estimula as células endoteliais vasculares a expressarem novas moléculas de adesão, as quais facilitam a entrada de neutrófilos e monócitos no local da infecção. O TNF é produzido em grandes quantidades em infecções graves e exerce efeitos sistêmicos: no hipotálamo, induz o aumento da temperatura corpórea; sobre o fígado, leva a produção de proteínas de fase aguda. Altas concentrações de TNF- α desencadeiam modificações hemodinâmicas e choque e, estado de hipercoagulabilidade endovascular e hipermetabolismo. Sobre as células T induz proliferação e efeitos pró-inflamatórios (MURPHY et al., 2008).

1.8 Papel do TNF na Imunopatogênese da Artrite Reumatoide

A demonstração que o TNF- α tem um papel importante na AR ocorreu após a observação do seu potencial em degradar a cartilagem e o osso *in vitro*. Além disso, em culturas de macrófagos sinoviais de pacientes com AR, o TNF- α e várias outras citocinas pró-inflamatórias são espontaneamente produzidas por vários dias. Curiosamente, se a atividade biológicas do TNF- α é bloqueada, a produção tanto da citocinas IL1- β como do seu mRNA está marcadamente reduzida. Esses achados sugerem que a produção sinovial de citocinas na AR não é randômica, mas uma rede hierárquica controlada.

A inibição da atividade biológica de TNF- α também reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e CXCL-8 e de GM-CSF, o qual é importante na indução e manutenção da expressão de MHC Classe II nas Células Apresentadoras de Antígeno (APC) na membrana sinovial (BRENNAN; MCINNES, 2008). Por outro lado, Keffer *et al.* (2006) mostraram que camundongos transgênicos que expressam o gene *TNF* humano modificado (com substituição da sequência reguladora da região 5'UTR), desenvolvem artrite espontânea.

Na realidade, tanto citocinas pró-inflamatórias como anti-inflamatórias são detectadas no líquido sinovial de pacientes com AR (Figura 18). Porém, citocinas reguladoras como TGF- β e IL-10 não estão presentes em quantidade suficiente para inibir a sinovite (FIRESTEIN, 2003; TAYLOR *et al.*, 2010).

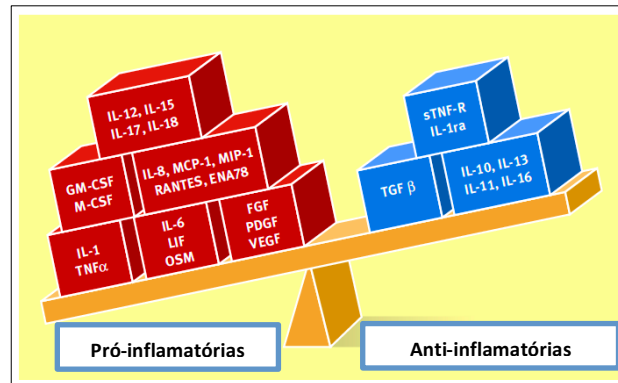


Figura 18. O Conceito do Desequilíbrio de Citocinas.

Fonte: Taylor (2010).

Durante a ativação das células sinoviais na membrana sinovial inflamada, o TNF- α é produzido continuamente (e em sua maior parte) pelos macrófagos sinoviais ativados (GIERUT et al., 2010). Conforme ilustrado na Figura 19, o TNF desempenha um papel central na imunopatogênese da AR, em função de suas múltiplas ações. Essas ações incluem a capacidade de induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6 que, em conjunto, acentuam a expressão de quimiocinas que atraem mais células para o tecido inflamado. Finalmente, a destruição da cartilagem articular e do osso subcondral é iniciada depois da indução de metaloproteinases (IMBODEN, 2009).

Acredita-se que a ativação de macrófagos sinoviais resulte de uma sequência de eventos iniciados a partir da apresentação de antígenos por uma APC a um linfócito T naïve, e sua diferenciação em uma célula TH17, sob ação de IL-21, IL-23, TGF β e IL-6. O conceito de que a AR é uma doença mediada Th1 perdeu espaço quando a resposta Th17 foi compreendida no contexto do desequilíbrio de citocinas (Figura 20). As células Th17 estimulam a alça pró-inflamatórias induzindo a secreção de TNF- α , IL-1- β IL-6, além de estimular a produção óxido nítrico, a osteoclastogênese, cujo resultado é a destruição da cartilagem e do osso subcondral (IMBODEN, 2009).

Para Anunziato et al. (2009) a participação das células Th17 se inicia ainda na fase de indução da AR, quando estas células são atraídas pela quimiocina CCL20 (ligante de CCR6), onde promovem a liberação de moléculas inflamatórias como óxido nítrico e metaloproteinases (MMPs) por fibroblastos sinoviais, osteoblastos e condrócitos; também por macrófagos sinoviais através da secreção de IL17A e IL17F. Segundo estes autores, as células Th17 também contribuem na fisiopatogenia da AR em razão de sua plasticidade fenotípica, transformando-se em células Th1 no local da infamação, ou ainda, atraindo estas células para a sinóvia pela produção de quimioquinas ligantes de CXCR3 como CXCL10, CXCL11 e CXCL12.

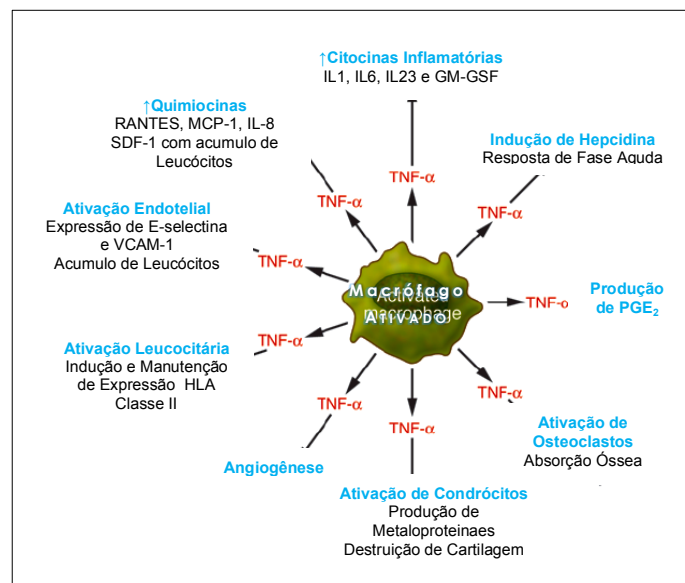


Figura 19. Atividades Relevantes do TNF- α na Imunopatogênese da Artrite Reumatoide.

Fonte: Brennan & McInnes (2008).

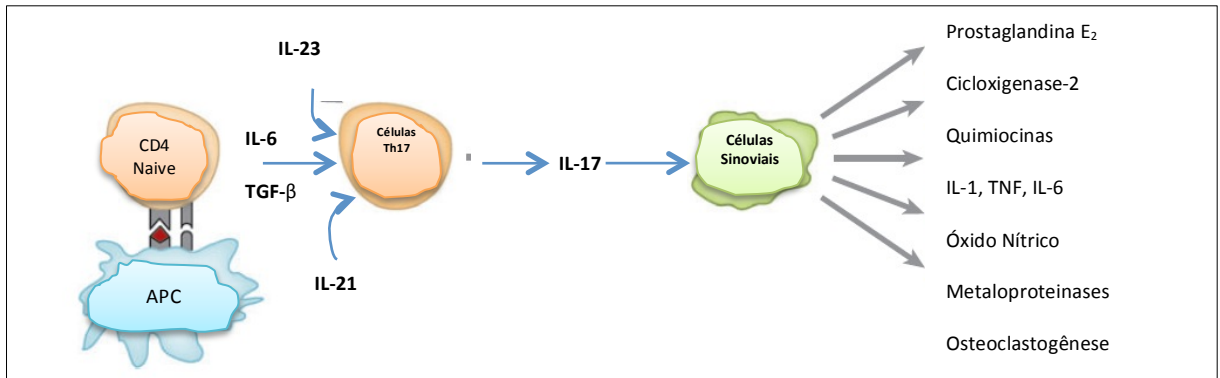


Figura 20. Ativação e Diferenciação de Células Th17 na Artrite Reumatoide.

Fonte: Imboden (2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- a) Analisar a associação dos polimorfismos dos genes *TNF -308 G/A* e *PTPN22 1858 C/T* com a Artrite Reumatoide no Amazonas, Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Determinar a distribuição dos genes de *TNF -308 G/A* e *PTPN22 1858 C/T* em pacientes com Artrite Reumatoide e Tuberculose.
- b) Analisar a associação dos genes *TNF -308 G/A* e *PTPN22 1858 C/T* com a Tuberculose.
- c) Verificar o perfil clínico e demográfico da Artrite Reumatoide.
- d) Analisar os fatores clínicos envolvidos com as formas sistêmicas da doença.
- e) Analisar a associação dos polimorfismos dos genes *TNF -308 G/A* e *PTPN22 1858 C/T* com as formas sistêmicas da Artrite Reumatoide.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo de Estudo

Foi conduzido estudo descritivo, transversal tipo caso-controle, selecionando-se indivíduos não índios, portadores de AR, controles sem AR ou TB e portadores de TB pulmonar.

3.2 Informações Éticas

O presente estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP-UFAM) e homologado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Adriano Jorge (CEP-FHAJ) de acordo com as leis brasileiras, CAAE - 0028.0.115.000-0. Pacientes e controles foram admitidos no estudo após ler, concordar e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1) para participação no estudo e coleta de amostras sanguíneas, considerando-se o protocolo de pesquisa contido no Apêndice 3.

3.3 Universo de Estudo

3.3.1 População de Estudo

Pacientes de Artrite Reumatoide, naturais do Amazonas, encaminhados ao Ambulatório de Artrite Reumatoide do Serviço de Reumatologia da FHAJ. Pacientes de Tuberculose, naturais do Estado do Amazonas, atendidos na Policlínica de Tisiologia Cardoso Fontes e Enfermaria de Pneumologia da FHAJ.

3.3.2 Participantes

Este estudo incluiu pacientes de AR e TB no período de agosto de 2007 a outubro de

2010 desde que completados os critérios de inclusão deste protocolo de pesquisa. Os pacientes de AR encaminhados de serviços de saúde da capital e do interior do Estado ao Ambulatório de Artrite Reumatoide do Serviço de Reumatologia da FHAJ, regularmente acompanhados neste serviço.

Todos os pacientes de TB da Enfermaria de Pneumologia que preencheram os critérios de inclusão neste protocolo no período da pesquisa foram selecionados. Os pacientes de TB também foram recrutados durante visitas semanais à Policlínica de Tisiologia Cardoso Fontes. Os pacientes foram questionados sobre seu desejo de participar do trabalho, após as consultas médicas nas quais foi estabelecido diagnóstico de tuberculose.

Foram eleitos e selecionados como controles indivíduos de ambos os sexos, não índios, entre 18 e 75 anos sem história e diagnóstico de quaisquer doenças alérgicas, autoimunes e crônico-degenerativas. Para tanto, um histórico e exame clínico foi obtido em consulta médica, sendo mantidos no estudo apenas os indivíduos com estes critérios.

3.3.3 Critérios de Elegibilidade

3.3.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos: a) os pacientes de AR entre 18 e 75 anos, de ambos os sexos, não índios, preenchendo os critérios de Classificação do Colégio Americano de Reumatologia para diagnóstico da Artrite Reumatoide (ARNETT et al., 1988; FUNOVITS et al., 2010); b) os pacientes de TB pulmonar de ambos os sexos, não índios, entre 18 e 75 anos, com exame BAAR positivo no escarro.

3.3.3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo: a) pacientes que, durante avaliação inicial tinham critérios de AR, mas que após avaliação sequencial tinham sintomas e sinais sugestivos de outras patologias autoimunes; b) cujos dados clínicos e laboratoriais eram insuficientes para completar as informações deste protocolo; c) foram excluídos indivíduos com TB portadores de imunodeficiências congênitas ou adquiridas, bem como portadores de quaisquer condições autoimunes, inclusive a própria AR.

3.3.3 Amostragem

Foi criado na FHAJ um ambulatório de referência para atender pacientes de AR, provenientes de unidades de saúde da capital e interior do Estado do Amazonas. A população em estudo foi definida por método não probabilístico, selecionando-se indivíduos em atendimentos consecutivos, onde todos os pacientes atendidos no Ambulatório no período da pesquisa foram inseridos no estudo, desde que atendessem aos critérios de elegibilidade.

3.4 Detalhamento dos Procedimentos

3.4.1 Obtenção de Informações de Pacientes com Artrite Reumatoide

Para todo paciente de AR selecionado, dados clínicos e laboratoriais foram coletados em formulário próprio separado (Apêndice 2 – Ficha de Investigação Clínica de Artrite Reumatoide), anotando Duração da Doença (DD), idade de início (ID), Fator Reumatoide

(FR), Velocidade de Hemossedimentação (VHS) e Proteína C Reativa (PC-R) no momento da avaliação, Drogas modificadoras do curso da doença (DMARDS), hemograma, função renal e hepática, glicemia, lipidograma, albumina, uso de drogas Anti-TNF, dose de corticoide em uso com equivalência à prednisona, cirurgia articular prévia (relacionada à AR – artroplastia ou artrodese), número de anos de educação, número de dias de afastamento do trabalho (definido como incapacidade legal para trabalho julgado por entidade ou órgão competente). Também foram anotados peso, altura e história de tabagismo.

Os pacientes de AR foram considerados com acometimento predominantemente articular ou sistêmico. Este último, quando pelo menos um dos achados clínicos seguintes foram detectados: nódulos subcutâneos, fibrose pulmonar confirmada por Tomografia Computadorizada de Alta Resolução de tórax, derrame pleural confirmado por radiografia de tórax, derrame pericárdico com evidência ecocardiográfica, Síndrome de Felty (hemograma com leucócitos $< 2 \times 10^6$ células, esplenomegalia), vasculite cutânea (evidencia histopatológica de vasculite leucocitoclástica), neuropatia periférica não compressiva comprovado por eletroneuromiografia, Síndrome de Sjögren (confirmada por Teste de Shirmer, biópsia de glândula salivar menor ou RNM glândulas salivares).

Foi obtida a atividade da doença acordo com o *Disease Activity Score* de 28 juntas doloridas/edemaciadas (DAS28), conforme Prevoo *et al.* (1995), além da medida de qualidade de vida com o *Health Assesment Quality* (HAQ) conforme Fries *et al.* (1980), validado para a língua portuguesa por Ferraz *et al.* (1990) (Anexo 1). Foram considerados casos graves aqueles pacientes que apresentaram pelo menos um dos seguintes: manifestações sistêmicas (conforme definição anterior) e/ou uso de medicação imunobiológica.

Todas as informações obtidas neste estudo foram identificadas com número de

registro próprio para todos os pacientes e inseridas em banco de dados produzido no software Microsoft Access 2010[®] e posteriormente analisadas estatisticamente., utilizando-se o Software R e Minitab 16.

3.4.2 Obtenção de Informações de Pacientes de Tuberculose

Para todos os pacientes de tuberculose incluídos neste estudo, foram coletados em formulário próprio, em separado (Anexo), o número de prontuário, nome completo, endereço, telefone, sexo, idade e data de nascimento, BAAR, esquema terapêutico para tratamento de tuberculose.

3.4.3 Recrutamento de Indivíduos Controles

Os indivíduos controles foram recrutados nas regiões da cidade próximas as residências dos pacientes de AR ou, ainda, acompanhantes de pacientes do ambulatório desde que não aparentados com os pacientes de AR ou TB selecionados anteriormente. Acompanhantes de pacientes com TB considerados “contatos de TB”, não foram selecionados como controles.

3.4.4 Coleta de Sangue e Extração de DNA Genômico

Dos indivíduos selecionados, após concordarem e assinarem o Termo de Livre Consentimento e Esclarecimento (TCLE) aprovado em Comitê de Ética em Pesquisa, foram realizadas coletas de 5mL de sangue venoso em sistema a vácuo. A extração de DNA foi realizada pela técnica rápida com sais de brometo de trimetilamônio (DTAB/CTAB), descrito por Gustincich *et al.* (1991), na qual a camada de leucócitos “Buffy Coat”, obtida a partir de sangue centrifugado a 250x *g* por 10 minutos foi misturada com igual volume de tampão de

lise: DTAB 12% (DTAB 12%, NaCl 2,25 M, Tris 150mM pH 8,6, EDTA 75mM) e incubada por 10 minutos a 68°C. Após esta etapa, adicionou-se 800µL de clorofórmio, seguindo-se vigorosa agitação e centrifugação à 10.000x *g* por 5 minutos; o sobrenadante foi recuperado e adicionado a 1mL de CTAB 0,5% (CTAB 0,5%, NaCl 0,4 M). Em seguida foi homogeneizado para se obter um precipitado DNA/CTAB. Após nova centrifugação a 10.000x *g* por 5 minutos, o precipitado foi resuspenso em 300µL de NaCl 1,2M e depois em 750µL de etanol absoluto, seguindo-se centrifugação por 5 minutos a 16.000 x *g*. As demais lavagens e centrifugações foram realizadas com etanol 70%. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado posteriormente dissolvido em 100µL de água ultrapura. O DNA extraído foi estocado em microtubo de 500µL (solução estoque), quantificado em espectrofotômetro em 230nm, 260nm, 280nm e anotada razão 260/280. Após a quantificação, as amostras foram diluídas para uma concentração de 50ng DNA/µL em água ultrapura (solução de uso) e utilizadas nas reações de PCR, mantendo-se a solução estoque armazenada em freezer a -20°C.

3.4.4 Genotipagem para o Polimorfismo *TNF* -308 G/A por PCR-RFLP

A genotipagem das amostras foi realizada segundo método descrito anteriormente por outros autores (WILSON et al., 1992; JONG et al., 2002), acesso no NCBI dbSNP ID rs1800629. Resumidamente, foi procedida a amplificação da região de interesse por PCR (fragmento de 147pb), utilizando-se os primers 5'-TACCGGGAGTTTTGGATA ACGGAG-3' e 5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3'. Para uma reação com volume final de 25µL, utilizou-se *TaqDNA Polimerase Platinum*[®] (Invitrogen) 1UI, buffer sugerido pelo fabricante (1x) 2,5µL (Tris-HCL 200mM pH8.4, KCl 500mM), 200ng de DNA, dNTP 200µM, MgCl₂ 1,5mM e 0,1µM de cada primer com o protocolo de amplificação em Termociclador (Applied Biosystems) abaixo (Quadro 3). O produto de amplificação foi digerido com Enzima *NcoI* (New England

Biolabs) 1U/50ug de DNA, NEBuffer 1X (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, pH 7,9 a 29°C) e incubado à 37°C por 8 horas. O produto de digestão foi analisado em eletroforese gel de agarose 2% com corante SyberGreen® (Invitrogen). Cada genótipo foi identificado conforme a visualização dos fragmentos descritos abaixo (Quadro 2 e 3).

Quadro 2. Protocolo de Amplificação *TNF -308 G/A*

<i>TNF -308</i> / Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
95	10:00"	1
95	00:30"	35
60	00:30"	
72	00:30"	
72	10:00"	1
4	∞	-

Quadro 3. Análise de Fragmentos de Restrição *TNF -308 G/A*

Polimorfismo <i>TNF -308</i>	Fragmentos de Restrição em Gel de Agarose 2%
GG	126pb + 21pb
GA	147pb + 126pb + 21pb
AA	147pb

3.4.5 Genotipagem para o Polimorfismo *PTPN22* 1858 C/T por PCR-RFLP

A genotipagem foi realizada conforme originalmente descrito por Bottini *et al.* (2004), acesso no NCBI dbSNP ID rs2476601. Resumidamente, foi procedida a amplificação da região de interesse (218pb) utilizando-se os primers 5'-TCACCAGCTTCCTCA ACCACA-3' e 5'- GATAATGTTGCTTCAACGGAATTTA -3'. Para uma reação com volume final de 25µL, utilizou-se *TaqDNA Polimerase Platinum*® (Invitrogen) 1UI, buffer sugerido pelo fabricante (1x) 2,5µL (Tris-HCL 200mM pH8.4, KCl 500mM), 100ng de DNA, dNTP 200µM, MgCl₂ 2,5mM

e 0,4 μ M de cada primer, com protocolo de amplificação em Termociclador (Applied Biosystems) abaixo (Quadro 4) . Cada 10 μ L do produto de amplificação foi digerido com 1 μ L de XcmI, 2 μ L de NE Buffer 1x (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, pH 7,9 a 29°C) e 7 μ L de H₂O MilliQ, com um volume final de reação com 20 μ L, à 37°C por 8 horas. O produto de digestão foi analisado em gel de agarose à 2% com corante SyberGreen® (Invitrogen). Cada genótipo foi caracterizado com forme visualização dos fragmentos descritos abaixo (Quadro 4 e 5).

Quadro 4. Protocolo de Amplificação *PTPN22* 1858 C/T.

<i>PTPN22</i> / Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
95	3:00"	1
95	00:30"	
60	00:30"	30
72	00:30"	
72	10:00"	1
4	∞	-

Quadro 5. Análise de Fragmentos de Restrição *PTPN22* 1858 C/T.

Polimorfismo <i>PTPN22</i>	Fragmentos de Restrição em Gel de Agarose 2%
CC	222pb
CT	222pb + 176pb
TT	176pb + 46pb

3.5 Análises Estatísticas

Em razão da amostragem deste estudo ter sido obtida por método não probabilístico, a Análise do Poder Estatístico alcançado na pesquisa foi realizada a partir da amostra obtida durante o período de estudo (Apêndice). A estatística descritiva foi aplicada para analisar as principais características clínicas de demográficas da amostra estudada. A partir dos resultados da genotipagem, o teste χ^2 foi aplicado para investigar a associação entre

genótipos e as doenças em estudado, com nível de significância $p < 0,05$. A razão de probabilidades (*odds ratio*) e intervalo de confiança foram calculados quando uma associação significativa foi observada. O teste *t*-Student foi utilizado para comparação de médias quando uma distribuição normal foi observada com teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando a distribuição normal não foi observada, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado na comparação de médias.

Foi aplicada regressão logística binária múltipla para analisar associação entre o polimorfismo *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T e as manifestações sistêmicas da Artrite Reumatoide. Durante o procedimento estatístico de regressão logística foi utilizada metodologia “*forward stepwise*” para selecionar quais variáveis (preditores) influenciavam um indivíduo com AR apresentar doença sistêmica (variável dependente). Cada variável foi incluída no modelo de regressão quando seu score estatístico foi menor que $p = 0,05$. Neste caso, utilizou-se como variável resposta a presença de manifestações sistêmicas, como variáveis categóricas independentes a presença de Fator Reumatoide positivo (variável dicotômica), a idade (variável contínua), tempo de doença (variável contínua) e a presença do alelo mutante para cada gene estudado (variável dicotômica).

Cada modelo de regressão foi analisada a calibração e sua capacidade de discriminação (ALTMAN; BLAND, 1994; HOSMER; LEMESHOW, 2000). Para verificar a calibração foi aplicada a estatística de Hosmer-Lemeshow, onde os menores valores de χ^2 calculado indicam boa calibração. Para verificar a calibração, entendida como a capacidade do modelo em classificar corretamente os sujeitos nos dois grupos (com e sem doença sistêmica), foi obtida Curva ROC e calculada Área sob a Curva (AUC). Valores de AUC maiores que 0,7 indicam melhor poder de discriminação.

3.5.1 Frequências Alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas pela contagem direta dos alelos, aplicando-se na fórmula: $X=n/2N$, onde X representa a frequência relativa do alelo, n a frequência absoluta do alelo e N o número total de indivíduos. A análise do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) revelou que os alelos estão em equilíbrio genético para os genes *TNF* e *PTPN22*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aspectos Clínicos, Demográficos e Epidemiológicos de Pacientes com Artrite Reumatoide.

Foram incluídos no estudo 132 paciente de AR, encaminhados de unidades de saúde da capital e interior do Estado do Amazonas, onde 44,7% são naturais procedentes de Manaus e 53% do interior, conforme Tabela de Dados Individuais (Apêndice 9). A amostra obtida representa comparativamente 12,7% da amostra de 1093 pacientes latino-americanos analisados pelo GLADAR (GLADAR, 2009), o que evidencia a representatividade do presente estudo. Entre os pacientes avaliados, 119 (90,20%) são do sexo feminino e 13 (9,80%) do sexo masculino (cerca 11 mulheres para 1 homem), o Fator Reumatoide foi positivo em 98 (74,24%), com média de idade no diagnóstico de 42,44 anos, tempo médio de doença na amostra 4,85 anos, e a média de anos de estudo 9,47 anos.

Entre aqueles com AR precoce (menos de 2 anos de doença), o DAS28 médio foi 4,51 e o HAQ 1,48 (Tabela 1). As manifestações sistêmicas foram observadas em 25,70% dos pacientes (Tabela 2), sendo a mais frequente a Síndrome de Sjogren em 25 pacientes (15,9%), seguidos de Nódulos Reumatoides em 9 pacientes (6,4%). Na amostra estudada, 38 (30,30%) usavam medicação imunobiológica e 69,70% usam DMARDS (Tabela 1).

A análise dos resultados apresentados na Tabela 1 revela características semelhantes a outros estudos realizados no Brasil (MOREIRA ALMEIDA et al., 2005; LOUZADA-JUNIOR et al., 2007; MOTA et al., 2010). Deve-se considerar que o Brasil, bem como a América Latina, apresenta características demográficas complexas, decorrentes de origem multiétnica e padrões de imigração. Da interação destes fatores resultou uma população miscigenada e distinta, inclusive em diferentes regiões do Brasil, com ampla variabilidade de constituição

genética (CALLEGARI-JACQUES et al., 2003). Desta forma, torna-se importante destacar os aspectos clínicos próprios, demográficos e epidemiológicos da AR em cada região do país.

De forma geral, autores observaram que em países de população caucasiana, a AR é mais comum em mulheres em relação aos homens na proporção de 3:1 (HOCHBERG, 2009), com início na quinta década de vida. Porém, conforme destaca Carvalho et al. (2008) em latino-americanos parece haver uma variação maior na proporção de mulheres em relação aos homens.

Tabela 1 – Características Clínicas e Epidemiológicas de 132 Pacientes de Artrite Reumatoide no Ambulatório de Artrite Reumatoide – FHAJ, Amazonas.

Características Clínicas	132 pacientes
Sexo	
Feminino	119 (90,2%)
Masculino	13 (9,8%)
Fator Reumatoide	98 (74,24%)
Idade no Diagnóstico (anos)	
Média	42,44 ± 13,21
Mediana	40,50
Tempo de Doença (anos)	
Média	4,85 ± 5,45
Mediana	2,75
Artrite Reumatoide Precoce	43 (32,6%)
Juntas Doloridas	9,45 ± 4,41
Juntas Edemaciadas	5,92 ± 2,28
DAS28	4,51 ± 1,59
HAQ	1,48 ± 1,02
PC-R	9,51 ± 11,99
VHS	29,8 ± 19,04
Padrão Articular	
Monoartrite	13 (30,2%)
Oligoartrite	7 (16,2%)
Poliartrite	23 (53,4%)
DAS28	4,81 ± 1,43
HAQ	1,68 ± 0,901
Manifestações Sistêmicas	34 (25,76%)
DMARDS	69,70%
Imunobiológicos	30,30%
Número de Anos de Estudo (anos)	
Média	9,47 ± 4,63
Mediana	9,00
Curso Superior	5,3%
Tabagismo	44 (33,3%)
Fumante habitual	4 (3,03%)

Na América Latina um estudo multicêntrico está sendo desenvolvido desde 2004 pelo GLADAR (Grupo Latino-Americano de Artrite Reumatoide), envolvendo 14 países e totalizando 1093 pacientes com AR precoce, cujos sintomas têm menos de um ano de início. Dos pacientes incluídos, 85% são mulheres (GLADAR, 2009).

Este estudo observou os principais grupos étnicos identificados: a) mestiços (ancestrais europeus e indígenas – 43%); b) caucasianos (31%); c) afro-latino-americanos (19%) e d) ameríndios (4%). A maioria dos indivíduos é de classe econômica baixa ou média baixa com menos de 12 anos de estudo (77%). A média de idade de início da doença 45,3 anos para as mulheres e 49,9 anos para os homens (CARVALHO et al., 2008). Estudos mostram que no Brasil a AR acomete cerca de seis a oito mulheres para um homem, com idade média de 45 anos, afetando pessoas com menos de nove anos de estudos (LOUZADA-JUNIOR et al., 2007; MOTA et al., 2010).

Devem ainda ser destacados em relação aos estudos brasileiros que, entre os 132 pacientes de AR estudados, a média de idade para início da doença foi mais baixa (42,4 anos), além do número médio de anos de estudo semelhante, entre 8 a 9 anos (LOUZADA-JUNIOR et al., 2007; MOTA et al., 2010).

No grupo de pacientes com AR precoce (menos de 2 anos de evolução de doença), houve o predomínio da forma poliarticular (53,40%), aparentando menor atividade inflamatória da doença em relação às características apresentadas no estudo de Mota et al. (2010), em função do menor número médio de articulações dolorosas de 9,45 e edemaciadas em 5,92. O estudo GLADAR, que observou 1059 pacientes com AR, relatou que 95% dos pacientes tinham um padrão poliarticular inicial (CARVALHO et al., 2008).

De acordo com Turesson e Matteson (2009), as formas mais graves de manifestações sistêmicas da AR desenvolvem-se em cerca de 15% de pacientes caucasianos com longo

tempo de acompanhamento, numa taxa de 1 caso/100 pessoas/ano. Ainda segundo Turesson e Matteson (2009), a forma mais frequente de manifestação extra-articular é o nódulo reumatoide que acomete 7% dos pacientes de AR no início da doença, além de 30% de todos os pacientes em qualquer ponto da evolução da doença; em seguida aos nódulos reumatoides, as formas pulmonares acometem 6% dos pacientes com mais de 10 anos de evolução da doença. Deve-se ressaltar que os pacientes com manifestações extra-articulares tem maior mortalidade cardiovascular (SOLOMON et al., 2010).

Estudos brasileiros revelam diferenças na frequência de manifestações extra-articulares. Para Louzada-Junior et al. (2007), no Estado de São Paulo, as manifestações mais frequentes são os nódulos reumatoides (29%), a Síndrome de Sjögren (28%) e o envolvimento pulmonar (15%). Ainda segundo os mesmos autores, essas manifestações acometem 23,3% do total de pacientes com AR. Para Mota et al. (2010) os nódulos reumatoide acometem 15,38% dos pacientes, enquanto a Síndrome de Sjögren 13,8% e as manifestações pulmonares 3%.

A Tabela 2 mostra que 34 dos 132 pacientes analisados (25,7%) apresentam manifestações sistêmicas da AR, sendo a Síndrome de Sjögren a forma mais frequente, seguida pelos Nódulos Reumatoides. Esses resultados diferem de dados provenientes de populações caucasoides, onde apenas 15% dos pacientes apresentam alguma forma sistêmica (TURESSON; MATTESON, 2009).

Além disso, há baixa frequência de nódulos reumatoides comparando-se aos caucasoides e aos estudos brasileiros citados, chama atenção a maior frequência de Síndrome de Sjögren entre os Amazonenses. Em relação ao total de pacientes com manifestações sistêmicas, a Síndrome de Sjögren representou 15,9% dos casos, enquanto que os nódulos reumatoides representam 6,4% deste total (Tabela 2). Cabe ressaltar que na

coorte latino-americana analisada pelo GLADAR a prevalência de Síndrome de Sjogren foi semelhante muito semelhante (13,6%) (GLADAR, 2009).

Tabela 2 – Manifestações Sistêmicas Observadas em 132 pacientes com Artrite Reumatoide no Amazonas.

Manifestação Sistêmica	34/132 (25,7%)
Síndrome de Sjögren	21 (15,9%)
Nódulos Reumatoides	9 (6,4%)
Neuropatia Periférica	2 (1,5%)
Fibrose Pulmonar	2 (1,5%)

Apenas 66 (50%) dos pacientes estudados têm cobertura no sistema previdenciário oficial (INSS), sendo que 32 (24,2%) declararam-se do lar (Tabela 3). Isto destaca que grande parte dos pacientes está fora do mercado de trabalho ou com trabalho informal. Entre os pacientes que tem cobertura previdenciária, 85,6% já permaneceram afastados do trabalho pelo INSS, com média de $436 \pm 572,1$ dias de afastamento (mediana de 180 dias).

É importante destacar que este estudo analisou a incapacidade para o trabalho pelo número de pacientes aposentados por invalidez ou afastados do trabalho, pelo vínculo com o sistema previdenciário oficial: o INSS. De qualquer forma, segundo estas informações, pacientes de AR permanecem cerca 1,2 anos em afastamento do trabalho frente ao INSS. Isto pode refletir, por um lado, o tempo de espera para a primeira consulta reumatológica; de outro lado, o tempo gasto para um paciente atingir remissão da doença, resultando em maior tempo de afastamento do trabalho.

Tabela 3 – Informações Previdenciárias entre 132 pacientes de Artrite Reumatoide.

Previdência (INSS)	66 (50%)
Nunca usaram benefício	14,4%
Usaram algum benefício	85,6%
Aposentados	22 (15,9%)
Invalidez	10 (8,33%)
Tempo de Serviço	11 (7,58%)
Dias Afastamento do Trabalho	
Média	$436,3 \pm 372,1$
Mediana	180

Não foram aplicados questionários específicos para avaliar incapacidade e

produtividade no trabalho, o absenteísmo e o presenteísmo, tais como o *Work Productivity and Activity Impairment Questionnaire for RA* (WPAI:RA) (CICONELLI et al., 2006). Portanto, é possível que um número maior de pacientes não estejam aptos para o trabalho, ao mesmo tempo sem cobertura previdenciária, aposentados, ou ainda, que não se sintam aptos para atividades da vida diária ou laborativas.

Ainda assim, tomados em conjunto, estes dados revelam o grande impacto social da AR no Amazonas, caracterizando uma população de baixo nível de escolaridade, em sua maioria sem vínculo formal de trabalho ou cobertura previdenciária. Além disso, tem HAQ médio de $1,68 \pm 0,901$, revelando perda de pelo menos metade da qualidade de vida avaliada por este instrumento (escore máximo 3).

Não foram encontrados estudos com pacientes brasileiros que tenham avaliado o HAQ, porém os pacientes latino-americanos avaliados pelo GLADAR tinham HAQ 1,5 na consulta de base (GLADAR, 2009). Uma coorte Suíça mostrou HAQ de 1,1 (KOBELT et al., 2005), enquanto estudo mais recente na França mostrou HAQ de 1,4 (KOBELT et al., 2008). Tem sido observado que o HAQ alto tem maior associação com a morbimortalidade na AR (LOUZADA-JUNIOR et al., 2007).

4.2. Genotipagem por PCR-RFLP

Após amplificação do segmento de interesse de ambos os genes, os produtos de amplificação foram digeridos com enzima de restrição, conforme itens 3.4.5 e 3.4.6 da Metodologia. Após a etapa de digestão enzimática, as amostras foram analisadas em gel de eletroforese a 2%, evidenciando a reprodutibilidade do método de genotipagem para os polimorfismos *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T descritos anteriormente (Figuras 21 e 22).

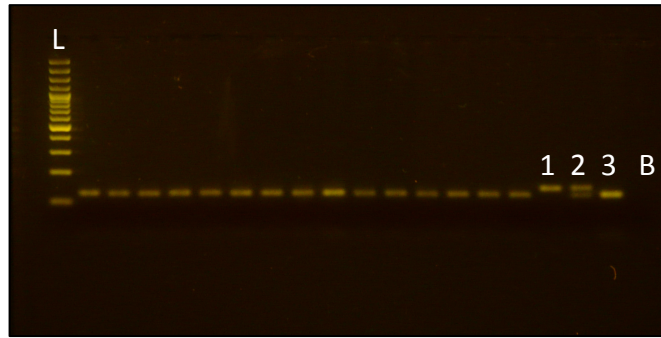


Figura 21 – Gel Agarose 2% - Eletroforese de Produtos de Restrição – RFLP para genotipagem do polimorfismo *TNF -308*. (L) Ladder de 123pb. (B) Branco. À direita os números indicam os controles da reação e seus genótipos: 1 (AA) – Fragmento de 147pb; Genótipo 2 (GA) - Fragmentos de 147 e 126pb; e Genótipo 3 (GG) – Fragmentos de 126pb +21pb. As demais bandas correspondem à genotipagem de pacientes, com genótipo GG.

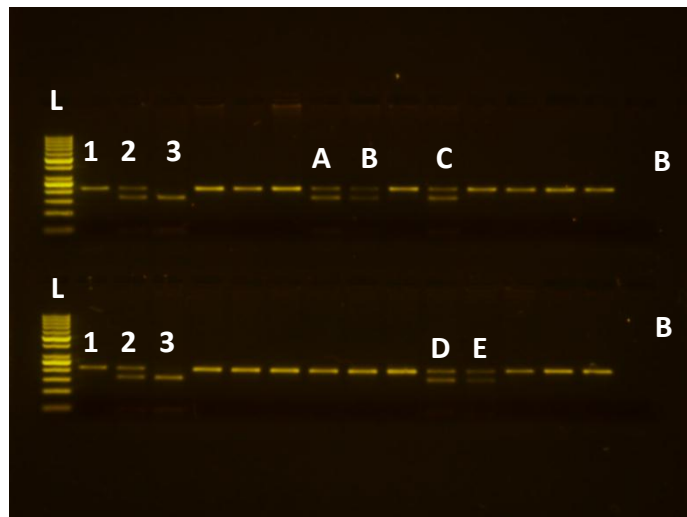


Figura 22 – Gel de Agarose à 2% - Eletroforese de Produtos de Restrição – RFLP para genotipagem do Polimorfismo *PTPN22 1858 C/T*. (L) Ladder 50pb. (B) Branco. À direita os números indicam os controles da reação e seus genótipos: 1 (CC) – Fragmento de 147pb; Genótipo 2 (CT) - Fragmentos de 147 e 126pb; e Genótipo 3 (TT) – Fragmentos de 126pb +21pb. As bandas A, B, C, D e E correspondem ao genótipo CT de pacientes; todas demais bandas correspondem ao genótipo CC de pacientes.

Durante os procedimentos de genotipagem para os alelos *TNF -308 G/A* oito amostras de pacientes com TB e de 13 controles não puderam ser genotipados por motivos técnicos. Além disso, três amostras de pacientes controles não foram genotipados pelas mesmas razões.

4.3 Distribuição dos Alelos dos Polimorfismos *TNF -308 G/A* e *PTPN22 1858 C/T*

A Tabela 4 mostra a distribuição e frequência dos alelos para pacientes com AR, TB e controles sadio. No nível de significância de $p < 0,05$, não foi observada associação estatística entre os alelos dos polimorfismos *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T com a TB e AR.

Tabela 4 – Frequência de Alelos dos Polimorfismos *TNF* e *PTPN22* em Pacientes com Artrite Reumatoide, Tuberculose e Controles.

Polimorfismos		Artrite Reumatoide (n=131)	Tuberculose (n=200)	Controles (n=192)	<i>p</i>
<i>TNF</i> -308 G/A	G	240 (91,6%)	362 (90,5%)	351 (91,4%)	0,218
	A	22 (8,39%)	38 (9,5%)	33 (8,6%)	
		Artrite Reumatoide (n=131)	Tuberculose (n=208)	Controles (n=205)	
<i>PTPN22</i> 1858 C/T	C	251 (95,8%)	406 (97,6%)	399 (97,3%)	0,376
	T	11 (4,20%)	10 (2,40%)	11 (2,7%)	

O presente estudo é primeiro a verificar se há associação da AR com polimorfismo *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T em uma população da Região Norte do Brasil. Há, porém, estudos realizados na América Latina mostrando associação do alelo *TNF2* e com AR em Colombianos e Mexicanos (CORREA et al., 2005a; RODRIGUEZ-CARREON et al., 2005; LEE et al., 2007). Por outro lado, em colombianos a associação entre *PTPN22* 1858T e a AR não foi demonstrada (GOMEZ, L. et al., 2005). Dentre estes estudos, destaca-se a meta-análise de Lee et al. (2007) que associou o polimorfismo *TNF* -308 G/A à AR em latino-americanos, mas não incluiu estudos brasileiros.

É possível observar na Tabela 4 que há tendência de que o alelo *PTPN22* 1858T seja mais frequente entre os pacientes com AR (4,20%) em relação aos pacientes de TB e controles, com uma diferença aproximada de 2% entre AR e controles. A Análise de Poder Estatístico (Apêndice 4 e 5) revela que a amostragem na pesquisa não atingiu poder estatístico suficiente para detectar uma diferença de 2% entre as proporções p_1 (AR) e p_2 (Controles) para o alelo *PTPN22* 1858T. Para detectar uma diferença estatística com

magnitude de 2% entre estas proporções, estima-se uma amostra de cerca de 400 indivíduos por grupo. Portanto, com os dados apresentados nesta pesquisa não é possível descartar a associação entre o alelo *PTPN22* 1858T e a Artrite Reumatoide.

A diferença da frequência do alelo *TNF2* de AR, TB e controles é de aproximadamente 0,2%. Considerando a Análise de Poder Estatístico da amostra para este alelo (Apêndice 4 e 5), observa-se que para demonstrar uma diferença desta magnitude são necessários cerca de 40 mil indivíduos por grupo, mais que a população estimada de pessoas com AR no Amazonas, considerando uma prevalência de 1% para AR (cerca de 20 mil pacientes). Portanto, de um ponto de vista prático a associação do alelo *TNF2* com a AR ou TB não existe na população em estudo.

Tabela 5 – Distribuição dos Genótipos do Polimorfismo *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T em Populações Diferentes.

População	Ancestralidade	<i>TNF</i> -308 G/A (%)		<i>PTPN22</i> 1858 C/T (%)	
		G	A	C	T
CEU*	Europeia	78,3	21,7	84,2	15,8
HCB*	Asiática	96,7	3,3	94,3	5,7
JPT*	Asiática	97,7	2,3	97,8	2,2
YRI*	África Subsaariana	93,9	6,1	96,7	3,3
Amazonas	-	91,4	8,6	95,8	4,2
Índios Terena [§]	Ameríndios	100	0	-	-
Centro-Oeste [§]	-	81,1	18,9	-	-
Colômbia [†]	-	89	11	96	4
Chile [†]	-	90,7	9,3	-	-
México	-	95,7	4,3	-	-

* Frequências alélicas de populações do HapMap Project, fontes:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800629 acessado em 20/10/2010;

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2476601 acessado em 20/10/2010.

[†] Adaptado de Correa et al. (2005a). [†] Adaptado de Cuenca et al. (2001). [§] Adaptado de Albuquerque et al. (2004).

Conforme se observa na Tabela 5, as frequências dos alelos *TNF2* e *PTPN22* 1858T sofrem variações conforme a população observada. Nos europeus a frequência alélica atinge 15,8% para o *PTPN22* 1858T e 21,70% para o *TNF2*. Esta variação na frequência alélica está relacionada à maior prevalência de doenças autoimunes, como o Diabetes Mellitus Tipo 1, o

Lúpus Eritematoso Sistêmico e a AR (GOMEZ, L. et al., 2005; NAGY et al., 2010). Considerando que a frequência observada para os alelos mutantes no presente estudo foi baixa em controles e pacientes (4,2% para o *PTPN22* 1858T e 8,4% para o *TNF2*), esta pode ser mais uma razão para a ausência de associação estatística destes alelos à AR no Amazonas.

Neste sentido, cabe ressaltar as diferenças de formação étnica da Região Norte, que diferiu de outras regiões do Brasil, em sua composição, nos estudos com DNA mitocondrial (mDNA) (CALLEGARI-JACQUES et al., 2003). A ancestralidade étnica analisada por Callegari-Jacques et al. (2003) a partir de análise de mDNA, mostra uma variação na composição genética da população brasileira, por exemplo, os indivíduos da Região Norte apresentam maior influência Ameríndia e Europeia, enquanto os da Região Sudeste têm influência Negra e Europeia e os da Região Sul do Brasil mostraram têm grande influência europeia.

Foram identificadas variações nas frequências alélicas do *TNF2* quando são comparadas as populações do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil (VISENTAINER et al., 2008). O mesmo foi observado em relação ao polimorfismo *PTPN22* 1858 C/T (LINS et al., 2009). Esses achados tem uma enorme importância para os estudos experimentais de polimorfismos genéticos, pois sugerem que, para diferentes regiões do Brasil, podem haver diferentes padrões genéticos de doenças.

4.4 Influências da Tuberculose sobre os Polimorfismos *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T?

Embora não tenha sido observada associação entre os polimorfismos estudados e a TB, a hipótese de Mobley (2004) sobre influência da TB como fator de pressão seletiva sobre o genoma humano, predispondo populações às condições autoimunes, continua sendo intrigante e difícil de ser abandonada. A pressão seletiva continua sendo uma explicação

plausível para variações nas frequências alélicas mostradas anteriormente. Além disso, diversos genes envolvidos na resistência ou suscetibilidade à Tuberculose estão envolvidos, de algum modo, com a Artrite Reumatoide (QUESNIAUXA et al., 2010). Entre estes se destaca o polimorfismo do gene interferon- γ +847T/A fortemente associado a resistência contra TB (PACHECO et al., 2008).

Análises de haplótipos estendidos do *PTPN22* em homozigose mostraram evidências de forte pressão seletiva sobre o *locus PTPN22* (STANFORD et al., 2010). O mesmo alelo *PTPN22* 1858T, envolvido na etiopatogênese de condições autoimunes, tem sido implicado na suscetibilidade ao *Mycobacterium tuberculosis* (LAMSYAH et al., 2009). Gomez et al. (2005) também encontraram clara associação do alelo *PTPN22* 1858T com a TB como fator de suscetibilidade.

Correa et al. (2005a) mostraram que o alelo *TNF1* se mostrou associado ao risco à TB, ao mesmo tempo exercendo um efeito protetor contra autoimunidade. Os autores também perceberam que o polimorfismo *TNF* -238A protegia de autoimunidade, aumentando o risco para TB.. Porém, no presente estudo esta associação também não foi observada entre os polimorfismos *PTPN22* 1858 C/T e *TNF* -308 G/A com a TB.

A associação entre o alelo *TNF2* e a TB também não foi observada em meta-análise realizada por Pacheco et al. (2008). Porém, os autores observaram que houve um efeito protetor não significativo deste alelo contra TB, quando analisaram a composição dos estudos na meta-análise (“pooled odds ratio”).

Em concordância com a literatura, os autores atribuíram este efeito aos arranjos complexos dos blocos de haplótipos da região 6p21, sobretudo haplótipos envolvendo o gene da linfotóxina- α em frequente desequilíbrio de ligação com o SNP *TNF* -308 G/A. Também se pode destacar do estudo de Pacheco et al. (2008) que estudos de associação

com genes candidatos estão sujeitos a resultados diferentes, em razão da variação das composições haplotípicas na região 6p21 em populações diversas.

Santana et al. (2009) estudando HLA Classe II genérico em pacientes com Tuberculose pulmonar no Amazonas, observaram a associação entre o *HLA-DRB1*04* e o risco de tuberculose pulmonar. O mesmo HLA está envolvido na susceptibilidade à Artrite Reumatoide no Amazonas (BOECHAT, N. comunicação pessoal).

O efeito de pressão seletiva da TB sobre polimorfismos genéticos pró-inflamatórios deve ser visto como um fenômeno que evolui com o tempo (RIDLEY, 2006). Sabe-se que o Amazonas é uma região de alta prevalência e incidência de TB, com taxa de mortalidade elevada (MARREIRO et al., 2009). Além disso, a capital Manaus, concentra o maior número de casos de TB de todas as formas no Estado do Amazonas (SOUZA; PINHEIRO, 2010).

Torna-se difícil, entretanto, demonstrar a hipótese de Mobley (2004), baseando-se apenas nas informações obtidas para a população em estudo, já que não foi observado aumento do *TNF2* ou *PTPN22* 1858T entre pessoas com AR em relação à pessoas com TB e controles. Mas, é possível observar uma tendência na concentração de alelos *PTPN22* 1858T em pacientes com AR (4,2%) comparando-se com pacientes com TB (2,4%), porém sem significância estatística ($p=0,376$).

Quando apenas os pacientes de AR com manifestações sistêmicas como subgrupo foram comparados com o grupo de pacientes com TB, foi observado que o alelo *TNF2* ($p=0,001$, OR 2,57) e *PTPN22* 1858T ($p=0,026$, OR 3,41) estão associados à AR com manifestações extra-articulares, com frequência menor nos pacientes com TB (Tabela 6).

Tabela 6 – Frequência dos Polimorfismos *TNF* -308 G/A e *PTPN22* 1858 C/T em 34 pacientes de Artrite Reumatoide com Manifestações Sistêmicas e em 208 pacientes Tuberculose.

Polimorfismo	Formas Sistêmicas	Tuberculose	<i>p</i>	OR	Intervalo de Confiança
<i>TNF</i> -308 G/A					
A	12 (35,30%)	35 (17,5%)	0,001	2,57	1,16 – 5,68
G	22 (64,70%)	165 (82,5%)			
<i>PTPN22</i> 1858 C/T					
T	5 (14,70%)	10 (5,50%)	0,026	3,41	1,10 – 10,7
C	29 (85,52%)	198 (95,2%)			

Como a maior parte dos indivíduos com manifestações sistêmicas na amostra estudada tem Síndrome de Sjögren (15,9%), surge uma pergunta a ser respondida em estudos posteriores: a TB como fator de pressão seletiva influencia a frequência destes polimorfismos, aumentando o risco de Síndrome de Sjogren primária ou secundária? A associação oposta entre a Síndrome de Sjogren Primária e a TB foi observada por Correa et al. (2005a) em colombianos, quando analisaram frequência de polimorfismos de *TNF* entre diversas condições autoimunes e a tuberculose.

4.5 Análise da Influência do *TNF2* e *PTPN22* 1858T sobre as formas graves da Artrite Reumatoide

Os dados expostos na Tabela 7 revelam que o alelo *TNF2* está associado à AR com manifestações extra-articulares, bem como ao uso de medicação imunobiológica Anti-TNF. No nível de significância de $p < 0,05$ houve associação entre o polimorfismo *TNF2* e as manifestações sistêmicas da AR ($p = 0,001$), bem como ao uso de imunobiológicos ($p = 0,21$). Por outro lado, não foi observada associação entre *PTPN22* 1858T e manifestações sistêmicas da AR ($p = 0,071$), embora possa haver uma tendência, enquanto o mesmo alelo está associado ao uso de imunobiológicos ($p = 0,021$) (Tabela 8).

Não foi encontrada associação do alelo *TNF2* com idade no diagnóstico, sexo

($p=0,886$), Fator Reumatoide positivo ($p=0,839$), aposentadorias por invalidez ($p=0,169$), dias de afastamento do trabalho, DAS28 $>5,1$ ou HAQ elevado. Entre as variáveis clínicas e demográficas anteriores, o alelo *PTPN22* 1858T esteve associado apenas ao Fator Reumatoide positivo ($p=0,012$).

Tabela 7 – Distribuição de Alelos do polimorfismo *TNF* -308 G/A em 131 pacientes de Artrite Reumatoide.

Alelos	Sistêmicos	Não-Sistêmicos	<i>p</i>	OR	Intervalo de Confiança
A	12	10	0,001	4,75	1,82 – 12,40
G	22	87			
	Biológicos	DMARDS	<i>p</i>		
A	13	9	0,021	2,93	1,15 – 7,49
G	36	73			

Tabela 8 – Distribuição de Alelos do polimorfismo *PTPN22* 1858 C/T em 131 pacientes de Artrite Reumatoide.

Alelos	Sistêmicos	Não-Sistêmicos	<i>p</i>	OR	Intervalo de Confiança
T	5	5	0,071	3,17	0,83 – 11,73
C	29	92			
	Biológicos	DMARDS	<i>p</i>		
T	7	3	0,021	4,39	1,08 – 17,86
C	42	79			

As manifestações sistêmicas graves da AR compartilham mecanismos imunológicos e inflamatórios: a) hiperprodução sistêmica de citocinas; b) imunocomplexos circulantes; c) ativação endotelial sistêmica; d) infiltração local de Célula B e T; e) Célula T CD28^{null} circulante, com perfil de imunosenescência (TURESSON, C. et al., 2003). Os fatores preditivos de manifestações sistêmicas incluem variáveis clínicas (tabagismo), sorológicas (Fator Reumatoide e Anti-CCP positivos) e genéticas (*alelos HLA-DRB1*). O tabagismo se mostrou um fator de risco independente para manifestações sistêmicas da AR (TURESSON, C et al., 2003).

Todavia, no presente trabalho, a história de tabagismo não se mostrou associado às

manifestações sistêmicas da AR ($p=0,312$), porém as formas sistêmicas estão associadas ao Fator Reumatoide positivo ($p=0,015$) (Tabela 6.3.6). Cabe, entretanto, observar que na população estudada neste trabalho, apenas 3,1% dos pacientes são fumantes habituais e 33,3% têm história de tabagismo. A história de tabagismo inclui pacientes que fumaram pelo menos meia carteira de cigarros/mês, por seis meses, nos últimos 10 anos. Por outro lado, segundo PNAD, o Amazonas tem uma das menores taxas de tabagismo entre os estados brasileiros – 13%. Portanto, sob um ponto de vista populacional, o tabagismo pode não ser um fator de risco importante para AR no Amazonas.

O alelo *PTPN22* 1858T, mostrou-se associado ao Fator Reumatoide ($p=0,012$) assim como observado por outros autores (Tabela 6.3.6) (LEE et al., 2005; JOHANSSON et al., 2006; OROZCO et al., 2008). Acredita-se que o alelo *PTPN22* 1858T possa estar envolvido na gênese de auto-anticorpos na membrana sinovial inflamada (LEE et al., 2005).

Os alelos *HLA-DRB1* os quais aumentam a suscetibilidade à AR, são, por outro lado, preditores da gravidade da doença, incluindo as manifestações sistêmicas da AR. Esta associação é observada principalmente no Norte da Europa, nos indivíduos com duplo alelo *HLA-DRB1*04* do epítipo compartilhado (TURESSON; MATTESON, 2009). Este fenômeno com “efeito de dose” dos alelos *HLA-DRB1*04* pode ser explicado por um efeito sobre a seleção e ativação das células T, através da interação entre o MHC de Classe II e o TCR (TURESSON et al., 2004).

Na Tabela 9, estão listados os fatores de risco identificados para manifestações extra-articulares: tempo doença maior que 10 anos ($p=0,019$), idade maior que 60 anos ($p=0,031$) e do FR positivo ($p= 0,015$). Quando estes fatores são analisados em conjunto, com modelo de Regressão Logística Binária, o alelo *TNF2* ($p=0,001$; OR=6,58), o Fator Reumatoide positivo ($p=0,022$; OR=2,51), o Tempo de Doença ($p=0,001$; OR = 1,13) e a Idade Maior que

60 anos ($p=0,007$; OR = 1,64), são preditivos para manifestações sistêmicas da AR, ao nível de significância de 0,05 ($p=0,0001$) (Tabela 10). O alelo *PTPN22* 1858T não foi associado como preditor de risco para manifestações sistêmicas ($p=0,180$) em modelo de Regressão Logística Binária (Tabela 11).

Tabela 9 – Fatores de Risco Associados com Manifestações Sistêmicas da Artrite Reumatoide em 131 Pacientes no Amazonas*.

Fatores de Risco	Artrite Reumatoide	Formas Sistêmicas	<i>p</i>	OR	Intervalo de Confiança
Idade > 60 anos	12/98 (12,2%)	12/34 (34,2%)	0,003	2,88	1,18 – 7,02
TD > 10 anos	11/43 (15,3%)	15/98 (32,3%)	0,019	2,65	1,07 – 6,54
Sexo Feminino	88/98 (89,8%)	31/34 (91,1%)	0,816	–	–
Tabagismo	31/98 (31,6%)	14/34 (41,2%)	0,312	–	–
Fator Reumatoide	69/98 (70,4%)	31/34 (91,1%)	0,015	4,64	1,32 – 16,34
DAS28 > 5,1	60/98 (38,7%)	23/34 (32,3%)	0,504	–	–
HAQ > 2,5	21/98 (21,2%)	9/34 (26,4%)	0,546	–	–
<i>TNF2</i>	10/97 (10,3%)	12/32 (37,5%)	0,001	4,75	1,82 – 12,40
<i>PTPN22</i> 1858T	5/34 (14,7%)	5/97 (5,1%)	0,071	–	–

* Análise univariada com χ^2 ao nível de significância 0,05.

Tabela 10 – Tabela de Regressão Logística Binária para Fatores de Associados ao Risco de Manifestações Sistêmicas da Artrite Reumatoide e o Alelo *TNF* -308 G/A*.

Variáveis Preditivas	<i>p</i>	OR	Intervalo de Confiança
Alelo <i>TNF2</i>	0,001	6,58	2,07 – 20,95
Idade > 60 anos	0,007	1,64	1,14 – 2,36
Tempo de Doença	0,001	1,13	1,05 – 1,21
Fator Reumatoide	0,022	2,51	1,14 – 5,52

* Modelo de Regressão Logística significativo para $p < 0,0001$.

Tabela 11 – Tabela de Regressão Logística Binária para Fatores de Associado ao Risco de Manifestações Sistêmicas da Artrite Reumatoide e o Alelo *PTPN22* 1858 C/T*.

Variáveis Preditivas	<i>p</i>	OR	Intervalo de Confiança
Alelo <i>PTPN22</i> 1858T	0,180	2,70	0,63 – 11,55
Idade > 60 anos	0,003	1,70	1,20 – 2,41
Tempo de Doença	0,002	1,12	1,04 – 1,19
Fator Reumatoide	0,033	2,33	1,07 – 5,08

* Modelo de Regressão Logística significativo para $p < 0,0001$.

Com a finalidade de analisar detalhadamente a influencia do alelo *TNF2* sobre as formas graves da AR, comparando-se o efeito de combinação das diferentes variáveis, quatro modelos de regressão construídos: a) Modelo 0: incluindo idade acima de 60 anos,

anos de duração de doença e o fator reumatoide; b) Modelo 1: incluindo idade acima de 60 anos, duração da doença, fator reumatoide e o alelo *TNF2*; c) Modelo 2: incluiu idade acima de 60 anos, anos de duração da doença acima de 10 anos, fator reumatoide e o alelo *TNF2*. O quarto modelo foi construído para analisar a influencia do *TNF2* sobre a probabilidade de um paciente com AR vir a usar drogas Anti-TNF (Tabela 12). A Tabela 13 apresenta os resultados da análise da calibração e discriminação dos quatro modelos.

Tabela 12 – Modelos de Regressão Logística para o Alelo *TNF2* e os Fenótipos de Gravidade da Artrite Reumatoide.

Variáveis Predictoras	Coefficientes	<i>p</i>	Odds Ratio	IC - 95%
Modelo 0^a				
Constante	-2,8712	0,0001	–	–
Idade > 60 anos	1,4429	0,0040	4,23	1,60 – 11,22
Fator Reumatoide	0,6717	0,0420	1,96	1,02 – 3,74
Duração da Doença	0,0670	0,0480	1,10	1,00 – 1,14
Modelo 1^b				
Constante	-3,2976	0,0001	–	–
Idade > 60 anos	1,4308	0,0060	4,18	1,50 – 11,70
Duração da Doença	0,7029	0,0420	1,10	1,00 – 1,15
Fator Reumatoide	0,6899	0,0450	1,99	1,02 – 3,91
Alelo <i>TNF2</i>	1,7152	0,0020	5,56	1,89 – 16,33
Modelo 2^c				
Constante	-3,2652	0,0001	–	–
Idade > 60 anos	0,5262	0,0080	4,06	1,45 – 11,38
Duração Doença > 10 anos	0,5227	0,0310	3,10	1,11 – 8,63
Fator Reumatoide	0,7294	0,0350	2,07	1,05 – 4,09
Alelo <i>TNF2</i>	1,7737	0,0010	5,89	1,98 – 17,51
Modelo 3^d				
Constante	-1,0440	0,0001	–	–
Duração da Doença	0,0661	0,0460	3,04	1,17 – 7,91
Alelo <i>TNF2</i>	1,1118	0,0230	1,10	1,00 – 1,14

^a *p* = 0,0001, ^b *p* = 0,0001, ^c *p* = 0,0001, ^d *p* = 0,0090.

Tabela 13 – Validação dos Modelos de Regressão Logística por Calibração e Discriminação.

	Calibração: Hosmer-Lemeshow χ^2	Discriminação: ROC AUC (95% CI)	Sensibilidade	Especificidade
Modelo 0	7.345 (0.394)	0.75 (0.69 – 0.87)	9.7%	77.4%
Modelo 1	5.674 (0.689)	0.81 (0.73 – 0.89)	11.3%	78.6%
Modelo 2	0.574 (0.967)	0.80 (0.70 – 0.88)	8.4%	92.6%
Modelo 3	7.320 (0.450)	0.71 (0.61 – 0.78)	19%	74%

A observação dos quatro modelos de regressão apresentada na Tabela 12 demonstra que quando o alelo *TNF2* é inserido no modelo com as principais variáveis preditoras para doença sistêmica, o Modelo 2 mostra variáveis com maior odds ratio. Além disso, o Modelo 2 apresenta melhor calibração (0,574; $p=0,967$), com boa acurácia (AUC 0,80). Os Gráficos 2 e 3 mostram as respectivas Curvas ROC para os modelos apresentados na Tabela 13.

Isto se deve a participação tanto do alelo *TNF2* quanto do Tempo de Doença maior 10 anos como variáveis preditoras neste modelo. A análise de calibração e discriminação também torna notório o efeito do alelo *TNF2*, considerando que sua inclusão no modelo 1, melhora sua calibração, sua capacidade discriminativa, assim como aumenta sua especificidade e sensibilidade, quando comparado ao Modelo 0 que não inclui o alelo *TNF2* (Tabela 13). Esses resultados mostram claramente que não só o alelo *TNF2* eleva a probabilidade de doença sistêmica, como também, esse efeito é maior em pacientes com mais de 60 anos e/ou tempo de doença superior a 10 anos. Esse efeito pode ser observado no Gráfico 1, onde a probabilidade de doença sistêmica aumenta em função do tempo de doença.

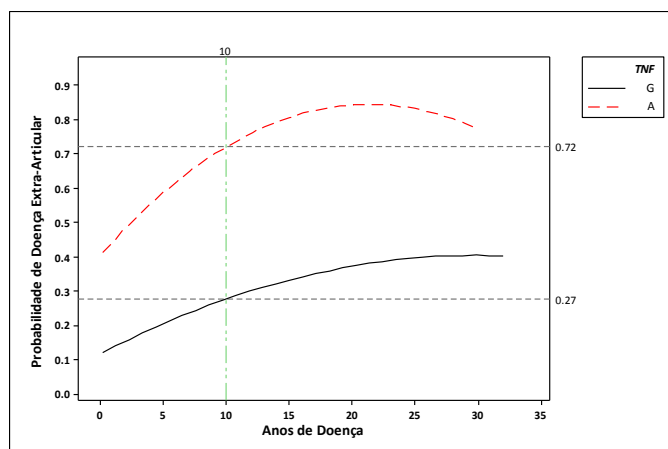


Gráfico 1 – Probabilidade de Doença Sistêmica em Pacientes com Artrite Reumatoide em Função do Tempo de Doença e do Alelo *TNF2*.

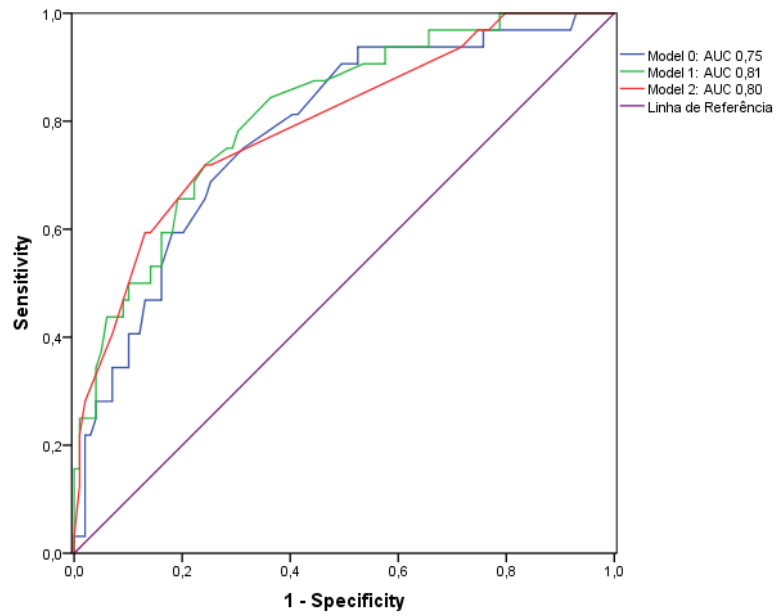


Gráfico 2 – Curva ROC para os Modelos Apresentados na Tabela 13.

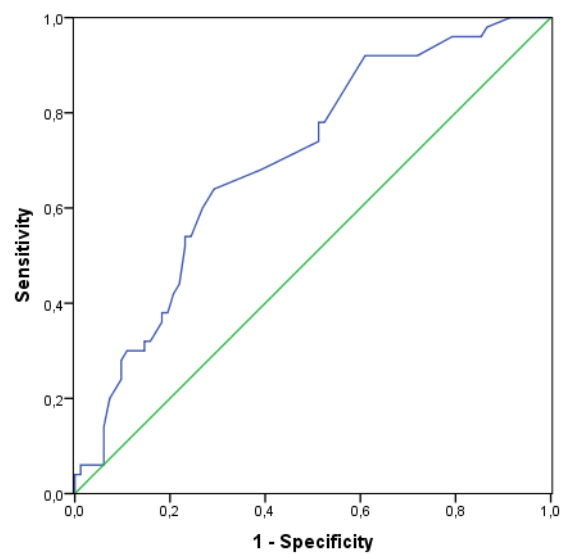


Gráfico 3 – Curva ROC para Modelo 2 com AUC 0.7 mostrando bom ajuste do modelo.

Deve-se observar ainda que, o Modelo 3 demonstra que o alelo *TNF2* é uma variável preditora para uso de medicações Anti-TNF (Tabela 12). Além disso, aplicando-se o Modelo 3, fica evidente que a probabilidade de uso destas medicações aumenta com o tempo de doença. A probabilidade calculada para uso de Anti-TNF em pacientes com cinco anos de doença, mas sem o alelo *TNF2* é 32,87%, enquanto alcança 59,82% em indivíduos portadores deste alelo – um aumento de 26,95% na probabilidade de uso destas medicações.

As manifestações sistêmicas na AR representam condições graves não só porque reduz a qualidade de vida, mas porque também estão associadas a maior morbimortalidade dos pacientes, especialmente por doença cardiovascular (TURESSON; MATTESSON, 2011). Grande parte das informações a respeito da doença sistêmica na AR foram obtidas a partir de populações caucasianas, nas quais a prevalência de manifestações extra-articulares atinge 15% dos casos com a evolução da doença. Assim, os principais fatores de risco identificados para esta condição foram o fator reumatoide positivo ou a presença do anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico, além de tabagismo e a idade (TURESSON; JACOBSSON, 2004).

A imunosenescência é um conhecido mecanismo de autoimunidade e várias evidências sugerem sua participação na imunopatogênese da AR, envolvendo tanto a susceptibilidade para a doença como para suas comorbidades (GORONZY et al., 2010). A senescência imune AR aumenta de células T $CD4^+CD28^{null}$ que, por sua vez, estão associadas a formas mais graves da doença. Na AR precoce, a frequência de células T $CD4^+CD28^{null}$ é um fator preditivo para formas de doença mais progressivas e erosivas. Por outro lado, na doença estabelecida a frequência destas células se correlaciona com as manifestações extra-articulares (MARTENS et al., 1997; GORONZY et al., 2004). Uma alta frequência deste tipo celular é vista na doença nodular reumatoide, sendo que a maior frequência observada para

estas células é encontrada na vasculite reumatoide. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que o efeito de associação entre a idade avançada, longo tempo de doença e o alelo pro-inflamatório *TNF2* não é fortuita, mas um efeito aditivo e de interação entre a senescência imunológica e um estado pró-inflamatório subjacente, que aumenta a frequência de manifestações extra-articulares, como também piora a resposta aos DMARDS tradicionais.

Com a senescência imunológica há uma progressiva perda da capacidade de reparo do DNA. Em decorrência, segue-se a ativação da maquinaria de apoptose, cujo saldo é a perda crônica de células T (GORONZY et al., 2010). A linfopenia resultante é compensada com proliferação homeostática das células T, o que aumenta o risco de autoimunidade. Segundo Goronzy et al. (2010), o modo pelo qual esse fenômeno de proliferação celular leva a autoimunidade envolve: a) uma seleção periférica de repertório de células T com TCR autorreativos; b) a proliferação homeostática produz linfócitos T que não são específicos para antígenos sinoviais e são encontradas no sangue periférico, podendo reconhecer peptídeos próprios fora da membrana sinovial. Este parece ser um passo favorável para o desenvolvimento de formas extra-articulares da AR, sobretudo em pacientes de idade avançada e com mais tempo de doença.

É possível que o fenótipo pró-inflamatório produzido pelo alelo *TNF2* participe de diferentes maneiras nos fenômenos de imunosenescência. Alguns autores demonstraram, recentemente, que as células T na AR tem um desequilíbrio da via de sinalização Raf-Mek-ERK (“Ras/Raf-mitogen activated Protein kinase /extracellular signal-regulated kinase”) (SINGH et al., 2008). Esse sistema está envolvido na regulação da ativação inicial do TCR, pela da fosforilação de Lck que impede o recrutamento da SHP-1, cujo resultado é a interrupção precoce da sinalização do TCR. Na imunosenescência da AR, há um viés de

seleção e proliferação no repertório de células T autorreativas que, por mudanças de calibração do TCR, tornam-se hiperativadas e reagem a estímulos subótimos (SINGH et al., 2009). Portanto, torna-se compreensível que, as interações dos alelos de epítipo compartilhado do *HLA-DRB1* com um *pool* de TCR autorreativo selecionado, sem tropismo pela membrana sinovial inflamada, possam estar envolvidas na gênese das manifestações sistêmicas da AR, num cenário fenotípico onde altos níveis circulantes de TNF estejam presentes.

A possibilidade do envolvimento destas modificações funcionais da célula T na imunopatogênese de manifestações extra-articulares da AR, foi também sugerida por um achado, muito sugestivo, da participação de células T CD4⁺ na doença inflamatória intersticial pulmonar (DIIP) da AR. Marcações específicas em exames histológicos da DIIP revelam que em pacientes com AR, as células T CD4⁺ estão no tecido do pulmão reumatoide, mas não na histologia da doença intersticial pulmonar *idiopática*. A participação de células T desreguladas específicas na AR, podem ter um papel na imunopatogênese do pulmão reumatoide, com grandes implicações para terapias inovadoras (TURESSON et al., 2005).

A ausência de associação entre o polimorfismo *PTPN22* 1858T com as manifestações extra-articulares da AR pode estar relacionada à mecanismos imunopatogênicos da senescência imune. Conforme discutido anteriormente neste trabalho, a mutação C>T na posição 1858 do gene *PTPN22*, produz um ganho de função na proteína Lyp que inibe acentuadamente a via de sinalização do TCR (STANFORD et al., 2010). Sendo assim, o estado hiper-reativo dos Linfócitos T na AR produzido pelo desequilíbrio do Sistema Raf-Mek-ERK, pode ser balanceado pelo ganho de função da Lyp em pacientes portadores do alelo *PTPN22* 1858T (CHISTIAKOV; CHISTIAKOVA, 2010). Esta hipótese não foi confirmada, mas trata-se de um mecanismo imunopatogênico importante a ser explorado.

A importância da associação do polimorfismo *TNF* -308 G/A e as formas sistêmicas da AR pode ainda ser destacada por outro aspecto. Há a possibilidade de sua influência genética indireta, já que o alelo *TNF2* eventualmente está em desequilíbrio de ligação com outros genes relacionados à inflamação e autoimunidade, tais como os alelos do epítipo compartilhado (CRISWELL et al., 2004). Isto já foi observado entre o polimorfismo *TNF* -836A e o *HLA-DRB1*0405* (HIRANKARN et al., 2007), e ainda, para os polimorfismos *TNF* -238A e -308A e *HLA-DR7* em pacientes com TB pulmonar (SELVARAJ et al., 2001).

A epidemiologia genética da AR na América Latina, os alelos *HLA-DRB1*0404* e *TNF2*, tem sido estabelecida de maneira uniforme (DELGADO-VEGA et al., 2006; DELGADO-VEGA; ANAYA, 2007). Achados de outros autores também mostram que o alelo *TNF2* pode estar envolvido no risco de formas mais graves da AR em mexicanos, de forma independente dos alelos de epítipo compartilhado (RODRIGUEZ-CARREON et al., 2005).

O polimorfismo de *TNF* -308 G/A foi associado em vários estudos, a uma resposta clínica insatisfatória aos imunobiológicos Anti-TNF (KREJSA et al., 2006; PLENGE; CRISWELL, 2008; O'RIELLY et al., 2009). Esses resultados também ficaram evidentes em estudos GWAS (LIU et al., 2008). Além disso, dois haplótipos estendidos entre *HLA-DRB1*0404*, *0101 e seis SNP dos genes *LTF* e *TNF*, foram associados à resposta ao tratamento com metotrexate ou etanercept (CRISWELL et al., 2004).

O presente trabalho não avaliou de forma prospectiva a resposta de medicações imunobiológicas no tratamento da AR, em pacientes portadores de polimorfismos *TNF* -308 G/A e *PTPN 1858 C/T*. No entanto, ambos os polimorfismos estão associados ao uso de imunobiológicos ($p= 0,21$; $p=0,21$, respectivamente). Isto sugere que a resposta clínica do tratamento da AR, na presença dos alelos *TNF2* e *PTPN22 1858T*, é mais eficiente aos imunobiológicos Anti-TNF em relação ao tratamento com DMARDS. No caso do alelo *TNF2*,

este fenômeno parece estar relacionado a hiperprodução de TNF(GOMES et al., 2010). Apenas o estudo de Potter et al. (2009), na Inglaterra, avaliou a influência do alelo *PTPN22* 1858T no tratamento com imunobiológicos, mas concluiu que este polimorfismo, bem como o epítipo compartilhado não exercem influência sobre a resposta aos Anti-TNF.

Por fim, considerando as variações genéticas aqui discutidas para populações brasileiras e de outras latino-americanas, é preciso ressaltar que diferenças importantes na epidemiologia genética podem ser observadas para a AR, bem como para TB em diferentes populações (KOCHI, Y. et al., 2010). Fatores de risco genéticos clássicos em caucasianos, não estão necessariamente envolvidos com a AR em outras populações tais como as latino-americanas (OROZCO; BARTON, 2010).

Apenas um terço das pessoas com AR na América Latina são portadores de alelos *HLA-DRB1* do epítipo compartilhado, indicando que outros genes não relacionados ao HLA podem estar envolvidos com a AR nestas populações (DELGADO-VEGA et al., 2006). Neste sentido, o *PTPN22* 1858T, alelo de alto risco para autoimunidade em caucasianos, pode ser usado como exemplo, pois não foi associado à AR em latino-americanos, como também nos pacientes deste estudo. Portanto, a discussão dos resultados obtidos, ressaltam a importância dos estudos em genética molecular das doenças autoimunes em populações da Amazônia Brasileira.

CONCLUSÕES

- a) As características clínicas e demográficas de pessoas com Artrite Reumatoide no Amazonas são semelhantes às de outras populações latino-americanas quanto à idade, distribuição por sexo, escolaridade e padrão de acometimento articular inicial, embora na Artrite Reumatoide precoce tenha um padrão inflamatório menos intenso.
- b) O alelo *TNF2* não está associado ao risco de Artrite Reumatoide no Amazonas. No entanto, está associado às manifestações sistêmicas da doença.
- c) Os alelos *TNF2* e *PTPN22* 1858T não influenciam o DAS28, o HAQ, a idade de início da doença, ou mesmo, a forma predominante de acometimento articular em pacientes amazonenses com Artrite Reumatoide precoce.
- d) O alelo *PTPN22* 1858T está associado ao Fator Reumatoide positivo na população estudada. Porém, o alelo *PTPN22* 1858T não está associado à AR ou a Tuberculose na população observada.
- e) A idade acima de 60 anos, o tempo de doença maior que 10 anos e o Fator Reumatoide positivo, estão associados às manifestações sistêmicas da Artrite Reumatoide em pacientes do Amazonas.
- f) Os alelos *TNF2* e *PTPN22* 1858T estão associados ao uso de medicação imunobiológica, pressupondo o envolvimento destes alelos na atividade de TNF na AR, mas estudos prospectivos são necessários para confirmar a influência destes alelos no tratamento da Artrite Reumatoide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 745-56, Sep 2003.

AGUILLON, J. C.; CRUZAT, A.; ARAVENA, O. et al. Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? **Immunobiology**, v. 211, n. 1-2, p. 75-84, 2006.

AHO, K.; KOSKENVUO, M.; TUOMINEN, J. et al. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. **J Rheumatol**, v. 13, n. 5, p. 899-902, Oct 1986.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 3, p. 130-6, Mar 2005.

ALAMANOS, Y.; VOULGARI, P.; DROSOS, A. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. **J Rheumatol**, v. 36, p. 182-188, 2006.

ALBUQUERQUE, A. G.; MORAES, M.; VANDERBORGHT, P. R. et al. Tumor necrosis factor and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Brazilian population and in Terena Indians. **Transplant Proc**, v. Array, n. Array, p. 825-6, 2004.

ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. **BMJ**, v. 309, n. 6948, p. 188, Jul 16 1994.

ANDERSEN, J. N.; JANSEN, P. G.; ECHWALD, S. M. et al. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. **FASEB J**, v. 18, n. 1, p. 8-30, Jan 2004.

ANDERSEN, J. N.; MORTENSEN, O. H.; PETERS, G. H. et al. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 21, p. 7117-36, Nov 2001.

ANNUNZIATO, F.; COSMI, L.; LIOTTA, F. et al. Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 6, p. 325-331, 2009.

APPELBOOM, T. Hypothesis: Rubens--one of the first victims of an epidemic of rheumatoid arthritis that started in the 16th-17th century? **Rheumatology (Oxford)**, v. 44, n. 5, p. 681-3, May 2005.

APPELBOOM, T.; BOELPAEPE, C.; EHRLICH, G. E. et al. Rubens and the question of antiquity of rheumatoid arthritis. **JAMA**, v. 245, n. 5, p. 483-6, Feb 6 1981.

ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 31, n. 3, p. 315-24, Mar 1988.

BALOG, A.; GAL, J.; GYULAI, Z. et al. Tumour necrosis factor-alpha and heat-shock protein 70-2 gene polymorphisms in a family with rheumatoid arthritis. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 51, n. 3, p. 263-9, 2004.

BANG, S. Y.; LEE, K. H.; CHO, S. K. et al. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 2, p. 369-377, 2010.

BARROS, M.; CÉSAR, C.; CARANDINA, L. et al. Desigualdades sociais na prevalência de doenças crônicas no Brasil, PNAD-2003. **Ciênc. saúde coletiva**, p. 911-926, 2006.

BAUGH, J. A.; BUCALA, R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. **Curr Opin Drug Discov Devel**, v. 4, n. 5, p. 635-50, Sep 2001.

BAYLEY, J. P.; OTTENHOFF, T. H. M.; VERWEIJ, C. L. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? **Genes and immunity**, v. 5, n. 5, p. 315-329, 2004.

BEGOVICH, A. B.; CARLTON, V. E.; HONIGBERG, L. A. et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet**, v. 75, n. 2, p. 330-7, Aug 2004.

BERG, W. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 5, p. 250, 2009.

BÉRTOLO, M.; BRENOL, C.; SCHAINBERG, C. et al. Update on the brazilian consensus for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47,

p. 151-159, 2007.

BOTTINI, N.; MUSUMECI, L.; ALONSO, A. et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nat Genet**, v. 36, n. 4, p. 337-8, Apr 2004.

BRAVO, M. J.; COLMENERO, J. D.; QUEIPO-ORTUNO, M. I. et al. PTPN22 C1858T polymorphism and human brucellosis. **Scand J Infect Dis**, v. 41, n. 2, p. 109-12, 2009.

BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 11, p. 3537-45, Nov 2008.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-86, Jul 8 1999.

CAETANO-LOPES, J.; CANHAO, H.; FONSECA, J. E. Osteoimmunology--the hidden immune regulation of bone. **Autoimmun Rev**, v. 8, n. 3, p. 250-5, Jan 2009.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M. et al. Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, n. 6, p. 824-834, 2003.

CARVALHO, M. A. P.; BÉRTOLO, M. B.; PINTO, M. R. C. Artrite Reumatoide. In: CARVALHO, M. A. P.; LANNA, C. C. D., et al (Ed.). **Reumatologia: Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. cap. 22, p.309-328.

CHERMONT, G. C.; KOWALSKI, S. C.; CICONELLI, R. M. et al. Resource utilization and the cost of rheumatoid arthritis in Brazil. **Clin Exp Rheumatol**, v. 26, n. 1, p. 24-31, Jan-Feb 2008.

CHISTIAKOV, D. A.; CHISTIAKOVA, E. I. T-cell protein tyrosine phosphatase: A role in inflammation and autoimmunity. **International Journal of Diabetes Mellitus**, v. 2, n. 2, p. 114-118, 2010.

CICONELLI, R. M.; SOÁREZ, P. C. D.; KOWALSKI, C. C. G. et al. The Brazilian Portuguese version of the Work Productivity and Activity Impairment : General Health (WPAI-GH) Questionnaire. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 124, p. 325-332, 2006.

CLELAND, L. G.; JAMES, M. J.; PROUDMAN, S. M. The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. **Drugs**, v. 63, n. 9, p. 845-53, 2003.

COOPER, G.; STROEHLA, B. The epidemiology of autoimmune diseases. **Autoimmunity reviews**, v. 2, n. 3, p. 119-125, 2003.

CORREA, P. A.; GOMEZ, L. M.; ANAYA, J. M. Polymorphism of TNF-alpha in autoimmunity and tuberculosis. **Biomedica**, v. 24 Supp 1, p. 43-51, Jun 2004.

CORREA, P. A.; GOMEZ, L. M.; CADENA, J. et al. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. **J Rheumatol**, v. 32, n. 2, p. 219-24, Feb 2005a.

CORREA, P. A.; GOMEZ, L. M.; CADENA, J. et al. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. **The Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 219-224, February 2005 2005b.

CRISWELL, L. A.; LUM, R. F.; TURNER, K. N. et al. The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 9, p. 2750-6, Sep 2004.

CUENCA, J.; PÉREZ, C. A.; AGUIRRE, A. J. et al. Genetic polymorphism at position -308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): Implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population. **Biological Research**, v. 34, p. 237-241, 2001.

CVETKOVIC, J. T.; WALLBERG-JONSSON, S.; STEGMAYR, B. et al. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. **J Rheumatol**, v. 29, n. 2, p. 212-9, Feb 2002.

DANIS, V. A.; MILLINGTON, M.; HYLAND, V. et al. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Dis Markers**, v. 12, n. 2, p. 127-33, Mar 1995.

DE AZEVEDO, A. B.; FERRAZ, M. B.; CICONELLI, R. M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Value Health**, v. 11, n. 5, p. 869-77, Sep-Oct 2008.

DEANE, K.; NORRIS, J.; HOLERS, V. Preclinical Rheumatoid Arthritis: Identification, Evaluation, and Future Directions for Investigation. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 213-241, 2010.

DELGADO-VEGA, A. M.; ANAYA, J. M. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin

American patients with rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 6, n. 6, p. 402-8, Jun 2007.

DELGADO-VEGA, A. M.; MARTIN, J.; GRANADOS, J. et al. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis: what to expect from Latin America? **Biomedica**, v. 26, n. 4, p. 562-84, Dec 2006.

ELAHI, M. M.; ASOTRA, K.; MATATA, B. M. et al. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 3, p. 163-72, Mar 2009.

FALVO, J. M.; TSYTSYKOVA, A. V.; GOLDFELD, A. E. Transcriptional Control of the TNF Gene. In: KOLLIAS, G. e SFIKAKIS, P. P. (Ed.). **TNF Pathophysiology**. Basel: Karger, v.11, 2010. p.28-60. (Current Direction in Autoimmunity).

FARIAS, A. C.; ANDRADE, L. E. C. HLA e polimorfismos gênicos na Artrite Reumatoide. In: BASTOS, L. (Ed.). **Estudos de Associação HLA x Doenças: Extratos do 1º Simpósio Brasileiro**. Rio de Janeiro: Eduerj, 2007. cap. 113-134,

FEERO, W. G.; GUTTMACHER, A. E.; MANOLIO, T. A. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 2, p. 166-176, 2010.

FERRAZ, M. B.; OLIVEIRA, L. M.; ARAUJO, P. M. et al. Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. **J Rheumatol**, v. 17, n. 6, p. 813-7, Jun 1990.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356-61, May 15 2003.

FRAZER, K. A.; BALLINGER, D. G.; COX, D. R. E. A. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 851-61, Oct 18 2007.

FRIES, J. F.; SPITZ, P.; KRAINES, R. G. et al. Measurement of patient outcome in arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 23, n. 2, p. 137-45, Feb 1980.

FUNOVITS, J.; ALETAHA, D.; BYKERK, V. et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Methodological Report Phase I. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 9, p.

1589-1595, September 1 2010.

GABRIEL, S. E.; CROWSON, C. S.; KREMERS, H. M. et al. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. **Arthritis Rheum**, v. 48, n. 1, p. 54-8, Jan 2003.

GARROD, A. **The nature and treatment of gout and rheumatic gout**. London: Walton & Malberly, 1859.

GERLI, R.; SHERER, Y.; BOCCI, E. B. et al. Precocious atherosclerosis in rheumatoid arthritis: role of traditional and disease-related cardiovascular risk factors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1108, p. 372-81, Jun 2007.

GIERUT, A.; PERLMAN, H.; POPE, R. M. Innate Immunity and Rheumatoid Arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 271-296, 2010.

GLADAR. Demographic and Clinical Characteristics of Early Rheumatoid Arthritis (RA) in a Inception Cohort of Latin American Patients. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 12 Suppl, n. 4, p. 128, 2009.

GOMES, F. M.; BIANCO, B.; TELES, J. S. et al. PTPN22 C1858T polymorphism in women with endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. Array, n. Array, p. 227-32, 2010.

GOMEZ, L.; ANAYA, J.; GONZALEZ, C. et al. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. **Genes and immunity**, v. 6, n. 7, p. 628-631, 2005.

GOMEZ, L. M.; ANAYA, J. M.; MARTIN, J. Genetic influence of PTPN22 R620W polymorphism in tuberculosis. **Hum Immunol**, v. 66, n. 12, p. 1242-7, Dec 2005.

GORONZY, J. J.; MATTESON, E. L.; FULBRIGHT, J. W. et al. Prognostic markers of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 1, p. 43-54, Jan 2004.

GORONZY, J. J.; SHAO, L.; WEYAND, C. M. Immune aging and rheumatoid arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 297-310, 2010.

GREGERSEN, P. K.; SHEN, M.; SONG, Q. L. et al. Molecular diversity of HLA-DR4 haplotypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 8, p. 2642-6, Apr 1986.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 30, n. 11, p. 1205-13, Nov 1987.

GUSTINCICH, S.; MANFIOLETTI, G.; DEL SAL, G. et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 302, Sep 1991.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. **Hum Immunol**, v. 62, n. 11, p. 1191-9, Nov 2001.

HARRISON, B. J. Influence of cigarette smoking on disease outcome in rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 14, n. 2, p. 93-7, Mar 2002.

HARRISON, B. J.; SILMAN, A. J.; HIDER, S. L. et al. Cigarette smoking as a significant risk factor for digital vascular disease in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 12, p. 3312-6, Dec 2002.

HARRISON, P.; POINTON, J. J.; FARRAR, C. et al. Effects of PTPN22 C1858T polymorphism on susceptibility and clinical characteristics of British Caucasian rheumatoid arthritis patients. **Rheumatology (Oxford)**, v. 45, n. 8, p. 1009-11, Aug 2006.

HIRANKARN, N.; NAKKUNTOD, J.; DUANGCHALERMWONG, P. et al. The association of DRB1*04 share epitope alleles and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism (-863) with susceptibility to rheumatoid arthritis in Thai. **Rheumatol Int**, v. 28, n. 2, p. 161-5, Dec 2007.

HOCHBERG, M. C. **Rheumatoid arthritis**. 1st. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2009. xx, 441 p. ISBN 9780323054751 (hbk.).

HOCHBERG, M. C.; OLIVER, J. E.; SILMAN, A. J. Risk Factors for Rheumatoid Arthritis: Other Nongenetic Host Factors. In: HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J., et al (Ed.). **Rheumatoid Arthritis**. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2009. cap. 3C, p.35-38.

HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A.; SMOLEN, J. et al. **Rheumatology**. 4th. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2007. 1009 ISBN 978-0-323-03364-0.

HOLLEGAARD, M. V.; BIDWELL, J. L. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line

databases, Supplement 3. **Genes Immun**, v. 7, n. 4, p. 269-76, Jun 2006.

HOLOSHITZ, J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 22, n. 3, p. 293-298, 2010.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. New York: Wiley, 2000.

IMBODEN, J. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 4, p. 417-434, 2009.

ISAACS, J. D. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 8, p. 605-611, 2010.

JACKSON, J. M. TNF- alpha inhibitors. **Dermatol Ther**, v. 20, n. 4, p. 251-64, Jul-Aug 2007.

JOHANSSON, M.; ARLESTIG, L.; HALLMANS, G. et al. PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 1, p. R19, 2006.

JONG, B. A.; WESTENDORP, R. G.; BAKKER, A. M. et al. Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production. **Genes Immun**, v. 3, n. 1, p. 25-9, Feb 2002.

JÖNSSON, B.; KOBELT, G.; SMOLEN, J. Patient access to rheumatoid arthritis treatments. **The European Journal of Health Economics**, v. 8, n. 0, p. 33-34, 2008.

KAISER, H. A. J. Landre-Beauvais (1772-1840)--the actual first description of rheumatoid arthritis. **Z Rheumatol**, v. 63, n. 5, p. 430-5, Oct 2004.

KARIMI, M.; GOLDIE, L. C.; CRUICKSHANK, M. N. et al. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. **Eur J Hum Genet**, v. 17, n. 11, p. 1454-1462, 2009.

KOBELT, G. The Social and Economic Impact of Rheumatoid Arthritis. In: HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J., et al (Ed.). **Rheumatoid Arthritis**. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2009. cap. 7, p.83-89.

KOBELT, G.; JONSSON, B. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: outcome and cost-utility of treatments. **Eur J Health Econ**, v. 8 Suppl 2, p. 95-106, Jan 2008.

KOBELT, G.; LINDGREN, P.; LINDROTH, Y. et al. Modelling the effect of function and disease activity on costs and quality of life in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 44, n. 9, p. 1169-75, Sep 2005.

KOBELT, G.; WORONOFF, A.-S.; RICHARD, B. et al. Disease status, costs and quality of life of patients with rheumatoid arthritis in France: The ECO-PR Study. **Joint Bone Spine**, v. 75, n. 4, p. 408-415, 2008.

KOCHI, Y.; SUZUKI, A.; YAMADA, R. et al. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis implications for pathogenesis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, n. 5, p. 290-295, 2010.

KOCHI, Y.; SUZUKI, A.; YAMADA, R. et al. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis implications for pathogenesis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 5, p. 290-295, 2010.

KREJSA, C.; ROGGE, M.; SADEE, W. Protein therapeutics: New applications for pharmacogenetics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 507-521, 2006.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The-308 tumor necrosis factor-[alpha] promoter polymorphism effects transcription. **Molecular immunology**, v. 34, n. 5, p. 391-399, 1997.

KROEGER, K. M.; STEER, J. H.; JOYCE, D. A. et al. Effects of stimulus and cell type on the expression of the-308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. **Cytokine**, v. 12, n. 2, p. 110-119, 2000.

KYOGOKU, C.; LANGEFELD, C. D.; ORTMANN, W. A. et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. **Am J Hum Genet**, v. 75, n. 3, p. 504-7, Sep 2004.

LAMSYAH, H.; RUEDA, B.; BAASSI, L. et al. Association of PTPN22 gene functional variants with development of pulmonary tuberculosis in Moroccan population. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 3, p. 228-32, Sep 2009.

LANDER, E.; LINTON, L. M.; BIRREN, B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LANDRE-BEAUVAIS, A. J. The first description of rheumatoid arthritis. Unabridged text of the doctoral dissertation presented in 1800. **Joint Bone Spine**, v. 68, n. 2, p. 130-43, Mar 2001.

LEE, A. T.; LI, W.; LIEW, A. et al. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. **Genes Immun**, v. 6, n. 2, p. 129-33, Mar 2005.

LEE, Y. H.; JI, J. D.; SONG, G. G. Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a metaanalysis. **J Rheumatol**, v. 34, n. 1, p. 43-9, Jan 2007.

LEWIN, B. Promoters and Enhancers. In: LEWIN, B. (Ed.). **Genes IX**. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 2006. cap. 24, p.609-639.

LIAO, P.; LEE, K. H. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 149-158, 2010.

LINS, T. C.; ABREU, B. S.; PEREIRA, R. W. TagSNP transferability and relative loss of variability prediction from HapMap to an admixed population. **J Biomed Sci**, v. Array, p. 73-73, 2009.

LINS, T. C.; VIEIRA, R. G.; GRATTAPAGLIA, D. et al. Allele and haplotype frequency distribution in PTPN22 gene across variable ethnic groups: Implications for genetic association studies for autoimmune diseases. **Autoimmunity**, v. Array, n. Array, p. 308-16, 2010.

LIU, C.; BATLIWALLA, F.; LI, W. et al. Genome-wide association scan identifies candidate polymorphisms associated with differential response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. **Mol Med**, v. 14, n. 9-10, p. 575-81, Sep-Oct 2008.

LOUIS; FRANCHIMONT; PIRON et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 113, n. 3, p. 401-406, 1998.

LOUZADA-JUNIOR, P.; SMITH, A. G.; HANSEN, J. A. et al. HLA-DRB1 and -DQB1 alleles in the Brazilian population of the northeastern region of the state of Sao Paulo. **Tissue Antigens**, v.

57, n. 2, p. 158-62, Feb 2001.

LOUZADA-JUNIOR, P.; SOUZA, B. D. B.; TOLEDO, R. A. et al. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, p. 84-90, 2007.

LYKOURAS, D.; SAMPSONAS, F.; KAPARIANOS, A. et al. Human genes in TB infection: their role in immune response. **Monaldi Arch Chest Dis**, v. 69, n. 1, p. 24-31, Mar 2008.

MACKOWIAK, P. A.; BLOS, V. T.; AGUILAR, M. et al. On the origin of American tuberculosis. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 4, p. 515-8, Aug 15 2005.

MARQUES, F. Freio na Corrosão. São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=2808&bd=1&pg=2&lg=>>. Acesso em: 06/09/2010.

MARQUES NETO, J.; GONÇALVES, E.; LANGEN, L. et al. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira; Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. **Rev. bras. reumatol**, v. 33, n. 5, p. 169, 1993.

MARREIRO, L. S.; CRUZ, M. A.; OLIVEIRA, M. N. F. et al. Tuberculose em Manaus, Estado do Amazonas: resultado de tratamento após a descentralização
Tuberculosis in Manaus, state of Amazon: treatment outcome decentralization. **Epidemiol. serv. saúde**, v. Array, n. Array, p. 237-242, 2009.

MARTENS, P. B.; GORONZY, J. J.; SCHAID, D. et al. Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 40, n. 6, p. 1106-14, Jun 1997.

MATTHEWS, R. J.; BOWNE, D. B.; FLORES, E. et al. Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, n. 5, p. 2396-2405, May 1, 1992 1992.

MENGES, T.; KONIG, I. R.; HOSSAIN, H. et al. Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor. **Crit Care Med**, v. 36, n. 5, p. 1456-62, e1-6, May 2008.

MENGES, T.; KÖNIG, I. R.; HOSSAIN, H. et al. Sepsis syndrome and death in trauma patients

are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor *. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 1456-e6 10.1097/CCM.0B013E318170ABB6, 2008.

MOBLEY, J. L. Is rheumatoid arthritis a consequence of natural selection for enhanced tuberculosis resistance? **Med Hypotheses**, v. 62, n. 5, p. 839-43, 2004.

_____. Using epidemiology and archaeology to unearth new drug targets for rheumatoid arthritis therapy. **Drug Discov Today**, v. 11, n. 1-2, p. 4-7, Jan 2006.

MONTECUCCO, F.; MACH, F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48, n. 1, p. 11-22, Jan 2009.

MONTEIRO, R.; ZANINI, A. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatóide. **Rev. Bras. Cienc. Farm. vol**, v. 44, n. 1, 2008.

MOREIRA ALMEIDA, M. D. S. T.; BERTOLO, M. B.; DA SILVA, B. B. et al. Epidemiological study of patients with connective tissue diseases in Brazil. **Trop Doct**, v. 35, n. 4, p. 206-209, October 1, 2005 2005.

MOTA, L. M. H. D.; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS NETO, L. L. D. Características demográficas e clínicas de uma coorte de pacientes com artrite reumatoide inicial. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 235-240, 2010.

MUGNIER, B.; BALANDRAUD, N.; DARQUE, A. et al. Polymorphism at position-308 of the tumor necrosis factor gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 7, p. 1849-1852, 2003.

MURPHY, K.; MURPHY, K.; TRAVERS, P. et al. **Janeway's immunobiology**. London: Garland Pub, 2008. 887 ISBN 0815341237.

NAGY, Z. B.; CSANÁD, M.; TÓTH, K. et al. Current concepts in the genetic diagnostics of rheumatoid arthritis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 5, p. 603-618, 2010.

NEDWIN, G. E.; NAYLOR, S. L.; SAKAGUCHI, A. Y. et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Res**, v. 13, n. 17, p. 6361-73, Sep 11 1985.

NELSON, J. L.; KOEPESELL, T. D.; DUGOWSON, C. E. et al. Fecundity before disease onset in women with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 36, n. 1, p. 7-14, Jan 1993.

NEWTON, J.; HARNEY, S.; WORDSWORTH, B. et al. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. **Genes and immunity**, v. 5, n. 3, p. 151-157, 2004.

O'DELL, J. R. Therapeutic Strategies for Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 25, p. 2591-2602, 2004.

O'RIELLY, D. D.; ROSLIN, N. M.; BEYENE, J. et al. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Pharmacogenomics J**, v. 9, n. 3, p. 161-7, Jun 2009.

OROZCO, G.; BARTON, A. Update on the genetic risk factors for rheumatoid arthritis. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 6, n. 1, p. 61-75, 2010.

OROZCO, G.; PASCUAL-SALCEDO, D.; LOPEZ-NEVOT, M. A. et al. Auto-antibodies, HLA and PTPN22: susceptibility markers for rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 2, p. 138-41, Feb 2008.

OZBALKAN, Z.; EFE, C.; CESUR, M. et al. An update on the relationships between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Apr 4 2010.

PACHECO, A. G.; CARDOSO, C. C.; MORAES, M. O. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Hum Genet**, v. 123, n. 5, p. 477-84, Jun 2008.

PASCUAL, V.; CHAUSSABEL, D.; BANCHEREAU, J. A Genomic Approach to Human Autoimmune Diseases. **Annual review of immunology**, v. 28, n. 1, p. 535-571, 2010.

PAWLIK, A.; FLORCZAK, M.; OSTANEK, L. et al. TNF-alpha -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 34, n. 1, p. 22-6, 2005.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 3-4, p. 185-91, Jun-Aug 2003.

PIERER, M.; KALTENHAUSER, S.; ARNOLD, S. et al. Association of PTPN22 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of

the risk allele in male compared to female patients. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 3, p. R75, 2006.

PLADEVALL-VILA, M.; DELCLOS, G. L.; VARAS, C. et al. Controversy of oral contraceptives and risk of rheumatoid arthritis: meta-analysis of conflicting studies and review of conflicting meta-analyses with special emphasis on analysis of heterogeneity. **Am J Epidemiol**, v. 144, n. 1, p. 1-14, Jul 1 1996.

PLENGE, R. M. Genetic Basis of Rheumatoid Arthritis. In: HOCHBERG, M.; SILMAN, A., et al (Ed.). **Rheumatoid Arthritis**. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2009a. cap. 3A, p.23-27.

_____. Recent progress in rheumatoid arthritis genetics: one step towards improved patient care. **Curr Opin Rheumatol**, v. 21, n. 3, p. 262-71, May 2009b.

_____. Rheumatoid arthritis genetics: 2009 update. **Curr Rheumatol Rep**, v. 11, n. 5, p. 351-6, Oct 2009c.

PLENGE, R. M.; CRISWELL, L. A. Genetic variants that predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis: current challenges and future directions. **Curr Opin Rheumatol**, v. 20, n. 2, p. 145-52, Mar 2008.

PLENGE, R. M.; PADYUKOV, L.; REMMERS, E. F. et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. **Am J Hum Genet**, v. 77, n. 6, p. 1044-60, Dec 2005.

PLENGE, R. M.; RAYCHAUDHURI, S. Leveraging Human Genetics to Develop Future Therapeutic Strategies in Rheumatoid Arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 259-270, 2010.

POTTER, C.; HYRICH, K. L.; TRACEY, A. et al. Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 68, n. 1, p. 69-74, Jan 2009.

PRATESI, F.; TOMMASI, C.; ANZILOTTI, C. et al. Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 3, p. 733-41, Mar 2006.

PRATT, A. G.; ISAACS, J. D.; MATTEY, D. L. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 23, n. 1, p. 37-48, Feb 2009.

PREVOO, M. L.; VAN 'T HOF, M. A.; KUPER, H. H. 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 Rheum**, v. 38, n. 1, p. 44-8, Jan 1995.

QUESNIAUXA, V. F. J.; JACOBS, M.; ALLIEB, N. et al. TNF in Host Resistance to Tuberculosis Infection. In: KOLLIAS, G. e SFIKAKIS, P. (Ed.). **TNF Pathophysiology**. Base: Karger, 2010. p.158-179. (Current Directions Autoimmunity).

RAYCHAUDHURI, S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 109-118, 2010.

REZAIYAZDI, Z.; AFSHARI, J. T.; SANDOOGHI, M. et al. Tumour necrosis factor α -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 28, n. 2, p. 189-91, Dec 2007.

RHO, Y. H.; CHUNG, C. P.; SOLUS, J. F. et al. Adipocytokines, insulin resistance, and coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 5, p. 1259-64, May 2010.

RIDLEY, M. Seleção Natural e Variação. In: RIDLEY, M. (Ed.). **Evolução**. 3a. Porto Alegre: Artmed, 2006. cap. 4, p.101-121. ISBN 8536306351.

RINK, L.; KIRCHNER, H. Recent progress in the tumor necrosis factor- α field. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 111, n. 3, p. 199-209, Nov 1996.

RODRIGUEZ-CARREON, A. A.; ZUNIGA, J.; HERNANDEZ-PACHECO, G. et al. Tumor necrosis factor- α -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. **J Autoimmun**, v. 24, n. 1, p. 63-8, Feb 2005.

ROGERS, J.; WATT, I.; DIEPPE, P. Palaeopathology of spinal osteophytosis, vertebral ankylosis, ankylosing spondylitis, and vertebral hyperostosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 113-120, February 1, 1985 1985.

ROMIEU, I.; HERNANDEZ-AVILA, M.; LIANG, M. H. Oral contraceptives and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis of a conflicting literature. **Br J Rheumatol**, v. 28 Suppl 1, p. 13-7; discussion 18-23, 1989.

ROTHSCHILD, B. M.; ROTHSCCHILD, C.; HELBLING, M. Unified theory of the origins of erosive arthritis: conditioning as a protective/directing mechanism? **J Rheumatol**, v. 30, n. 10, p. 2095-102, Oct 2003.

ROTHSCHILD, B. M.; WOODS, R. J. [Does rheumatoid polyarthritis come from the New World?]. **Rev Rhum Mal Osteoartic**, v. 57, n. 3 (Pt 2), p. 271-4, Apr 10 1990a.

_____. Symmetrical erosive disease in Archaic Indians: the origin of rheumatoid arthritis in the New World? **Semin Arthritis Rheum**, v. 19, n. 5, p. 278-84, Apr 1990b.

ROTHSCHILD, B. M.; WOODS, R. J.; ROTHSCCHILD, C. et al. Geographic distribution of rheumatoid arthritis in ancient North America: Implications for pathogenesis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 22, n. 3, p. 181-187, 1992.

SAAG, K. G.; CRISWELL, L. A.; SEMS, K. M. et al. Low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis. A meta-analysis of their moderate-term effectiveness. **Arthritis Rheum**, v. 39, n. 11, p. 1818-25, Nov 1996.

SANTANA, L. L. O.; MAKIMOTO, F. H.; MONTENEGRO, E. L. L. P. et al. HLA CLASSE II Genérico em Pacientes Com Tuberculose Pulmonar. 29o. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. Porto de Galinhas. Sociedade Brasileira de Microbiologia.

SCHIATTINO, I.; VILLEGAS, R.; CRUZAT, A. et al. Multiple imputation procedures allow the rescue of missing data: an application to determine serum tumor necrosis factor (TNF) concentration values during the treatment of rheumatoid arthritis patients with anti-TNF therapy. **Biol Res**, v. 38, n. 1, p. 7-12, 2005.

SELVARAJ, P.; SRIRAM, U.; MATHAN KURIAN, S. et al. Tumour necrosis factor alpha (-238 and -308) and beta gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 81, n. 5-6, p. 335-41, 2001.

SENNA, E.; DE BARROS, A.; SILVA, E. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594, 2004.

SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. J168-J177, 2010a.

_____. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, n. 8, p. 468-476, 2010b.

SIMKINS, H. M.; MERRIMAN, M. E.; HIGHTON, J. et al. Association of the PTPN22 locus with rheumatoid arthritis in a New Zealand Caucasian cohort. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 7, p. 2222-5, Jul 2005.

SINGH, K.; COLMEGNA, I.; HE, X. et al. Synoviocyte stimulation by the LFA-1-intercellular adhesion molecule-2-Ezrin-Akt pathway in rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 180, n. 3, p. 1971-8, Feb 1 2008.

SINGH, K.; DESHPANDE, P.; PRYSHCHEP, S. et al. ERK-dependent T cell receptor threshold calibration in rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 183, n. 12, p. 8258-67, Dec 15 2009.

SMOLEN, J.; ALETAHA, D. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: a medical overview. **The European Journal of Health Economics**, v. 8, n. 0, p. 39-47, 2008.

SMOLEN, J.; ALETAHA, D.; BIJLSMA, J. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 4, p. 631, 2010.

SNORRASON, E. Landre-Beauvais and his "goutte asthenique primitive". **Acta Med Scand Suppl**, v. 266, p. 115-8, 1952.

SOLOMON, D. H.; KREMER, J.; CURTIS, J. R. et al. Explaining the cardiovascular risk associated with rheumatoid arthritis: traditional risk factors versus markers of rheumatoid arthritis severity. **Ann Rheum Dis**, May 5 2010.

SOUZA, M.; PINHEIRO, E. Incidência e Distribuição da Tuberculose na Cidade de Manaus/AM, BRASIL. **Revista Geográfica Acadêmica**, v. 3, n. 2, p. 35-43, 2010.

SPECTOR, T. D.; HOCHBERG, M. C. The protective effect of the oral contraceptive pill on rheumatoid arthritis: an overview of the analytical epidemiological studies using meta-analysis. **Br J Rheumatol**, v. 28 Suppl 1, p. 11-2; discussion 18-23, 1989.

SPINDLER, A.; BELLOMIO, V.; BERMAN, A. et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in Tucumán, Argentina. **The Journal of rheumatology**, v. 29, n. 6, p. 1166, 2002.

STANFORD, S.; MUSTELIN, T.; BOTTINI, N. Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases. **Seminars in Immunopathology**, v. 32, n. 2, p. 127-136, 2010.

STASTNY, P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**, v. 57, n. 5, p. 1148-57, May 1976.

SUGIYAMA, D.; NISHIMURA, K.; TAMAKI, K. et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 1, p. 70-81, Jan 2010.

TAYLOR, P. C.; MEHTA, P.; TULL, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. **Medicine**, v. 38, n. 4, p. 163-166, 2010.

TOBON, G. J.; YOUINOU, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **J Autoimmun**, v. 35, n. 1, p. 10-4, 2010.

TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 11, p. 833-46, Nov 2006.

TORIGOE, D.; LAURINDO, I. Artrite reumatoide e doenças cardiovasculares. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n. 1, 2006.

TSOI, M. S.; WARREN, R. P.; STORB, R. et al. Autologous marrow recovery and sensitization to non-HLA antigens after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia. **Exp Hematol**, v. 11, n. 1, p. 73-81, Jan 1983.

TURESSON, C.; JACOBSSON, L. Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 33, n. 2, p. 65-73, 2004.

TURESSON, C.; MATTESON, E. L. Clinical Features of Rheumatoid Arthritis: Extra-Articular Manifestations. In: HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J., et al (Ed.). **Rheumatoid Arthritis**. 1st. Philadelphia: Mosby/Elsevier, 2009. cap. 5b, p.62-65.

TURESSON, C.; MATTESON, E. L. Extra-articular features of Rheumatoid Arthritis and Systemic Involment. In: HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A., et al (Ed.). **Rheumatology**. Fifth. Philadelphia: Mosby Elsevier, v.1, 2011. p.19-27.

TURESSON, C.; MATTESON, E. L.; COLBY, T. V. et al. Increased CD4+ T cell infiltrates in rheumatoid arthritis-associated interstitial pneumonitis compared with idiopathic interstitial pneumonitis. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 1, p. 73-9, Jan 2005.

TURESSON, C.; O'FALLON, W. M.; CROWSON, C. S. et al. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. **Ann Rheum Dis**, v. 62, n. 8, p. 722-7, Aug 2003.

TURESSON, C.; O'FALLON, W. M.; CROWSON, C. S. et al. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 8, p. 722-727, August 1, 2003 2003.

TURESSON, C.; WEYAND, C. M.; MATTESON, E. L. Genetics of rheumatoid arthritis: Is there a pattern predicting extraarticular manifestations? **Arthritis Rheum**, v. 51, n. 5, p. 853-63, Oct 15 2004.

UGLIALORO, A. M.; TURBAY, D.; PESAVENTO, P. A. et al. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. **Tissue Antigens**, v. 52, n. 4, p. 359-67, Oct 1998.

URSUM, J.; VAN DER WEIJDEN, M. A.; VAN SCHAARDENBURG, D. et al. IL10 GGC haplotype is positively and HLA-DQA1*05-DQB1*02 is negatively associated with radiographic progression in undifferentiated arthritis. **J Rheumatol**, v. 37, n. 7, p. 1431-8, 2010.

VAN DOORNUM, S.; MCCOLL, G.; WICKS, I. P. Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 4, p. 862-73, Apr 2002.

VAN VOLLENHOVEN, R. F. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. **Nat Rev Rheumatol**, v. 5, n. 10, p. 531-41, Oct 2009.

VINASCO, J.; BERAUN, Y.; NIETO, A. et al. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 49, n. 1, p. 74-78, 2008.

VISENTAINER, J. E.; SELL, A. M.; DA SILVA, G. C. et al. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. **Int J Immunogenet**, v. Array, n. Array, p. 287-93, 2008.

VITTECOQ, O.; LEQUERRÉ, T.; GOËB, V. et al. Smoking and inflammatory diseases. **Best**

Practice and Research: Clinical Rheumatology, v. 22, n. 5, p. 923-935, 2008.

VLANTIS, K.; PASPARAKIS, M. Role of TNF in Pathologies Induced by Nuclear Factor κ B Deficiency. In: KOLLIAS, G. e SFIKAKIS, P. P. (Ed.). **TNF Pathophysiology: Molecular and Cellular Mechanisms**. Basel: Karger, 2010. p.80-93.

WARE, C. F. The TNF superfamily. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, n. 3-4, p. 181-4, Jun-Aug 2003.

_____. The TNF Superfamily-2008. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 19, n. 3-4, p. 183-6, Jun-Aug 2008.

WILSON, A.; SYMONS, J.; MCDOWELL, T. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3195, 1997.

WILSON, A. G.; DI GIOVINE, F. S.; BLAKEMORE, A. I. et al. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Hum Mol Genet**, v. 1, n. 5, p. 353, Aug 1992.

WILSON, K.; GOLDSMITH, C. Does smoking cause rheumatoid arthritis? **Journal of rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 1-3, 1999.

YOUINO, P.; PERS, J.-O.; GERSHWIN, M. E. et al. Geo-epidemiology and autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. J163-J167, 2010.

ZANELLI, E.; JONES, G.; PASCUAL, M. et al. The telomeric part of the HLA region predisposes to rheumatoid arthritis independently of the class II loci. **Hum Immunol**, v. 62, n. 1, p. 75-84, Jan 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do Projeto: “ESTUDO DA GENÉTICA MOLECULAR DA ARTRITE REUMATOIDE E DA TUBERCULOSE EM PACIENTES NATURAIS DA AMAZÔNIA”.

Objetivo do Estudo: estudar aspectos genéticos da artrite reumatoide e da tuberculose em pacientes nascidos no Estado do Amazonas e que sejam portadores destas doenças.

Justificativa: A artrite reumatoide é uma doença reumática frequente, cuja causa ainda é desconhecida. Estudos genéticos podem colaborar para o entendimento da doença. A tuberculose, por outro lado, é causada por um bacilo, tem tratamento estabelecido, mas o conhecimento da genética da tuberculose pode auxiliar a conhecer as variações de resposta ao tratamento.

Procedimentos: Para este estudo será coletada amostra de 5mL de sangue. Será extraído o DNA do sangue coletado para análise do gene do Fator de Necrose Tumoral (*TNF*), na posição -308, e do gene *PTPN22* posição 1858, através de genotipagem por *Reação em Cadeia de Polimerase* (PCR). Posteriormente, outros genes poderão ser estudados.

Benefícios: Será possível conhecer a frequência de marcadores moleculares para gravidade da Artrite Reumatoide e Tuberculose, que interferem inclusive na resposta ao tratamento.

Riscos Associados ao Estudo: Há o desconforto na realização do exame para coleta de amostra de sangue em veia do antebraço, não existindo riscos a sua participação neste estudo.

Voluntariedade: Sua participação neste estudo é voluntária. O senhor (a) pode retirar-se a qualquer momento, não havendo qualquer tipo de prejuízo para o senhor(a) dentro da instituição onde recebe atendimento. O senhor(a) pode a qualquer tempo tomar informações dos resultados dos testes obtidos neste trabalho.

Confidencialidade e sigilo: Os dados referentes à sua participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade. Os dados obtidos serão utilizados apenas para fins deste estudo.

Uso e Conservação do Material Biológico: O sangue coletado, bem como o DNA extraído, serão conservados em freezer à -20° C, sendo utilizado para fins que se propõe o estudo, permanecendo armazenado para estudos posteriores, localizado no Laboratório de Imunologia/ICB/UFAM.

Acompanhamento assistencial: Sendo o senhor(a) participante deste estudo terá sempre que necessário, esclarecimento de dúvidas, no que diz respeito ao estudo, podendo entrar em contato com os pesquisadores responsáveis: Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes (Av. Prof. Nilton Lins, 2274 Flores CEP 69058-030, celular 8127-3388), Maria Cristina dos Santos (Rua São Benedito nº 215, apto 103, Adrianópolis, fone 3236-1789, celular 9981-3473), Aya Sadahiro (Rua B, Q/ “A”, nº 53, Conjunto Arthur Reis, CEP 6954-660, fone 3236-7431, celular 8116-2299).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ler o termo acima eu, _____, concordo em participar do Projeto “ESTUDO DA GENÉTICA MOLECULAR DA ARTRITE REUMATOIDE E DA TUBERCULOSE EM PACIENTES NATURAIS DA AMAZÔNIA”, voluntariamente.

() Autorizo () Não Autorizo o armazenamento e uso posterior do material biológico coletado

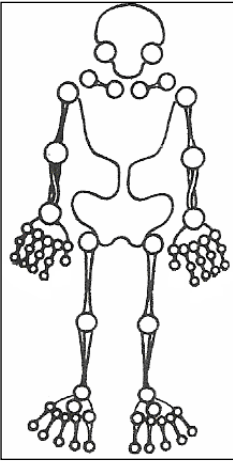
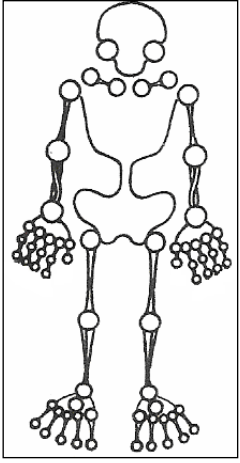
Participante

Pesquisador

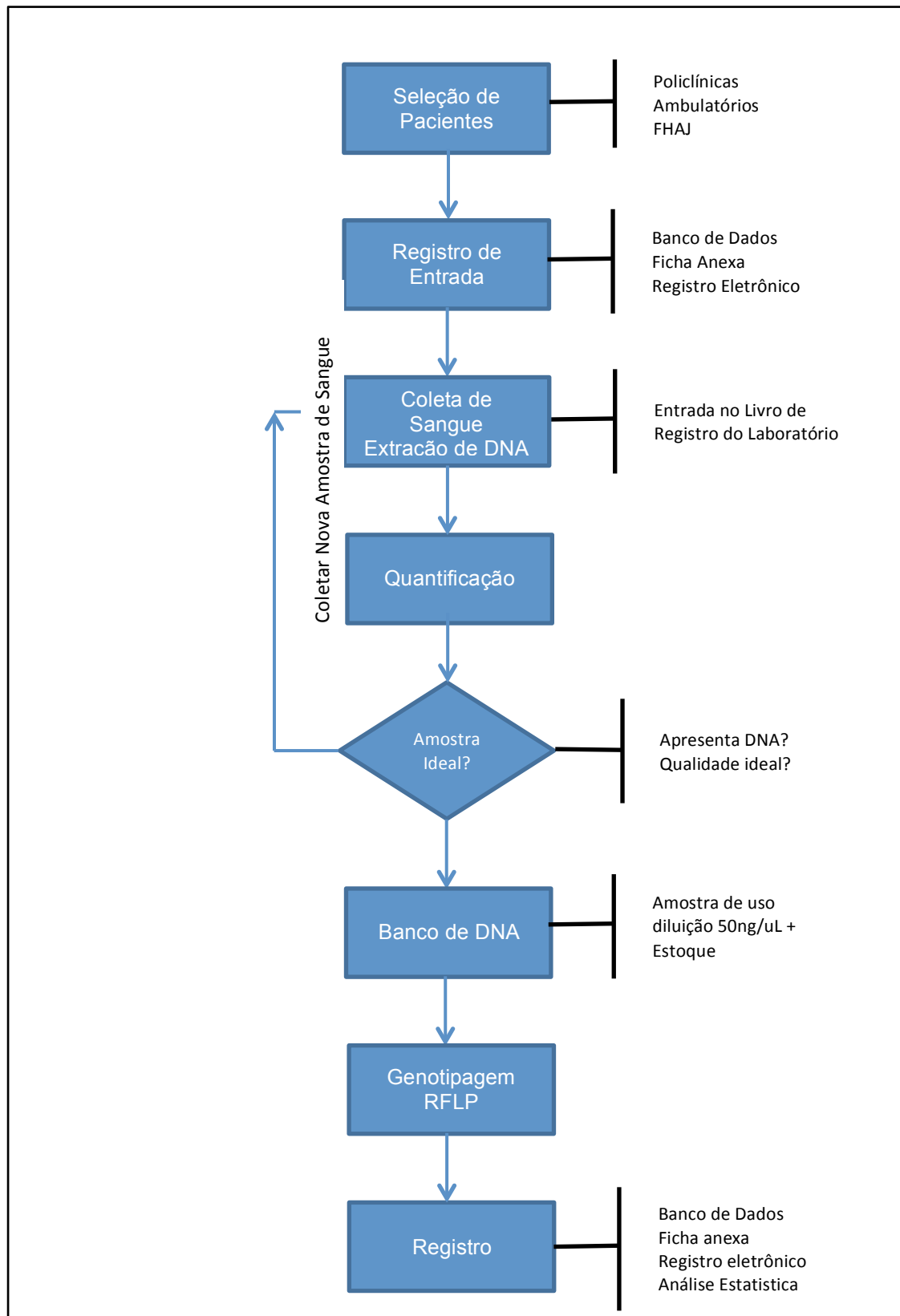


Impressão Dactiloscópica

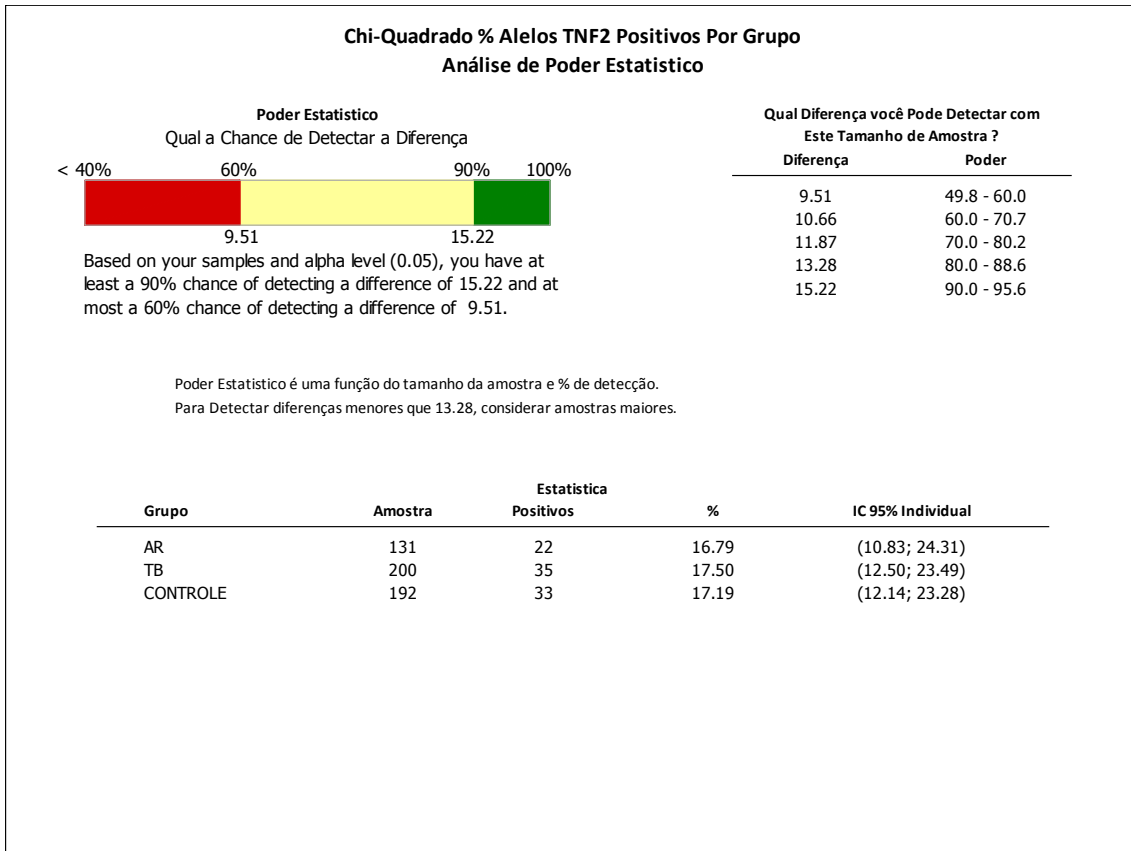
APÊNDICE 2 – FICHA DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA DE ARTRITE REUMATOIDE

Número: _____ Prontuário: _____ Gênero: _____ Idade: _____ NAE: _____	
Nome: _____	
Endereço: _____	
Data de Nascimento: ____/____/____	Profissão/Ocupação: _____
Naturalidade: _____	Telefones de Contato: _____
Diagnóstico de AR em: ____/____/____ ID: _____ TD: _____ DAT: _____	
<p>Critérios do ACR (1992) ou ACR (2010):</p> <p>() Artrite por mais de 6 semanas</p> <p>() MCF, IFP, Punhos</p> <p>() Duas ou Mais articulações</p> <p>() Alterações Radiológicas</p> <p>() Poliartrite Simétrica</p> <p>() Fator Reumatóide</p> <p>() Nódulo Reumatóide</p> <p>() Anti-CCP</p> <p>Tabagismo: () Sim () Não () Passivo</p>	<p>Data do Exame: ____/____/____</p> <p>TA: _____ mmHg FC: _____ bpm</p> <p>Altura: _____ Peso: _____ Kg IMC _____ CA _____</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Inchadas</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Doloridas</p> </div> </div>
<p>Medicação em Uso:</p> <p>() CLQ _____mg () MTX _____mg</p> <p>() HCQ _____mg () SSZ _____mg</p> <p>() AZA _____mg () CsA _____mg</p> <p>() LFM _____mg () CRT _____mg</p> <p>() Ciclofosfamida _____mg () Imunobiológico: _____</p> <p>() Ácido Fólico _____</p> <p>() AINH _____</p>	<p>_____/_____/____</p> <p>PCR _____mg/dl</p> <p>VHS _____ 1ª hora</p> <p>HEMÁC: _____ milhões/mm³</p> <p>HEMOG: _____g/dl</p> <p>HT: _____%</p> <p>VCM: _____fl</p> <p>Leuco.: _____/mm³</p> <p>Plaquetas: _____mil/mm³</p> <p>Perfil Lipídico:</p> <p>Coolesterol Total: _____mg/dl</p> <p>HDL – c: _____mg/dl</p> <p>LDL – c: _____mg/dl</p> <p>VLDL – c: _____mg/dl</p> <p>Triglicerídeos: _____mg/dl</p> <p>Lipídeos Totais: _____mg/dl</p> <p>Glicemia: _____mg/dl</p> <p>Uréia: _____mg/dl</p> <p>Creatinina: _____mg/dl</p> <p>ALT: _____U/l</p> <p>AST: _____U/l</p>
<p>Densitometria Óssea ____/____/____</p> <p><u>Coluna Lombar (L1 – L4)</u> Colo</p> <p>T-score: _____ T-score: _____</p> <p>Z-score: _____ Z-score: _____</p> <p>BMD: _____ BMD: _____</p>	<p>Outros Exames Complementares:</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
<p>Envolvimento Sistêmico:</p> <p>() Vasculite () Serosite</p> <p>() Escleromácea () Síndrome de Felty</p> <p>() Síndrome Sjögren () Alveolite/Fibrose</p> <p>() Neuropatia () Nódulos Reumatóides</p> <p>() Osteoporose () Artrose de Quadril</p> <p>() Outros: _____</p> <p>DAS28 () HAQ ()</p> <p>Score de SvdH () em ____/____/____</p>	
<p>Genotipagem (Laboratório de Imunologia):</p>	

APÊNDICE 3 – FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.

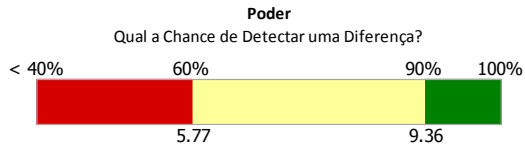


APÊNDICE 4 – ANÁLISE DE PODER ESTATÍSTICO PARA O ALELO TNF2



APÊNDICE 5 – ANÁLISE DE PODER ESTATÍSTICO PARA O ALELO *PTPN22* 1858T

Qui-Quadrado - % de Alelos *PTPN22* 1858T Positivos Por Grupo Análise de Poder Estatístico



Based on your samples and alpha level (0.05), you have at least a 90% chance of detecting a difference of 9.36 and at most a 60% chance of detecting a difference of 5.77.

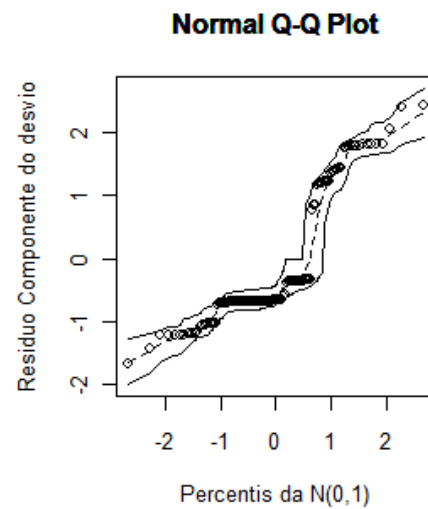
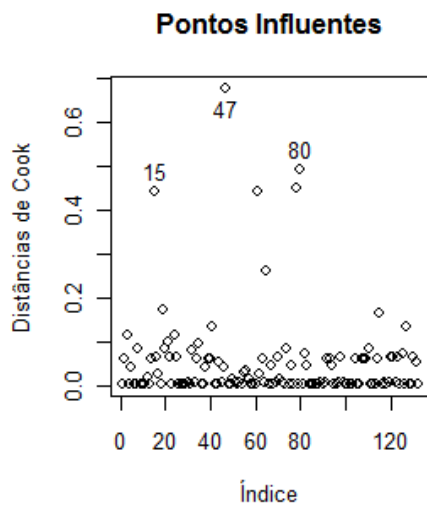
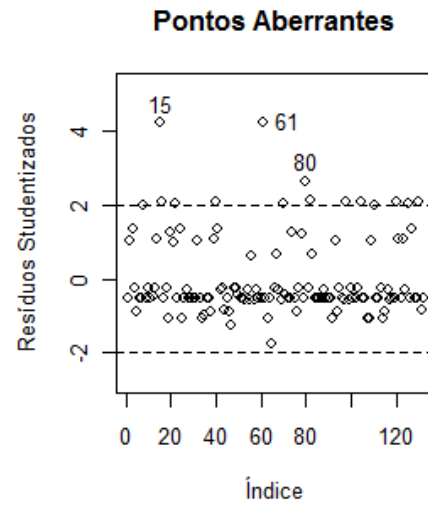
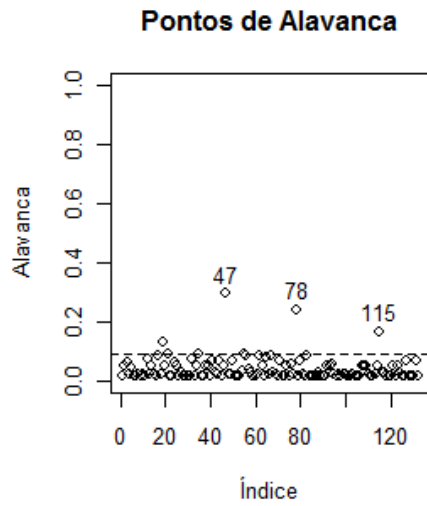
Qual diferença pode ser Detectada nesta Amostra ?

Diferença	Poder
5.77	48.7 - 60.0
6.56	60.0 - 71.9
7.30	70.0 - 81.3
8.17	80.0 - 89.5
9.36	90.0 - 96.0

Para detectar Diferenças menores que 8.17 e com Poder Estatístico maior que 80%, considerar amostras maiores.

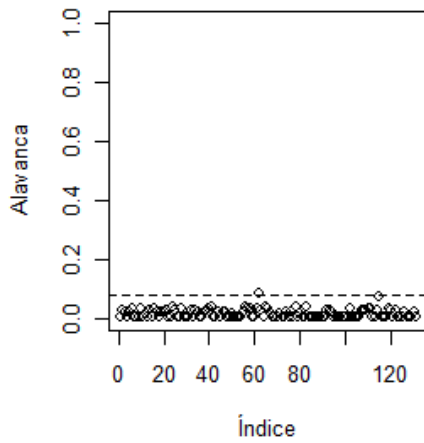
Grupo	Amostra	Estatística		IC 95% Individual
		Positivos	%	
AR	131	11	8.40	(4.27; 14.53)
TB	208	10	4.81	(2.33; 8.66)
Controle	205	11	5.37	(2.71; 9.40)

APÊNDICE 6 – ANÁLISE DE RESÍDUOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DE MANIFESTAÇÕES SISTEMICAS, TEMPO DE DOENÇA (10ANOS), FATOR REUMATOIDE, IDADE (>60ANOS).

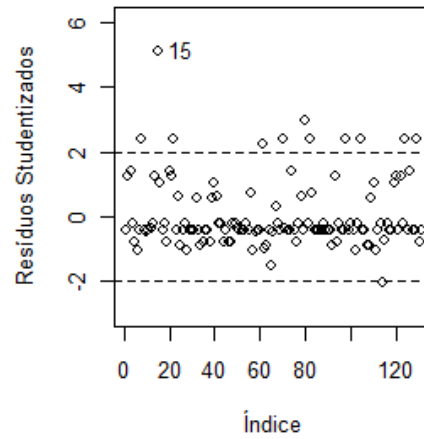


APÊNDICE 7 – ANÁLISE DE RESÍDUOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA DE MANIFESTAÇÕES SISTEMICAS, TEMPO DE DOENÇA (10ANOS), FATOR REUMATOIDE, IDADE (>60ANOS) E GENE *TNF*.

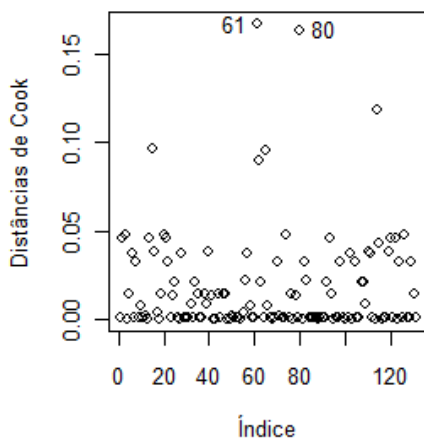
Pontos de Alavanca



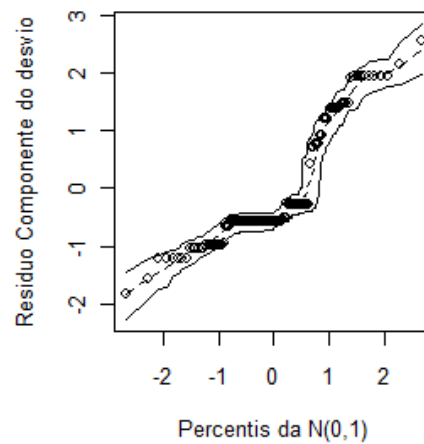
Pontos Aberrantes



Pontos Influentes



Normal Q-Q Plot



ORIGINAL ARTICLE

THE INFLUENCE OF THE *TNF* GENE POLYMORPHISM ON THE SEVERITY OF RHEUMATOID ARTHRITIS IN THE BRAZILIAN AMAZON

Authors and Affiliations

Antonio Luiz Boechat ^{a,b}, Maurício Morishi Ogusku^c, Mariana Raposo Alencar^a; Themis da Costa Abensur^d; José Cardoso Neto^d; Leilian Amorim^a, Lívia Moura de Oliveira^a, Dra. Aya Sadahiro^b, Maria Cristina Dos-Santos^b

^a Clínica de Artrite Reumatoide, Hospital Adriano Jorge, Manaus/Brasil.

^b Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.

^c Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

^d Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas.

Corresponding author: Antônio Luiz Boechat, Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Manaus, Brasil. CEP 69077-000. Tel: +55 92 3305-4271 e-mail: alboechat@ufam.edu.br.

Competing Interests None.

Word Count: 6468

Abstract

Background. The aim of this study was to investigate the influence of the *TNF* 308 G/A polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor- α gene on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (RA) in individuals from the Brazilian Amazon.

Methodology/Principal Findings. A total of 323 individuals — 192 healthy controls without arthritis and 131 individuals suffering from arthritis — were genotyped for this polymorphism using a methodology based on PCR-RFLP. The frequency of the A allele (*TNF2*) in rheumatoid arthritis sufferers was not found to be significantly higher than in the controls ($p=0.926$; OR=0.97; confidence interval 0.54 – 1.76). However, using a logistic regression model, when the patients were stratified according to whether the manifestations were preponderantly articular or systemic, there was a strong association between the *TNF2* allele and the systemic disease ($p=0.001$; OR=5.89; confidence interval = 1.98 – 17.5) as well as the use of Anti-TNF immunotherapy ($p=0.021$; OR 2.93; confidence interval = 1.15 – 7.49). The main factors that influence the risk of extra-articular disease were age after 60 years old ($p=0.008$; OR=4.06; confidence interval = 1.45 – 11.38), disease duration more than ten years ($p=0.031$; OR=3.10; confidence interval = 1.11 – 8.63) and also a positive rheumatoid factor ($p=0.035$; OR=2.07; confidence interval = 1.05 – 4.09).

Conclusions/Significance. These results suggest that the *TNF2* allele is associated with the more serious forms of the disease in individuals from the Brazilian Amazon but not with a risk for developing AR.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) was first described by the French clinician Augustin Landré-Beauvais in 1800 as a primitive form of gout. It is a chronic inflammatory arthropathy affecting around 1% of the world's population [1-3] and a serious pathological condition that can lead to incapacitation and reduced life expectancy compared with the normal population [4]. Studies in Brazil indicate that the prevalence of RA in the population is between 0.2 and 1%. There are estimated to be 900,000 people suffering from the disease [5], and its direct and indirect costs in Brazil are considered to be very high [6-8]. To date there have been no studies in the Brazilian Amazon of the clinical or epidemiological aspects of RA or the genetic factors associated with the disease.

Although the etiology of RA has yet to be clarified, it has been established that genetic factors play a role in susceptibility to RA. Familial aggregation, multiple genetic linkage and association studies have demonstrated the genetic basis of the disease [9,10]. Several genetic associations have been found, especially in the region of the human leukocyte antigen (HLA) loci, which have the strongest genetic association with RA [10-13].

Tumor necrosis factor (TNF) is a potent pleiotropic proinflammatory cytokine produced mainly by macrophages. Elevated levels of this cytokine have been implicated in various proinflammatory conditions [14]. In rheumatoid arthritis, proinflammatory cytokines such as TNF- α , interleukin-1 and interleukin-6 (IL-1, IL-6) are highly expressed and very abundant in synovial fluid, as are the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β . The latter, however, are not present in sufficiently high concentrations to suppress synovitis [15-18]. It is against this background that genetic polymorphisms of proinflammatory cytokines can play an important role by amplifying the chain of inflammatory events triggered by the disease. TNF stimulates secretion of cytokines, increases expression of adhesion molecules in the endothelium and promotes neutrophil activation and migration. In addition, it has co-stimulatory effects on T-cell activation and production of antibodies by B-lymphocytes [17].

The *TNF* gene is located on the short arm of chromosome 6 in the 6p21 region, a highly polymorphic region of the human genome where the *HLA* genes are located. Various single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described in the promoter region of the *TNF* gene. One of these, a common mutation in the promoter region with a G→A substitution in position 308, has been the subject of intense study [14,19]. It is not clear whether the *TNF* -308 G/A polymorphism has any functional significance, but there is evidence that the A (*TNF2*) allele is associated with higher levels of TNF transcription than the G (*TNF1*) allele [20,21]. The A allele has been associated with worse clinical outcomes in diseases such as sepsis and multiple trauma [22,23] or even in the clinical spectrum of bacterial or viral infections [24]. Although the results do not agree for different populations and the same diseases, articles have regularly

been published providing further evidence that the *TNF2* SNP can play a role — albeit not the same one in different populations and diseases — in clinical variants of inflammatory, autoimmune and infectious diseases.

Several authors have recently started to discuss the correct nomenclature for this polymorphism. Although it has been pointed out that dbSNP ID rs1800629 is in fact located at nucleotide 307 relative to the transcription start site, we have maintained the 308 nomenclature, which is used in most of the literature [25,26].

Many studies have investigated the potential role of the *TNF* -308G/A polymorphism in susceptibility to RA [27-36], but to our knowledge there are no references in the literature to an association between this SNP and RA in the Amazon Brazilian population. In light of this, it was decided to undertake this study to determine the influence of the *TNF*- α polymorphism on susceptibility to and the severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients in the Amazon.

Methods

Objectives

The aim of this study was to investigate the influence of the *TNF* -308 G/A polymorphism in the promoter region of the Tumor Necrosis Factor- α gene (*TNF*) on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (RA) in individuals from the Brazilian Amazon.

Participants

A total of 323 between 18 and 75 years old, non-Indian individuals were selected, consisting of a cohort of 131 consecutive RA sufferers and 192 controls. Controls were randomly selected by inviting people who lived in the same area as the patients to take part in the study. Controls were considered healthy if their medical history did not reveal any chronic diseases, endemic infectious diseases or autoimmune diseases and their physical examination and blood tests (e.g. glucose) failed to show otherwise. Any individual with one or more of these conditions was excluded from the control sample. For individuals who satisfied the medical history requirement, 5mL of blood sample was collected and genomic DNA extracted, as was done for the patients. The DNA samples were registered and stored in a control DNA bank. When this study began, a number was selected at random from the register and the corresponding control and appropriate number of sequentially numbered controls were taken from the DNA bank, matching age and sex as required. The RA sufferers were referenced and then selected at the rheumatoid arthritis clinic in the Hospital Geral Adriano Jorge, Manaus, Brazil, and met the American College of Rheumatology The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis [37].

Description of Procedures

Patient's information

The following information was gathered from the patients' medical records and collated on a form specifically prepared for the purpose: disease duration (DD); age at onset (AO); rheumatoid factor (RF), erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) at time of assessment; disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) being used; complete blood count, kidney and liver function, blood glucose, lipid profile and albumin; use of anti-TNF drugs; corticoid dose in use with prednisone-equivalent dose; prior joint surgery (related to RA – arthroplasty or arthrodesis); number of years of education; and number of days off work (defined as the number of days when the patient was legally unfit for work as determined by the appropriate body or entity). Weight, height and a history of smoking were also recorded. Patients were classified as having either only joint involvement or systemic involvement, the latter being considered to be present when at least one of the following clinical findings was detected: subcutaneous nodules, lung fibrosis confirmed by high-resolution computed tomography of the thorax; pleural effusion confirmed by chest X-ray; pericardial effusion with ecocardiographic evidence; Felty's syndrome (white blood cell count $< 2 \times 10^6$ cells, splenomegaly); cutaneous vasculitis (histopathological evidence of leukocytoclastic vasculitis); non-compressive peripheral neuropathy confirmed by electroneuromyography; Sjögren's syndrome (confirmed by the Schirmer test, biopsy of minor salivary glands or MRI of salivary glands). Disease activity was determined according to the *Disease Activity Score* for 28 painful/swollen joints (DAS28) [38] as well as the *Health Assessment Quality* (HAQ) validated for the Portuguese language [39,40]. Serious cases were considered to be those with at least one of the systemic manifestations previously mentioned and/or immunotherapy (use of Anti-TNF medication).

Extraction of Genomic DNA and Genotyping for the TNF -308 G/A Polymorphism (dbSNP ID rs1800629)

DNA was extracted using 5mL of peripheral blood and the rapid trimethyl ammonium bromide salts (DTAB/CTAB) technique [41]. The samples were genotyped using a method previously described [42]. Briefly, the region of interest (a 147bp fragment) was amplified by PCR using the primers 5'-TACCGGGAGTTTTGGATAACGGAG-3' and 5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3'. The reaction mixture was prepared in a final volume of 25 μ L containing 1UI TaqDNA Polymerase Platinum® (Invitrogen), 2.5 μ L of the buffer suggested by the manufacturer (1x) (200mM Tris-HCL pH8.4, 500mM KCl), 200ng of DNA, 1.5Mm MgCl₂, 200 μ M dNTPs and 0.1 μ M of each primer in a Thermocycler (Applied Biosystems, USA). Cycling conditions were as follows: 10min at 95°C followed by 35 cycles of 95°C for 30s, 60°C for 30s and 72°C for 30s, and a final extension cycle at 72°C for 10min. The amplification product was digested with *Nco*/ (New England Biolabs, USA) 1U/50ug of DNA, NEBuffer 1X (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl,

10mM MgCl₂ and 1mM Dithiothreitol, pH 7.9 at 29°C) and incubated at 37°C for 8 hours. The digestion product was separated by electrophoresis on a 3% agarose gel and the bands were stained with SyberGreen® (Invitrogen, USA). Genotypes were identified according to the following bands: 126pb + 21pb (GG); 147pb + 126pb + 21pb (GA); and a single 147pb band (AA). The population studied was observed to be in Hardy-Weinberg equilibrium.

Ethics

This study was approved by the Federal University of Amazonas Human Research Ethics Committee in accordance with Brazilian law, which complied with the Declaration of Helsinki. All the study participants provided written information consent on the analysis of the *TNF* gene polymorphism prior to enrolment.

Statistical methods

Descriptive statistics was used to describe the main clinical and demographic RA features. Using the results from the genotyping, the χ^2 test was applied to investigate the association between the each alleles of the controls and patients and susceptibility to RA. The population studied was observed to be in Hardy-Weinberg equilibrium using a χ^2 test. The two-tailed Student *t*-test was used to compare means when normal distribution was observed in a Kolmogorov-Smirnov test. When normality was not observed the nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare medians. A forward stepwise multivariate logistic regression analysis was applied to select which variables (predictors) influences an individual with RA presents systemic disease (dependent variable). A variable is entered into the model if the probability of its score statistic is less than $p < 0.05$. For convenient prediction, we kept years of disease duration as a continuous variable and others as dichotomous variables. With the purpose of analyze the influence of *TNF2* allele on severe forms of RA four logistic regression models were used considering the previous selected predictors: (a) model 0: including age over than 60 years old, years of disease duration and rheumatoid factor; (b) model 1: including age over than 60 years old, years of disease duration, rheumatoid factor and *TNF2* allele; (c) model 2: age over than 60 years old, disease duration over 10 years, rheumatoid factor and *TNF2* allele. A final regression analysis was performed to investigate the influence of *TNF2* allele on the probability of treatment with anti-TNF therapy: (d) model 3: including years of disease duration and *TNF2* Allele.

Thus, calibration and discrimination abilities of the four models were examined. Calibration assesses how closely the predicted probabilities reflect the risk. Observed and predicted frequencies by each model were calculated. Goodness-of-Fit test was performed using a Hosmer-Lemeshow χ^2 statistics for calibration to compare observed and predicted risk deciles; and small values indicate good calibration [43]. Discrimination examines the ability to correctly classify subjects into different groups. Thus, receiver operating characteristic curve (ROC Curve) and an area under curve (AUC) were obtained for accuracy verification of logistic regression models. ROC presents a curve of sensitivity (y-axis) against 1-sensitivity (x-axis) at different cut-off points of the risk score. Larger AUC values from each ROC indicate better discriminative power [44].

Results

Population Characteristics

A total of 131 RA patients were included in the study and the Table 1 summarizes the main demographic and clinical Characteristics of patients with RA. The sample had mean age of 42.7 years (SD ± 2.85), 90.2% women, and 74.24% where rheumatoid factor positive and also 25.7% had extra-articular disease, in which Sjögren syndrome was the most frequent systemic

manifestation, followed by rheumatoid nodules, pulmonary fibrosis and rheumatoid vasculitis. No patients who receiving biological therapy because they had had side effects with conventional DMARDs were not selected for this study.

TNF2 Allele in RA susceptibility

The *TNF2* allele frequencies in RA patients (8.4%) and controls (8.6%) was quite similar and no association between *TNF2* and RA were detected ($p=0.926$). The Hardy-Weinberg Equilibrium was observed in both RA ($p=0.294$) and controls samples ($p=0.192$). The Allele Distribution in the *TNF*-308 G/A polymorphism is summarized on Table 2 for both RA patients and controls.

The Influence of TNF2 Allele on Severe forms of RA

For the purpose of this study the severe forms of RA were considered to be those with at least one of the systemic manifestations previously mentioned and/or immunotherapy (use of Anti-TNF medication). In this context, Model 0 shows that main predictors for systemic RA were positive rheumatoid factor (OR 1.96, 95% CI 1.02 – 3.74), age beyond 60 years old (OR 4.23, 95% CI 1.60 – 11.22) and disease duration (OR 1.10, 95% CI 1.00 -1.14). The *TNF2* allele was also associated with RA severe forms by Model 1 (OR 5.56, 95% CI 1.89 – 16.33) and also by Model 2 (OR 5.89, 95% CI 1.98 – 17.51), in which age, especially over 60 years (4.06, 95% CI 1.45 – 11.38) and disease duration, especially over 10 years (OR 3.10, 95% CI 1.11 – 8.63) were the main predictors for extra-articular disease. Obtaining the predicted probability for an extra-articular manifestation using Model 2 it is possible to observe that this effect rises with disease duration (Figure 1). Não foi observada influencia do alelo *TNF2* sobre o DAS28 ou HAQ (Tabela 6).

On the other hand, Model 3 shows that *TNF2* allele (OR 1.12; 95% CI 1.00 – 1.14) and disease duration predicts the use of Anti-TNF agents for properly control of disease activity and, in addition, that probability of Anti-TNF use raises with disease years. Applying Model 3, the Anti-TNF use probability for patients with five years of disease duration and without *TNF2* allele is 32.87% against 59.82% for those who carriers the *TNF2* allele at the same time, showing a 26.95% growth in the probability of biologics use.

Models Validation

The Hosmer-Lemeshow χ^2 statistics for goodness-of-fit showed good calibration for all prediction models (Table 4). Model 2 has smallest Hosmer-Lemeshow χ^2 statistics 0.574 ($p=0.967$). The area under curve for all models was higher than 0.7 and shows good to excellent discriminative ability. However, it is noteworthy the better discriminative ability for Model 1 (AUC 0.81, 95% CI 0.73 to 0.89) against Model 0 (AUC 0.75, 95% CI 0.69 to 0.87) clearly showing that inclusion of *TNF2* allele in the model raises probability of extra-articular disease (Table 5, Figure 2). On the other hand, Model 2 that include as a variables disease

duration over 10 years, age over 60 years, rheumatoid factor and *TNF2* has a higher specificity (96.2%) than other models. The Model 3 showed good discriminative ability (AUC 0.71, 95% CI 0.61 to 0.78, Figure 3), with a 74% specificity for Anti-TNF use prediction (Table 4).

Discussion

This study suggests that the *TNF* -308 G/A polymorphism is associated with susceptibility to some factors related to severity of rheumatoid arthritis as well as with the need for biological Anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis sufferers from the Brazilian Amazon when the individual is a carrier of at least one A allele. This is also the first study to investigate genetic aspects of RA sufferers in the Brazilian Amazon.

Table 1 shows the main clinical and demographic characteristics of the cohort of 131 RA sufferers, which are similar to those found in other Brazilian states [45,46]. The present study showed that RA patients carrying the minor allele A of the *TNF2* rs1800629 (G >A) polymorphism were not associated with RA in our population, in which the allele A frequency is less than in Caucasians nor other Latin-American populations (Table 2) [47-49]. Although the *TNF2* allele has been associated with RA in Mexicans in North America, as well as Colombians and Chileans in South America [50-52], this finding was not confirmed in the present study, in which we failed to find this association ($p=0.926$) (Table 2). Although located in South America, Brazil, unlike Spanish-speaking South American countries, is made up by ethnically influence from Portuguese populations in which the *TNF2* allele is not currently associated with a risk for RA [53,54]. No differences between *TNF1* and *TNF2* alleles were observed for clinical and demographic variables such as the ratio of males to females, positive rheumatoid factor, DAS28, HAQ, age at diagnosis and number of years of education, although a high number of minor allele A carriers were in use of Anti-TNF therapy (Table 3).

Loss of productivity and inability to work have long been recognized to be an important problem in RA sufferers [55], and it is reasonable to suppose that high serum TNF levels and greater inflammatory activity (DAS28) are related to this, as Anti-TNF therapy is able to reduce absenteeism [56]. An important unanswered question is whether the *TNF2* allele has an influence on these two factors. The influence of this allele on incapacity for work in patients who had the disease for more than 10 years has been described, although no association with DAS28 was observed [53]. It should be stressed that in the present study, incapacity for work was assessed by the number of people who were registered in the Brazilian social security system (INSS) as having retired because of disability or being on sick leave. Hence, other patients, who are not fit for work but do not have social security cover, or even retired people who do not feel able to carry out daily life activities or do not feel fit for work, may not have been included in the analysis. Specific questionnaires to measure incapacity for work or productivity were not applied [57]. Nevertheless, there was no difference between *TNF1* and *TNF2* alleles among individuals who were registered in the INSS as having retired or being on sick leave. Nor

was *TNF2* found to be associated with pensions granted by INSS in the study population.

However, a relationship was observed between the *TNF2* allele and a larger number of severe cases, here considered to be those rheumatoid arthritis patients with systemic manifestations ($p=0.001$; OR 5.89). According with our data, this effect rises with aging and disease duration (Figure 1), especially in those patients who are beyond the sixty years old ($p=0.008$; OR=4.06) and/or more than ten years of disease duration ($p=0.031$; OR=3.10). Most data about extra-articular RA manifestations is obtained from Caucasians and achieves approximately 15% of RA case in disease evolution. The main predicting factors that were identified for this condition are a positive rheumatoid factor or anti-citrullinated protein antibody, smoking and age. The extra-articular disease in RA is serious condition not only because it reduces the quality of life, but also because it is associated with a high morbidity and mortality rates, especially by cardiovascular diseases [58].

Obviously, it should be remembered that there is not one parameter alone that is sufficiently to clearly identify a patient with more severe RA or with a worse prognosis. Furthermore, many authors agree with the fact that systemic inflammatory process associated with extra-articular disease is a major predictor of mortality in RA. This in itself shows the severity of extra-articular forms of the disease.

Concerning *TNF* gene polymorphisms, there are data relating the rare *TNF2* allele to a higher transcriptional activity than the common *TNF1* allele, although a lack of such an association has also been reported in non-white populations, depending on the HLA ancestral haplotype carrying this SNP [59-61]. Regardless of potential controversies, most data suggest a potential role of the *TNF2* rs1800629 polymorphism in the regulation of *TNF* gene expression [21,22] and, in those patients who do not achieves high standards of disease activity control, a higher serum TNF levels by his pro-inflammatory endothelial and systemic effects may imply in the increasing of other autoimmune phenomena, such extra-articular manifestations, with aging and years of disease. In this line of reasoning, recently, *TNF2* allele was involved in high cardiovascular events in a large RA sample and as proinflammatory phenotype component contributing for reducing longevity [62,63]. In addition, immune aging is a known mechanism of autoimmunity and even in RA appears to be a representative way phenomenon for RA susceptibility and comorbidity [64]. The senescence immune system in RA, specifically, increased frequencies of CD4⁺CD28null T cells that are associated with more severe disease [65]. In early RA, the frequency of CD4⁺CD28null T cells is a predictor for erosive progression. On the other hand, in the established disease, the frequency correlates with extra-articular manifestations. Increased frequencies are seen in nodular disease, and the highest frequencies are found in patients with rheumatoid vasculitis [66,67]. Thus, our findings those suggest an association effect of older age, long disease duration and a proinflammatory *TNF2* allele may not coincidental, but an additive and interacting effect of immune aging and underlying

proinflammatory status that raises the frequency of extra-articular manifestations and also poor responses to traditional DMARDs.

The response to Anti-TNF therapy was not evaluated, although patients who were carriers of at least one A allele were more likely to undergo immunotherapy ($p=0.023$; OR 1.10), reflecting the severity of the disease in these patients. Like the Portuguese [55], South American patients of Spanish origin who are carriers of this allele also appear to exhibit greater clinical severity and little response to Anti-TNF [51,68-71] (Table 5).

Limitations

Some study limitations are noteworthy. First, while the association between *TNF2* allele and extra-articular disease or use of biologics remains significant, only prospective studies have the potential to reveal and assess this effect accurately. This study can not be widely generalized to other populations because it included only individuals of the Brazilian Amazon. In addition, did not include the African-descended Brazilians, or Indian individuals, and the influence of the *TNF2* allele in these ethnic populations of the Amazon remains a problem. However, it should be stressed that African-Brazilian individuals were not genetically representative in this region [54]. We did not assess other *TNF* promoter polymorphisms and HLA-shared epitope alleles that can be in linkage disequilibrium with *TNF2* allele possibly contributing to that influences we find on severe forms of RA [72].

References

1. Kaiser H (2004) A. J. Landre-Beauvais (1772-1840)--the actual first description of rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 63: 430-435.
2. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A (2010) The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 35: 10-14.
3. Alamanos Y, Drosos AA (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4: 130-136.
4. Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, et al. (2003) Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 48: 54-58.
5. Marques Neto J, Gonçalves E, Langen L, Cunha M, Radominski S, et al. (1993) Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira; Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. *Rev bras reumatol* 33: 169.
6. Azevedo AB, Ferraz MB, Ciconelli RM (2008) Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. *Value Health* 11: 869-877.
7. Chermont GC, Kowalski SC, Ciconelli RM, Ferraz MB (2008) Resource utilization and the cost of rheumatoid arthritis in Brazil. *Clin Exp Rheumatol* 26: 24-31.
8. Monteiro R, Zanini A (2008) Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatóide. *Rev Bras Cienc Farm* vol 44.
9. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, et al. (2000) Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 43: 30-37.
10. Raychaudhuri S (2010) Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 22: 109-118.
11. Plenge RM, Raychaudhuri S (2010) Leveraging Human Genetics to Develop Future Therapeutic Strategies in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 36: 259-270.
12. Plenge RM (2009) Recent progress in rheumatoid arthritis genetics: one step towards improved patient care. *Curr Opin Rheumatol* 21: 262-271.
13. Choi SJ, Rho YH, Ji JD, Song GG, Lee YH (2006) Genome scan meta-analysis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45: 166-170.
14. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS (2009) Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792: 163-172.
15. Feldmann M, Brennan F, Maini R (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology* 14: 397-440.
16. Firestein GS (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356-361.
17. Brennan FM, McInnes IB (2008) Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 118: 3537-3545.
18. Taylor PC, Mehta P, Tull T (2010) Aetiopathology of rheumatoid arthritis. *Medicine* 38: 163-166.
19. Hajeer AH, Hutchinson IV (2001) Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol* 62: 1191-1199.

20. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, et al. (1996) Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 43: 456-463.
21. Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ (2009) A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet* 17: 1454-1462.
22. Menges T, Konig IR, Hossain H, Little S, Tchatalbachev S, et al. (2008) Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor. *Crit Care Med* 36: 1456-1462, e1451-1456.
23. Teuffel O, Ethier M-C, Beyene J, Sung L (2010) Association between tumor necrosis factor-[alpha] promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care Medicine* 38: 276-282
210.1097/CCM.1090b1013e3181b1042af1090.
24. Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, et al. (2010) Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 71: 1135-1140.
25. Uglialoro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, et al. (1998) Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Tissue Antigens* 52: 359-367.
26. Hollegaard MV, Bidwell JL (2006) Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun* 7: 269-276.
27. Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK (2002) Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. *J Rheumatol* 29: 212-219.
28. Ursum J, van der Weijden MA, van Schaardenburg D, Prins AP, Dijkmans BA, et al. (2010) IL10 GGC haplotype is positively and HLA-DQA1*05-DQB1*02 is negatively associated with radiographic progression in undifferentiated arthritis. *J Rheumatol* 37: 1431-1438.
29. Pawlik A, Florczak M, Ostanek L, Brzosko M, Brzosko I, et al. (2005) TNF- -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* 34: 22-26.
30. Mugnier B, Balandraud N, Darque A, Roudier C, Roudier J, et al. (2003) Polymorphism at position-308 of the tumor necrosis factor gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48: 1849-1852.
31. Schiattino I, Villegas R, Cruzat A, Cuenca J, Salazar L, et al. (2005) Multiple imputation procedures allow the rescue of missing data: an application to determine serum tumor necrosis factor (TNF) concentration values during the treatment of rheumatoid arthritis patients with anti-TNF therapy. *Biol Res* 38: 7-12.
32. Balog A, Gal J, Gyulai Z, Zsilak S, Mandi Y (2004) Tumour necrosis factor-alpha and heat-shock protein 70-2 gene polymorphisms in a family with rheumatoid arthritis. *Acta Microbiol Immunol Hung* 51: 263-269.
33. Balog A, Klausz G, Gál J, Molnár T, Nagy F, et al. (2004) Investigation of the Prognostic Value of TNF-a Gene Polymorphism among Patients Treated with Infliximab, and the Effects of Infliximab Therapy on TNF-a Production and Apoptosis. *Pathobiology* 71: 274-280.

34. Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Sandooghi M, Mohajer F (2007) Tumour necrosis factor α -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 28: 189-191.
35. Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, et al. (2008) Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 49: 74-78.
36. Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL, Barton A, Worthington J, et al. (2008) Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 17: 3532-3538.
37. Funovits J, Aletaha D, Bykerk V, Combe B, Dougados M, et al. (2010) The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Methodological Report Phase I. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 1589-1595.
38. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, et al. (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 44-48.
39. Ferraz MB, Oliveira LM, Araujo PM, Atra E, Tugwell P (1990) Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. *J Rheumatol* 17: 813-817.
40. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR (1980) Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum* 23: 137-145.
41. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P (1991) A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11: 298-300, 302.
42. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW (1992) Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor α (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1: 353.
43. Hosmer DW, Lemeshow S (2000) *Applied Logistic Regression*. New York: Wiley.
44. Altman DG, Bland JM (1994) Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ* 309: 188.
45. Louzada-Junior P, Souza BDB, Toledo RA, Ciconelli RM (2007) Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Reumatologia* 47: 84-90.
46. Mota LMHd, Laurindo IMM, Santos Neto LLd (2010) Características demográficas e clínicas de uma coorte de pacientes com artrite reumatoide inicial. *Revista Brasileira de Reumatologia* 50: 235-240.
47. Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM (2005) Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *The Journal of Rheumatology* 32: 219-224.
48. Cuenca J, Pérez CA, Aguirre AJ, Schiattino I, Aguilón JC (2001) Genetic polymorphism at position -308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): Implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population. *Biological Research* 34: 237-241.
49. (2011) International Hapmap Project. Reference SNP(refSNP) Cluster Report: rs1800629. NCBI.

50. Lee YH, Ji JD, Song GG (2007) Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *J Rheumatol* 34: 43-49.
51. Correa PA, Gomez LM, Anaya JM (2004) Polymorphism of TNF-alpha in autoimmunity and tuberculosis. *Biomedica* 24 Supp 1: 43-51.
52. Rodriguez-Carreón AA, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, et al. (2005) Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun* 24: 63-68.
53. Fonseca JE, Cavaleiro J, Teles J, Sousa E, Andreozzi VL, et al. (2007) Contribution for new genetic markers of rheumatoid arthritis activity and severity: sequencing of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Arthritis Res Ther* 9: R37.
54. Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, et al. (2003) Historical genetics: Spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *American Journal of Human Biology* 15: 824-834.
55. Sokka T, Kautiainen H, Pincus T, Verstappen S, Aggarwal A, et al. (2010) Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA Study. *Arthritis Research & Therapy* 12: R42.
56. Augustsson J, Neovius M, Cullinane-Carli C, Eksborg S, van Vollenhoven RF (2010) Patients with rheumatoid arthritis treated with tumour necrosis factor antagonists increase their participation in the workforce: potential for significant long-term indirect cost gains (data from a population-based registry). *Annals of the Rheumatic Diseases* 69: 126-131.
57. Ciconelli RM, Soárez PCd, Kowalski CCG, Ferraz MB (2006) The Brazilian Portuguese version of the Work Productivity and Activity Impairment : General Health (WPAI-GH) Questionnaire. *Sao Paulo Medical Journal* 124: 325-332.
58. Turesson C, Jacobsson L (2004) Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* 33: 65-73.
59. Abraham LJ, French MA, Dawkins RL (1993) Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol* 92: 14-18.
60. Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C (2002) Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmunity reviews* 1: 29-35.
61. Price P, Witt C, Allock R, Sayer D, Garlepp M, et al. (1999) The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunological Reviews* 167: 257-274.
62. Rodríguez-Rodríguez L, González-Juanatey C, Palomino-Morales R, Vázquez-Rodríguez TR, Miranda-Fillooy JA, et al. (2011) TNFA -308 (rs1800629) polymorphism is associated with a higher risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 216: 125-130.
63. Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, et al. (2003) Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoter SNP and its interaction with TNF-alpha -308 promoter SNP. *J Med Genet* 40: 296-299.
64. Goronzy JJ, Shao L, Weyand CM (2010) Immune aging and rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 36: 297-310.

65. Goronzy J, Weyand C (2003) Ageing, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 5: 225 - 234.
66. Goronzy JJ, Matteson EL, Fulbright JW, Warrington KJ, Chang-Miller A, et al. (2004) Prognostic markers of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 43-54.
67. Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D, Weyand CM (1997) Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40: 1106-1114.
68. Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM (2005) Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* 32: 219-224.
69. Llanos C, Soto L, Sabugo F, Bastias MJ, Salazar L, et al. (2005) The influence of -238 and -308 TNF alpha polymorphisms on the pathogenesis and response to treatment in rheumatoid arthritis. *Rev Med Chil* 133: 1089-1095.
70. Cuchacovich M, Soto L, Edwardes M, Gutierrez M, Llanos C, et al. (2006) Tumour necrosis factor (TNF)alpha -308 G/G promoter polymorphism and TNFalpha levels correlate with a better response to adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 35: 435-440.
71. Cuchacovich M, Ferreira L, Aliste M, Soto L, Cuenca J, et al. (2004) Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels and influence of -308 TNF-alpha promoter polymorphism on the responsiveness to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 33: 228-232.
72. Qidwai T, Khan F (2011) Tumour Necrosis Factor (Tnf) Gene Polymorphism and Disease Prevalence. *Scand J Immunol*: no-no.

Figure Legends

Figure 1. Predicted of event probability for extra-articular manifestations over the time of disease duration considering individuals under 60 years and positive rheumatoid factor. The event probability raises over time when the *TNF2* allele where present.

Figure 2. ROC curve for all Logistic Regression Models that considering a probability of extra-articular RA manifestations.

Figure 3. ROC curve for Logistic Regression Model 4 that considering a probability of biologics use over the time when and the *TNF2* allele is present. The Area Under Curve (AUC) of 0.71.

Tables

Table 1 The Main Demographic and Clinical Characteristics of Patients with Rheumatoid Arthritis and Controls in the Brazilian Amazon Region

Characteristics	131 patients	Control Individuals
Female (%) / Male (%)	90.2 / 9.8	89.3% / 10.7%
Age, mean (SD)	48.5 (±12.4)	49.2 (±12.1)
Age at Diagnosis, mean (SD)	42.4 (±13.1)	-
Duration of the Disease, mean (SD)	4.7 (±2.85)	-
Rheumatoid Factor, n (%)	98 (74.8)	-
Patients Beyond 60 year's old, n (%)	24 (18.3)	-
Patients with more than 10 years of disease, n (%)	27 (20.6)	-
DAS28, mean (SD)	4.8 (±1.43)	-
HAQ, mean (SD)	1.68 (±0.901)	-
Systemic Manifestations, n (%)	34 (25.3)	-
DMARDS, n (%)	91 (69.4)	-
Biologics (Anti-TNF), n (%)	40 (30.5)	-
Social Security (INSS), n (%)	66 (50.3)	-
Retired, n (%)	11 (16.6)	-
Retired because of Disability, n (%)	6 (9.10)	-
Days Off Work, mean (SD)	436.6 (±271.1)	-
Number of Years of Education, mean (SD)	9.47 (±4.63)	-
Third Level Education, n (%)	7 (5.34)	-

Table 2 Allele Distribution in the TNF-308 G/A Polymorphism in Rheumatoid Arthritis Sufferers and Controls

Alleles	RA Patients (n=131)	Allele Frequency	HWE p^2	Controls (n=192)	Allele Frequency	HWE p^2	p^1	OR	Confidence Interval
G	109	0.9160	0.294	159	0.9141	0.192	0.926	0,97	0.54 – 1.76
A	22	0.084		33	0.086				

¹Chi Square test, significance level $p < 0,05$

²Hardy-Weinberg Equilibrium

Table 3. Influence Analysis of TNF2 Allele on RA Clinical Features

RA Features	A	G	p
Female ¹ , %	90.9	89.9	0.886
Male ¹ , %	9.0	10.1	0.886
Rheumatoid Factor ¹ , %	77.2	75.2	0.839
Age ² , mean (SD)	47.8 (±14.5)	48.6 (±12.0)	0.785
Age at Diagnosis ² , mean (SD)	43.2 (±14.3)	42.1 (±13.0)	0.787
Years of Disease ³ , median	2.5	3.0	0.853
DAS28 ² , mean (SD)	4.67 (±1.57)	4.84 (±1.41)	0.621
HAQ ³ , median	2.0	1.62	0.083
DMARDS ¹ , %	40.1	66.9	0.021
Biologics ¹ , %	59.1	33.0	0.021
Days off work ³ , median	365	180	0.408
Retired because of Disability ¹ , %	22.7	13.8	0.286
Years of Education ³ , median	9	10	0.507

¹ χ^2 test for association, significance level $p < 0.05$

²Two-tailed Student *t* test, significance level $p < 0.05$

³Kruskal-Wallis test adjusted for ties

Table 5 Logistic Regression Tables for All Models

Predictor	Coefficients	<i>p</i>	Odds Ratio	95% Confidence Interval
Model 0^a				
Constant	-2.8712	0.0001	–	–
Age over 60 years	1.4429	0.0040	4.23	1.60 – 11.22
Rheumatoid Factor	0.6717	0.0420	1.96	1.02 – 3.74
Disease Duration	0.0670	0.0480	1.10	1.00 – 1.14
Model 1^b				
Constant	-3.2976	0.0001	–	–
Age over 60 years	1.4308	0.0060	4.18	1.50 – 11.70
Disease Duration	0.7029	0.0420	1.10	1.00 – 1.15
Rheumatoid Factor	0.6899	0.0450	1.99	1.02 – 3.91
<i>TNF2</i> Allele	1.7152	0.0020	5.56	1.89 – 16.33
Model 2^c				
Constant	-3.2652	0.0001	–	–
Age over 60 years	0.5262	0.0080	4.06	1.45 – 11.38
Disease Duration over 10 years	0.5227	0.0310	3.10	1.11 – 8.63
Rheumatoid Factor	0.7294	0.0350	2.07	1.05 – 4.09
<i>TNF2</i> Allele	1.7737	0.0010	5.89	1.98 – 17.51
Model 3^d				
Constant	-1.0440	0.0001	–	–
Disease Duration	0.0661	0.0460	3.04	1.17 – 7.91
<i>TNF2</i> Allele	1.1118	0.0230	1.10	1.00 – 1.14

^a *p* = 0.0001

^b *p* = 0.0001

^c *p* = 0.0001

^d *p* = 0.0090

Table 6. Logistic Regression for *TNF2* Allele Influence Analysis on DAS28 and HAQ

Predictor	Coefficients	<i>p</i>	Odds Ratio	95% Confidence Interval
DAS28 > 3.1^a				
Constant	0.8733	0.097	–	–
Age over 60 years	0.8004	0.224	2.64	0.55 – 12.7
Rheumatoid Factor	0.0241	0.930	1.02	0.60 – 1.76
Disease Duration	0.1928	0.041	1.21	1.01 – 1.46
<i>TNF2</i> Allele	-0.2817	0.659	1.01	0.22 – 2.64
HAQ > 1.0^b				
Constant	0.7915	0.077	–	–
Age over 60 years	1.4233	0.541	1.02	0.95 – 1.10
Disease Duration	0.0235	0.066	4.15	0.91 – 18.9
Rheumatoid Factor	-0.0753	0.876	1.02	0.36 – 2.39
<i>TNF2</i> Allele	0.7366	0.270	2.64	0.56 – 7.73

^a *p*=0.056

^b *p*=0.151