

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
LÉIA DE SENA BARBOZA FERREIRA

POLIMORFISMOS DO GENE C3 E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA C3 DO
SISTEMA COMPLEMENTO NA ARTRITE REUMATOIDE

CURITIBA
2019

LÉIA DE SENA BARBOZA FERREIRA

POLIMORFISMOS DO GENE C3 E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA C3 DO
SISTEMA COMPLEMENTO NA ARTRITE REUMATOIDE

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Medicina, no Curso
de Pós- Graduação em Medicina Interna e Ciências
da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Fabiana Antunes de
Andrade

Co-orientadora: Prof. Dra. Iara de Messias-Reason

CURITIBA
2019

F383 Ferreira, Léia de Sena Barboza

Poliformismos do gene C3 e concentração da proteína C3 do sistema complemento na artrite reumatóide [recurso eletrônico] / Léia de Sena Barboza Ferreira. – Curitiba, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Antunes de Andrade

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Iara de Messias-Reason

1. Artrite reumatóide. 2. Polimorfismo genético. 3. Proteínas do sistema complemento. I. Andrade, Fabiana Antunes de. II. Messias-Reason, Iara de. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WE 346



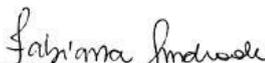
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECTOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

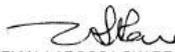
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LÉIA DE SENA BARBOZA** intitulada: **POLIMORFISMOS DO GENE C3 E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA C3 DO SISTEMA COMPLEMENTO NA ARTRITE REUMATÓIDE**, sob orientação da Profa. Dra. **FABIANA ANTUNES DE ANDRADE**, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Agosto de 2019.


FABIANA ANTUNES DE ANDRADE

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


THELMA LARocca SKARE

Avaliador Externo (FACULDADE EVANGELICA DO PARANA)


KARIN BRAUN PRADO

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)

À minha filha, razão da minha vida.
Ao meu esposo, pelo companheirismo.
Aos meus pais, pela minha base e referência
Às minhas irmãs, pelo imenso amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade, disposição e saúde para realizar esse trabalho. Em meio aos meus erros, dúvidas e fraquezas, obrigado Pai por ser minha fortaleza, sua fidelidade me constrange.

A Prof. Dra. Fabiana Antunes Andrade, mais que orientadora, uma amiga e exemplo de profissional. Pessoa dedicada, paciente, companheira e íntegra em tudo que se propõem a fazer. Para agradecer por sua generosidade em dividir seus conhecimentos e compreender minhas limitações, as palavras sempre serão poucas, fica como gratidão minhas orações.

A minha querida co-orientadora Prof. Dra. Iara de Messias-Reason, por me acolher e apoiar em todos os momentos, pelos conhecimentos transmitidos, pelas críticas construtivas, incentivo e fé. Que Deus continue lhe usando como um canal de bênçãos.

Obrigada a todos os funcionários e estudantes do laboratório de Imunopatologia Molecular do HC-UFPR, onde vivenciamos a satisfação e as angústias inerentes ao exercício da prática científica. Sentirei muita falta de todos vocês! Em especial, obrigada à doutoranda Sandra Catarino, pelo suporte na execução prática do trabalho, carinho, amizade. Agradeço também a doutoranda Camila Toré, pela dedicação e prontidão em me auxiliar na parte escrita dessa pesquisa, palavras de otimismo e incentivo sempre que algo não ia bem, sua amizade foi uma das minhas grandes conquistas nesse mestrado.

Aos amigos da Unidade de Hemoterapia do Complexo HC-UFPR, especialmente meus companheiros de plantão Maria e Enéias, pelo incentivo constante.

Minhas amigas Priscilla, Patrícia e Silvana, que sempre me deram bons conselhos, me consolaram no desespero e sempre estiveram ao meu lado quando precisei.

Obrigado aos meus pais, Antônio e Lécia pelo amor incondicional e dedicação sem os quais eu não teria chegado até aqui. É por vocês que concluo essa etapa com tanta alegria, podendo assim retribuir um pouco do orgulho que sinto de vocês. Obrigada à minhas irmãs, Leandra e Leidiane por serem minhas companheiras de todas as horas e por me incentivar a ir além do que eu julgava ser capaz.

Ao meu esposo, amor da minha vida, Rodrigo, meu exemplo de superação. Juntos temos sonhos, esperança, planos e principalmente temos amor que nos torna capazes de ousar e acreditar que nossos amanhãs serão brilhantes.

E por fim, minha filha Letícia que me deu um novo sentido a vida e novo significado a palavra amor, por compreender meus momentos de ausência.

'A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original'.

Albert Einstein

RESUMO

INTRODUÇÃO: A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória e crônica caracterizada por inflamação sinovial, levando à destruição grave da cartilagem, erosão óssea, deformidades e incapacidade funcional. O sistema complemento é um componente chave da imunidade inata que desempenha um papel significativo no desenvolvimento e na apresentação clínica da AR. A proteína C3 do complemento é uma molécula central na ativação do complemento e foi encontrada aumentada nos fluidos sinoviais de pacientes com AR e correlacionada com o processo inflamatório na AR, porém o impacto dos polimorfismos do gene C3 na AR ainda é desconhecido.

OBJETIVO: Investigar a possível influência dos polimorfismos do gene C3 na suscetibilidade e expressão clínica da AR. **MÉTODOS:** Três polimorfismos de nucleotídeo único C3 (SNPs) (rs2250656:A>G no intron 2, rs2230199:C>G [p.Arg102Gli] no exon 3 e rs1047286:C>T [p.Pro314Leu] no exon 9) foram avaliados por PCR sequência-específica em um total de 156 pacientes com AR do Sul do Brasil e 270 controles saudáveis. A concentração sérica de C3 foi avaliada em 60 controles e 60 pacientes através imunoturbidimetria. Os valores de dosagem de anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), fator reumatoide (FR-IgM) e características clínicas como a presença da síndrome de Sjögren e nódulos reumatoides, duração da doença e idade no início da doença foram coletados dos prontuários médicos. **RESULTADOS:** A frequência do alelo rs2230199G e genótipo rs2230199GG foi significativamente maior nos pacientes com AR do que nos controles ($p_{aju}=0,012$, OR=1,57 [1,11-2,31]; $p_{aju}=0,008$, OR=1,60 [1,35-2,33]) assim como rs1047286T e rs1047286TT ($p_{aju}=0,010$, OR=1,67 [1,12-2,40]; $p_{aju}=0,001$, OR=1,83 [1,27-2,65]). Além disso, o haplótipo C3 AGT foi mais frequente em pacientes com AR ($p_{aju}=0,0007$, OR=1,92 [1,32-2,80]). Os níveis séricos de C3 foram maiores em pacientes do que em controles (mediana: 169mg/dl vs.155mg/dl; $p_{aju}=0,022$), assim como naqueles soronegativos para FR comparados aos soropositivos (mediana: 166mg/dl vs. 172mg/dl; $p_{aju}=0,007$) e negativamente correlacionado com os níveis de FR ($p = 0,022$, $r = -30$). **CONCLUSÕES:** Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que aborda a associação entre polimorfismos do gene C3 e a AR. Nossos resultados sugerem que os alelos rs2230199G (p.102Gli) e rs1047286T (p.314Leu) desempenham um papel na fisiopatologia da AR, possivelmente impactando a ativação do complemento pela via alternativa.

PALAVRAS-CHAVE: Artrite Reumatoide; gene C3; polimorfismo; sistema complemento.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by synovial inflammation, leading to severe cartilage destruction, bone erosion, deformities and functional disability. The complement system is a key component of the innate immunity that plays a significant role in the development and clinical presentation of RA. Complement protein C3 is a central molecule in the activation of complement and was found increased in the synovial fluids of RA patients and correlated with the inflammatory process in RA, however the impact of C3 gene polymorphisms in RA is still unknown. **OBJECTIVE:** We investigate the possible influence of C3 gene polymorphisms in the susceptibility and clinical expression of RA. **METHODS:** Three C3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs2250656:A>G in intron 2, rs2230199:C>G [p.Arg102Gln] in exon 3 and rs1047286:C>T [p.Pro314Leu] in exon 9) were assessed by sequence-specific PCR in a total of 156 patients from Southern Brazil with RA and 270 healthy controls. C3 serum concentration was evaluated in 60 controls and 60 patients by immunoturbidimetry. Anti-cyclic citrullinated peptide, rheumatoid factor (RF), and clinical features such as the presence of Sjögren syndrome and nodules, disease duration and age at disease onset were collected from medical records. **RESULTS:** The frequency of rs2230199G allele and rs2230199GG genotype were significantly higher in RA patients than controls ($p_{adj}=0.012$ OR=1.57 [1.11-2.31]; $p_{adj}=0.008$, OR=1.60 [1.35-2.33]) as well as the rs1047286T and rs1047286TT ($p_{adj}=0.010$, OR=1.67 [1.12-2.40]; $p_{adj}=0.001$, OR=1.83 [1.27-2.65]). In addition, C3 AGT haplotype was more frequent in RA patients than controls ($p_{adj}=0.0007$ OR=1.92 [1.32-2.80]). Moreover, C3 levels were higher in patients than controls (median: 169mg/dl vs.155mg/dl; $p_{adj}=0.022$), as well as in RF seropositive compared with seronegative patients (166mg/dl vs. 172mg/d; $p_{adj}=0.007$), and negatively correlated with RF levels ($p=0.022$, $r=-0.3$). **CONCLUSIONS:** To our knowledge, this is the first study addressing the association between C3 gene polymorphisms and RA. Our results suggest that the rs2230199G (p.102Gln) and rs1047286T (p.314Leu) alleles play a role in the pathophysiology of RA, possibly impacting complement activation by the alternative pathway.

Key words: Rheumatoid arthritis; polymorphism; gene C3; Complement System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	ARTICULAÇÕES PERIFÉRICAS QUE PODEM SER ACOMETIDAS PELA AR / VISÃO AMPLIADA DA ARTICULAÇÃO.....	18
Figura 2:	FATORES ASSOCIADOS À MANIFESTAÇÃO DA AR.....	20
Figura 3:	ARTICULAÇÃO NORMAL X ARTICULAÇÃO NA AR.....	25
Figura 4:	ARTICULAÇÃO ACOMETIDA PELA AR.....	27
Figura 5:	CASCATA DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	35
Figura 6:	A: ESTRUTURA TRIDIMENCIONAL DA PROTEÍNA C3 COM A LIGAÇÃO TIOÉSTER EM DESTAQUE. B: PROCESSO DE CLIVAGEM SEQUENCIAL QUE ATIVA A PROTEÍNA C3.....	39
Figura 7:	REPRESENTAÇÃO DO GENE C3 NO CROMOSSOMO 19.....	41
Figura 8:	PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR MULTIPLEX C3.....	49
ARTIGO		
Figura 1:	A: CONCENTRAÇÃO DE C3 EM PACIENTES E CONTROLES, B: NÍVEIS DE C3 EM PACIENTES SOROPOSITIVOS E SORONEGATIVOS PARA FR; C: CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE C3 E FR.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE AR.....	29
Tabela 2:	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS ARTRITES.....	30
Tabela 3:	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS.....	43
Tabela 4:	INICIADORES SSP PROJETADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DO GENE C3	49
ARTIGO		
Tabela 1:	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS.....	73
Tabela 2:	INICIADORES SSP PROJETADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DO GENE C3	76
Tabela 3:	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE C3 EM PACIENTES E CONTROLES.....	77
Tabela 4:	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE C3 EM PACIENTES *BIOMARCADORES.....	78
Tabela 5:	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE C3 EM PACIENTES *MEA'S.....	79
Tabela 6:	FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DE C3 EM PACIENTES COM AR E CONTROLES.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR - American College of Rheumatology
AINE - Drogas Anti-Inflamatórias Não Esteroidais
Anti - CCP - Anticorpo Antipeptídeo Citrulinado Cíclico
AR - Artrite Reumatoide
BF - Fator B
DAÍ - Doenças Autoimunes
DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Dano
DMARD - Drogas Modificadoras Antirreumáticas
dNTP - Desoxirribonucleotídeos
FR - Fator Reumatóide
IL-1 - Interleucina 1
HLA - Antígeno Leucocitário Humano
MAC - Complexo de Ataque a Membrana
MBL - Lectina Ligante de Manose
NK - Natural Killer
PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR - Proteína C Reativa
PMN - Leucócitos Polimorfonucleares
RRP - Receptores de Reconhecimento de Padrões
SC - Sistema Complemento
TCR - Receptor de linfócitos T
TLRs - Receptores Toll-like
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa
VA - Via Alternativa
VC - Via Clássica
VL - Via Lectina
VHS - Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. REVISÃO E LITERATURA.....	18
3.1 Aspectos gerais da Artrite Reumatoide.	18
3.2 Fatores de patogenicidade associados a AR	19
3.2.1 Fatores genéticos.....	20
3.2.2 Fatores Ambientais	21
3.2.3 Fatores Hormonais	22
3.2.4 Fatores Imunológicos	23
3.3 Fisiopatogenia da AR.....	24
3.4 Manifestações clínicas.....	27
3.4.1 Manifestações Clínicas Articulares	27
3.4.2 Manifestações Clínicas Extra-articulares.....	28
3.5 Diagnóstico	28
3.6 Tratamento	31
3.7 Sistema Complemento.....	32
3.7.1 Via Alternativa.....	34
3.7.2 Via Clássica.....	36
3.7.3 Via das Lectinas.....	36
3.8 Sistema complemento e artrite reumatoide.....	37
3.9 Componente C3 do complemento.....	38

4. MATERIAIS E M ÉTODOS.....	43
4.1 CAUSÍSTICA.....	43
4.1.1 Pacientes.....	44
4.1.2 Controles	45
4.2 Técnicas.....	46
4.2.1 Extração do DNA.....	46
4.2.2 Reação em cadeia da polimerase sequência específica (PCR-).....	46
4.2.3 PCR-SSP para o gene C3	47
4.2.4 Dosagem da Proteína C3.....	50
4.3 Análises Estatística.....	50
5. RESULTDOS E DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERENCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, de etiologia desconhecida, caracterizada pela inflamação do tecido sinovial de múltiplas articulações, levando a destruição da cartilagem, erosão óssea e à rigidez nas articulações (MCINNES; SCHETT, 2017). Essas alterações podem interferir de forma negativa no desempenho das atividades de vida diária e do trabalho, com conseqüente impacto na qualidade de vida (CAMPOS et al., 2013). A incidência da AR é aproximadamente 1% da população mundial, sendo de duas a três vezes mais prevalente em mulheres (RENAN LUIZ FERNANDES. et al., 2011; SCOTT et al., 2010). Segundo o American College of Rheumatology (ACR), o diagnóstico da AR deve ser pautado em correlação a sintomas e sinais clínicos, exames laboratoriais e radiográficos (ARNETT et al., 1988), sendo o diagnóstico precoce por meio de marcadores sorológicos de fundamental importância para prevenção de agravos da doença (ALETABA et al., 2010a). Para o tratamento da AR, faz-se necessário uma avaliação individual do paciente, considerando a atividade da doença, avaliando os sintomas e estados funcionais, bem como a eficácia de possíveis tratamentos anteriores (VENSON, 2011). O tratamento tem como objetivo principal a remissão da doença, para isso o diagnóstico precoce é determinante, prevenindo incapacidade funcional e lesão articular irreversível (SINGH et al., 2015).

Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da AR, sendo que 60% deste risco está associado a contribuição genética (REGO-PÉREZ et al., 2009). Estudos demonstram forte associação de genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e a predisposição a AR (REGO-PÉREZ et al., 2009). A exposição a fatores ambientais também pode ser um gatilho para o desenvolvimento da AR em indivíduos geneticamente susceptíveis a doença (GOELDNER et al., 2011)

O Sistema Complemento (SC) é um componente da imunidade inata que desempenha importante papel no sistema de vigilância imunológica, participando de processo como opsonização e fagocitose de agentes

patogênicos, inflamação, lise celular, depuração de complexos imunes e na remoção de células apoptóticas

(ANDRADE et al., 2017; BAHIA EL IDRISSEI et al., 2016). O SC apresenta um papel importante na fisiopatologia da AR uma vez que atua no processo inflamatório e na remoção de complexos imunes circulantes e células apoptóticas característicos da doença (BAHIA EL IDRISSEI et al. 2016), sendo associado a susceptibilidade e apresentação clínica da doença (DELANGHE; SPEECKAERT; SPEECKAERT, 2014)

O componente C3 desempenha um papel central na ativação do SC, e é comum as três vias de ativação: via clássica, via alternativa e via das lectinas. Independente da via de iniciação do SC, todas culminam na ativação da proteína C3, que gera os fragmentos C3a e C3b, os quais contribuem levando adiante a cascata de ativação de complementos (BAHIA EL IDRISSEI et al. 2016). C3 é uma das moléculas mais versáteis e multifuncionais conhecidas, interagem com numerosas proteínas séricas, moléculas de superfície celular e patógenos, por isso tem sido alvo de diversos estudos com doenças infecciosas e inflamatórias (URSINI et al., 2017). Alta concentração de C3 já foi observada no líquido sinovial e plasmas de pacientes com AR (BEMIS et al., 2019; HOLERS; BANDA, 2018; NEUMANN et al., 2002) bem como alguns de seus metabolitos ativos (C3a e C3d) (NEUMANN et al., 2002; OKROJ et al., 2007), indicando sua contribuição na doença, contudo o impacto dos polimorfismos do gene C3 na AR ainda é desconhecido.

Considerando a alta prevalência da AR e seu poder incapacitante, que pode levar à invalidez econômica e social, a busca por marcadores associados a doença é imprescindível e pode contribuir tanto para melhor compreensão da fisiopatologia da AR como servir como ferramenta para futuros métodos de diagnósticos e prognóstico. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a possível associação entre polimorfismos do gene C3 e concentração da proteína C3 do complemento com a AR e suas formas clínicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a possível associação entre polimorfismos do gene C3 e níveis séricos de C3 com a AR e suas manifestações clínicas.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar possíveis associações entre polimorfismos do gene C3 com a AR e suas manifestações clínicas;
- b) Avaliar associação entre níveis séricos de C3 e a AR e suas manifestações clínicas;
- c) Verificar se os polimorfismos do gene C3 influenciam nas concentrações séricas da proteína nos grupos de pacientes e controles.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos Gerais da Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune (DAI), sistêmica inflamatória crônica que afeta principalmente as articulações periféricas, levando à inflamação sinovial seguida de destruição da cartilagem e do osso (HOLERS; BANDA, 2018) (**Figura1**). Além das articulações, a AR pode acometer também outros órgãos como coração, pulmão, cérebro e sistema cardiovascular (SINGH et al., 2015). Nessas condições a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida no prazo de cinco a dez anos (SINGH et al., 2015). Indivíduos acometidos com AR demonstram ter capacidade ocupacional diminuída e limitação funcional resultando em prejuízos socioeconômicos (CAMPOS et al., 2013)

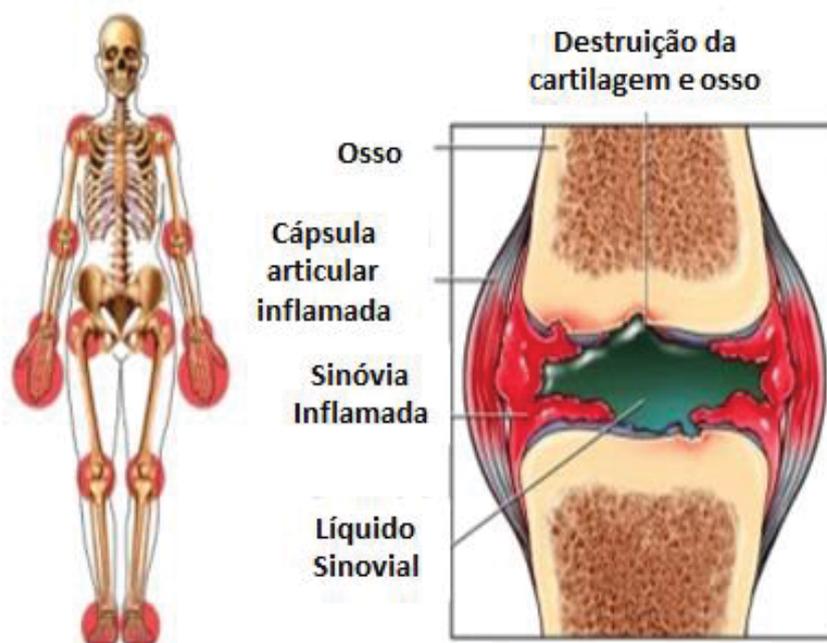


Figura 1: ARTICULAÇÕES PERIFÉRICAS QUE PODEM SER ACOMETIDAS PELA AR / VISÃO AMPLIADA DA ARTICULAÇÃO

Fonte: Adaptado («ARTRITE REUMATÓIDE. | lamoreabio: biologia e educação em saúde.»), [s.d.]

Além dos problemas relacionados à dor e à inflamação característica da doença, os pacientes com AR também são acometidos por problemas psicológicos, como ansiedade e depressão com uma prevalência de 13% a 47% (ROMA et al., 2014)

A AR acomete atualmente cerca de 1% da população mundial, podendo variar entre diferentes grupos populacionais, sendo observada em todos os grupos étnicos (VAZ et al., 2013). Estima-se que a prevalência da AR na população brasileira esteja entre 0,2 e 1% (SINGH et al., 2015). Os sintomas da doença costumam geralmente aparecer entre a 4ª e a 6ª década de vida, estando às mulheres duas a três vezes mais susceptíveis que homens (MICHOU et al., 2012; VAZ et al., 2013)

3.2 Fatores de Patogenicidade associados a AR

Os distúrbios autoimunes afetam cerca de 7 a 9% da população mundial e consistem em mais de 80 distúrbios diferentes (ZAMANPOOR, 2018). Estudos clínicos e experimentais confirmam que a sobreposição de fatores ambientais, hormonais e imunológicos pode influenciar no aparecimento de uma doença autoimune (SILVA, 2013). A exposição a esses fatores em indivíduos geneticamente susceptíveis seriam um possível gatilho para desenvolver a AR, (ZAMANPOOR 2018) conforme **Figura 2**.

A AR se desenvolve em um período assintomático de risco genético, um período pré-clínico em que os anticorpos associados à AR podem ser detectados, e um período clínico de sinais e sintomas da artrite inflamatória (KARLSON et al., 2009). Vários fatores contribuem para a patogenia da AR, entre eles estão os fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos. Sobreposição de fatores de risco em indivíduos geneticamente suscetíveis determina o desenvolvimento da doença (KARLSON *ET AL.* 2009)

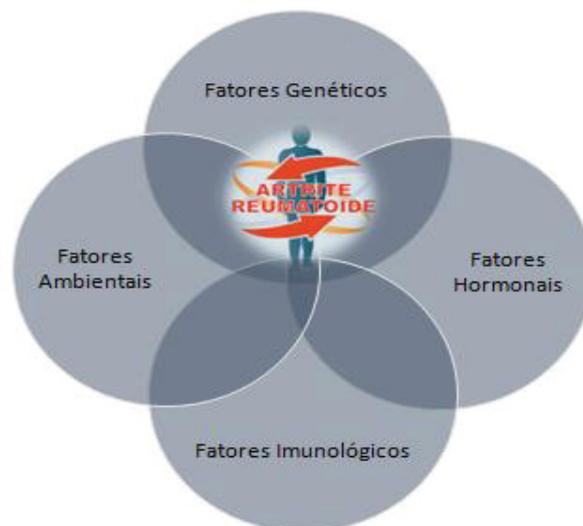


Figura 2: FATORES ASSOCIADOS À MANIFESTAÇÃO DA AR

Fonte: ADAPTADO SILVA, 2013

3.2.1 Fatores genéticos

Entre os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da AR, 60% deste risco está associado a contribuição genética. (ZAMANPOOR 2018) Há também um risco aumentado para desenvolvimento de AR em parentes de primeiro grau de pacientes acometidos (VIATTE; PLANT; RAYCHAUDHURI, 2013).

Segundo a base de dados de polimorfismos relacionados com a AR (RADB) cerca de 3235 polimorfismos de 636 genes já foram associados a AR. Essa variabilidade de polimorfismo reflete-se nas manifestações clínicas, determinando um prognóstico de severidade da doença (ZHANG et al., 2014)

Muitos estudos têm demonstrado que genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) estão associados à predisposição para AR. A associação com maior prevalência foi para a região do antígeno leucocitário humano (HLA) classe II e codifica a molécula *HLA-DRB1*, elucidando 30% do risco genético (ZHANG et al. 2014). Outros estudos também confirmaram a associação do gene *HLA-DRB1* com doença articular mais grave e presença de manifestações extra articulares na AR, essas manifestações têm papel importante como preditores de mortalidade prematura em pacientes com AR (ZHANG et al. 2014).

Embora os genes HLA tenham grande importância na AR, a susceptibilidade genética à doença não se restringe a eles. Em trabalho recente, Zamanpoor *et al.* demonstrou uma associação com a AR genes que estão envolvidos em vias inflamatórias e respostas autoimunes como transdutor de sinal e ativador de transcrição 4 (*STAT4*), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e NF-κB (ZAMANPOOR 2018). Além de tentar encontrar novos polimorfismos ou genes responsáveis pelo desenvolvimento da AR, pesquisadores trabalham para elucidar os mecanismos patogênicos sugeridos por esses polimorfismos já relatados. Estudos investigam como tais polimorfismos regulam a expressão gênica ou atividade celular, quais tipos de células imunes e vias biológicas são afetadas. Esses achados estão sendo usados para orientar o desenvolvimento de novas drogas e o reaproveitamento de drogas já disponíveis (YARWOOD; HUIZINGA; WORTHINGTON, 2016).

Estudos do campo da epigenética têm demonstrado que o estilo de vida e os fatores ambientais são determinante para a expressão de específicos genes. A ciência da epigenética na autoimunidade ainda é relativamente jovem, porém estudos demonstram que uma variedade de mecanismos epigenéticos foram associados na AR, incluindo metilação do DNA, modificação de histonas e expressão de microRNA (FIRESTEIN; MCINNES, 2017)

3.2.2 Fatores Ambientais

Exposição ao tabaco é um dos fatores ambientais mais importantes o desenvolvimento da AR, estando relacionado a 50% do diagnóstico para AR (SILVA, 2013). A hipótese de que o tabagismo e a poluição levam a um risco aumentado de AR abriu o caminho para a hipótese de que a inflamação inicial e a produção de auto anticorpos relacionados à AR (chamados anticorpos antiproteína citrulinada ACPA) nos pulmões podem levar à AR. Porém até o momento, não há estudos mostrando a migração direta de ACPA dos pulmões para as articulações periféricas para precipitar a doença (HOLERS E BANDA 2018).

Mimetismo molecular também sido sugerido como desencadeador de doenças autoimunes incluindo a AR. Entre os microrganismos mais estudados na AR estão o *Proteus mirabilis*, vírus *Epstein-Barr*, infecções por alfavírus (vírus transmitidos por mosquitos) como o vírus Ross River (SUHRBIER; LA LINN, 2004), e o vírus Chikungunya (SCHILTE et al., 2013). Deficiência de vitamina D, condições de estresse mental, algumas vacinas (SILVA, 2013) disbiose do microbioma nas regiões orais ou intestinais, (HOLERS E BANDA 2018), pó de sílica (CATRINA et al., 2017) entre outros fatores (SILVA 2013; ZHANG et al. 2015). A microbiota intestinal contribui para a patogênese da AR por ruptura do sistema imune inato e adaptativo via indução de citrulinização com auto proteína em células imunes como neutrófilos, produção de citocinas inflamatórias e auto anticorpos em indivíduos geneticamente suscetíveis (ZAMANPOOR 2018).

3.2.3 Fatores Hormonais

O fato de a AR afetar duas a três vezes mais mulheres do que homens, com uma prevalência em mulheres de 30 a 50 anos, pode estar relacionado com fatores hormonais, já que alguns estudos demonstram um efeito protetor durante o período de gestação devido ao aumento estrógenos e progesterona (GOELDNER et al., 2011). Outros, apontam a influência do estradiol sobre diminuição da apoptose e função de células imunológicas, suprimindo a resposta imunológica (GOELDNER et al., 2011; SOKKA et al., 2009). Embora ainda não possuam relação entre anticoncepcionais orais ou terapia de reposição hormonal e o risco de desenvolver AR, a doença apresentam-se mais frequentemente após a menopausa. Há também relatos que os estrógenos estão significativamente elevados em relação aos andrógenos no fluxo sinovial de pacientes com AR (ORTONA et al., 2016).

3.2.4 Fatores Imunológicos

Na fase pré-clínica, período que precede o início do aparecimento de sinais e sintomas clinicamente aparentes da doença, pode-se detectar anticorpos associados à AR. Esse estágio pré-clínico é caracterizada pela

presença de biomarcadores relacionados à doença (DEMORUELLE; DEANE; HOLERS, 2014)

Um anticorpo clássico relacionado a AR é o fator reumatoide (FR), sua presença está relacionada com a forma mais grave da doença tanto para a ocorrência da inflamação articular quanto aos processos extra-articulares (MOTA, 2009). Dirigido contra o fragmento Fc da imunoglobulina, o FR se une a anticorpos da classe IgG para formar complexos imunes, desencadeando a cascata de ativação do complemento e mecanismos de fagocitose, pela via clássica (MOTA, 2009). Em relação ao isotipo, o FR pode ser das classes IgA, IgG e IgM, sendo IgM o mais frequentemente determinado, possui sensibilidade de aproximadamente 74% e especificidade de 77% para a AR. Porém, o FR-IgM pode estar presente em outras doenças e na população sadia, o que limita seu uso isolado (CHATFIELD et al., 2009). A presença de imunocomplexos FR-IgG ativa o sistema complemento, resultando consequentemente em uma acentuada resposta inflamatória, com liberação de histamina, produção de fatores quimiotáticos e lesão celular (GOELDNER et al., 2011)

Outros anticorpos fortemente associado ao risco de desenvolvimento da AR são os anticorpos antiproteínas e peptídeos citrulinados (ACPA – *anti-citrulinated protein/peptide antibodies*), incluindo anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) (COSTA; BECK, 2011). São mais específicos que o FR em pacientes com AR, ocorrendo em menos de 2% dos indivíduos saudáveis e apenas em baixos níveis em outras doenças inflamatórias (MALMSTRÖM; CATRINA; KLARESKOG, 2017). A citrulina é um aminoácido pouco comum, resultado da deaminação de um resíduo de arginina pela enzima peptil-arginino-deiminase, estando presentes em poucas proteínas humanas, entre elas a profilagrina e a filagrina, conferindo uma maior sensibilidade para o diagnóstico da AR (COSTA; BECK, 2011). FR e ACPA contribuem para a ativação de macrófagos e produção de citocinas e suas interações potencializam o efeito sobre a resposta inflamatória e lesão tecidual (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Embora o comitê do Colégio Americano de Reumatologia (ACR- *American College of Rheumatology*) e a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR - *European League Against Rheumatism*),

indique no item "auto anticorpos" a investigação apenas FR e ACPA, outros auto anticorpos tem sido utilizados na investigação da AR. Entre eles, anticorpos contra vimentina citrulinada mutada (anti-MCV - *mutated citrullinated vimentin*), antiqueratina (AKA - *antikeratin antibodies*) e fator antiperinuclear (APF - *anti-perinuclear factor*), antifibrinogênio citrulinado (ACF - *antibodies to citrullinated human fibrinogen*) e o antiproteína A2 do complexo de ribonucleoproteína nuclear heterogêneo (anti-RA), anti-interleucina 1 (anti-IL1), anti-1- α -enolase os quais apresentam boa especificidade, mas sensibilidade inferior ao anti-CCP para o diagnóstico da AR (COSTA; BECK, 2011)

3.3 Fisiopatogenia da AR

Fisiopatologia da AR é definida por um processo inflamatório intenso da membrana sinovial, caracterizado pela hiperplasia, hipertrofia e alteração funcional dos sinoviócito. (FERNANDES. et al., 2011) **Figura 3.** Sinovócitos são tipos de células da imunidade inata que podem ser responsáveis por iniciar o processo inflamatório dentro da articulação, podendo ser de dois tipos: fibroblastos e macrófagos (ARROTÉIA, 2014). Segundo Buckley et al. sinovócitos tem a propriedade de apresentarem antígenos para célula T, caracterizando a participação de fibroblastos e na propagação da sinovite (BUCKLEY et al., 2019). Esse processo pode ser desencadeado por um estímulo antigênico, iniciando o processo inflamatório em indivíduos geneticamente predispostos e em condições ambientais favoráveis. (BUCKLEY et al. 2019)

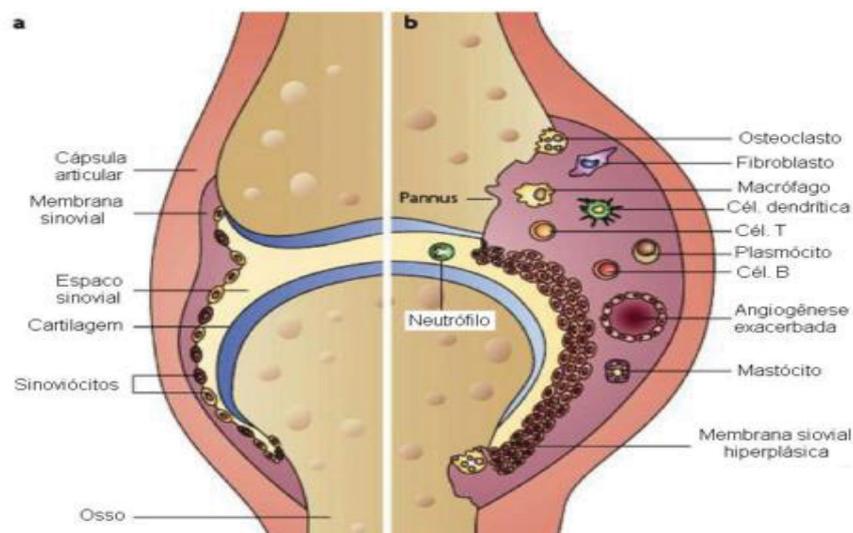


Figura 3: ARTICULAÇÃO NORMAL X ARTICULAÇÃO NA AR
 Nota: A: articulação normal. B: articulação inflamada na AR;

Fonte: (SILVA, 2013).

A composição celular da sinovite na AR inclui tanto as células imunes inatas quanto as adaptativas, como as células da linhagem de monócitos, as células dendríticas, os mastócitos, os osteoclastos, as células T auxiliares tipo Th1 e Th17, as células B bem como células plasmáticas (ZAMANPOOR, 2018). Esse processo de infiltração celular resulta na destruição e remodelação óssea, estimulando a produção de mediadores da inflamação, proliferação de vasos sanguíneos e acúmulo de células inflamatórias na membrana sinovial (SCOTT *et al.* 2010). Os linfócitos T CD4⁺ (predominantes na membrana sinovial) capazes de produzir citocinas, atraem e ativam macrófagos que por sua vez produzem citocinas associadas ao desenvolvimento da AR e na manutenção do processo inflamatório como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Diante dessa cascata inflamatória, também são ativadas outras citocinas como fatores de crescimento, produzidas pelos macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e sinovócitos. Tais alterações sinoviais são responsáveis pelas manifestações clínicas clássicas inerentes a AR como: edema, dor e rigidez articular (ARROTÉIA, 2014).

O tecido inflamatório sinovial em proliferação é chamado de “*pannus*”. Esse tecido recém-formado cresce sobre a cartilagem articular, revestindo-a e

ligando-se a ela de tal maneira que não é possível ser afastado (REGO-PÉREZ et al. 2009). A invasão da cartilagem pelo “*pannus*” leva a destruição do colágeno tipo II por metaloproteinases da matriz (MMPs), e por outras enzimas produzidas por células sinoviais e condrócitos quando estimulados por citocinas, como TNF α , IL1, IL6, IL 17 e oncostatina (REGO-PÉREZ et al. 2009). As MMPs do tipo 1 (MMP-1) medeiam a ação do “*pannus*” na cartilagem (FERNANDES et al., 2011). As erosões ósseas ocorrem precocemente na AR e de forma irreversível. Nesta doença, o equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea está alterado, com aumento da reabsorção, a qual é mediada pelos osteoclastos, células multinucleadas, que existem em grande quantidade na articulação afetada (FERNANDES et al. 2011).

Ocorre ainda um estímulo à produção de imunoglobulinas (fator reumatoide-FR), com a formação de imunocomplexos que se depositam na membrana sinovial, ativando o sistema complemento e promovendo a progressiva migração de neutrófilos e macrófagos para o local (SCOTT 2010). Os neutrófilos são uma fonte de auto antígenos e têm papel citotóxico e imunoregulatório na fisiopatologia da AR (ZAMANPOOR 2018). Embora a relação entre a positividade para o fator reumatoide (FR) e o desenvolvimento da AR não seja elucidada, ambos estão intimamente associados. A presença de agregados de imunoglobulina do tipo G (IgG) ou de complexos de IgG-FR ativa o sistema complemento resultando em diversos fenômenos inflamatórios (NASS et al., 2015). Além disso, o reconhecimento dos imunocomplexos (IC's) por fagócitos promove liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, principalmente o TNF- α , o que exacerba ainda mais o processo inflamatório (GOELDNER et al., 2011)

3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

3.4.1 Manifestações Clínicas Articulares

O curso da AR é extremamente variável, as manifestações clínicas podem iniciar de forma branda, onde observa-se mal-estar, fadiga, dores musculoesqueléticas, encaminhando-se para a sinovite, com o envolvimento preferencial nas articulações de mãos e punhos, até formas graves como a poli

artrite onde as articulações apresentam-se edemaciadas, quentes e dolorosas (GOELDNER et al. 2011). (**Figura 4**)

Manifestações articulares podem ser reversíveis quando diagnosticadas na fase inicial da doença, após o processo de sinovite onde há destruição e remodelação óssea, elas são irreversíveis. A sinovite é a característica clássica da manifestação articular, acometendo qualquer articulação diartrodial do corpo (MARIA et al. 2012). Segundo o Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia, são características da artrite na AR: acometimento poliarticular, artrite em mãos e punhos, artrite simétrica, artrite cumulativa ou aditiva e rigidez matinal (MARIA et al. 2012).

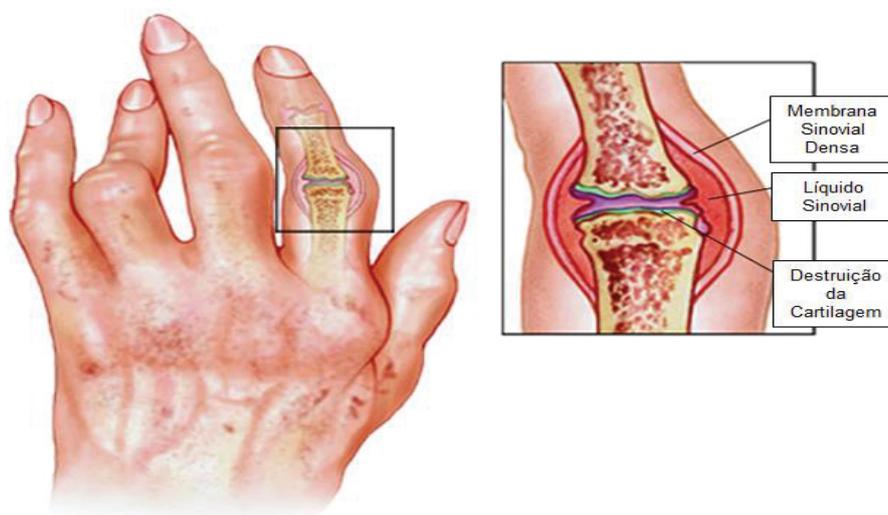


Figura 4: ARTICULAÇÃO ACOMETIDA PELA AR

Nota: A artrite reumatóide pode causar dor, inchaço e deformidade. À medida que o tecido que reveste suas articulações (membrana sinovial) se torna inflamado e denso, o fluido se acumula ocorrendo o desgaste e destruição da cartilagem e do osso.

Fonte: («Rheumatoid arthritis - Symptoms and causes - Mayo Clinic», [s.d.]

3.4.2 Manifestações Clínicas Extra-articulares

Embora a AR seja uma doença de caráter articular, ela também pode acometer outros órgãos e sistemas as quais são denominadas manifestações extra-articulares (MEA's) como nódulos reumatóides, síndrome de Sjögren secundária, vasculite, doenças pulmonares entre outras. (Das & Padhan, 2017; Scott et al., 2010). Além de comorbidades como trombose venosa, embolia

pulmonar, dislipidemia, diabete *melittus*, arterosclerose, síndrome metabólica, neoplasias, síndrome de Sjogren secundária e arritmia cardíaca (Marques, Cruz, Rego, & Silva, 2016).

Quase 50% dos pacientes com AR, desenvolve algum tipo de MEA (SUBHAN; PADHAN, 2017). É mais observada em pacientes com acometimento poliarticular, sorologia positiva para marcadores imunológicos (MARIA *et al.* 2012) estando associada a uma maior taxa de mortalidade ou redução significativa da sobrevida dos pacientes (SUBHAN; PADHAN, 2017).

A manifestação extra-articular mais frequente é o nódulo reumatoide, porém a que está associada a maior taxa de mortalidade são as doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e suas complicações. Diferente do que é visto na AR, MEA's ocorre igualmente entre homens e mulheres em qualquer idade da doença (SUBHAN; PADHAN, 2017).

3.5 Diagnóstico

Em 2010, o American College of Rheumatology (ACR) e European League Against Rheumatism, apresentou critérios de classificação para o diagnóstico da AR baseados na extensão da sensibilidade e inchaço das articulações, níveis séricos de autoanticorpos como fator reumatoide (FR) e autoanticorpo proteico anticitrulinato (ACPA), níveis de proteína de fase aguda, como proteína C reativa (PCR), taxa de sedimentação de eritrócitos (VHS) e duração dos sintomas. Porém, a sensibilidade da ACPA é de 60 a 75% e a taxa de positividade de FR é de 60 a 70%, o que nos sugere que o diagnóstico precoce é muito difícil e justifica o porquê do prognóstico ruim da doença (MUN *et al.* 2018).

Os critérios diagnósticos estão dispostos na Tabela 1. Quando a soma dos itens de A até D resulta igual ou superior a 6, os achados correspondem à AR definida. Embora pacientes com somatório inferior a 6 não sejam considerados como portadores de AR, os mesmos podem ser reavaliados e os critérios podem ser completados de maneira cumulativa no decorrer do tempo (ALETAHA *et al.*, 2010).

Tabela 1: CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE AR

	Pontos
A- Envolvimento articular – por envolvimento entende-se edema ou sensibilidade à palpação que podem ser confirmados por exames de imagem. <u>Excluem-se:</u> interfalangeanas distais, 1ª carpo-metacarpiana e 1ª tarso-metatarsiana.	0
1 articulação grande (cotovelos, ombros, joelhos, coxo-femorais e tornozelos);	1
2-10 articulações grandes (cotovelos, ombros, joelhos, coxo-femorais e tornozelos);	2
1-3 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalangeanas, interfalangianas proximais, 2ª a 5ª metatarsofalangeanas, interfalangeanas do hálux e punhos;	3
4-10 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, 2ª a 5ª metatarsofalangeanas e, interfalangeanas do halux e punhos;	5
> 10 articulações (com pelo menos 1 articulação pequena incluída).	5
B- Sorologia (o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação)	
FR E anti-CCP negativo;	0
FR OU anti-CCP positivo fraco;	2
FR OU anti-CCP fortemente positivo.	3
C- Reagentes de fase aguda (o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação)	
Proteína C reativa E VHS normal;	0
Proteína C reativa OU VHS alterado.	1
D- Duração dos sintomas (autorreferidos pelo paciente)	
< 6 semanas;	0
≥ 6 semanas.	1

Legenda: VHS: velocidade de hemossedimentação (ALETAAH et al., 2010).

Os novos critérios classificatórios ACR/EULAR podem ser usados em qualquer paciente, desde que dois requisitos básicos estejam presentes: 1) Deve haver evidência de sinovite clínica ativa no momento do exame em pelo menos uma articulação. 2) Os critérios só são aplicáveis aos pacientes para os quais a sinovite não possa ser melhor explicada por outros diagnósticos. (MARIA et al., 2012)

Casos em que a AR se apresenta de forma clássica, o diagnóstico se torna mais fácil, porém na sua fase inicial onde alterações sorológicas e radiográficas podem estar ausentes, torna o reconhecimento da doença mais

complexo. Testes ou sintomas isolados não confirmam o diagnóstico, pois diversas doenças podem cursar com artrite. É necessário o diagnóstico diferencial conforme **Tabela 2** (MARIA et al., 2012)

Tabela 2: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS ARTRITES

GRUPOS DE DOENÇAS	DOENÇAS
INFECÇÕES	Virais (ex. dengue, HIV, parvovirus, citomegalovírus, vírus da hepatite), bacterianas(ex. <i>N.gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i>), microbacterianas, fúngicas e outras.
ESPONDILOARTRITES	Artrites retivas (<i>Chlamydia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Yersinia</i>), espondilites anquilosante, artrite psoriásica, artrite entoropáticas.
DOENÇAS REUMÁTICAS SISTÊMICAS	Lupus eritematoso sistêmico, polimiosite/dermatomiosite, esclerose sistêmica, síndrome do Sjögren, doença de Behçet, polialmialgia reumática, vasculites sistêmicas e outras.
ARTRITES MICROCRISTAIS	Gota, doenças por depósito de cristais de pirofosfato de cálcio e outros.
DOENÇAS ENDÓCRINAS	Hipotireoidismo, hipertireoidismo.
DOENÇAS NEOPLÁSICAS	Doenças neoplásicas metastáticas, linfoma, síndromes paraneoplásicas e outras.
OUTRAS	Osteoartrite, Hematomacrose, amiloidose, sarcoidose, doença do soro, angioedema

Fonte: Adaptado MARIA et al., 2012

O diagnóstico precoce por meio de marcadores sorológicos é de fundamental importância para prevenção de agravos da doença. Os anticorpos anti-CCP presentes vários anos antes do início da doença, pode ser uma ferramenta importante para um tratamento precoce em indivíduos susceptíveis, de forma a prevenir severas lesões tardias (ALETAHA et al., 2010a).

O exame de dosagem do FR foi incluso em 2007 pela Liga Europeia contra o Reumatismo como o principal exame laboratorial de investigação para o diagnóstico precoce da AR (ALETAHA et al., 2010), durante muitos anos, considerado como principal ferramenta laboratorial no diagnóstico da AR, por sua sensibilidade. Porém devido à sua baixa especificidade pode ser detectado em pacientes com outras doenças inflamatórias e reumáticas limitando o diagnóstico. Isso levou os pesquisadores a buscar novos testes e marcadores para doença. Tanto o FR quanto anti-CCP podem ser usados para prever AR mesmo quando detectado em indivíduos saudáveis (COSTA; BECK, 2011; MENON et al., 2016)

A atividade da doença é medida baseando-se nas queixas do paciente, resultados de exames físicos, laboratoriais, radiográficos e avaliando a limitação funcional. Contam-se articulações dolorosas e edemaciadas, considerando a intensidade da dor. (MARIA *et al.* 2012).

3.6 Tratamento

Para o tratamento da AR, faz-se necessário uma avaliação individual do paciente, considerando a atividade da doença, avaliando os sintomas e estados funcionais, bem como a eficácia de possíveis tratamentos anteriores. O tratamento tem como objetivo principal a remissão da doença, para isso o diagnóstico precoce é determinante, prevenindo incapacidade funcional e lesão articular irreversível. Infelizmente são poucos os casos com sucesso (SINGH et al., 2015; VENSON, 2011)

Fisioterapia e terapia ocupacional são exemplos de tratamentos não medicamentosos que contribuem para a qualidade de vida do paciente. Já que visam o fortalecimento da musculatura peri-articular. Eles devem contemplar um programa de flexibilidade adequado, evitando o excesso de movimento, distribuindo a sobrecarga de peso. O repouso, embora importante, não deve ser prolongado, a fim de evitar maior degeneração articular (SINGH et al. 2015).

Quanto ao tratamento medicamentoso, existem três principais grupos farmacológicos para o tratamento da AR: drogas anti-inflamatórias não

esteroidais (AINEs) e glicocorticoides, drogas modificadoras antirreumáticas (DMARD) e agentes imunobiológicos. (MARIA et al. 2012; SINGH et al. 2015).

Drogas anti-inflamatórias não esteroidais são utilizadas para controle da dor e edemas articulares. Os glicocorticoides, além de alívio dos sintomas, podem reduzir dano articular ou intra-articular. As drogas modificadoras antirreumáticas reduzem o avanço da doença controlando o processo inflamatório, sendo considerados modificadores do curso da doença (MARIA et al. 2012; SINGH et al. 2015).

Medicamentos imunobiológicos, são drogas geneticamente construídas para atuarem sobre proteínas ou células do sistema imune que participam do processo inflamatório, tem como objetivo o bloqueio da destruição cartilaginosa e óssea. Também modificam o curso da doença, porém ainda existem dúvidas e controvérsias sobre a eficácia e segurança da terapia com agentes biológicos (MARIA et al. 2012).

A redução da qualidade de vida e excesso de mortalidade está diretamente relacionada com o tratamento inadequado. A idéia atual de condução do tratamento depende do diagnóstico precoce, da prescrição imediata de um DMARD e controle da inflamação (ROCHA et al., 2018). Progressos em ferramentas de diagnóstico e desenvolvimento de novas opções terapêuticas, principalmente os agentes biológicos, foram de extrema importância para a melhora do resultado do tratamento. Apesar de todo esse progresso, o diagnóstico de AR é lento e os pacientes permanecem com o tratamento inadequado, resultando em grande impacto na qualidade de vida e perda da capacidade funcional (ROCHA et al., 2018).

3.7 Sistema Complemento

O Sistema Complemento (SC) é um componente da imunidade inata, sendo formado por cerca de 50 proteínas plasmáticas (inativadas na circulação) e de superfície celular, produzidas principalmente pelos hepatócitos, macrófagos e fibroblastos. Ao serem ativadas estas proteínas interagem entre si formando complexos com propriedades proteolíticas, ativando os elementos seguintes em uma cascata, processo que requer um sistema eficiente de moléculas reguladoras para manter o equilíbrio

homeostático (VARELA; TOMLINSON, 2015). As principais funções biológicas do SC são: opsonização, aumento da fagocitose por macrófagos e neutrófilos, participação na ativação de células B e T, remoção de imunocomplexos e células apoptóticas, estimulação inflamatória contribuindo para o aumento da permeabilidade e influxo capilar, citólise mediada pelo MAC (complexo de ataque à membrana) (VARELA; TOMLINSON 2015).

Por muitos anos o SC foi considerado como uma simples cascata lítica destinada a atacar bactérias invasoras. Porém ao longo dos anos ficou claro que ele é multifuncional e que suas ações vão além de simples atividades bactericidas (MERLE et al., 2015). Além de seu papel central na imunidade inata, o SC participa também da modulação da imunidade adaptativa, além de ter um importante papel como mediador humoral do processo inflamatório (CRUVINEL, 2010).

O SC pode ser ativado através de três vias: a clássica (VC) depende da produção prévia de anticorpos específicos aderidos às superfícies dos patógenos, está associada à resposta imune específica humoral; via das lectinas (VL) ativada por ligação de uma lectina plasmática à um resíduo de manose de um patógeno; e a via alternativa (VA) que é espontaneamente ativada na superfície das células microbianas, no plasma e outros fluidos, independente da presença de anticorpos (BAHIA EL IDRISSEI et al., 2016). **(Figura 4)**

As três vias do SC se diferenciam na forma como são iniciadas, porém todas culminam na clivagem da proteína C3, resultando a primeira enzima da cascata, a C3 convertase (BAHIA EL IDRISSEI et al., 2016).

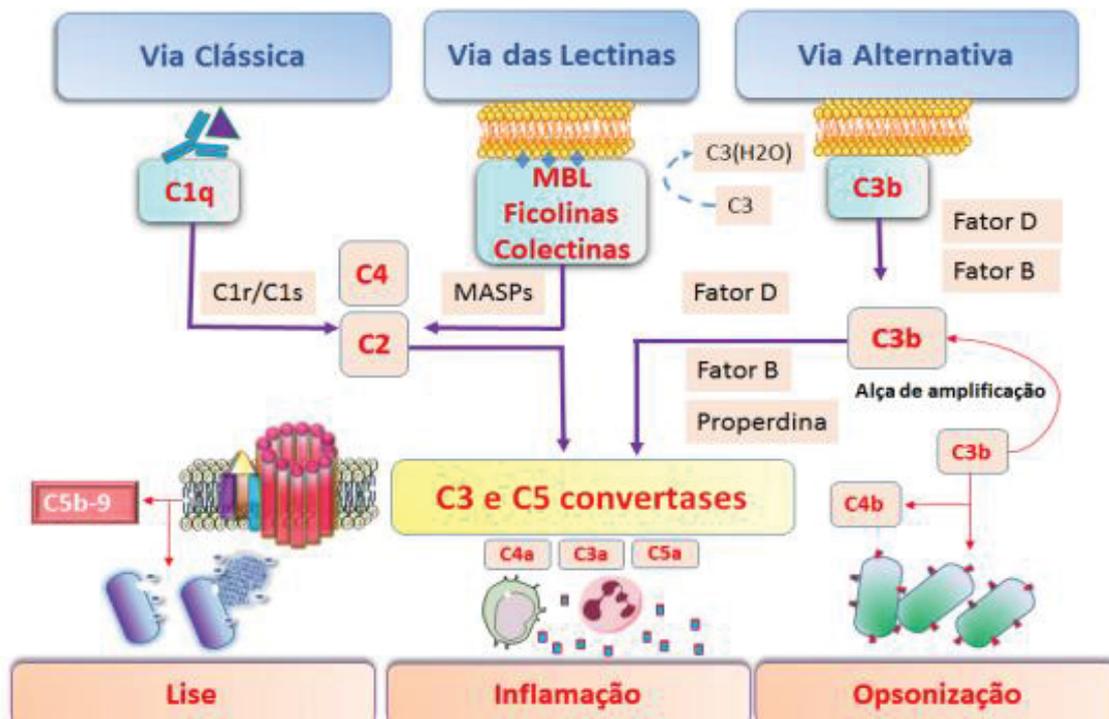


FIGURA 4: CASCATA DO SISTEMA COMPLEMENTO

Nota: A ativação do complemento pode se dar por uma das três diferentes vias, convergindo para a formação de C3b. O C3b inicia os passos finais da ativação do complemento, ativando C5 e formando o complexo de ataque à membrana que leva à lise do microrganismo (ABBAS et al., 2015)

Fonte: ANDRADE et al., 2017

3.7.1 Via Alternativa

A via alternativa (VA) desempenha uma espécie de papel sentinela, sendo ativada principalmente em superfícies de células alvo. Em condições fisiológicas, alguns componentes do SC são produzidos biologicamente inativos, permitindo-lhes coexistir no plasma, sem interagir uns com os outros, tão pouco induzindo uma ativação indesejada do sistema complemento. Ao contrário da via clássica, a via alternativa está constantemente ativada no plasma em níveis reduzidos, prosseguindo a cascata a menos que sejam inativadas por moléculas reguladoras ligadas presentes no plasma ou membrana (MERLE et al., 2015; SILVA et al., 2016).

A VA é iniciada pela hidrólise espontânea (tick-over) de uma ligação tioéster intra-cadeia localizada na molécula C3, proteína do complemento mais abundante do plasma e a única proteína do complemento capaz de ser lisada

sem a ação de uma enzima. Essa hidrólise resulta numa drástica alteração conformacional, tornando-a biologicamente ativa à exposição de novos locais de ligação, formando C3a e C3b. C3a fica livre no plasma onde irá realizar quimiotaxia. C3b é a fração ativa que se liga covalentemente a superfície da célula alvo, quando não, a proteína é inativada (PENG et al., 2017)

Nessa nova forma C3b recruta outra molécula plasmática, Fator B (BF) que se liga à C3b formando o complexo C3bB que é subsequentemente clivado pela enzima chamada Fator D, originando então dois fragmentos Ba e Bb. O fragmento Ba, irá realizar quimiotaxia, enquanto o fragmento Bb mantém-se ligado à C3b, gerando o C3bBb, a C3 convertase da via alternativa. Essas por sua vez produzem moléculas C3b adicionais amplificando a cascata (SILVA et al., 2016).

A C3 convertase é uma molécula lábil estabilizada pela agregação de uma molécula de properdina que por sua vez aumenta pelo menos 10 vezes a meia vida do complexo e sua capacidade de interagir com FB. Parte do C3b formado irá se ligar ao complexo C3bBb, dando origem à outra enzima C3bBbC3bP, a C5 convertase da VA. (ARROTÉIA, 2014). A C5 convertase é clivada em C5a e C5b, o fragmento C5b permanece ligado ao complexo e os outros componentes (C6, C7, C8 e C9) se ligam para a formação do MAC complexo de ataque a membrana, iniciando a via comum do SC (COIT; SAWALHA, 2016).

Os fragmentos C3a e C5a, gerados pela ativação da VA medeiam o recrutamento e a ativação de leucócitos nas respostas inflamatórias, sendo que C5a possui maior atividade biológica. Estas anfilotoxinas agem nas paredes dos vasos aumentando a permeabilidade vascular e permitindo o acúmulo de fluidos e células no local da inflamação (MERLE et al., 2015).

A proteína fator H (FH) é potente regulador da VA, pois tem a capacidade de se ligar a C3b. O FH inibe a ativação da VA tanto no plasma como nas superfícies celulares promovendo a proteólise de C3b e prevenindo a formação ou intensificando a dissociação da C3 convertase (PENG et al., 2017).

3.7.2 Via Clássica

A via clássica (VC) é desencadeada pela ligação de C1q ao domínio Fc de anticorpos da classe IgM e IgG ou pelo reconhecimento direto de determinados patógenos e da proteína C reativa (PCR), gerando a ativação de C1r que ativa C1s (HOLERS; BANDA, 2018).

A interação de C1q com Fc provoca uma alteração conformacional dentro da molécula C1q e a subsequente clivagem e ativação das proteases de serina C1r e C1s associadas. O C1s ativado cliva C4 e C2 em dois grandes fragmentos ativos (C4b e C2a) e dois pequenos fragmentos inativos solúveis (C4a e C2b). A clivagem de C4 expõe um tioéster reativo dentro do fragmento C4b, o que resulta na ligação covalente de C4b à superfície de ativação (HOLERS; BANDA, 2018).

A ligação de C2 a C4b e a subsequente clivagem de C2 resultam na via C3 convertase da via clássica covalentemente ligada, C4bC2a. Este complexo cliva C3 em C3b e C3a. Semelhante a C4b, C3b contém um tioéster reativo que pode se ligar covalentemente à superfície de ativação, e que pode iniciar a ativação da via alternativa. Se C3b se liga ao complexo C4bC2a, ele forma a C5 convertase da via clássica (C4bC2aC3b) que cliva C5 em C5b e C5a, com o início da via terminal do complemento o MAC (Complexo de Ataque à Membrana) (VARELA; TOMLINSON, 2015).

3.7.3 Via das Lectinas

A via das lectinas (VL) é iniciada pela ligação de moléculas de reconhecimento de padrões que podem ser: lectina ligante de manose (MBL), coletina-11 (CL-K1) ou ficolinas (FCN-1, FCN-2 e FCN-3) a carboidratos ou moléculas acetiladas, na superfície de patógenos (HOLERS; BANDA, 2018).

As sequências de ativação catalítica da via da lectina se assemelham às da via clássica, mas com a utilização de diferentes moléculas de reconhecimento e diferentes serinas proteases associadas à MBL (MASPs). A lectina de ligação a manose é estrutural e funcionalmente semelhante a C1, e a ligação de MBL (ou ficolina) a um ligante de carboidrato, gera a ativação da

MASP-1 que transativa a MASP-2 ou se autoativa e assim dá continuidade na ativação da cascata do complemento (VARELA; TOMLINSON, 2015).

Após MBL ou ficolinas terem se ligado aos seus alvos, as MASPs são ativadas. MASP-1 e MASP-2 são necessárias para a formação das C3 e C5 convertases da via das lectinas (C3b). MASP-1 ativada cliva C2 e C3 diretamente levando à ativação da via alternativa, MASP-2 ativada cliva C4 e C2. O fragmento C4b se liga a C2a, formando C4b2a, a C3 convertase das vias clássica e das lectinas. As sequencias restantes são as mesmas da via clássica (VARELA; TOMLINSON, 2015).

3.8 Sistema Complemento e Artrite Reumatoide

Embora o SC desempenhe um papel central de proteção em muitos processos imunológicos, a ativação inadequada do complemento está na base da patogênese das doenças inflamatórias e autoimunes humanas, incluindo a AR (HOLERS; BANDA, 2018).

Enfatiza-se a ativação do SC na AR pela presença de imunocomplexos no fluido sinovial, decorrente da liberação de peptídeos biologicamente ativos com capacidade de intensificar a reação inflamatória. Os imunocomplexos ligam-se à cartilagens e tecidos colagenosos, podendo ocorrer uma ativação local do complemento. Consequentemente ocorre lesão tecidual devido à ativação do MAC e liberação de enzimas lisossomais de células inflamatórias (WATZKO, 1993). A ativação do complemento na AR foi confirmada em estudos que observaram uma elevada concentração de produtos de ativação (C3d, C3a, C4d, Ba) no líquido sinovial de pacientes (BRODEUR et al., 2010; OLMEZ et al., 1991; PERRIN et al., 1977). Um aumento na formação de MAC nos pacientes com AR também já foi observado, indicando a natureza destrutiva desta ativação na AR (BRODEUR et al., 2010; OLMEZ et al., 1991; PERRIN et al., 1977).

A ativação inicial do SC na AR pode ocorrer pela via clássica, devido a presença de anticorpos, imuno-complexos e células apoptóticas na articulação. Presença de agregados de IgG ou de complexos de IgG-FR podem ativar o SC. (ARROTÉIA, 2014). Quanto a via das lectinas, Graudal et.al. relacionou a

deficiência de MBL com predisposição da forma erosiva da AR. Em outro estudo foi observado que baixos níveis séricos desta lectina, estão associados à complicações decorrentes de infecções. (GOELDNER et al. 2011). O interesse pela participação da via alternativa tem sido de relevância para a terapêutica e diagnóstica da doença (ARROTÉIA, 2014; NEUMANN et al., 2002). Observam-se no líquido sinovial níveis reduzidos de proteínas do complemento como C3, C4 e Fator B se comparado com o total de proteínas presentes (ARROTÉIA, 2014; NEUMANN et al., 2002).

Além disso, a correlação entre a atividade da doença e a ativação do SC no líquido sinovial já foi observada; entre a expressão de C2 e C3 na sinóvia reumatoide e processo inflamatório bem como entre os níveis elevados de C5a e presença de neutrófilos no fluido sinovial de pacientes com AR. Tais achados não deixam dúvidas que a ativação sistêmica do SC desempenha um importante papel nas manifestações clínicas da AR (PAOLIELLO-PASCHOALATO et al., 2015). O SC mostra-se como alvo relevante de fármacos anti reumáticos e antiinflamatórios. Essa importância está no fato que o SC, componente chave do sistema imune participa, diretamente ou indiretamente, em manifestações locais e sistêmicas do AR e como regulador do curso das respostas inflamatórias (PAOLIELLO-PASCHOALATO et al., 2015).

3.9 COMPONENTE C3 DO COMPLEMENTO

O componente C3 do SC foi identificado pela primeira vez em 1912 (DODDS; ALEX LAW, 1998) e pertence à família das α 2-macroglobulinas (α 2M) sendo uma das proteínas mais importantes do SC (JANSSEN et al., 2005).

A proteína C3 185 (kDa) é composta por uma cadeia β (resíduos 1-645) e uma α (resíduos 650-1641), que juntas dão origem à 13 domínios protéicos (JANSSEN et al., 2005). C3 produzido no organismo entra na forma inativa na circulação sanguínea, onde o domínio tioéster, o qual se liga a superfície de patógenos, encontra-se estabilizado no interior hidrofóbico da proteína. Com a ativação de C3 (clivagem em C3a e C3b), o domínio tioéster torna-se exposta

em C3b que agora pode se ligar a proteínas e carboidratos das superfícies dos patógenos, bem como complexos imunes e debris celulares (**Figura 6**) (PENG et al., 2016). O processamento adicional de C3b resulta na formação de iC3b e C3f e finalmente C3c e C3dg (GROS; MILDER; JANSSEN, 2008; JANSSEN et al., 2005). Recentemente, foi demonstrado que a calicreína plasmática humana cliva diretamente o C3 em C3a e C3b e desencadeia um ciclo de amplificação. Curiosamente, o local de clivagem dentro de C3 é idêntico àquele reconhecido pela C3 convertase e também é inibido pela FH (HOLERS; BANDA, 2018)

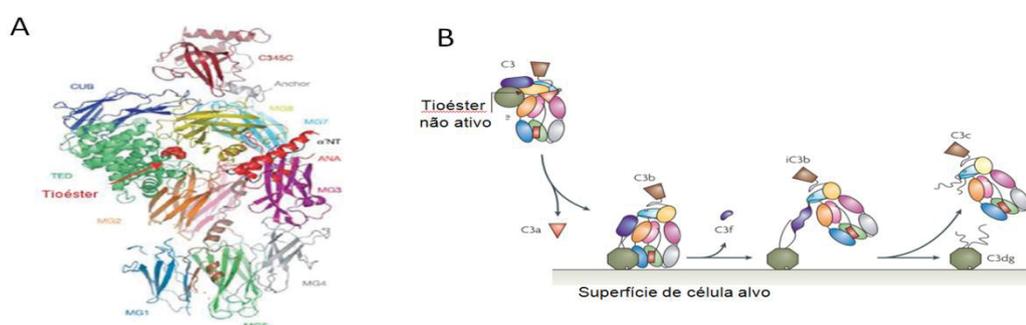


FIGURA 6: A: ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA C3 COM A LIGAÇÃO TIOÉSTER EM DESTAQUE. B: PROCESSO DE CLIVAGEM SEQUENCIAL QUE ATIVA A PROTEÍNA C3.

Fonte: Adaptado JANSSEN et al., 2005

A concentração sérica da proteína de C3 em adultos podem variar entre 1,0 e 2,6 mg/ml, portanto o componente plasmático mais abundante do SC (Silva *et al.* 2016). Como quase todas as moléculas do sistema complemento, C3 é sintetizado principalmente no fígado por hepatócitos, também é sintetizada em monócitos, astrócitos, linfócitos B e diferentes linhagens de células tumorais, sendo uma proteína de fase aguda (URSINI et al., 2017).

C3 é provavelmente uma das moléculas mais versáteis e multifuncionais do organismo, interagindo com numerosas proteínas séricas, moléculas de superfície celular e de patógenos, sendo por isso alvo de diversos estudos (URSINI et al., 2017). Sua síntese pode ser impulsionada por compostos bacterianos, como LPS, citocinas, como a IL-1, IL-6 e, ao mesmo tempo em que IFN- γ induz uma diminuição em sua taxa de síntese (URSINI et al., 2017).

A deficiência do C3 leva a incapacidade de sintetizar o MAC resultando em graves e recorrentes infecções por patógenos encapsulados nos primeiros tempos de vida. Segundo estudos publicados, 78% dos doentes com deficiência em C3 apresentam infecções de repetição e 79% doenças autoimunes (Reis *et al.* 2015).

3.9.1 Gene C3

O gene C3 humano (ENSG00000125730), representado na **Figura 7**, está localizado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.3) e é composto por 41 exons (SILVA *et al.*, 2016), que dá origem a 18 transcritos, dos quais 5 transcritos codificam proteínas C3 e 3 são RNA longos não codificantes (lncRNA). O principal transcrito (ENST00000245907.60) possui 5263 pares de base e codifica a proteína C3 com 1633 aminoácidos (P01024) («Gene: C3 (ENSG00000125730) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 97», [s.d.]; «Portal GTEx», [s.d.]»)

Os primeiros 16 exons codificam a cadeia β e os 25 restantes a cadeia α . No exon 24, estão localizados os aminoácidos necessários para a formação da ligação tiol-éster (URSINI *et al.* 2017).

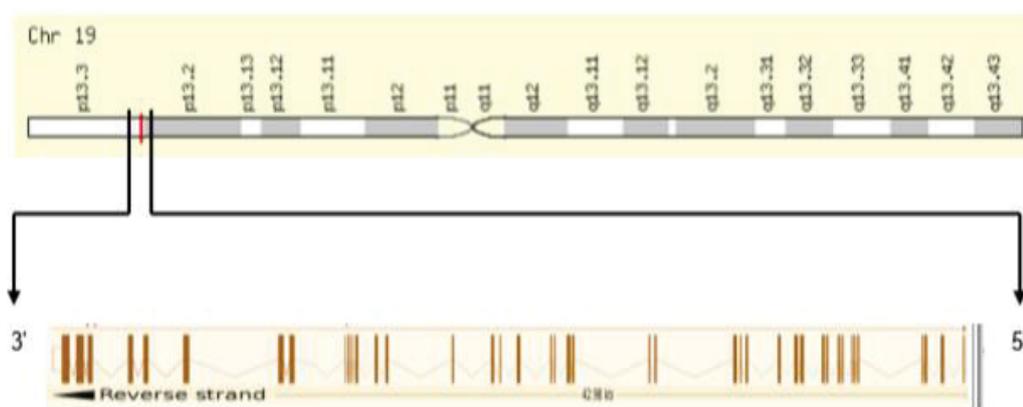


Figura 7: REPRESENTAÇÃO DO GENE C3 NO CROMOSSOMO 19

Nota: O gene C3 encontra-se no braço curto do cromossomo 19, região 3, banda 3 e apresenta 41 exons

Fonte: GeneCards: human gene database; Adaptado Andrade (2017)

3.8.2 Polimorfismo do gene C3 e implicações clínicas

O gene C3 apresenta algumas variantes comuns descritos, tais como: rs2230199:C>G [Arg102Gli], rs1047286:C>T [Pro314Leu], rs2241394:G>C, rs2250656:A>G, rs344542:A>G, rs2230205:A>G, rs339392:T>G, rs3745565:C>G e rs11569536:G>A. Dentre as quais três (rs2230199, rs1047286 e rs2250656) foram avaliadas no presente estudo.

O SNP rs2230199 ocorre no exon 3 do gene C3 e refere-se à troca do nucleotídeo Citosina para Guanina (C>G), levando à troca do aminoácido Arginina para Glicina (Arg>Gli) (YATES et al., 2007). Este polimorfismo mais estudado do gene C3, sendo descrito como responsável por formas variadas da proteína C3, chamadas de alótipos S (slow) e F (fast), com base em sua mobilidade em eletroforese agarose. Estes alótipos dão origem aos fenótipos C3SS, C3FS e C3FF, que compreendem 98% de todos os fenótipos C3 (DELANGHE; SPEECKAERT; SPEECKAERT, 2014). A variante mais comum é C3*S (CC), com uma frequência de 0,79 em brancos; 0,95 negros americanos; 0,97 índios sul-americanos e 0,99 em asiáticos. (UTIYAMA *et al.* 2004). O alótipo C3F já foi associado a diversas doenças como: como Vasculite sistêmica (FINN et al., 1994), Nefrite mesangiocapilar (BARTÓK; WALPORT, 1995), Doença de Crohn e colite ulcerosa (ELMGREEN; SØRENSEN; BERKOWICZ, 1984), assim como no Câncer de Pulmão (SUADICANI; HEIN; GYNTELBERG, 2012), Acidente vascular cerebral isquêmico (OLSSON et al., 2011) e na Cardiomiopatia Chagásica (MESSIAS-REASON; URBANETZ; PEREIRA DA CUNHA, 2003). Análises moleculares demonstraram associação entre o alelo rs2230199G e aumento no risco de desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada a Idade e a maior ativação do complemento na doença (PAUN et al., 2016; QIAN-QIAN et al., 2015; ZHANG et al., 2015) comprometimento cognitivo em pacientes com Esclerose Múltipla (ROOSTAEI et al., 2019) e Diabetes tipo 1 (TORN et al 2016).

Phillips e colaboradores (2009) apontaram que os polimorfismos rs2250656 e rs2230199 de C3 poderiam ser responsáveis pela modulação do risco de desenvolver Síndrome Metabólica (SMet). Pacientes homozigotos AA para o polimorfismo rs2250656 apresentaram um aumento no risco de desenvolver SMet ($p=0,01$), quando comparados àqueles que possuíam o alelo G. Aqueles que apresentavam o alelo A desenvolveram o perfil clássico da

SMet: triglicerídeos aumentados e menor concentração de HDL ($p < 0,05$), aumento do índice de massa corpórea ($p < 0,05$), obesidade abdominal ($p = 0,006$) e diminuição da sensibilidade à insulina ($p = 0,035$). Além disso, também apresentavam níveis de inflamação elevados, com aumento de C3 no plasma ($p = 0,005$). Análises de regressão logística revelaram que aqueles que apresentavam o alelo A tinham a chance dobrada de desenvolver SMet, em relação aos homozigotos GG (PHILLIPS et al., 2009)

Já os indivíduos homozigotos para o polimorfismo *rs11569562GG* teriam o risco de desenvolver SMet reduzido, em comparação aos que apresentavam o alelo A. Os homozigotos GG para o segundo polimorfismo tinham uma concentração de C3 menor que os homozigotos AA e risco diminuído de apresentar quadros de hipertrigliceridemia, em comparação aos com alelo A (PHILLIPS et al. 2009).

Qian-Qian e colaboradores (2015) publicaram uma meta-análise onde analisaram nove polimorfismos encontrados no gene *C3* (*rs2230199 G>C*, *rs1047286 G>A*, *rs2241394 G>C*, *rs2250656 C>T*, *rs344542 G>A*, *rs2230205 C>T*, *rs339392 T>G*, *rs3745565 C>G* e *rs11569536 G>A*). Foi encontrada uma associação positiva entre o polimorfismo *rs2230199*CG* e a suscetibilidade para desenvolver degeneração macular relacionada a idade (DMRI). A meta-análise também indicou uma associação positiva entre o polimorfismo *rs1047286*CT* e a suscetibilidade à DMRI. Em ambos os SNPs foram encontrados uma associação significativa entre a suscetibilidade e a etnia, onde os 32 caucasianos eram mais suscetíveis, quando comparado às demais etnias. Em contrapartida, foi encontrada uma associação negativa (fator de proteção) entre o SNP *rs2250656*AG* e a DMRI. O polimorfismo *rs11569536*GA* também está relacionado à suscetibilidade à DMRI. Os demais polimorfismos não apresentaram relação com a DMRI (QIAN-QIAN et al. 2015).

Apesar de polimorfismos no gene *C3* já terem sido associadas a diversas doenças inflamatórias, o impacto de polimorfismos no gene *C3* na susceptibilidade a AR e suas apresentações clínicas ainda não foi avaliado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho é um estudo de transversal realizado no Laboratório de Imunopatologia Molecular (LIPM) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) em parceria com o Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba. Foi aprovado pelo Comitê de Ética da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba e encontra-se registrado sob o número 1.669.709 e CAAE: 57674716.1.0000.0103.

4.1 Casuística

4.1.1 Pacientes

Um total de 156 pacientes diagnosticados com AR foram incluídos no presente estudo. As amostras foram coletadas no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba, e armazenadas na soroteca e banco de DNA do LIPM/ HC-UFPR. Os pacientes com AR foram selecionados consecutivamente frente aos seguintes critérios de inclusão: atender a pelo menos 4 dos critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia relacionados a seguir:

1. rigidez matinal e em torno de articulações com duração de pelo menos 1 hora antes da melhora;
2. inchaço dos tecidos moles de 3 ou mais áreas comuns observadas por um médico;
3. inchaço das articulações interfalângicas, metacarpofalangeanas ou pulso proximais;
4. edema simétrico;
5. nódulos reumatóides;
6. presença de fator reumatóide e
7. erosões radiográficas e/ou osteopenia periarticular na mão e/ou articulações do punho (ARNETT et al., 1988).

Os critérios adotados para diagnóstico dos pacientes neste trabalho foram diferentes dos preconizados na literatura atual pelo motivo de que essas amostras já haviam sido coletadas em estudo anterior e naquele momento o critério utilizado para diagnóstico foi o acima explicitado.

Além disso, os pacientes incluídos no presente trabalho apresentam mais de 18 anos, e o início da doença maior ou igual a 16 anos. Ainda, visando

à caracterização dos participantes da pesquisa, foram levantadas por meio de questionário e observação de prontuários as seguintes informações: idade, sexo, etnia, uso do tabaco, idade do início da doença, duração da doença, aborto espontâneo, classe funcional, níveis de Anti-CCP e FR e presença de manifestações extra-articulares conforme dados observados na **Tabela 3**. Foram rejeitados para o estudo, pacientes menores de 18 anos ou cuja idade de início da doença fosse inferior a 16 anos.

Tabela 3: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES n=156
IDADE	
Média ± DV	51,1±13,2
Mínima	18
Máxima	84
SEXO n/total (%)	
Feminino	134 /156 (86)
Masculino	22/156 (14)
ETNIA n/total (%)	
Euro-descendente	113/156 (72)
Não Euro-descendente	43/156 (28)
PRESENÇA DE MEA's n/total(%)	
DCV	8/156 (5)
Nódulos	12/156 (8)
Sjorgren	35/115 (30)
IR	24/144 (17)
Pneumonite	12/121 (10)
BIOMARCADORES n/total(%)	
Anti CCP (≥20 U/ml)	121/156 (78)
Fator Reumatóide (≥30 U/ml)	108/156 (69)
CLASSE FUNCIONAL n/total (%)	
I	72/156 (46)
II	65/156 (42)
III e IV	19/156 (12)
OUTRAS CARACTERÍSTICAS n/total (%)	

Tabagismo	65/156 (42)
Início da Doença (\leq 40anos)	60/156 (38)
Aborto	5/134 (4)

Legenda: **DCV:** Doença Cardiovascular; **IR:** Infecções Recorrente; **MEA:** Manifestações Extra articulares.

4.1.2 Controles

O grupo controle compõe-se de 270 indivíduos, sem AR que também declararam não ter familiares com a doença, doadores de sangue procedentes do Banco de sangue do Hospital de Clínicas da UFPR e do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR). As amostras de material biológico do grupo controle pertencem à soroteca e ao banco de DNA do LIPM/HC-UFPR. A média de idade do grupo controle foi de 42 anos (variando de 18 a 89 anos), sendo 225 (83%) era euro descendentes e 124 (46%) eram mulheres.

4.2 Técnicas

4.2.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído da camada leuco-plaquetária de sangue periférico, empregando método de *salting out* que consiste em lise celular com SDS, remoção das proteínas por precipitação com cloreto de sódio concentrado (“salting-out”) e isolamento do DNA genômico por precipitação etanólica. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e diluídas a 50ng/ul e armazenadas a -20°C.

4.2.2 Reação em cadeia da polimerase sequência específica (PCR-SSP)

Os polimorfismos do gene C3 foram avaliados com a técnica de amplificação alélica por PCR sequência-específica (PCR-SSP). A genotipagem SSP se baseia no princípio de que, se não houver complementaridade perfeita entre o último nucleotídeo do iniciador e a fita-molde, não há amplificação da sequência desejada (STINGHEN, 2015).

A PCR-SSP pode ser dividida em simples ou multiplex, sendo que as duas podem ser classificadas como uniespecífica ou biespecífica. Para o gene C3 a tipagem foi realizada através da PCR-SSP multiplex e biespecífica, capaz de amplificar simultaneamente vários fragmentos de DNA visando economizar a amostra do DNA, tempo, material e reagentes (BOLDT et al., 2011)

A técnica é dividida em três fases, na primeira ocorre uma desnaturação fragmento de DNA, conseqüentemente separação da fita dupla, por meio do aquecimento da amostra a 96°C. Em seguida, ocorre um resfriamento da amostra à uma faixa de temperatura que varia entre 35 e 60°C, para promover o anelamento dos iniciadores, chamados de *primers*, à fita simples de DNA molde.

Na terceira etapa, a enzima DNA polimerase inicia a extensão da cadeia de DNA com a organização dos desoxirribonucleotídeos (dNTPs) conforme o modelo de fragmento pré-selecionado (STINGHEN, 2015)

Cada PCR é acompanhada de controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA, e controles de DNA sabidamente positivos ou negativos para os genótipos estudados. O resultado é observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídio ou Sybersafe (Invitrogen), os quais são fluorescentes sob radiação ultra-violeta ou luz azul, respectivamente. Em ambos os casos, a genotipagem é rápida e baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados. Esta estratégia permite também rápida resolução haplotípica. A metodologia utilizada baseou-se no artigo de BOLDT et al., 2011.

4.2.3 PCR-SSP para o gene C3

Os polimorfismos avaliados no presente trabalho (**Figura 7**) foram selecionados com base em sua frequência populacional, associação com outras doenças e potencial alteração na atividade da proteína. O SNP *rs2250656*, ocorre no intron 2 no gene C3, e trata-se da alteração do nucleotídeo Adenina por Guanina (A>G) (A:70%, G30%), não levando a alteração de aminoácido porque não ocorre na região que codifica a proteína (exons). O SNP *rs2230199*, ocorre no exon 3 do gene C3 e leva a troca do nucleotídeo Citosina para Guanina (C>G), levando a uma alteração do

aminoácido Arginina para Glicina (Arg>Gli) na posição 102 (R102G). O alelo C está presente em 83% dos indivíduos europeus (C:83%, G:17%) (YATES et al., 2007). Este polimorfismo é descrito como responsável por formas variadas da proteína C3 chamadas de alótipos (DELANGHE et al., 2013). Já o SNP *rs1047286*, localizado no exon 9, leva a alteração de uma guanina para uma adenina (G>A), levando a uma mudança do aminoácido na posição 314 de prolina para leucina (P314L) frequências alélicas dos SNPs estudados, observadas em populações de origem europeia (CEU) e africana (YRI) do banco de dados do Ensembl, podem ser observadas na **Tabela 4**.

Uma reação de PCR-SSP multiplex abrangendo todos os polimorfismos de interesse foi utilizada para a genotipagem de pacientes e controles. Os detalhes do protocolo são descritos a seguir:

O SNP *rs2250656* foi avaliado através dos primers *IVS2_-111For_A/G* que foram conjugados com o iniciador reverso do SNP *rs2230199 Exo3_+37_Rev_G/C* para gerar um fragmento de 182pb. (**Tabela 3**) A condição da PCR foi a seguinte: 0,2 µM de cada primer, 1X de tampão PCR CoralLoad (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,5% de glicerol, 0,2 mM desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/µL de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 20 ng/ul de DNA e água ultrapura para 15 µl.

Além disso, o SNP *rs1047286 Exo9_+65_For_C/T* que foram conjugados com o primer do *Exo10_Rev* para gerar um fragmento de 752pb(**Tabela 3**). A condição da PCR foi a seguinte: 0,3 µM de cada primer da região do exon9 e 0,2 µM de cada primer da região do exon 10, 1X de tampão PCR CoralLoad (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,5% de glicerol, 0,2 mM desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/µL de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 20 ng/ul de DNA e água ultrapura para 15 µl.

O programa de ciclos no termociclador consiste na repetição de 3 passos por 35 vezes: primeiramente há um aquecimento à 94°C por 3 minutos, para a desnaturação da dupla fita de DNA - este passo ocorre apenas no primeiro ciclo - o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ocorre nos 45 segundos subsequentes à mesma temperatura; para a extensão do molde pela

Taq DNA polimerase, a temperatura é diminuída até 64°C, a qual permanece constante por 30 segundos; por fim, a última etapa consiste em elevar a temperatura até 72°C para que ocorra a desnaturação da fita adquirida, para que esta sirva de molde para o próximo ciclo.

TABELA 4 - INICIADORES SSP PROJETADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DO GENE C3

dbSNP	Frequência alélica	Localização	Iniciador	Sequência 5' - 3'	Produto Amplificado
rs2250656	A 70% G 30%	Intron 2	IVS2_-111A_For IVS2_-111G_For	AAAACGGCCACCTCGGA AAAACGGCCACCTCGGG	182 pb
rs2230199	C 83% G 17%	Exon 3	Exo3_+37G_Rev Exo3_+37C_Rev	CGGTCACGAACTTGTTCGG CGGTCACGAACTTGTTCGC	
rs1047286	C 76% T 24%	Exon 9 Exon 10	Exo9_+65C_For Exo9_+65T_For Exo10_Rev	GACGGGGTGCAGAACCC GACGGGGTGCAGAACCT CAAAGGGCATTCTGGTTTGA	752pb
Controle		MBL		ATGGGGCTAGGCTGCTGAG CCAACACGTACCTGGTTCCC	1059pb

O gene *MBL* foi escolhido como controle endógeno da reação pois seu tamanho (1059 pb) não confronta com o dos produtos de PCR de C3, que apresentam 182 pb e 752 pb. A genotipagem é baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados.

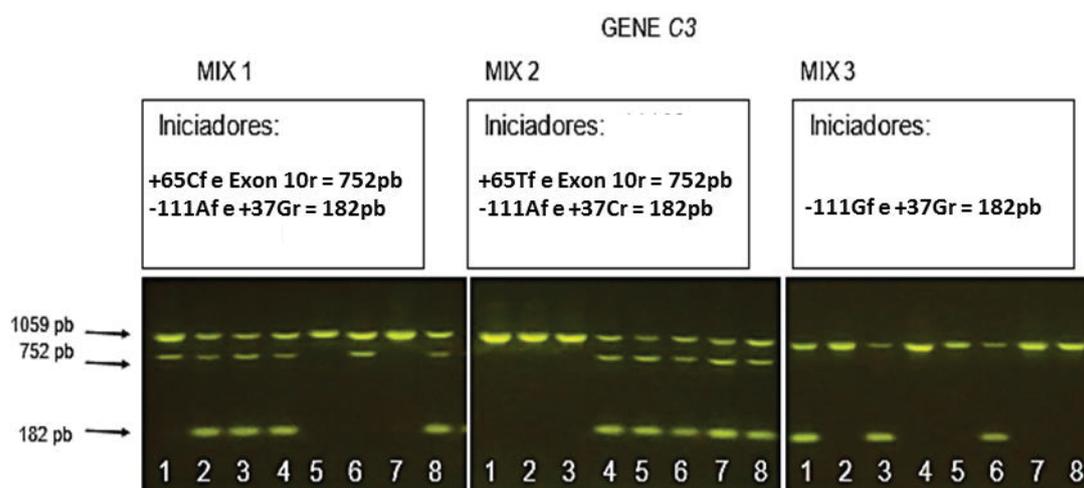


Figura 8: PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR MULTIPLEX C3

Tamanhos dos Fragmentos de DNA: controle endógeno=1059pb; Interpretação dos genótipos: 1=CC/GC/GC; 2=CC/AC/AC; 3= CC/AC/AC; 4=CT/AC/AG; 5=TT/AG/AG; 6=CT/AG/GC; 7= TT/AG/AG; 8=CT/AC/AG.

LEGENDA: pb= pares de bases. A= adenina. T= timina. C= citosina. G= guanina.

4.2.4 Dosagem da Proteína C3

A dosagem da proteína C3 no soro foi realizada em 60 pacientes e 60 controles pareados por sexo, idade e etnia. A técnica empregada foi a imunoturbidimetria automatizada, método que mede e a diminuição da luz ao passar por um complexo antígeno-anticorpo. Os anticorpos anti-C3 formam compostos insolúveis quando se combinam com o C3 da amostra a ser dosada, ocasionando uma relação de absorvância proporcional a concentração de C3 na amostra e que pode ser quantificada por comparação com um calibrador de C3 de concentração conhecida (PAULO FRANCISCO NAOUM). As análises foram realizadas pelo laboratório Diagnóstico do Brasil que presta serviços de terceirização de exames.

4.3 Análises Estatística

As frequências alélicas e genótípicas foram determinadas através de contagem direta. Os haplótipos foram inferidos através dos algoritmos EML e EBL utilizando o programa Arlequin (v.3.1). Para as análises de associação foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes qui-quadrado com correção de Yates ou teste de Fisher bicaudal. Quando apropriado, calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. Os dados também foram avaliados por análise de regressão logística através do programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA). As covariáveis idade, sexo, etnia, Anti-CCP, FR, hábito de fumar, duração da doença e presença de manifestações extra-articulares, foram incluídas no modelo de regressão logística quando a análise univariada apresentou $p \leq 0,2$. Os valores de Desequilíbrio de Ligação (DL) entre os SNPs avaliados foram obtidos através do programa Haploview 4.2 (<http://broadinstitute.org/haploview/haploview>). Valores de p menores que 0,05 serão considerados significativos. A correção

de Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicada quando o valor de p foi significativo. Para auxiliar a análise estatística deste trabalho foi utilizado o programa “GraphPad Prism – versão 3.0” e Excel.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta tese foi escrita em modelo misto, sendo que os resultados e discussão serão apresentados na forma de artigo.

ARTIGO

Polimorfismos funcionais do gene C3 e concentração da proteína C3 do Complemento na Artrite Reumatoide

Abstract

INTRODUCTION:Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by synovial inflammation, leading to severe cartilage destruction, bone erosion, deformities and functional disability. The complement system is a key component of the innate immunity that plays a significant role in the development and clinical presentation of RA. Complement protein C3 is a central molecule in the activation of complement and was found increased in the synovial fluids and correlated with the inflammatory process in RA, however the impact of C3 gene polymorphisms in RA is still unknown. **OBJECTIVE:** We investigated the possible influence of C3 gene polymorphisms in the susceptibility and clinical expression of RA. **METHODS:** Three C3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs2250656:A>G in intron 2, rs2230199:C>G [p.Arg102Gln] in exon 3 and rs1047286:C>T [p.Pro314Leu] in exon 9) were assessed by sequence-specific PCR in a total of 156 RA patients and 270 healthy controls from Southern Brazil. C3 serum levels were evaluated in 60 controls and 60 patients by immunoturbidimetry. Anti-cyclic citrullinated peptide, rheumatoid factor (RF) and clinical features such as the presence of Sjögren syndrome, nodules, disease duration and age at disease onset were collected from medical records. **RESULTS:** The frequency of rs2230199G allele and rs2230199GG genotype were significantly higher in RA patients than controls ($p_{adj}=0.012$ OR=1.57 [1.11-2.31]; $p_{adj}=0.008$, OR=1,60 [1.35-2,33]) as well as the rs1047286T and rs1047286TT ($p_{adj}=0,010$, OR=1.67 [1,12-2,40]; $p_{adj}=0.001$, OR=1.83 [1.27-2,65]). In addition, C3 AGT haplotype was more frequent in RA

patients than controls ($p_{adj}=0.0007$ OR=1.92 [1.32-2.80]). Moreover, C3 levels were higher in patients than controls (median: 169mg/dl vs.155mg/dl; $p_{adj}=0,022$), as well as in RF seropositive compared with seronegative patients (166mg/dl vs. 172mg/d; $p_{adj}= 0,007$), and negatively correlated with RF levels ($p=0.022$, $r=-0,3$). CONCLUSIONS: To our knowledge, this is the first study addressing the association between C3 gene polymorphisms and RA. Our results suggest that the rs2230199G (p.102Gli) and rs1047286T (p.314Leu) alleles play a role in the pathophysiology of RA, possibly impacting complement activation by the alternative pathway.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica e progressiva que acomete aproximadamente 1% da população mundial adulta, sendo cerca de duas vezes mais frequente em mulheres (HOLERS; BANDA, 2018; SCODELER; RESENDE, 2017). A doença caracteriza-se principalmente pela inflamação do tecido sinovial de múltiplas articulações levando a destruição da cartilagem, erosão óssea e à rigidez nas articulações, com importante impacto na qualidade de vida destes pacientes. (NAGAYOSHI et al., 2018). Além disso, manifestações extra articulares como síndrome de Sjögren, nódulos reumatoides, complicações cardíacas e infecções são frequentemente observadas nestes pacientes (DAS; PADHAN, 2017). A AR apresenta etiologia complexa, sendo seu desenvolvimento influenciado por fatores ambientais, hormonais e imunológicos em indivíduos com predisposição genética, porém a relação entre estes fatores não está completamente elucidada (VIATTE et al., 2015)

O Sistema Complemento (SC) é um componente da imunidade inata que desempenha papel fundamental em diversos processos imunológicos como, opsonização e fagocitose de agentes patogênicos, inflamação, lise celular, depuração de complexos imunes e na remoção de células apoptóticas (MÖDINGER et al., 2018). Entretanto, a ativação inadequada do complemento está relacionada à patogênese de diversas doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo a AR (BAJIC et al., 2015; OKROJ et al., 2007). Embora

o mecanismo não esteja completamente esclarecido, diversos estudos apontam o envolvimento do SC tanto no desenvolvimento quanto na apresentação clínica da doença (HOLERS; BANDA, 2018; NASS et al., 2015; NEUMANN et al., 2002; PAOLIELLO-PASCHOALATO et al., 2015).

O componente C3 é a molécula central do SC e possui papel crucial nas três vias de ativação do complemento, desempenhando importantes funções biológicas como: formação da C3 e C5 convertases as quais são essenciais na cascata de ativação do complemento; produção da opsonina C3b, envolvida na solubilização e depuração de complexos imunes e de C3a, uma potente molécula inflamatória (RICKLIN et al., 2016) Alta concentração de C3 foram observadas no líquido sinovial de pacientes com AR (BEMIS et al., 2019; HOLERS; BANDA, 2018; NEUMANN et al., 2002), bem como altos níveis de seus metabolitos ativos (C3a e C3d) (NEUMANN et al., 2002; OKROJ et al., 2007), indicando sua contribuição na fisiopatologia da doença. Variantes genéticas de C3 já foram associadas a Degeneração Macular Relacionada a Idade (PAUN et al., 2016; ZHANG et al., 2015), ao comprometimento cognitivo em pacientes com Esclerose Múltipla (ROOSTAEI et al., 2019a) e Diabetes tipo 1 (TORN et al. 2016), entretendo o impacto dos polimorfismos do gene C3 na AR ainda não foi reportado. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a associação entre polimorfismos do gene C3 e a concentração sérica de C3 na suscetibilidade e apresentação clínica da AR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 156 pacientes diagnosticados com AR, da população urbana de Curitiba, sul do Brasil, foram incluídos neste estudo. Os pacientes foram diagnosticados seguindo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ARNETT et al., 1988) no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba e consecutivamente incluídos no estudo de agosto de 2007 a abril de 2009. Os pacientes incluídos apresentam mais de 18 anos e início da doença maior ou igual a 16 anos. Os valores de anticorpo antipeptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) e o fator reumatoide (FR-IgM) foram determinados de acordo com os procedimentos padrões descritos previamente (GOELDNER et al., 2011) sendo considerados positivos os valores de anti-CCP ≥ 20 U/ml e FR-

IgM ≥ 30 U/ml. Os dados demográficos e clínicos, como idade, sexo, etnia, uso do tabaco, idade do início da doença, duração da doença e presença de manifestações extra-articulares como nódulos reumatoides, síndrome de Sjögren, infecções de repetição, aborto espontâneo e doença cardiovascular foram levantadas através de questionário no momento da coleta e prontuário médico, tais dados podem ser observado na Tabela 1. Como grupo controle, foram incluídas 270 amostras doadores de sangue e voluntários (46% mulheres; média de idade de 42 anos; 83% Euro-Brasileiros) do Banco de Sangue do HemePar e Biobanco do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), auto declarados sem doenças reumatológicas e sem familiares com AR.

PCR sequência-específica

Todas as amostras tiveram seu DNA extraído da camada leucocitária empregando método de *salting out* que consiste em lise celular, remoção das proteínas por precipitação com cloreto de sódio concentrado (“salting-out”) e isolamento do DNA genômico por precipitação etanólica. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e diluídas a 50 ng/ul e armazenadas a -20°C até a amplificação. Pacientes e controles foram genotipados através de PCR sequência-específica (PCR-SSP) para os polimorfismos do gene C3: *rs2250656:A>G*, que ocorre no intron 2, *rs2230199:C>G* (p.Arg102Gln), no exon 3 e *rs1047286:C>T* (p.Pro314Leu) no exon 9. Os polimorfismos avaliados no presente trabalho foram selecionados com base em sua frequência populacional através da base de dados Ensembl (<http://www.ensembl.org>), associação com outras doenças e potencial alteração na atividade da proteína C3. O primer C3IVS2_-111T_For ou C3IVS2_-111C_For foram conjugados com o C3Exo3_+37G_Rev ou C3Exo3_+37C_Rev para gerar um fragmento de C3 182pb. Enquanto o primer C3Exo9_+65C_For ou C3Exo9_+65T_For foram conjugados com o C3Exo10_Rev para gerar um fragmento de 752pb. Simultaneamente um fragmento controle de 1059pb do gene *MBL* foi amplificado (Tabela 2).

As condições da PCR foram as seguintes: 0,2 μ M de primers iniciadores SSP, 1X de tampão PCR CoralLoad (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,5% de glicerol, 0,2 mM desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/ μ L de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,1 μ g/ml de DNA e água ultrapura para 15 μ l. O protocolo de amplificação iniciou com uma etapa de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 64°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 62°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C, concluindo com 5 min a 72°C no passo final de extensão do DNA. O resultado foi observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5 % corado com SYBR® Safe (Invitrogen). A genotipagem foi baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados.

Concentração sérica de C3

A avaliação de níveis séricos da proteína C3 foi realizada em 60 pacientes e 60 controles pareados por idade, etnia e sexo, através do método de imunoturbidimetria automatizada em laboratório terceirizado.

Análise Estatística

As frequências alélicas e genotípicas foram determinadas através de contagem direta. Os haplótipos foram inferidos através dos algoritmos EML e EBL utilizando o programa Arlequin (v.3.1). Para as análises de associação foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes qui-quadrado com correção de Yates ou teste de Fisher bicaudal. Quando apropriado, calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. A estatística descritiva em relação as concentrações séricas de C3 foi apresentada em mediana e percentis. As comparações entre médias foram realizadas através dos testes não-paramétricos Mann-Whitney. Os dados também foram avaliados por análise de regressão logística através do programa STATA v.9.2 (StataCorp, EUA). As covariáveis idade, sexo, etnia,

Anti-CCP, FR, hábito de fumar, duração da doença e presença de manifestações extra-articulares, foram incluídas no modelo de regressão logística quando a análise univariada apresentou $p \leq 0,2$. Os valores de Desequilíbrio de Ligação (DL) entre os SNPs avaliados foram obtidos através do programa Haploview 4.2 (<http://broadinstitute.org/haploview/haploview>). Valores de p menores que 0,05 serão considerados significativos. A correção de Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicada quando o valor de p foi significativo. Para auxiliar a análise estatística deste trabalho foi utilizado o programa “GraphPad Prism – versão 3.0” e Excel.

RESULTADOS

A distribuição genotípica dos SNPs de C3 não foi diferente da esperada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg em controles e pacientes. Também não houve diferença quanto a frequência de genótipos/alelos dos SNPs avaliados entre homens e mulheres e entre as etnias. Além disso, a frequência de genótipos/alelos dos SNPs avaliados estava de acordo com a descrita no banco de dados do Ensembl para os controles. A análise de desequilíbrio de ligação (DL) entre os polimorfismos de C3 indicou alto DL entre os alelos *rs2230199G* e *rs1047286T* ($D' > 0,90$, $R^2 > 0,80$) em pacientes e controles.

Polimorfismos do gene C3 na AR

A frequência do alelo *rs2230199G* e genótipo *rs2230199GG* foi significativamente maior em pacientes com AR que controles ($p_{\text{adj}}=0,012$ OR=1,57 [1,11-2,31]; $p_{\text{adj}}=0,008$, OR=1,60 [1,35-2,33]) assim como do alelo *rs1047286T* e genótipo *rs1047286TT* ($p_{\text{adj}}=0,010$, OR=1,67 [1,12-2,40]; $p_{\text{adj}}=0,001$, OR=1,83 [1,27-2,65]) (tabela 3), apresentando um efeito aditivo, com homozigotos associados a um maior risco do que heterozigotos. Além disso, pacientes soropositivos para FR também apresentaram maior frequência do alelo *rs2230199G* e genótipo *rs2230199GG* ($p=0,018$, OR=1,70 [1,12-2,28]; $p=0,007$, OR=1,75 [1,18-2,61]) bem como *rs1047286T* e genótipo *rs1047286TT* ($p=0,011$ OR=1,89 [1,17-3,05]; 0,001 IR=1,97 [1,31-2,95]) quando comparados a controles. Porém, não houve significância quando pacientes soropositivos foram comparados a aqueles soronegativos para o FR, ou quando estes foram comparados aos controles (Tabela 4). Os SNPs avaliados não foram

associados a presença de manifestações extra-articulares da AR (tabela 5), no entanto, uma elevada frequência dos genótipos que carregam os alelos rs2230199G e rs1047286T foi observada em pacientes com nódulos reumatóides comparado aqueles que não o apresentavam (rs2230199G: 42% (5/12) vs. 36% (53/144); rs1047286T: 42% (5/12) vs. 35% (50/144), (tabela 5).

Os três polimorfismos de C3 avaliados, resultaram na combinação de cinco haplótipos (ACC, GCC, AGT, GCT, AGC), presentes em pacientes e controles. A ordem dos SNPs nos haplótipos segue a ordem de aparecimento do gene: rs2250656:A>G, rs2230199:C>G e rs1047286:C>T. O haplótipo C3 AGT foi mais frequente em pacientes com AR do que em controles ($p_{\text{adj}}=0.0007$, OR=1.92 [1.32-2.80]). Os demais haplótipos de C3 não foram associados à AR ou suas características clínicas, conforme apresentados na Tabela 6.

Concentração de C3 na AR

Observamos maior concentração de C3 em pacientes (mediana: 169mg/dl; max-min: 97-225mg/dl) do que em controles (mediana:155mg/dl; min-max: 92-211mg/dl; $p_{\text{adj}}=0,022$; OR=1,02; [1,01-1,03]; Figura 1 A). Além disso, menores níveis séricos de C3 foram observados em pacientes com AR e FR soropositivos (mediana: 166mg/dl; min-max: 97-218mg/dl) quando comparado à pacientes FR soronegativos (mediana: 172mg/dl; min-max: 137-225mg/dl; $p_{\text{adj}}= 0,007$; OR 1,05; IC [1.01-1,08]; figura 1 B). Ainda, uma correlação negativa entre concentração de C3 e FR foi observada ($p= 0,022$, $r= -0,3$; Figura 1 C). Os polimorfismos avaliados não foram associados aos níveis de C3 em controles e pacientes.

DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem que os alelos rs2230199G (p.102Gli) e rs1047286T (p.314Leu) do gene C3 apresentam um papel na fisiopatologia da AR, possivelmente por impactarem na ativação do complemento através da via alternativa, contribuindo para o processo inflamatório crônico da doença. Este é

o primeiro estudo que aborda a associação entre polimorfismos do gene C3 e AR.

Ambos os SNPs associados à AR (rs2230199 e rs1047286) estão localizados em exons que codificam domínios do tipo macroglobulina da proteína C3 e são responsáveis pelos alótipos C3S/F e HAV4-1±, respectivamente (BOTTO *et al.*, 1990). O SNP rs2230199 está localizado no exon 3, o qual codifica para o domínio macroglobulina 1, sítio de ligação para o fator H (FH) que apresenta papel de regulador do complemento (PAUN *et al.*, 2016). Já o SNP rs1047286 está posicionado no exon 9, que codifica o domínio macroglobulina 3, sítio de ligação para o fator B (FB), o qual é componente crucial para a formação da C3 convertase da via alternativa (PAUN *et al.*, 2016). Estudos funcionais demonstraram que a molécula C3b p.102Gli (alótipo C3F) apresenta menor afinidade ao FH, enquanto a molécula C3b p.314Leu (alótipo HAV4-1+), apresentaria maior afinidade ao FB (DELANGHE; SPEECKAERT; SPEECKAERT, 2014; HEURICH *et al.*, 2011) sendo que ambos os variantes (p.102Gli e p.314Leu) foram associados a maior atividade da via alternativa (DELANGHE; SPEECKAERT; SPEECKAERT, 2014; HEURICH *et al.*, 2011; PAUN *et al.*, 2016).

Considerando as alterações funcionais promovidas pelos polimorfismos, nossa hipótese seria de que os alelos rs2230199G (p.102Gli) e rs1047286T (p.314Leu) associados a AR estariam estimulando a formação da C3 convertase, e simultaneamente impactando a regulação do C3b (DELANGHE; SPEECKAERT; SPEECKAERT, 2014; HEURICH *et al.*, 2011; PAUN *et al.*, 2016) na AR. Estes eventos estariam promovendo uma ativação excessiva do complemento pela via alternativa, contribuindo para inflamação e danos tecidual associados a AR nos pacientes que carregam essas variantes. De fato, pacientes portando o haplótipo contendo ambos os alelos associados a AR (C3 AGT) apresentaram cerca de duas vezes mais chances de desenvolver a doença, indicando o efeito aditivo destes alelos sobre a ativação do complemento em pacientes com AR e C3 p.102Gli e p.314Leu.

A ativação do complemento na AR foi confirmada em estudos que observaram uma elevada concentração de produtos da ativação (C3d, C3a,

C4d, Ba) no líquido sinovial de pacientes (BRODEUR et al., 2010; OLMEZ et al., 1991; PERRIN et al., 1977). Além disso, o aumento significativo de MAC nestes pacientes indica a natureza destrutiva desta ativação na AR (BRODEUR et al., 2010; OLMEZ et al., 1991; PERRIN et al., 1977). Nossos resultados corroboram a importância da ativação da via alternativa no mecanismo patogênico da AR.

O aumento na frequência dos alótipos C3 F e C3 S/F já foram descritos em pacientes com AR (FARHUD et al. 1972, UTIYAMA, REASON, & KOTZE, 2004). No entanto esses trabalhos não observaram diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles. Este é o primeiro estudo a empregar uma abordagem molecular na análise dos alótipos S/F de C3 na AR e a descrever a associação entre o polimorfismo responsável pelo alótipo C3 F (rs2230199G; p.102Gli) e a doença. Por outro lado, a associação que observamos entre o alelo rs2230199G (p.102Gli) e a soropositividade para o FR, já foi relatada em um trabalho que avaliou este polimorfismo ao nível proteico (FARHUD, 1972). A presença de FR é sugestiva de prognóstico desfavorável em pacientes com AR (GOELDNER et al 2011), o que vai de acordo com a hipótese de que os alelos rs2230199G (p.102Gli) e rs1047286T (p.314Leu) estariam contribuindo para inflamação e danos tecidual nestes pacientes. A ausência de significância entre os alelos rs2230199G (p.102Gli) e rs1047286T (p.314Leu) e manifestações extra-articulares pode ser um reflexo do tamanho amostral. Estudos adicionais com uma amostra representativa de pacientes com AR que expressem tais características clínicas são necessários para conclusões definitivas.

Os alelos rs2230199G (p.102Gli) e rs1047286T (p.314Leu) já foram associados ao aumento no risco de desenvolvimento da Degeneração Macular Relacionada a Idade e a maior ativação do complemento na doença (QIAN-QIAN et al. 2015, ZHANG et al 2015, CONSTANTIN PAUN 2016). Além disso, o alelo rs2230199G (p.102Gli) também já foi relacionado a outras condições, como ao comprometimento cognitivo em pacientes com Esclerose Múltipla (ROOSTAEI et al., 2019) e Diabetes tipo 1 (TORN et al 2016). As análises ao nível proteico apontaram um aumento na frequência do alótipo C3F em diversas doenças inflamatórias, como Vasculite sistêmica (FINN et al., 1994),

Nefrite mesangiocapilar (BARTÓK; WALPORT, 1995) Doença de Crohn e colite ulcerosa (ELMGREEN; SØRENSEN; BERKOWICZ, 1984), assim como no Câncer de Pulmão (SUADICANI; HEIN; GYNTELBERG, 2012), Acidente vascular cerebral isquêmico (OLSSON et al., 2011) e na Cardiomiopatia (MESSIAS-REASON; URBANETZ; PEREIRA DA CUNHA, 2003).

Os polimorfismos avaliados parecem não influenciarem na expressão de C3 em pacientes e controles, já que não foi observada diferença na média de concentração de C3 entre os genótipos. No entanto, uma maior concentração da proteína foi observada nos pacientes comparado a controles. Um maior nível de C3 no soro de pacientes pode derivar de mecanismos compensatórios de regulação positiva decorrentes do processo inflamatório da doença. Maior concentração de C3 já foi observada no líquido sinovial e plasma de pacientes com AR, bem como de produtos da ativação do complemento. (BEMIS et al., 2019; HOLERS; BANDA, 2018; NEUMANN et al., 2002) reforçando a hipótese de uma excessiva produção de C3 como consequência dos mecanismos inflamatórios da AR. Já a correlação negativa entre as concentrações de FR e C3, bem como a menor concentração de C3 em pacientes soropositivos para o FR pode ser devido à opsonização de C3b aos imunocomplexos contendo FR (OKROJ et al., 2007). O reconhecimento de complexos imunes opsonizados pelo complemento por células fagocíticas promove a liberação de citocinas proinflamatórias, exacerbando o processo inflamatório com consequente erosão das articulações (GOELDNER et al., 2011; OKROJ et al., 2007)

Este trabalho apresenta algumas limitações. Maior ativação do complemento em pacientes carregando os alelos rs2230199G (p.102Gli) e rs1047286T (p.314Leu) foi suposta baseada em trabalhos funcionais que avaliaram os polimorfismos estudados. Apesar do número relativamente baixo de pacientes, especialmente daqueles manifestando alguma característica extra articular relacionada a doença, tentamos garantir maior confiança nos resultados através de análises estatísticas robustas, incluindo correção para comparações múltiplas e regressão logística. Embora o presente estudo contribua para um melhor entendimento dos fatores genéticos relacionados a AR, mais estudos clínicos e moleculares com maior tamanho amostral são

necessários para elucidar o papel destes polimorfismos na fisiopatologia da AR.

Em resumo, nossos achados sugerem um papel dos alelos rs2230199G (p.102Gli) e rs1047286T (p.314Leu) no mecanismo patogênico da AR associado a excessiva ativação do complemento. Este achado pode ser relevante no contexto de futuros tratamentos que buscam a redução da ativação do complemento na AR. A estratificação baseada em genótipo pode ser útil na identificação de indivíduos predispostos a maior ativação, os quais são potencialmente os melhores candidatos para terapias inibidoras de complemento na AR.

REFERENCIAS

ALETAHA, D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 69, n. 9, p. 1580–8, 1 set. 2010

ANDRADE, F. A. et al. Serine proteases in the lectin pathway of the complement system. In: *Proteases in Physiology and Pathology*. [s.l: s.n.].

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 31, n. 3, p. 315–24, mar. 1988.

ARROTÉIA, F. R. N. Variabilidade Alotípica do fator B e dos sistema complemento em pacientes com artrite reumatóide e familiares: associação com biomarcadores sorológicos e aspectos clínicos da doença. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2014.

ARTRITE REUMATÓIDE. | lamoreabio: biologia e educação em saúde. Disponível em: <<https://lamoreabio2.blogspot.com/2013/01/artrite-reumatoide.html?view=snapshot>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

BAHIA EL IDRISSEI, N. et al. Complement activation in leprosy: a retrospective study shows elevated circulating terminal complement complex in reactional leprosy. *Clinical and experimental immunology*, v. 184, n. 3, p. 338–46, 2016.

BAJIC, G. et al. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *The EMBO Journal*, 2015.

BARTÓK, I.; WALPORT, M. J. Comparison of the binding of C3S and C3F to complement receptors types 1, 2, and 3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1995.

BEMIS, E. A. et al. Complement and its environmental determinants in the progression of human rheumatoid arthritis. *Molecular Immunology*, v. 112, p. 256–265, ago. 2019.

BIÓLOGO PAULO FRANCISCO NAOUM. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO LABORATORIAL. Disponível em: <<http://www.ciencianews.com.br/aulavirt/metodos.pdf>>. Acesso em: 3 out. 2019.

BRODEUR, J. P. et al. Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 34, n. 12, p. 1531–1537, 26 ago. 2010.

BUCKLEY NICOLE AMFT, C. D. et al. Return in Rheumatoid Arthritis Accumulation and Compromised Lymphatic Mechanism for Aberrant Lymphocyte A Chemokine-Dependent Stromal Induction. 2019.

CAMPOS, A. P. R. et al. Depressão e qualidade de vida em indivíduos com artrite reumatoide e indivíduos com saúde estável: um estudo comparativo. *Fisioterapia e Pesquisa*, v. 20, n. 4, p. 401–407, dez. 2013.

CATRINA, A. I. et al. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 13, n. 2, p. 79–86, 15 fev. 2017.

CHATFIELD, S. M. et al. Anti-citrullinated peptide antibody: death of the rheumatoid factor? *Medical Journal of Australia*, v. 190, n. 12, p. 693–695, 1 jun. 2009.

COIT, P.; SAWALHA, A. H. The human microbiome in rheumatic autoimmune diseases: A comprehensive review *Clinical Immunology*, 2016.

COSTA, J. P. DA; BECK, S. T. Avanços no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. *Saúde (Santa Maria)*, v. 37, n. 1, p. 65–76, 6 jul. 2011.

CRUVINEL, ET AL. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, v. 50, n. 4, p. 434–61, 2010.

DAS, S.; PADHAN, P. An Overview of the Extraarticular Involvement in Rheumatoid Arthritis and its Management. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, v. 8, n. 3, p. 81–86, 2017.

DELANGHE, J. R.; SPEECKAERT, R.; SPEECKAERT, M. M. Complement C3 and its polymorphism: biological and clinical consequences. *Pathology*, v. 46, n. 1, p. 1–10, jan. 2014.

DEMORUELLE, M. K.; DEANE, K. D.; HOLERS, V. M. When and where does inflammation begin in rheumatoid arthritis? *Current opinion in rheumatology*, v. 26, n. 1, 2014.

DODDS, M. W.; ALEX LAW, S. K. The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and alpha2-macroglobulin. *Immunological Reviews*, v. 166, n. 1, p. 15–26, dez. 1998.

ELMGREEN, J.; SØRENSEN, H.; BERKOWICZ, A. Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease. Predominance of the C3F gene in Crohn's disease. *Acta medica Scandinavica*, v. 215, n. 4, p. 375–8, 1984a.

ELMGREEN, J.; SØRENSEN, H.; BERKOWICZ, A. Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease. Predominance of the

C3F gene in Crohn's disease. *Acta medica Scandinavica*, v. 215, n. 4, p. 375–8, 1984b.

FARHUD. Association between C'3 phenotypes and various diseases. *Human Genetics*, v. 17, n. 1, p. 57–60, 1972.

FINN, J. E. et al. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, v. 9, n. 11, p. 1564–7, 1994a.

FINN, J. E. et al. Nephrology Dialysis Transplantation Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis *Nephrol Dial Transplant*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://ndt.oxfordjournals.org/>>. Acesso em: 21 jul. 2019b.

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, v. 46, n. 2, p. 183–196, 21 fev. 2017.

Gene: C3 (ENSG00000125730) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 97. Disponível em: <https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000125730;r=19:6677704-6730562>. Acesso em: 10 ago. 2019.

GOELDNER, I. et al. Artrite reumatoide: uma visão atual Rheumatoid arthritis: a current view. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n5/v47n5a02.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

GROS, P.; MILDNER, F. J.; JANSSEN, B. J. C. Complement driven by conformational changes. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 1, p. 48–58, jan. 2008.

HEURICH, M. et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 21, p. 8761–6, 24 maio 2011.

HOLERS, V. M.; BANDA, N. K. Complement in the Initiation and Evolution of Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1057, 2018a.

HOLERS, V. M.; BANDA, N. K. Complement in the initiation and evolution of rheumatoid arthritis *Frontiers in Immunology*, 2018b.

JANSSEN, B. J. C. et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*, v. 437, n. 7058, p. 505–511, 22 set. 2005.

KARLSON, E. W. et al. Biomarkers of inflammation and development of rheumatoid arthritis in women from two prospective cohort studies. *Arthritis and rheumatism*, v. 60, n. 3, p. 641–52, mar. 2009.

MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 1, p. 60–75, 5 jan. 2017.

MARIA, L. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol*, v. 52, n. 2, p. 135–174, 2012.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 389, n. 10086, p. 2328–2337, 10 jun. 2017.

MENON, N. V. B. et al. Clinical profile and juvenile arthritis damage index in children with juvenile idiopathic arthritis: A study from a tertiary care center in south India. *International journal of rheumatic diseases*, 16 jun. 2016.

MERLE, N. S. et al. Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in immunology*, v. 6, p. 257, 2015.

Marques, W. V., Cruz, V. A., Rego, J., & Silva, N. A. da. (2016). Influência das comorbidades na capacidade funcional de pacientes com artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 56(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2015.01.009>

MESSIAS-REASON, I. J.; URBANETZ, L.; PEREIRA DA CUNHA, C. Complement C3 F and BF S allotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. *Tissue antigens*, v. 62, n. 4, p. 308–12, out. 2003.

MICHOU, L. et al. A genetic association study of the CLEC12A gene in rheumatoid arthritis. *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme*, v. 79, n. 5, p. 451–6, out. 2012.

MÖDINGER, Y. et al. Role of the Complement System in the Response to Orthopedic Biomaterials. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 11, 27 out. 2018.

MOTA, L. MA. H. DA. Artrite Reumatóide Inicial: Estudo De Coorte Para Avaliação De Marcadores Sorológicos De Atividade, Determinantes. [s.l.] Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, 2009.

NAGAYOSHI, B. A. et al. Rheumatoid arthritis: profile of patients and burden of caregivers. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 21, n. 1, p. 44–52, fev. 2018.

NASS, F. R. et al. Association of complement factor B allotypes and serum biomarkers in rheumatoid arthritis patients and their relatives. *International Journal of Immunogenetics*, 2015.

NEUMANN, E. et al. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis and Rheumatism*, 2002a.

NEUMANN, E. et al. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis & Rheumatism*, v. 46, n. 4, p. 934–945, abr. 2002b.

OKROJ, M. et al. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Annals of Medicine*, v. 39, n. 7, p. 517–530, 8 jan. 2007.

OLMEZ, U. et al. C3 activation products, C3 containing immune complexes, the terminal complement complex and native C9 in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*, v. 20, n. 3, p. 183–9, 1991.

OLSSON, S. et al. Genetic variation in complement component C3 shows association with ischaemic stroke. *European Journal of Neurology*, 2011.

ORTONA, E. et al. Sex-based differences in autoimmune diseases. *Ann Ist Super Sanità*, v. 52, n. 2, p. 205–212, 2016.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B. et al. Fcγ and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, v. 2015, p. 429878, 2015.

PAUN, C. C. et al. A Novel Complotype Combination Associates with Age-Related Macular Degeneration and High Complement Activation Levels in vivo. *Scientific Reports*, 2016.

PENG, M. et al. Complement C3 gene: Expression characterization and innate immune response in razor clam *Sinonovacula constricta*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 55, p. 223–232, 2016.

PENG, M. et al. Expression of a novel complement C3 gene in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune response and hemolysis. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017.

PERRIN, L. H. et al. Correlation between levels of breakdown products of C3, C4, and properdin factor b in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 20, n. 2, p. 647–652, 1 mar. 1977.

PHILLIPS, C. M. et al. Complement component 3 polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of metabolic syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 90, n. 6, p. 1665–1673, 1 dez. 2009.

Portal GTEx. Disponível em: <<https://www.gtexportal.org/home/gene/ENSG00000125730>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

QIAN-QIAN, Y. et al. Nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the complement component 3 gene are associated with risk of age-related macular degeneration: A meta-analysis. *Gene*, v. 561, n. 2, p. 249–255, maio 2015.

REGO-PÉREZ, I. et al. [Gene polymorphisms and pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis]. *Reumatología clínica*, v. 5, n. 6, p. 268–79, 1 jan. 2009.

RENAN LUIZ FERNANDES. et al. ABORDAGENS FISIOPATOLÓGICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DA ARTRITE REUMATÓIDE - ARTIG...: Busca Integrada ao Acervo UFPR. 2011.

Rheumatoid arthritis - Symptoms and causes - Mayo Clinic. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/rheumatoid-arthritis/symptoms-causes/syc-20353648>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

RICKLIN, D. et al. Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunological Reviews*, 2016.

ROCHA CASTELAR-PINHEIRO, G. et al. The REAL study: a nationwide prospective study of rheumatoid arthritis in Brazil. *Advances in Rheumatology*, v. 58, n. 1, p. 9, 28 dez. 2018.

ROMA, I. et al. Qualidade de vida de pacientes adultos e idosos com artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 54, n. 4, p. 279–286, jul. 2014.

ROOSTAEI, T. et al. Convergent effects of a functional C3 variant on brain atrophy, demyelination, and cognitive impairment in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 2019a.

ROOSTAEI, T. et al. Convergent effects of a functional C3 variant on brain atrophy, demyelination, and cognitive impairment in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 25, n. 4, p. 532–540, 27 abr. 2019b.

ROOSTAEI, T. et al. Convergent effects of a functional C3 variant on brain atrophy, demyelination, and cognitive impairment in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 25, n. 4, p. 532–540, 27 abr. 2019c.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.

SCODELER, G. C.; RESENDE, F. C. B. E. Avanços e perspectivas dos estudos da artrite reumatoide. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. Esp., n. 6, p. S386–S391, 2017.

SCOTT, D. L. et al. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, set. 2010.

SILVA, I. G. DA. Concentrações séricas e polimorfismo de MBL e MASP-2 em pacientes com artrite reumatóide e familiares. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2013.

SILVA, K. R. DA et al. Skipping of exon 27 in C3 gene compromises TED domain and results in complete human C3 deficiency. *Immunobiology*, v. 221, n. 5, p. 641–649, 1 maio 2016.

SINGH, J. A. et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care & Research*, 2015.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 22 out. 2016.

SOKKA, T. et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis research & therapy*, v. 11, n. 1, p. R7, 2009.

STINGHEN, S. T. Polimorfismos do gene VSIG4 em pacientes com hanseníase e coinfeção com hepatite B de Curitiba-PR e Sinop-MT. 2015.

SUADICANI, P.; HEIN, H. O.; GYNTEMBERG, F. Serum selenium level and risk of lung cancer mortality: a 16-year follow-up of the Copenhagen Male Study. *The European respiratory journal*, v. 39, n. 6, p. 1443–8, jun. 2012.

SUBHAN; PADHAN, P. An Overview of the Extraarticular Involvement in Rheumatoid Arthritis and its Management. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, v. 8, n. 3, p. 81–86, 2017.

SUHRBIER, A.; LA LINN, M. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Current opinion in rheumatology*, v. 16, n. 4, p. 374–9, 1 jul. 2004.

URSINI, F. et al. Complement C3 and fatty liver disease in Rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional study. *European Journal of Clinical Investigation*, 2017.

- VARELA, J. C.; TOMLINSON, S. Complement: an overview for the clinician. *Hematology/oncology clinics of North America*, v. 29, n. 3, p. 409–27, jun. 2015.
- VAZ, A. E. et al. Perfil epidemiológico e clínico de pacientes portadores de artrite reumatóide em um hospital escola de medicina em Goiânia, Goiás, Brasil. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v. 46, n. 2, p. 141, 16 jun. 2013.
- VENSON, R. ET. A. Avaliação econômica das anticitocinas adalimumabe, etanercepte e infliximabe no tratamento da artrite reumatoide no Estado do Paraná |. *Physis -Revista de Saúde Coletiva*, v. 21, n. 2, p. 359–375, 2011.
- VIATTE et al. Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response. *JAMA*, v. 313, n. 16, p. 1645–56, 28 abr. 2015.
- VIATTE, S.; PLANT, D.; RAYCHAUDHURI, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, v. 9, n. 3, p. 141–53, mar. 2013.
- WATZKO, W. L. Estudo do polimorfismo genético de C4A, C4B, BF e C3 do sistema complemento em artrite reumatoide. 14 ago. 1993.
- YARWOOD, A.; HUIZINGA, T. W. J.; WORTHINGTON, J. The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 55, n. 2, p. 199–209, fev. 2016.
- ZAMANPOOR, M. The genetic pathogenesis, diagnosis and therapeutic insight of rheumatoid arthritis. *Clinical Genetics*, v. 95, n. 5, p. 547–557, 28 maio 2018.
- ZHANG, R. et al. RADB: a database of rheumatoid arthritis-related polymorphisms. *Database: the journal of biological databases and curation*, v. 2014, 15 set. 2014.
- ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature medicine*, v. 21, n. 8, 2015a.
- ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine*, v. 21, n. 8, p. 895–905, 27 ago. 2015b.

Tabela 1: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES COM AR.

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES n=156
IDADE	
Média ± DV	51,1±13,2
Mínima	18
Máxima	84
SEXO n/total (%)	
Feminino	134 /156 (86)
Masculino	22/156 (14)
ETNIA n/total (%)	
Euro-descendente	113/156 (72)
Não Euro-descendente	43/156 (28)
PRESENÇA DE MEA's e COMORBIDADES	n/total(%)

DCV	8/156 (5)
Nódulos	12/156 (8)
Sjorgren	35/115 (30)
Pneumonite	12/121 (10)
BIOMARCADORES n/total(%)	
Anti CCP (≥ 20 U/ml)	121/156 (78)
Fator Reumatóide (≥ 30 U/ml)	108/156 (69)
CLASSE FUNCIONAL n/total (%)	
I	72/156 (46)
II	65/156 (42)
III e IV	19/156 (12)
OUTRAS CARACTERÍSTICAS n/total (%)	
Tabagismo	65/156 (42)
Início da Doença (≤ 40 anos)	60/156 (38)

Legenda: **DCV**: Doença Cardiovascular; **MEA**: Manifestações Extra articulares.

Tabela 2 - INICIADORES SSP PROJETADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DO GENE C3

dbSNP	Frequência alélica	Localização	Iniciador	Sequência 5'- 3'	Produto Amplificado
rs2250656	A 70% G 30%	Intron 2	IVS2_-111A_For IVS2_-111G_For	AAAACGGCCACCTCGGA AAAACGGCCACCTCGGG	182 pb
rs2230199	C 83% G 17%	Exon 3	Exo3_+37G_Rev Exo3_+37C_Rev	CGGTCACGAACTTGTGCG CGGTCACGAACTTGTGCC	
rs1047286	C 76% T 24%	Exon 9	Exo9_+65C_For Exo9_+65T_For	GACGGGGTGCAGAACCC GACGGGGTGCAGAACCT	752pb
		Exon 10	Exo10_Rev	CAAAGGGCATTCTGGTTTGA	
Controle		MBL		ATGGGGCTAGGCTGCTGAG CCAACACGTACCTGGTTCCC	1059pb

Tabela 3: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE C3 EM PACIENTES E CONTROLES

Gene C3	Alótipo	Controles	Pacientes	Modelo	p _{Aju} *	OR [95% IC]
		n=270 N (%)	n=156 N (%)			
Intron 2 rs2250656						
AA		146 (54)	87 (56)	AAxAGxGG	0,691	0,93 [0,65-1,32]
AG		101 (37)	59 (38)	AAxAG+GG	0,609	0,89 [0,57-1,37]
GG		23 (9)	10 (6)	AA+AGxGG	0,973	1,01 [0,42-2,42]
A		393 (72)	233 (75)	AxG	0,573	0,91 [0,65-1,24]
G		147 (27)	79 (25)			
Exon 3 rs2230199 (Arg102Gli)						
CC	C3S	197 (73)	98 (63)	CCxCGxGG	0,012	1,57 [1,11-2,31]
CG	C3FS	67 (25)	47 (30)	CCxCG+GG	0,046 (ns)	1,60 [1,00-2,05]
GG	C3F	6 (2)	11 (7)	CC+CGxGG	0,076	2,67 [0,90-7,90]
C		461 (85)	243 (78)	CxG	0,008	1,60 [1,35-2,33]
G		79 (15)	69 (22)			
Exon 9 rs1047286 (Pro314Leu)						
CC	HAV4-1-	204 (75)	101 (64)	CCxCTxTT	0,010	1,67 [1,12-2,40]
CT	HAV4-1±	62 (23)	43 (28)	CCxCT+TT	0,040 (ns)	1,64 [1,02-2,69]
TT	HAV4-1+	4 (2)	12 (8)	CC+CTxTT	0,021 (ns)	4,13 [1,23-13,83]
C		470 (87)	245 (79)	CxT	0,001	1,83 [1,27-2,65]
T		70 (13)	67 (21)			

*Valores de p ajustados por regressão logística binária. ns. não significativo.

Nível de significância após Bonferroni: p=0,02

Tabela 4: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS

Gene C3 Alótipo Anti CCP - N: 156

Fator Reumatoide - N: 156

POLIMORFISMOS DO GENE C3 EM PACIENTES *BIOMARCADORES

	Ausente ≤20 U/ml N (%)	Presente ≥20U/ml N (%)	Modelo p _{Aju} *	Ausente ≤30U/ml N (%)	Presente ≥30U/ml N (%)	Modelo p _{Aju} *
Intron 2 rs2250656						
AA	17 (49)	70 (58)	AAxAGxGG	23 (48)	64 (59)	AAxAGxGG
AG	14 (40)	45 (37)	0,128	22 (46)	37 (34)	0,109
GG	4 (11)	6 (5)		3 (6)	7 (7)	
A	48 (69)	185 (76)	AxG	68 (71)	165 (76)	AxG
G	22 (31)	57 (24)	0,068	28 (29)	51 (24)	0,101
Exon 3 rs2230199 (Arg102Gli)						
CC	C3S 22 (63)	76 (63)	CCxCGxGG	33 (69)	65 (60)	CCxCGxGG
CG	C3FS 10 (29)	37 (31)	0,570	11 (23)	36 (33)	0,126
GG	C3F 3 (9)	8 (7)		4 (8)	7 (7)	
C	54 (77)	189 (78)	CxG	77 (80)	166 (77)	CxG
G	16 (23)	53 (22)	1,000	19 (20)	50 (23)	0,217
Exon 9 rs1047286 (Pro314Leu)						
CC	HAV4-1- 23 (66)	78 (64)	CCxCTxTT	34 (71)	67 (62)	CCxCTxTT
CT	HAV4-1± 9 (26)	34 (28)	0,303	10 (21)	33 (31)	0,455
TT	HAV4-1+ 3 (9)	9 (7)		4 (8)	8 (7)	
C	55 (79)	190 (79)	CxT	78 (81)	167 (77)	CxT
T	15 (21)	52 (21)	0,641	18 (19)	49 (23)	0,07

*Valores de p ajustados por regressão logística binária.

As frequências dos genótipos e alelos dos SNPs estudados não foram associadas a presença de Biomarcadores (p> 0,05).

Tabela 5: FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE C3 EM PACIENTES *MEAS E COMORBIDADES

Gene	Alótipo	Pneumonite	Nódulos	Sjogren	DCV
C3					

		Ausente (%)	N	Presente N(%)	Ausente N (%)	Presente N(%)	Ausente N (%)	Presente N(%)	Ausente N (%)	Presente N(%)
Intron 2 rs2250656										
AA		63 (58)		7 (58)	79 (55)	8 (67)	45 (56)	21 (60)	82 (55)	5 (63)
AG		38 (35)		5 (42)	56 (39)	3 (25)	28 (35)	14 (40)	56 (38)	3 (38)
GG		8 (7)		0	9 (6)	1 (7)	7 (9)	0 (7)	10 (7)	0
A		164 (75)		19 (79)	214 (74)	19 (79)	118 (74)	56 (80)	220 (74)	13 (81)
G		54 (25)		5 (21)	74 (26)	5 (21)	42 (26)	14 (20)	76 (26)	3 (19)
Exon 3 rs2230199 (Arg102Gln)										
CC	C3S	66 (61)		7 (58)	91 (63)	7 (58)	50 (63)	22 (63)	91 (61)	7 (88)
CG	C3FS	34 (31)		5 (42)	43 (30)	4 (33)	21 (26)	13 (37)	46 (31)	1 (13)
GG	C3F	9 (8)		0	10 (7)	1 (8)	9 (11)	0	11 (7)	0
C		166 (76)		19 (79)	225 (78)	18 (75)	121 (76)	57 (81)	228 (77)	15 (94)
G		52 (24)		5 (21)	63 (22)	6 (25)	39 (24)	13 (19)	68 (23)	1 (6)
Exon 9 rs1047286 (Pro314Leu)										
CC	HAV4-1-	69 (63)		7 (58)	94 (65)	7 (58)	51 (64)	23 (66)	94 (64)	7 (88)
CT	HAV4-1±	31 (28)		5 (42)	39 (27)	4 (33)	19 (24)	12 (34)	42 (28)	1 (13)
TT	HAV4-1+	9 (8)		0	11 (8)	1 (8)	10 (13)	0	12 (8)	0
C		169 (78)		19 (79)	227 (79)	18 (75)	121 (76)	58 (83)	230 (78)	15 (94)
T		49 (22)		5 (21)	61 (21)	6 (25)	39 (24)	12 (17)	66 (22)	1 (6)

DCV: Doenças Cardiovascular. As frequências dos genótipos e alelos dos SNPs estudados não foram associadas a presença de MEAs ou comorbidades ($p > 0,05$).

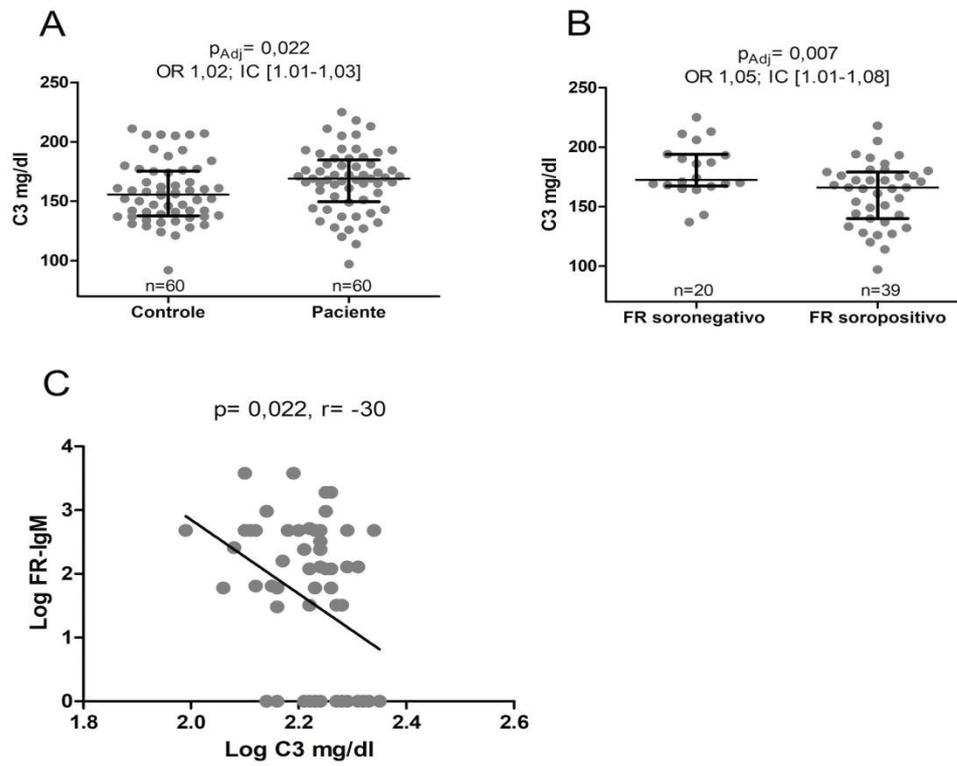
Tabela 6: FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DE C3 EM PACIENTES COM

AR E CONTROLES

Haplótipo	Controles	Pacientes	Modelo	p _{Aju} *	OR [95% IC]
	n=540 N (%)	n=312 N (%)			
ACC	314 (58,1)	164 (52,6)	Haplótipo	0,115	0,79 [0,60-1,51]
			Aditivo	0,151	0,81 [0,60-1,08]
			Dominante	0,222	0,75 [0,47-1,19]
			Recessivo	0,243	0,73 [0,43-1,23]
GCC	146 (27)	77 (24,7)	Haplótipo	0,467	0,88 [0,64-1,21]
			Aditivo	0,594	0,90 [0,63-1,29]
			Dominante	0,973	1,01 [0,42-2,42]
			Recessivo	0,495	0,85 [0,55-1,32]
AGT	65 (12)	65 (20,8)	Haplótipo	0,0007	1,92 [1,32-2,80]
			Aditivo	0,009	1,72 [1,14-2,57]
			Dominante	0,033 (ns)	3,78 [1,11-12,85]
			Recessivo	0,024 (ns)	1,73 [1,07-2,80]
GCT	1 (0,2)	2 (0,6)	Haplótipo	0,558	3,47 [0,31-38,5]
			Dominante	0,331	3,94 [0,24-62,89]
AGC	14 (2,6)	4 (1,4)	Haplótipo	0,227	0,22 [0,15-1,49]
			Dominante	0,428	0,61 [1,80-2,06]

*Valores de p ajustados por regressão logística binária. ns. não significativo. Negrito indica valores significativos. Nível de significância após Bonferroni: p=0,02 Ordem dos SNPs no haplótipo segue a ordem de aparecimento do gene: rs2250656, rs2230199 e rs1047286

Figura 1. A: CONCENTRAÇÃO DE C3 EM PACIENTES E CONTROLES, B: NÍVEIS DE C3 EM PACIENTES SOROPOSITIVOS E SORONEGATIVOS PARA FR; C: CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE C3 E FR.



6. CONCLUSÕES

- O alelo rs2230199G e genótipo rs2230199GG foram associados a AR, bem como a positividade do FR nestes pacientes.
- O alelo rs1047286T e genótipo rs1047286TT foram associados a AR, bem como a positividade do FR nestes pacientes.
- O haplótipo contendo os alelos de risco C3 AGT também foi associado a AR.
- O SNP rs2250656 presente no intron 2 não foi associado a doença.
- Nenhum dos três SNPs avaliados foi associado a presença de manifestações extra-articulares ou comorbidades.
- Níveis aumentados de C3 foram associados a AR.
- Menor níveis de C3 foram associados a soropositivos para o FR.
- Os níveis de C3 em pacientes estão negativamente correlacionados aos de FR.
- Os polimorfismos não foram associados à concentração sérica de C3 em pacientes e controles.

7- REFERENCIAS

ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, 2010a.

ALETAHA, D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 69, n. 9, p. 1580–8, 1 set. 2010b.

ANDRADE, F. A. et al. Serine proteases in the lectin pathway of the complement system. In: *Proteases in Physiology and Pathology*. [s.l.: s.n.].

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 31, n. 3, p. 315–24, mar. 1988.

ARROTÉIA, F. R. N. Variabilidade Alotípica do fator B e dos sistema complemento em pacientes com artrite reumatóide e familiares: associação com biomarcadores sorológicos e aspectos clínicos da doença. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2014.

ARTRITE REUMATÓIDE. | lamoreabio: biologia e educação em saúde. Disponível em: <<https://lamoreabio2.blogspot.com/2013/01/artrite-reumatoide.html?view=snapshot>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

BAHIA EL IDRISSE, N. et al. Complement activation in leprosy: a retrospective study shows elevated circulating terminal complement complex in reactional leprosy. *Clinical and experimental immunology*, v. 184, n. 3, p. 338–46, 2016.

BAJIC, G. et al. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *The EMBO Journal*, 2015.

BARTÓK, I.; WALPORT, M. J. Comparison of the binding of C3S and C3F to complement receptors types 1, 2, and 3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1995.

BEMIS, E. A. et al. Complement and its environmental determinants in the progression of human rheumatoid arthritis. *Molecular Immunology*, v. 112, p. 256–265, ago. 2019.

BIÓLOGO PAULO FRANCISCO NAOUM. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO LABORATORIAL. Disponível em: <<http://www.ciencianews.com.br/aulavirt/metodos.pdf>>. Acesso em: 3 out. 2019.

BOLDT, A. B. W. et al. Multiplex sequence-specific polymerase chain reaction reveals new MASP2 haplotypes associated with MASP-2 and MAp19 serum levels. *Human immunology*, v. 72, n. 9, p. 753–60, set. 2011.

BRODEUR, J. P. et al. Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 34, n. 12, p. 1531–1537, 26 ago. 2010.

BUCKLEY NICOLE AMFT, C. D. et al. Return in Rheumatoid Arthritis Accumulation and Compromised Lymphatic Mechanism for Aberrant Lymphocyte A Chemokine-Dependent Stromal Induction. 2019.

CAMPOS, A. P. R. et al. Depressão e qualidade de vida em indivíduos com artrite reumatoide e indivíduos com saúde estável: um estudo comparativo. *Fisioterapia e Pesquisa*, v. 20, n. 4, p. 401–407, dez. 2013.

CATRINA, A. I. et al. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 13, n. 2, p. 79–86, 15 fev. 2017.

CHATFIELD, S. M. et al. Anti-citrullinated peptide antibody: death of the rheumatoid factor? *Medical Journal of Australia*, v. 190, n. 12, p. 693–695, 1 jun. 2009.

COIT, P.; SAWALHA, A. H. The human microbiome in rheumatic autoimmune diseases: A comprehensive review *Clinical Immunology*, 2016.

COSTA, J. P. DA; BECK, S. T. Avanços no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. *Saúde (Santa Maria)*, v. 37, n. 1, p. 65–76, 6 jul. 2011.

CRUVINEL, ET AL. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, v. 50, n. 4, p. 434–61, 2010.

DAS, S.; PADHAN, P. An Overview of the Extraarticular Involvement in Rheumatoid Arthritis and its Management. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, v. 8, n. 3, p. 81–86, 2017.

DELANGHE, J. R.; SPEECKAERT, R.; SPEECKAERT, M. M. Complement C3 and its polymorphism: biological and clinical consequences. *Pathology*, v. 46, n. 1, p. 1–10, jan. 2014.

DEMORUELLE, M. K.; DEANE, K. D.; HOLERS, V. M. When and where does inflammation begin in rheumatoid arthritis? *Current opinion in rheumatology*, v. 26, n. 1, 2014.

DODDS, M. W.; ALEX LAW, S. K. The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and alpha2-macroglobulin. *Immunological Reviews*, v. 166, n. 1, p. 15–26, dez. 1998.

ELMGREEN, J.; SØRENSEN, H.; BERKOWICZ, A. Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease. Predominance of the C3F gene in Crohn's disease. *Acta medica Scandinavica*, v. 215, n. 4, p. 375–8, 1984a.

ELMGREEN, J.; SØRENSEN, H.; BERKOWICZ, A. Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease. Predominance of the C3F gene in Crohn's disease. *Acta medica Scandinavica*, v. 215, n. 4, p. 375–8, 1984b.

FARHUD. Association between C'3 phenotypes and various diseases. *Human Genetics*, v. 17, n. 1, p. 57–60, 1972.

FINN, J. E. et al. Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, v. 9, n. 11, p. 1564–7, 1994a.

FINN, J. E. et al. Nephrology Dialysis Transplantation Molecular analysis of C3 allotypes in patients with systemic vasculitis *Nephrol Dial Transplant*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://ndt.oxfordjournals.org/>>. Acesso em: 21 jul. 2019b.

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, v. 46, n. 2, p. 183–196, 21 fev. 2017.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2013.

Gene: C3 (ENSG00000125730) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 97. Disponível em: <https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000125730;r=19:6677704-6730562>. Acesso em: 10 ago. 2019.

GOELDNER, I. et al. Artrite reumatoide: uma visão atual Rheumatoid arthritis: a current view. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n5/v47n5a02.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

GROS, P.; MILDNER, F. J.; JANSSEN, B. J. C. Complement driven by conformational changes. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 1, p. 48–58, jan. 2008.

HEURICH, M. et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 21, p. 8761–6, 24 maio 2011.

HOLERS, V. M.; BANDA, N. K. Complement in the Initiation and Evolution of Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1057, 2018a.

HOLERS, V. M.; BANDA, N. K. Complement in the initiation and evolution of rheumatoid arthritis *Frontiers in Immunology*, 2018b.

JANSSEN, B. J. C. et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*, v. 437, n. 7058, p. 505–511, 22 set. 2005.

KARLSON, E. W. et al. Biomarkers of inflammation and development of rheumatoid arthritis in women from two prospective cohort studies. *Arthritis and rheumatism*, v. 60, n. 3, p. 641–52, mar. 2009.

MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 1, p. 60–75, 5 jan. 2017.

MARIA, L. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol*, v. 52, n. 2, p. 135–174, 2012.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 389, n. 10086, p. 2328–2337, 10 jun. 2017.

MENON, N. V. B. et al. Clinical profile and juvenile arthritis damage index in children with juvenile idiopathic arthritis: A study from a tertiary care center in south India. *International journal of rheumatic diseases*, 16 jun. 2016.

MERLE, N. S. et al. Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in immunology*, v. 6, p. 257, 2015.

MESSIAS-REASON, I. J.; URBANETZ, L.; PEREIRA DA CUNHA, C. Complement C3 F and BF S allotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. *Tissue antigens*, v. 62, n. 4, p. 308–12, out. 2003.

MICHOU, L. et al. A genetic association study of the CLEC12A gene in rheumatoid arthritis. *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme*, v. 79, n. 5, p. 451–6, out. 2012.

MÖDINGER, Y. et al. Role of the Complement System in the Response to Orthopedic Biomaterials. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 11, 27 out. 2018.

MOTA, L. MA. H. DA. Artrite Reumatóide Inicial: Estudo De Coorte Para Avaliação De Marcadores Sorológicos De Atividade, Determinantes. [s.l.] Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, 2009.

NAGAYOSHI, B. A. et al. Rheumatoid arthritis: profile of patients and burden of caregivers. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 21, n. 1, p. 44–52, fev. 2018.

NASS, F. R. et al. Association of complement factor B allotypes and serum biomarkers in rheumatoid arthritis patients and their relatives. *International Journal of Immunogenetics*, 2015.

NEUMANN, E. et al. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis and Rheumatism*, 2002a.

NEUMANN, E. et al. Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis & Rheumatism*, v. 46, n. 4, p. 934–945, abr. 2002b.

OKROJ, M. et al. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Annals of Medicine*, v. 39, n. 7, p. 517–530, 8 jan. 2007.

OLMEZ, U. et al. C3 activation products, C3 containing immune complexes, the terminal complement complex and native C9 in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*, v. 20, n. 3, p. 183–9, 1991.

OLSSON, S. et al. Genetic variation in complement component C3 shows association with ischaemic stroke. *European Journal of Neurology*, 2011.

ORTONA, E. et al. Sex-based differences in autoimmune diseases. *Ann Ist Super Sanità*, v. 52, n. 2, p. 205–212, 2016.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B. et al. Fcγ and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, v. 2015, p. 429878, 2015.

PAUN, C. C. et al. A Novel Complotype Combination Associates with Age-Related Macular Degeneration and High Complement Activation Levels in vivo. *Scientific Reports*, 2016.

PENG, M. et al. Complement C3 gene: Expression characterization and innate immune response in razor clam *Sinonovacula constricta*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 55, p. 223–232, 2016.

PENG, M. et al. Expression of a novel complement C3 gene in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune response and hemolysis. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017.

PERRIN, L. H. et al. Correlation between levels of breakdown products of C3, C4, and properdin factor b in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 20, n. 2, p. 647–652, 1 mar. 1977.

PHILLIPS, C. M. et al. Complement component 3 polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of metabolic syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 90, n. 6, p. 1665–1673, 1 dez. 2009.

Portal GTEEx. Disponível em: <<https://www.gtexportal.org/home/gene/ENSG00000125730>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

QIAN-QIAN, Y. et al. Nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the complement component 3 gene are associated with risk of age-related macular degeneration: A meta-analysis. *Gene*, v. 561, n. 2, p. 249–255, maio 2015.

REGO-PÉREZ, I. et al. [Gene polymorphisms and pharmacogenetics in Rheumatoid Arthritis]. *Reumatología clínica*, v. 5, n. 6, p. 268–79, 1 jan. 2009.

RENAN LUIZ FERNANDES. et al. ABORDAGENS FISIOPATOLÓGICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DA ARTRITE REUMATÓIDE - ARTIG...: Busca Integrada ao Acervo UFPR. 2011.

Rheumatoid arthritis - Symptoms and causes - Mayo Clinic. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/rheumatoid-arthritis/symptoms-causes/syc-20353648>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

RICKLIN, D. et al. Complement component C3 – The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunological Reviews*, 2016.

ROCHA CASTELAR-PINHEIRO, G. et al. The REAL study: a nationwide prospective study of rheumatoid arthritis in Brazil. *Advances in Rheumatology*, v. 58, n. 1, p. 9, 28 dez. 2018.

ROMA, I. et al. Qualidade de vida de pacientes adultos e idosos com artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 54, n. 4, p. 279–286, jul. 2014.

ROOSTAEI, T. et al. Convergent effects of a functional C3 variant on brain atrophy, demyelination, and cognitive impairment in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 2019a.

ROOSTAEI, T. et al. Convergent effects of a functional C3 variant on brain atrophy, demyelination, and cognitive impairment in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 25, n. 4, p. 532–540, 27 abr. 2019b.

ROOSTAEI, T. et al. Convergent effects of a functional C3 variant on brain atrophy, demyelination, and cognitive impairment in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 25, n. 4, p. 532–540, 27 abr. 2019c.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.

SCODELER, G. C.; RESENDE, F. C. B. E. Avanços e perspectivas dos estudos da artrite reumatoide. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. Esp., n. 6, p. S386–S391, 2017.

SCOTT, D. L. et al. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, set. 2010.

SILVA, I. G. DA. Concentrações séricas e polimorfismo de MBL e MASP-2 em pacientes com artrite reumatóide e familiares. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2013.

SILVA, K. R. DA et al. Skipping of exon 27 in C3 gene compromises TED domain and results in complete human C3 deficiency. *Immunobiology*, v. 221, n. 5, p. 641–649, 1 maio 2016.

SINGH, J. A. et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care & Research*, 2015.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 22 out. 2016.

SOKKA, T. et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis research & therapy*, v. 11, n. 1, p. R7, 2009.

STINGHEN, S. T. Polimorfismos do gene VSIG4 em pacientes com hanseníase e coinfeção com hepatite B de Curitiba-PR e Sinop-MT. 2015.

SUADICANI, P.; HEIN, H. O.; GYNTEMBERG, F. Serum selenium level and risk of lung cancer mortality: a 16-year follow-up of the Copenhagen Male Study. *The European respiratory journal*, v. 39, n. 6, p. 1443–8, jun. 2012.

SUBHAN; PADHAN, P. An Overview of the Extraarticular Involvement in Rheumatoid Arthritis and its Management. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, v. 8, n. 3, p. 81–86, 2017.

SUHRBIER, A.; LA LINN, M. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Current opinion in rheumatology*, v. 16, n. 4, p. 374–9, 1 jul. 2004.

URSINI, F. et al. Complement C3 and fatty liver disease in Rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional study. *European Journal of Clinical Investigation*, 2017.

VARELA, J. C.; TOMLINSON, S. Complement: an overview for the clinician. *Hematology/oncology clinics of North America*, v. 29, n. 3, p. 409–27, jun. 2015.

VAZ, A. E. et al. Perfil epidemiológico e clínico de pacientes portadores de artrite reumatóide em um hospital escola de medicina em Goiânia, Goiás, Brasil. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v. 46, n. 2, p. 141, 16 jun. 2013.

VENSON, R. ET. A. Avaliação econômica das anticitocinas adalimumabe, etanercepte e infliximabe no tratamento da artrite reumatoide no Estado do Paraná |. *Physis -Revista de Saúde Coletiva*, v. 21, n. 2, p. 359–375, 2011.

VIATTE et al. Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response. *JAMA*, v. 313, n. 16, p. 1645–56, 28 abr. 2015.

VIATTE, S.; PLANT, D.; RAYCHAUDHURI, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, v. 9, n. 3, p. 141–53, mar. 2013.

WATZKO, W. L. Estudo do polimorfismo genético de C4A, C4B, BF e C3 do sistema complemento em artrite reumatoide. 14 ago. 1993.

YARWOOD, A.; HUIZINGA, T. W. J.; WORTHINGTON, J. The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 55, n. 2, p. 199–209, fev. 2016.

ZAMANPOOR, M. The genetic pathogenesis, diagnosis and therapeutic insight of rheumatoid arthritis. *Clinical Genetics*, v. 95, n. 5, p. 547–557, 28 maio 2018.

ZHANG, R. et al. RADB: a database of rheumatoid arthritis-related polymorphisms. *Database : the journal of biological databases and curation*, v. 2014, 15 set. 2014.

ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature medicine*, v. 21, n. 8, 2015a.

ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine*, v. 21, n. 8, p. 895–905, 27 ago. 2015b.