

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTHINE PIECZARKA

POLIMORFISMOS NOS GENES DAS FICOLINAS 1 E 3 EM PACIENTES  
COM ARTRITE REUMATÓIDE

CURITIBA

2018

CRISTHINE PIECZARKA

POLIMORFISMOS NOS GENES DAS FICOLINAS 1 E 3 EM PACIENTES  
COM ARTRITE REUMATÓIDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Iara J. Messias Reason  
Co-orientadora: Dra. Fabiana Antunes de Andrade

CURITIBA

2018

Pieczarka, Cristhine

Polimorfismos nos genes da ficolinas 1 e 3 em pacientes com artrite reumatóide / Cristhine Pieczarka - Curitiba, 2018.

82 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Iara J. Messias Reason

Coorientadora: Dra. Fabiana Antunes de Andrade

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui referência

1. Artrite reumatóide. 2. Doença autoimune. 3. Ficolina-1. 4. Ficolina-3. 5. Polimorfismo genético.  
I. Reason, Iara J. Messias. II. Andrade, Fabiana Antunes de. III. Universidade Federal do Paraná.  
IV. Título.

CDD 616.7227



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CRISTHINE PIECZARKA** intitulada: **Polimorfismos nos Genes das Ficolinas 1 e 3 em Pacientes com Artrite Reumatóide**, 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, 23 de Fevereiro de 2018.

IARA JOSE DE MESSIAS REASON  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LORENA BAVIA  
Avaliador Externo (UFPR)

THELMA LAROCCA SKARE  
Avaliador Externo (FEPAR)

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Iara, exemplo de pessoa e profissional. Agradeço por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa e ter me proporcionado momentos tão agradáveis de aprendizado junto ao Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC/UFPR. Ensinaamentos profissionais e de vida que levarei sempre comigo.

À minha co-orientadora, professora Fabiana, sempre presente, atenciosa e paciente. Obrigada por todo apoio durante esses dois anos, sua contribuição foi extremamente valiosa para o meu trabalho.

À equipe do Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC/UFPR, em especial à Sandra que esteve sempre presente e me deu todo o suporte necessário para a execução da parte prática do trabalho. Obrigada por todo apoio e ensinamentos.

À Léia, companheira de mestrado que me auxiliou na elaboração do projeto deste trabalho. Obrigada pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, em especial ao Jean, sempre disposto a sanar as dúvidas referentes ao programa.

Às amigas Vanessa e Karita, pelos cafés, ideias e conhecimentos compartilhados.

À equipe do Laboratório Municipal de São José dos Pinhais, que contou com a minha ausência em vários momentos ao longo desses dois anos devido a minha licença parcial para estudo. Em especial à Rosângela que me auxiliou no processo de conseguir a licença e sempre me deu todo o suporte enquanto estive ausente. Obrigada também às amigas Ana Paula e Michele Lissa pela amizade, apoio e compreensão durante esses dois anos.

À amiga Patrícia, por acreditar na minha capacidade, no meu potencial. Obrigada por me guiar pelo setor da Imunologia e sempre me estimular a continuar estudando.

À minha prima, Fernanda, por seu apoio ao longo desses dois anos. Obrigada pelo incentivo e admiração com a qual sempre tratou meu trabalho.

Aos meus irmãos e cunhadas. Obrigada por todo apoio e incentivo.

Ao meu marido, Guilherme, que acreditou no meu potencial e na minha capacidade e sempre me incentivou a seguir em frente. Obrigada meu amor por todo apoio e também por entender a minha ausência em alguns momentos de extrema importância para você.

“Pouca ciência nos afasta de Deus. Muita, nos aproxima.”  
(Louis Pasteur)

## RESUMO

**Introdução:** A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, que compromete a membrana sinovial das articulações periféricas resultando em um processo inflamatório crônico. As ficolinas atuam na ativação do complemento como Moléculas de Reconhecimento de Padrões (PRM) associados a patógenos e autoantígenos alterados. A Ficolina-1 é codificada pelo gene *FCN1* e sintetizada por monócitos e granulócitos. A ficolina-3 é codificada pelo gene *FCN3* e expressa principalmente no fígado e pulmão. Níveis elevados de ficolina-1 foram observados nas articulações de pacientes com AR, no entanto os resultados de associação com polimorfismos de *FCN1* e AR são controversos. Também foram encontrados níveis elevados de ficolina-3 em plasma de pacientes com AR recente quando comparados a controles saudáveis. **Objetivo:** Investigar polimorfismos nos genes das ficolinas 1 e 3 em pacientes com AR e em controles, e verificar a possível associação destes com a susceptibilidade à AR e suas formas clínicas. **Métodos:** Foram genotipados um total de 148 pacientes com AR e 160 controles através da amplificação alélica por PCR sequência-específica (PCR-SSP) para os polimorfismos rs2989727 (-1981G>A), rs10120023 (-542G>A), rs17039495 (-399G>A) e rs10117466 (-144C>A), presentes na região promotora do gene *FCN1* e rs10858293 (+33T>G) presente no exon 1 do gene *FCN1*. Já para o gene *FCN3* foram genotipados os seguintes polimorfismos: rs532781899 (+1637delC) do exon 5, rs28362807 (+3524\_+3532delTATTTGGCC) do intron 5 e rs4494157 (+4479C>A) do intron 7. **Resultados:** Verificamos que para o gene *FCN1*, a frequência dos genótipos GG e alelo G do SNP -542 e do genótipo CC do SNP -144 foi maior em pacientes do que em controles ( $p=0,025$ ;  $p=0,041$  e  $p=0,055$ , respectivamente). O diplótipo -542G;-144C também foi observado mais frequentemente em pacientes que em controles ( $p=0,050$ ). Além disso, o haplótipo *FCN1* AAGAG foi associado à ausência de fator reumatoide (FR) ( $p=0,0065$ ). Por outro lado, não encontramos associação entre os genótipos e alelos dos polimorfismos avaliados do gene *FCN3* com a susceptibilidade à AR ou características clínicas da doença. **Conclusão:** Nosso estudo traz achados inéditos com relação à associação dos polimorfismos do gene *FCN1* -542G>A e -144C>A à susceptibilidade a AR. Além disso, a relação entre o haplótipo *FCN1* AAGAG com a ausência de FR também foi demonstrada pela primeira vez. A avaliação de polimorfismos de *FCN3* na AR também é inédita. A ausência de associação dos polimorfismos da ficolina-3 com AR sugere que as ficolinas 1 e 3 desempenham diferentes papéis na doença.

**Palavras-chave:** Artrite reumatoide. Ficolina-1. Ficolina-3. Sistema Complemento. Polimorfismo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease, which compromises the synovial membrane of the peripheral joints resulting in a chronic inflammatory process. Ficolins act on complement activation as Pattern Recognition Molecules (PRMs) associated with pathogens and altered autoantigens. Ficolin-1 is encoded by the *FCN1* gene and synthesized by monocytes and granulocytes. Ficolin-3 is encoded by the *FCN3* gene and expressed primarily in the liver and lung. High levels of ficolin-1 have been observed in the joints of patients with RA, however the results of association with polymorphisms of *FCN1* and RA are controversial. Elevated plasma levels of ficolin-3 were also found in patients with recent RA when compared to healthy controls. **Objective:** To investigate the polymorphisms in the genes of the ficolins 1 and 3 in patients with RA and controls and to verify possible association with susceptibility to RA and its clinical forms. **Methods:** A total of 148 patients with RA and 160 controls were genotyped by sequence-specific PCR (PCR-SSP) for the polymorphisms rs2989727 (-1981G>A), rs10120023 (-542G>A), rs17039495 (-399G>A), rs10117466 (-144C>A) present in the promoter region of the *FCN1* gene and rs10858293 (+33T>G) present in exon 1 of the *FCN1* gene. For the *FCN3* gene, the following polymorphisms were genotyped: rs532781899 (+1637delC) of exon 5, rs28362807 (+3524\_+3532delTATTTGGCC) of intron 5 and rs4494157 (+4479C>A) of intron 7. **Results:** We found that, for the *FCN1* gene, the frequency of the GG and G allele genotypes of the SNP -542 and the CC genotype of the SNP -144 were higher in patients than in controls ( $p = 0.025$ ,  $p = 0.041$  and  $p = 0.055$ , respectively). The diplotype -542G;-144C was also observed more frequently in patients than in controls ( $p = 0.050$ ). In addition, the haplotype *FCN1* AAGAG was associated with absence of rheumatoid factor ( $p = 0.0065$ ). On the other hand, we did not find an association between the genotypes and alleles of the evaluated polymorphisms of the *FCN3* gene with the susceptibility to RA or clinical characteristics of the disease. **Conclusion:** Our study has unpublished findings regarding the association of the polymorphisms of the gene *FCN1* -542G>A and -144C>A and the susceptibility to RA. In addition, the relationship between the haplotype *FCN1* AAGAG with absence of rheumatoid factor was also demonstrated for the first time. The evaluation of *FCN3* polymorphisms in RA is also unprecedented. The absence of association of ficolin-3 polymorphisms with RA suggests that ficolins 1 and 3 play different roles in the disease.

**Key words:** Rheumatoid arthritis. Ficolin-1. Ficolin-3. Complement System. Polymorphism.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	HIPÓTESE DA INTERAÇÃO ENTRE HLA E O TABAGISMO ....	21
FIGURA 2.	FISIOPATOGENIA DA AR.....	23
FIGURA 3.	ARTICULAÇÃO NORMAL X ARTICULAÇÃO NA AR .....	24
FIGURA 4.	DEFORMAÇÃO ARTICULAR EM PESCOÇO DE CISNE OBSERVADA NA AR.....	26
FIGURA 5.	VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO .....	32
FIGURA 6.	ESTRUTURA MOLECULAR DAS FICOLINAS .....	35
FIGURA 7.	ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS MEDIADA PELAS FICOLINAS .....	36
FIGURA 8.	ESTRUTURA DO GENE <i>FCN1</i> .....	37
FIGURA 9.	UM MODELO DE INTERAÇÃO pH-DEPENDENTE DO COMPLEXO FICOLINA-MASP <sub>s</sub> COM A PROTEÍNA C REATIVA E GPCR43.....	39
FIGURA 10.	ESTRUTURA DO GENE <i>FCN3</i> .....	41
FIGURA 11.	SNPs AVALIADOS NO GENE <i>FCN1</i> .....	45
FIGURA 12.	PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2989727 (-1981G>A) DO GENE <i>FCN1</i> .....	48
FIGURA 13.	PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs10120023 (-542G>A) E rs10117466 (-144C>A) DO GENE <i>FCN1</i> .....	48
FIGURA 14.	PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs17039495 (-399G>A) E rs10858293 (+33T>G) DO GENE <i>FCN1</i> .....	48
FIGURA 15.	ESTRUTURA GÊNICA E POLIMORFISMOS DO GENE <i>FCN3</i> , RELACIONADOS AOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA .....	49
FIGURA 16.	PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO rs532781899 DO EXON 5, DO GENE <i>FCN3</i> .....	52
FIGURA 17.	PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs28362807 DO INTRON 5 E rs4494157 DO INTRON 7, DO GENE <i>FCN3</i> .....	52
FIGURA 18.	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs DE <i>FCN1</i> AVALIADOS.....	56

FIGURA 19. CONCENTRAÇÃO DE FICOLINA-1 EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS -542 E -144 NO GRUPO CONTROLE .....	61
FIGURA 20. ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA .....	62
FIGURA 21. EXPRESSÃO DE mRNA DO GENE <i>FCN1</i> EM DIFERENTES TECIDOS EM RELAÇÃO AOS SNPs -542 E -144.....	63
FIGURA 22. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs DE <i>FCN3</i> AVALIADOS EM PACIENTES COM AR E CONTROLES.....	64

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE AR .....	28
TABELA 2. SEQUÊNCIA DE INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DE <i>FCN1</i> .....	47
TABELA 3. SEQUÊNCIA DE INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DE <i>FCN3</i> .....	50
TABELA 4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES COM AR E CONTROLES AVALIADOS .....	55
TABELA 5. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>FCN1</i> EM PACIENTES E CONTROLES .....	57
TABELA 6. FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DE <i>FCN1</i> EM PACIENTES COM AR E CONTROLES .....	59
TABELA 7. EFEITO ADITIVO DOS GENÓTIPOS DOS SNPS -542G>A E -144C>A EM PACIENTES COM AR E CONTROLES .....	60
TABELA 8. FREQUÊNCIA DOS DIPLÓTIPOS DOS SNPs -542G>A E -144C>A .....	60
TABELA 9. FREQUÊNCIA DE PACIENTES DUPLO POSITIVOS PARA OS ANTICORPOS ANTI-CCP E FR PARA OS POLIMORFISMOS DE <i>FCN1</i> .....	61
TABELA 10. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs DE <i>FCN3</i> EM PACIENTES COM AR E CONTROLES .....	65
TABELA 11. FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS SNPs DE <i>FCN3</i> EM PACIENTES COM AR E CONTROLES .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPA	Anticorpo Anti-peptídeo Citrulinado
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
Anti-CCP	Anticorpo Anti-peptídeo Citrulinado Cíclico
AR	Artrite Reumatoide
CL-K1	Colectinas
CRT	Calreticulina
DAI	Doenças Autoimunes
DAS28	Índice de Atividade da Doença
DL	Desequilíbrio de Ligação
DMCD	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
ELISA	Imunoensaio enzimático
EULAR	Liga Europeia contra o Reumatismo
FI	Fator de Serina Protease
FR	Fator Reumatoide
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
GPCR43	Receptor 43 Acoplado a Proteína G
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
IFN	Interferon
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IL-17A	Interleucina 17A
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
MASP	Serina Protease Associada à MBL
MBL	Lectina Ligante de Manose
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
nIgG	Anticorpo IgG Natural
PAD	Peptidilarginina Desiminase
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógeno
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-SSP	Amplificação Alélica por PCR sequência específica
PRM	Moléculas de Reconhecimento de Padrões
RAC	Regulador da Ativação do Complemento
RADB	Base de Dados de Polimorfismos Relacionados à AR
RRP	Receptor de Reconhecimento de Padrão
r2	Valores de Coeficientes de Correlação
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
3.1 ASPECTOS GERAIS .....	18
3.2 FATORES PATOGÊNICOS ASSOCIADOS À AR.....	19
3.3 FISIOPATOGENIA DA AR .....	21
3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA AR .....	26
3.5 DIAGNÓSTICO DA AR .....	27
3.6 TRATAMENTO DA AR.....	29
3.7 SISTEMA COMPLEMENTO.....	30
3.8 FICOLINAS .....	34
3.8.1 Ficolina-1 .....	37
3.8.1.1 Polimorfismos no gene <i>FCN1</i> .....	39
3.8.2 Ficolina-3.....	41
3.8.2.1 Polimorfismos no gene <i>FCN3</i> .....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
4.1 COMITÊ DE ÉTICA.....	43
4.2 PACIENTES E CONTROLES .....	43
4.3 GENOTIPAGEM.....	44
4.3.1 Genotipagem dos polimorfismos no gene <i>FCN1</i> .....	45
4.3.2 Genotipagem dos polimorfismos no gene <i>FCN3</i> .....	49
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FICOLINA-1 .....	52
4.5 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....	52
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>54</b>
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES COM AR E CONTROLES.....	54
5.2 POLIMORFISMOS DO GENE <i>FCN1</i> .....	56
5.2.1 Associação de polimorfismos do gene <i>FCN1</i> com a AR.....	57
5.2.2 Concentração de ficolina-1 em controles .....	61

5.2.3 Análise <i>in silico</i> .....	62
5.3 POLIMORFISMOS DO GENE <i>FCN3</i> .....	64
5.3.1 Associação dos polimorfismos e haplótipos do gene <i>FCN3</i> com AR .....	65
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica que compromete a membrana sinovial das articulações periféricas resultando em processo inflamatório crônico. É caracterizada pelo acometimento simétrico das pequenas e das grandes articulações, com prevalência nos pés e mãos, apresentando efeitos deletérios sobre a capacidade funcional e mobilidade física (MOTA et al., 2012). Pacientes com AR tem expectativa de vida diminuída quando comparados com a população em geral (TURESSON; MATTESON, 2009) e aproximadamente 50% deles ficam impossibilitados de trabalhar após 10 anos do início da doença (GOELDNER et al., 2011). Portanto, a doença leva a prejuízos socioeconômicos, e pode estar relacionada a quadros depressivos, resultantes da limitação funcional (CAMPOS et al., 2013).

Atualmente, o diagnóstico da AR é feito principalmente através dos achados clínicos e exames complementares. Não existe ainda um marcador específico que confirme o diagnóstico, porém os dois marcadores sorológicos utilizados - fator reumatoide e anticorpos anti-CCP - auxiliam o diagnóstico (MOTA et al., 2011).

Mesmo com vários estudos publicados sobre o tema, acredita-se que fatores genéticos desconhecidos estejam envolvidos na etiologia da doença. Estudos mostram que há uma influência genética relevante, inclusive em regiões onde há elevada taxa de miscigenação, como é o caso do Brasil (SILVA, 2013).

O sistema complemento consiste num complexo sistema de proteínas plasmáticas e de membrana, sendo um dos principais mecanismos efetores da imunidade inata. Três principais associações do complemento com doenças incluem: associação com a susceptibilidade à infecções, consequências de anormalidades na regulação do complemento e deficiência associada às doenças inflamatórias (UTIYAMA et al., 2004). O complemento desempenha um papel significativo no desenvolvimento e apresentação clínica da AR (BELTRAME et al., 2014; GOELDNER et al., 2014). Enquanto o aumento da ativação do complemento parece estar associado à ocorrência e/ou gravidade do processo inflamatório na AR, deficiências de componentes como C1q e C2

parecem induzir a doença (CHEN et al., 2010). Além disso, verificou-se que os níveis de proteínas do complemento geralmente estão diminuídos no líquido sinovial de pacientes com AR, refletindo o consumo de complemento. Por outro lado, níveis elevados de vários produtos de clivagem do complemento foram observados no fluido sinovial (BALLANTI et al., 2011).

A via das lectinas é uma das três vias de ativação do complemento, desencadeada pela ligação de polissacarídeos microbianos a lectinas circulantes, tais como a lectina ligante de manose (MBL), as colectinas (CL-K1) e as ficolinas (GARRED et al., 2009). As ficolinas atuam na ativação do complemento como Moléculas de Reconhecimento de Padrões (PRM) associados a patógenos e auto antígenos alterados. Cada ficolina é capaz de se ligar a um espectro diferente de microrganismos, incluindo alguns vírus e parasitas (ENDO et al., 2015). Já foi demonstrado que as ficolinas estão envolvidas com o processo de remoção de células apoptóticas e necróticas (KURAYA et al., 2005). Ainda, estudos recentes demonstraram que as ficolinas podem interagir com pentraxina 3 e proteína C reativa (ENDO et al., 2015).

São escassos e controversos os estudos relacionando polimorfismos da ficolina 1 com a AR. Um estudo mostra relação de susceptibilidade a AR em pacientes da Bélgica que possuem o polimorfismo rs2989727 (CRUYSSSEN et al., 2007), enquanto outro recente não encontrou associação entre tal polimorfismo e a AR em pacientes do Brasil (ADDOBBATI et al., 2016). Além disso, não existem trabalhos até o momento que investiguem polimorfismos do gene *FCN3* associados à AR.

Considerando-se que a AR é uma doença progressiva e incapacitante, é imprescindível a busca por novos conhecimentos. Pesquisas científicas envolvendo a geração de novas informações, como proposto neste estudo, podem contribuir para a inovação e o melhoramento dos recursos disponíveis para o manejo clínico e terapêutico mais precoce e adequado para os pacientes com AR.

## **2 OBJETIVOS**

Investigar os polimorfismos nos genes das *FCN1* e *FCN3* em pacientes com artrite reumatoide e controles.

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os polimorfismos rs2989727 (-1981G>A), rs10120023 (-542G>A), rs17039495 (-399G>A) e rs10117466 (-144C>A), presentes na região promotora, e rs10858293 (+33T>G) presente no exon 1 do gene *FCN1* em pacientes com AR e controles.
- Investigar os polimorfismos rs532781899 (+1637delC) do exon 5, rs28362807 (+3524\_+3532delTATTTGGCC) do intron 5 e rs4494157 (+4479C>A) do intron 7 do gene *FCN3* em pacientes com AR e controles.
- Avaliar possíveis associações entre os polimorfismos dos genes *FCN1* e *FCN3* e a susceptibilidade à AR, apresentação clínica e positividade dos marcadores sorológicos.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 ASPECTOS GERAIS

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, que compromete a membrana sinovial das articulações periféricas resultando em um processo inflamatório crônico. Sua prevalência estimada está entre 0,5% e 1% da população mundial, sendo as mulheres três vezes mais susceptíveis que os homens. A maior incidência ocorre na faixa etária de 30 a 50 anos (MOTA et al., 2012). Estudos epidemiológicos apontam que a AR possui alta incidência nos Estados Unidos (38 casos/10<sup>5</sup> habitantes) e no norte da Europa (29 casos/10<sup>5</sup> habitantes) (GOELDNER et al., 2011). No Brasil, a prevalência de AR segundo um estudo realizado em Montes Claros é de 0,46% (SENNA et al., 2004).

A AR é uma doença altamente incapacitante, proporcionando expectativa de vida significativamente diminuída quando comparada com a população em geral. Além disso, aproximadamente 50% dos pacientes perdem a capacidade laboral após 10 anos do diagnóstico da doença (GOELDNER et al., 2011), levando a prejuízos socioeconômicos e a quadros depressivos, resultantes da limitação funcional (CAMPOS et al., 2013).

### 3.2 FATORES PATOGÊNICOS ASSOCIADOS À AR

O desenvolvimento da AR é influenciado por fatores ambientais, hormonais e imunológicos em indivíduos com predisposição genética. Estudos têm mostrado que esses fatores precisam ocorrer concomitantemente para que haja o aparecimento da doença. Estima-se em 60% a contribuição genética para o desenvolvimento da AR (GOELDNER et al., 2011). Segundo Zhang et al., 2014, que criaram o RADB (base de dados de polimorfismos relacionados com a AR), cerca de 3235 polimorfismos associados a 636 genes já foram relacionados com a AR.

Muitos estudos têm demonstrado que genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) estão associados à predisposição para AR. A associação com maior prevalência foi para alelos específicos do gene *HLA-DRB1* que compartilham sequências de aminoácidos glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina (QRRAA, RRRAA ou QKRAA) codificadas por uma sequência conservada de aminoácidos nas posições 71-75 da terceira região de hipervariabilidade da cadeia beta da molécula *HLA-DRB1*, conhecida como epítipo comum (GOELDNER et al., 2011). Acredita-se que essas regiões contribuam aproximadamente com 30% do risco genético. Esses alelos específicos de *HLA-DRB1* têm sido associados a formas mais graves da doença como presença de nódulos reumatóides, maior desgaste das articulações e síndrome de Felty (REGO-PÉREZ et al., 2009).

Embora os genes *HLA* tenham grande importância na AR, a susceptibilidade genética à doença não se restringe a eles. Atualmente diversos polimorfismos foram descritos e associados à AR em diferentes genes, como *TNF- $\alpha$* , *TNFRSF1B*, *IL-1*, *IL-6* e *IL-10*, porém as conclusões ainda são controversas (REGO-PÉREZ et al., 2009).

Em pessoas com até 50 anos de idade, a AR é cerca de três vezes mais frequente em mulheres do que em homens. Após essa idade, tal proporção é reduzida para cerca de 2:1 entre os 55 e os 64 anos. Essa característica inverte-se para um excesso masculino em pessoas com mais de 75 anos de idade (ORTONA et al., 2016).

O fato da AR afetar mais mulheres do que homens até os 50 anos de idade pode estar relacionado com fatores hormonais. Estudos sugerem que estradiol e progesterona aumentam o risco da doença. No entanto, a AR

apresenta-se mais frequentemente após a menopausa e os estudos não conseguiram estabelecer nenhuma relação entre anticoncepcionais orais ou terapia de reposição hormonal e o risco de desenvolver AR. Já a gravidez parece diminuir o risco de desenvolver a AR. Foi relatado também que os estrógenos estão significativamente elevados em relação aos andrógenos no fluxo sinovial de pacientes com AR (ORTONA et al., 2016).

Em relação aos hormônios sexuais masculinos, os dados disponíveis sugerem que o início e a gravidade da AR são inversamente associados aos níveis de androgênio, proporcionando uma possível explicação para o aumento da taxa de incidência de AR em homens após 55 anos de idade. Contudo, há evidências de que alguns pacientes com AR de ambos os sexos apresentam redução de androgênios séricos vários anos antes do início da doença. A terapia de reposição de andrógenos tem efeitos positivos em pacientes do sexo masculino com AR, particularmente como tratamento adjuvante, e um ligeiro efeito modificador de doença em mulheres pós-menopáusicas com AR (ORTONA et al., 2016).

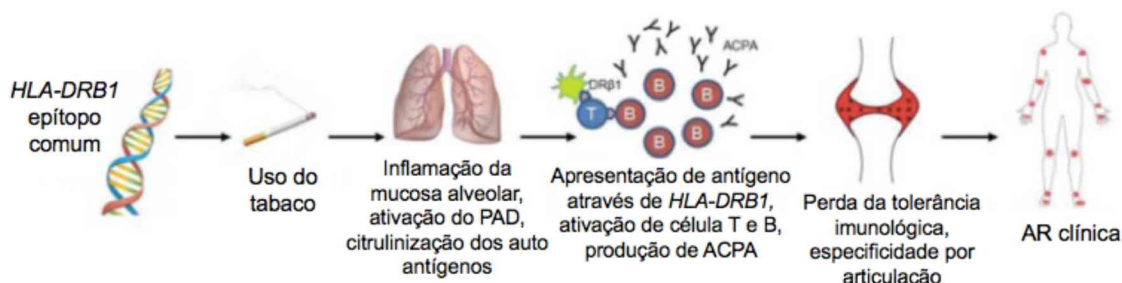
Mimetismo molecular tem sido sugerido como desencadeador de doenças autoimunes, incluindo a AR. Entre os microrganismos mais estudados na AR estão o *Proteus mirabilis* e o vírus *Epstein-Barr* (GOELDNER et al., 2011). A infecção pré-clínica de *Porphyromonas gingivalis* ou sua resposta imune podem ser importantes no desenvolvimento de imunidade alterada na AR. Há relatos na literatura de que essa bactéria causadora da periodontite expressa a enzima peptidilarginina desaminase, que pode citrulinar tanto a enolase como o fibrinogênio, auto antígenos que estão envolvidos na especificidade articular da AR (SPARKS; COSTENBADER, 2014).

A exposição ao tabaco é um dos fatores ambientais mais importantes, sendo o risco de desenvolver AR duas vezes maior em fumantes do que em não fumantes (CHANG et al., 2014). Estudos mostram que pessoas com intenso uso do tabaco e que apresentam um ou mais alelos de epítipo comum dos genes *HLA-DRB1* aumenta em 23 vezes a probabilidade de ter AR quando comparados com aqueles que não apresentam esses fatores de risco. Estudos em ratos transgênicos demonstraram forte resposta imune entre *HLA-DRβ1* e auto antígenos citrulinados implicados no tabagismo, oferecendo mais evidências de plausibilidade biológica para esta hipótese. A interação HLA-

tabagismo pode contribuir para processos de citrulinização e auto imunidade e pode explicar a soro conversão observada na AR pré-clínica (FIGURA 1) (SPARKS; COSTENBADER, 2014). No entanto, após 20 anos da exclusão do uso do tabaco o risco de desenvolver AR volta ao risco da população em geral (SPARKS; COSTENBADER, 2014).

Outros fatores ambientais de risco relacionados à AR descritos incluem: exposição ocupacional à sílica e excesso de massa corporal (SPARKS; COSTENBADER, 2014). Enquanto que fator dietético como a ingestão de peixe pode ter efeito protetor para a AR (GIUSEPPE, DI et al., 2014).

FIGURA 1. HIPÓTESE DA INTERAÇÃO ENTRE HLA E O TABAGISMO



Esquema da interação *HLA-DRB1*-tabaco no desenvolvimento de AR soro positiva. Indivíduos com um ou mais alelos de epítipo comum *HLA-DRB1* fazem o uso do tabaco, o que induz inflamação nas vias aéreas e na mucosa alveolar. A peptidilarginina desiminase (PAD) é ativada, e faz a citrulinização dos auto antígenos. As células apresentadoras de antígeno estimulam as células T através de interações *HLA-DRB1* aberrantes e estimulam as células B a produzirem anticorpos anti-peptídeos citrulinados (ACPA). A tolerância imune é perdida especificamente nas articulações. Assim ocorre o aparecimento de sinovite com sinais e sintomas compatíveis com a AR (adaptado de SPARKS; COSTENBADER, 2014).

### 3.3 FISIOPATOGENIA DA AR

A autoimunidade relacionada à AR, detectada pela presença dos autoanticorpos, pode se desenvolver cerca de 3 a 5 anos antes dos primeiros sintomas nas articulações. Alguns autores relatam que os autoanticorpos podem preceder em até 15 anos o início da doença (DEANE et al., 2010). Inicialmente a inflamação é mínima. Ao longo do tempo a autoimunidade progride com espalhamento de epítomos, aumento na patogenicidade e avides dos autoanticorpos (DEANE, 2014). A AR se desenvolve em um período pré-clínico onde os anticorpos associados à AR podem ser detectados, e um período clínico de sinais e sintomas da artrite inflamatória. Vários fatores contribuem para a patogenia da AR, incluindo fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos. A sobreposição de fatores de risco em indivíduos

geneticamente suscetíveis determina o desenvolvimento da doença (GOELDNER et al., 2011).

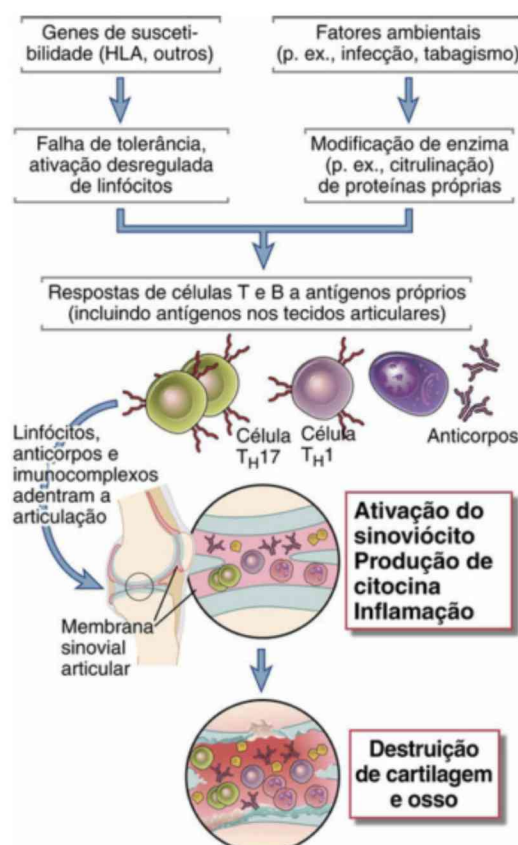
Dessa forma, na fase pré-clínica é possível detectar anticorpos associados à AR. A produção de anticorpos é elemento importante na patogênese da AR, levando à formação de complexos antígeno-anticorpo e à ativação do sistema complemento (MOTA et al., 2011). Os principais autoanticorpos encontrados na AR são o fator reumatoide (FR) e os anticorpos anti-peptídeos citrulinados (ACPA). No entanto, ainda não está claro qual desses autoanticorpos aparece por primeiro. Alguns estudos sugerem que os ACPAs precedem o FR e outros sugerem que o FR precede os ACPAs. Independente disso, a presença de ACPAs e FR parece ser a combinação de biomarcadores mais específica e precursora do início iminente de artrite clinicamente aparente (DEANE, 2014).

O FR é um anticorpo clássico relacionado à AR, presente em 70% dos pacientes e relacionado com a forma mais grave da doença, porém não é considerado específico. Dirigido contra o fragmento Fc da imunoglobulina IgG, o FR se liga à IgG para formar complexos imunes, desencadeando a cascata de ativação do complemento e mecanismos de fagocitose, tendo papel importante tanto na ocorrência da inflamação articular quanto nos processos extra articulares. No entanto, seu uso é limitado, pois cerca de 30 a 50% dos pacientes com AR são soronegativos para FR (MOTA et al., 2011). Além disso, esse marcador apresenta especificidade limitada, já que resultados falso positivos de FR ocorrem em casos de infecções crônicas, malignidade e outras doenças reumáticas. Ainda, o FR pode ser detectado em 1 a 4% dos soros de jovens saudáveis e em maior porcentagem de pessoas idosas sem AR (AGGARWAL et al., 2009).

Já o ACPA é produzido contra proteínas e peptídeos citrulinados que são gerados através do processo de citrulinção, que é uma modificação pós traducional de arginina para citrulina pela enzima peptidilarginina desiminase (PAD). Este processo ocorre naturalmente durante a inflamação, apoptose e queratinização. No líquido sinovial de pacientes com AR existem várias proteínas citrulinadas como fibrinogênio e fibronectina, além de outros epítomos citrulinados que foram identificados como alvos dos autoanticorpos altamente específicos. Para auxiliar no diagnóstico da AR e melhorar a composição do

antígeno e o reconhecimento de anticorpos foi desenvolvida uma variação do ACPA, anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (Anti-CCP), tornando possível detectar autoanticorpos em pacientes com AR através de testes de imunoenensaio enzimático (ELISA) comerciais (AGGARWAL et al., 2009).

FIGURA 2. FISIOPATOGENIA DA AR



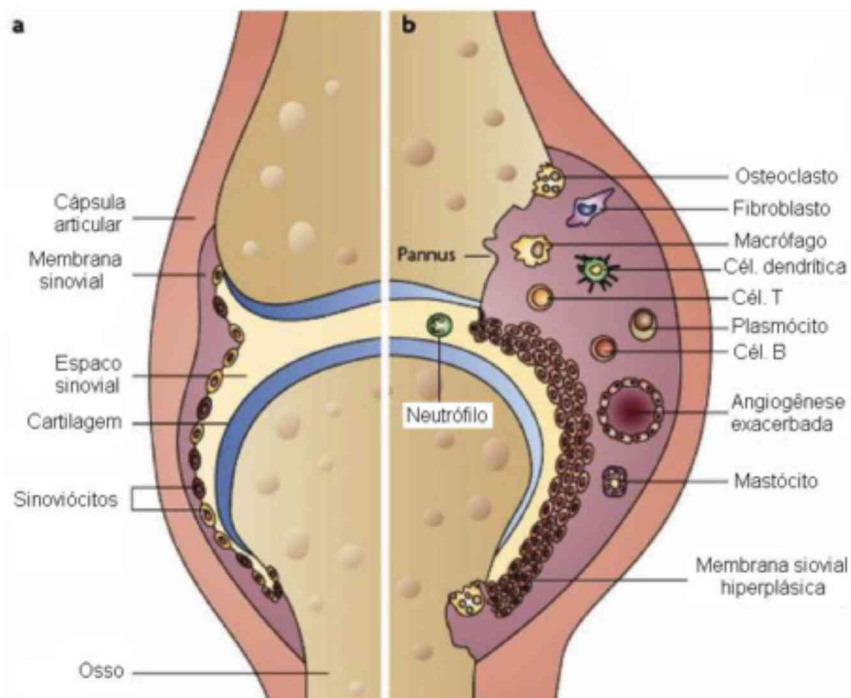
As proteínas citrulinadas induzidas por estímulos ambientais produzem respostas de células T e de anticorpos em indivíduos geneticamente suscetíveis. As células T e os anticorpos adentram às articulações, respondem a proteínas próprias e causam lesão tecidual principalmente por secreção de citocinas e por mecanismos efetores dependentes de anticorpos e complemento. Outras modificações de proteínas além da citrulinação podem levar ao mesmo resultado (ABBAS et al., 2015).

Os papéis dos peptídeos citrulinados e autoanticorpos na patogênese da AR ainda não estão claros. O ACPA está fortemente associado a um risco aumentado de desenvolver AR em indivíduos saudáveis. Além disso, está presente no sangue de pessoas saudáveis antes da manifestação da AR clínica. Entre os pacientes com AR, sua presença está associada a danos estruturais mais graves, progressão radiográfica e menor resposta à terapia, estando relacionado a um fenótipo homogêneo de AR grave. Ainda, o ACPA está fortemente associado ao tabagismo e com o epítipo compartilhado *HLA-*

*DRB1* e *PTPN22*, sendo considerado um forte fator de risco para a AR (FIGURA 2) (AGGARWAL et al., 2009).

A AR caracteriza-se por inflamação sinovial (sinovite), infiltração celular e um processo desorganizado de destruição e remodelação óssea, resultante da ação de células B e T autorreativas (GOELDNER et al., 2011). A sinovite é caracterizada por proliferação celular da membrana sinovial, e erosão da cartilagem articular e do osso subcondral. Embora esse processo ainda não esteja totalmente elucidado, parece envolver alguma estimulação antigênica específica de linfócitos T suscetíveis levando à formação de células B autorreativas, estimulando a produção de mediadores da inflamação, proliferação de vasos sanguíneos e acúmulo de células inflamatórias na membrana sinovial (SCOTT et al., 2010). Projeções de tecido proliferativo penetram a cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o pannus, característico da AR (FIGURA 3) (GOELDNER et al., 2011).

FIGURA 3. ARTICULAÇÃO NORMAL X ARTICULAÇÃO NA AR



A: articulação normal. B: articulação inflamada na AR (SILVA, 2013).

Os linfócitos T CD4 (predominantes na membrana sinovial) produzem citocinas que atraem e ativam macrófagos, os quais por sua vez secretam

citocinas associadas ao desenvolvimento da AR e na manutenção do processo inflamatório tais como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). O TNF- $\alpha$  tem um papel chave na cascata inflamatória já que participa tanto da inflamação quanto da destruição da articulação. Após a estimulação de linfócitos B, FR é produzido formando complexos imunes capazes de ativar o complemento, aumentando assim o processo inflamatório através do acúmulo de células polimorfonucleares. Diante dessa cascata inflamatória, também são ativadas outras citocinas como fatores de crescimento, produzidas pelos macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e sinoviócitos (SCOTT et al., 2010).

Sinoviócitos são células encontradas nas articulações e podem ser de em 2 tipos: fibroblastos e macrófagos. Na AR, os sinoviócitos do tipo macrófago apresentam uma superprodução de citocinas pró-inflamatórias. Já os do tipo fibroblastos apresentam comportamento anormal na AR, invadindo a cartilagem, corroborando com a destruição da articulação. Ainda não está claro se a AR começa como um problema primário no osso e depois se move para a articulação ou o contrário. Tais alterações sinoviais são responsáveis pelas manifestações clínicas clássicas inerentes à AR tais como: edema, dor e rigidez articular (SCOTT et al., 2010).

Estudos recentes evidenciam um importante papel das células Th17 na modulação das respostas autoimunes relacionadas com a AR. As células Th17 e suas moléculas efetoras: a interleucina 17A (IL-17A), IL-17F, interferon (IFN)  $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) estão implicados na patologia da AR. As interações entre células Th17 e outras células imunes ou células estromais que estão presentes no tecido sinovial durante as primeiras fases da doença podem eventualmente levar a inflamação crônica, degradação irreversível da cartilagem e erosões ósseas. Evidências recentes apontam para a plasticidade da célula Th17, sendo esta capaz de adotar fenótipo patogênico sob a influência de fatores ambientais, inflamatórios e genéticos, tendo papel essencial na patologia da AR (HAMBURG; TAS, 2017).

### 3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA AR

As manifestações clínicas da AR podem ter início em qualquer idade, no entanto, são observadas com maior frequência entre a quarta e quinta década de vida. A AR pode se manifestar de maneira branda ou de maneira agressiva com poliartrite associada a manifestações extra articulares, já que a doença é sistêmica. O acometimento articular na AR costuma ser simétrico, sendo afetadas as articulações das mãos, dedos, pés e punhos. Outras articulações também podem ser comprometidas como cotovelos, ombros, joelhos, quadris, tornozelos, temporomandibular e coluna cervical. As articulações afetadas apresentam edema, dor e calor no local. Deformações articulares ocasionadas por inflamação persistente como “pescoço de cisne” são características da AR (FIGURA 4) (GOELDNER et al., 2011).

FIGURA 4. DEFORMAÇÃO ARTICULAR EM PESCOÇO DE CISNE OBSERVADA NA AR



Deformação articular em “pescoço de cisne”, característica em pacientes com AR (GOELDNER et al., 2011).

Entre as manifestações extra articulares estão os nódulos reumatoides e a síndrome de Sjogren, observadas em aproximadamente 50% dos pacientes. Altos índices de mortalidade de pacientes com AR estão associados a complicações cardíacas e infecções. Acredita-se que 80% dos pacientes estejam incapacitados após 20 anos do início da doença (GOELDNER et al., 2011). Por isso, a importância do diagnóstico precoce e tratamento preventivo são essenciais afim de evitar complicações pelo avanço da doença.

### 3.5 DIAGNÓSTICO DA AR

O diagnóstico da AR deve ser pautado na correlação de sintomas e sinais clínicos, exames laboratoriais, de imagem (ultrassom e ressonância magnética) e radiográficos. Nenhum teste isolado confirma o diagnóstico da AR (MOTA et al., 2011). Em 2010, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) revisaram os critérios diagnósticos visando favorecer o diagnóstico precoce da AR. A precocidade do diagnóstico é considerada fator importantíssimo para garantir melhor prognóstico ao paciente (ALETABA et al., 2010).

Dessa forma, o paciente com suspeita de AR deve apresentar ao menos uma evidência clínica de sinovite ativa, bem como ter outra possibilidade diagnóstica descartada como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), por exemplo (ALETABA et al., 2010). 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 (ALETABA et al., 2010).

O diagnóstico precoce por meio de marcadores sorológicos é de fundamental importância para prevenção de agravos da doença. Os anticorpos anti-CCP podem estar presentes vários anos antes do início da doença, podendo ser ferramenta importante para tratamento precoce em indivíduos susceptíveis, de forma a prevenir futuras lesões. Já o FR foi durante muitos anos considerado como principal ferramenta laboratorial no diagnóstico da AR, por sua sensibilidade. Porém, devido sua baixa especificidade, pode ser detectado em pacientes com outras doenças inflamatórias e reumáticas, o que limita seu uso no diagnóstico. Tanto o FR quanto anti-CCP podem ser usados para prever AR mesmo quando detectado em indivíduos saudáveis (MOTA et al., 2011).

O aparecimento precoce dos sintomas (antes dos 16 anos), associados à alta titulação de anticorpos marcadores da doença, elevação de níveis de proteína C reativa e/ou velocidade de hemossedimentação (VHS), presença de nódulos reumatoides, sobreposição com outras doenças autoimunes (DAI)

como, por exemplo, síndrome de Sjogren, indicam a gravidade da doença (MOTA et al., 2011).

TABELA 1. CRITÉRIOS CLASSIFICATÓRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE AR

	<b>Pontos</b>
<b>A- Envolvimento articular</b> – 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);	1
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;	2
4-10 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes). São articulações pequenas: metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, 2ª a 5ª metatarsofalangeanas e, interfalangeanas do hálux e punhos;	3
> 10 articulações (com pelo menos 1 articulação pequena incluída).	5
<b>B- Sorologia</b> (o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação)	
FR <b>E</b> anti-CCP negativo;	0
FR <b>OU</b> anti-CCP positivo fraco;	2
FR <b>OU</b> anti-CCP fortemente positivo.	3
<b>C- Reagentes de fase aguda</b> (o resultado de pelo menos um teste é necessário para a classificação)	
Proteína C reativa <b>E</b> VHS normal;	0
Proteína C reativa <b>OU</b> VHS alterado.	1
<b>D- Duração dos sintomas</b> (autorreferidos pelo paciente)	
< 6 semanas;	0
≥ 6 semanas.	1

LEGENDA: FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; VHS: velocidade de hemossedimentação (ALETAHA et al., 2010).

Uma vez estabelecido o diagnóstico de AR, seus fatores prognósticos e a possível ocorrência de comorbidades, é importante caracterizar parâmetros úteis para monitorar adequadamente a atividade da doença. A avaliação do grau de comprometimento do paciente em relação as suas atividades cotidianas é feito utilizando classes funcionais descritas a seguir (STEINBROCKER et al., 1949):

- Classe I: o paciente é completamente capaz de executar atividades profissionais, de cuidado pessoal e de lazer;
- Classe II: o paciente é capaz de executar atividades profissionais e de cuidado pessoal, porém tem limitações na execução de atividades de lazer;
- Classe III: o paciente é capaz de executar atividades de cuidado pessoal, porém possui limitações em relação às atividades profissionais e de lazer;
- Classe IV: o paciente apresenta limitações para a execução de atividades profissionais, de cuidado pessoal e de lazer.

Outro índice muito utilizado é o DAS28 (índice de atividade de doença), que mede a atividade inflamatória da doença. O cálculo desse índice leva em consideração a avaliação de 28 articulações e se baseia no número de articulações dolorosas. Ao final a atividade da doença é caracterizada em remissão, baixa, moderada e alta. Essa classificação é útil para acompanhamento do paciente e avaliação da terapia medicamentosa adotada (MOTA et al., 2011).

### 3.6 TRATAMENTO DA AR

O tratamento da AR tem como objetivo principal a remissão da doença. Para isso, inclui educação do paciente e de sua família, terapia medicamentosa, fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas. Os principais grupos de medicamentos utilizados no tratamento da AR são: drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), corticoides, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) (sintéticas e biológicas) e drogas imunossupressoras (MOTA et al., 2012).

Drogas anti-inflamatórias não esteroidais são utilizadas para controle da dor e edemas articulares. Os glicocorticoides, além de proporcionar alívio dos sintomas, podem reduzir dano articular ou intra-articular. As DMCD reduzem o avanço da doença controlando o processo inflamatório. Elas podem ser sintéticas como o metotrexato ou imunobiológicas como o anti-TNF. Os agentes imunobiológicos atuam sobre proteínas ou células do sistema imune que participam do processo inflamatório, bloqueando a destruição cartilaginosa e óssea (MOTA et al., 2015).

O medicamento de primeira escolha para o tratamento da AR é o metotrexato, agente imunomodulador cuja ação consiste na inibição da síntese de DNA, RNA, timidinato e proteínas. Caso haja contraindicação pode-se utilizar a sulfassalazina ou a leflunomida. Os antimaláricos devem ser indicados apenas para pacientes com doença leve ou artrite indiferenciada com baixo potencial erosivo. Doses baixas de corticoides podem ser utilizadas no início do tratamento para diminuir a ocorrência de efeitos adversos, no entanto, recomenda-se seu uso pelo menor tempo possível (MOTA et al., 2012).

Não havendo resposta clínica (remissão ou redução da atividade da doença) com dose máxima tolerada de metotrexato, recomenda-se a troca por outra DMCD em monoterapia ou o uso de combinação de DMCD. Caso não haja resposta à primeira linha de tratamento instituída, e a doença continuar com atividade moderada ou alta, indica-se a terapia imunobiológica. Nesse caso a droga de escolha é o anti-TNF (MOTA et al., 2012).

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 periarticular, mas devem contemplar um programa de flexibilidade adequado, evitando o excesso de movimento e distribuindo a sobrecarga de peso (MOTA et al., 2012).

### 3.7 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é um importante mecanismo efetor da imunidade inata e mediador da resposta inflamatória. Consiste em um complexo sistema de proteínas séricas e de superfície celular que interagem entre si e com outras moléculas do sistema imune de maneira extremamente regulada, de forma a eliminar microrganismos invasores (ABBAS et al., 2015). Além dessa função bem estabelecida, o complemento exerce outras funções na vigilância imune e na homeostase, auxiliando na remoção de complexos imunes, detritos (debris) celulares e células apoptóticas, além de estar associado ao desenvolvimento precoce e à reparação tecidual (RICKLIN et al., 2016).

O envolvimento tão amplo nos processos fisiológicos só é possível através de uma estreita comunicação do complemento com outros sistemas biológicos. No entanto, a ativação indesejada desse sistema contribui para a

inflamação através da capacidade de reconhecimento de superfície, versatilidade funcional e interconectividade do complemento. Portanto, a imagem emergente do complemento é a de um sistema de vigilância poderoso que pode ser desencadeado inadvertidamente por células danificadas ou alteradas. Reações autoimunes, modificações relacionadas à idade, deficiências e alterações genéticas nas proteínas do complemento muitas vezes agravam os danos mediados pelo complemento e contribuem para a condição inflamatória (RICKLIN et al., 2016).

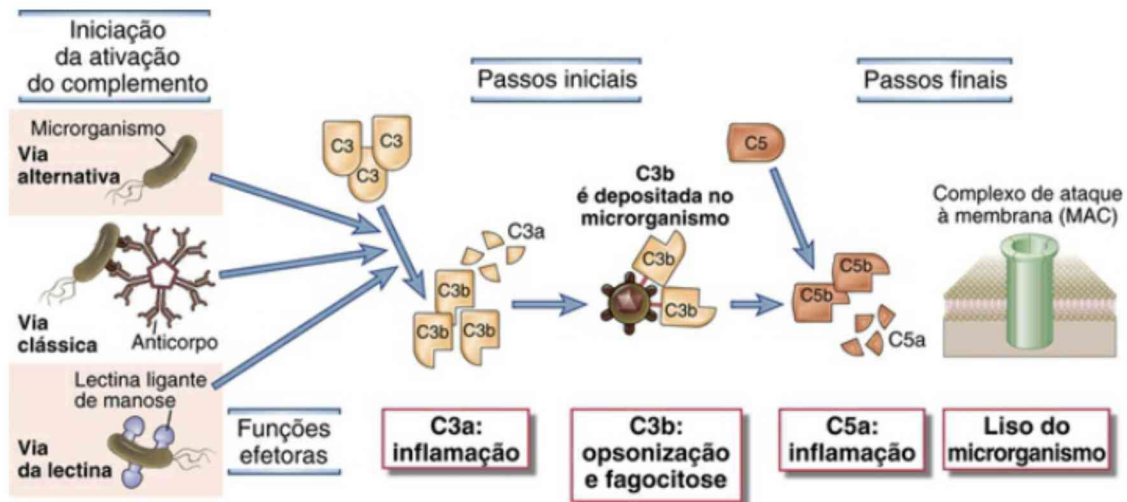
As funções do complemento envolvem reconhecimento de superfície e opsonização da célula alvo, auto amplificação, geração de moléculas efetoras e indução de sinalização imune. O envolvimento de moléculas distintas de reconhecimento determina a amplitude e intensidade da resposta do complemento para garantir que a reação a uma célula apoptótica seja mais temperada do que a um patógeno invasor, por exemplo, e para poupar células hospedeiras saudáveis da ativação do complemento (RICKLIN et al., 2016).

A ativação do complemento ocorre através de três vias distintas: via clássica, que envolve a ativação mediada por anticorpos através do complexo C1 que compreende C1q, C1r e C1s; via das lectinas, que é desencadeada por carboidratos presentes nas superfícies celulares de microrganismos; e a via alternativa, que envolve a ativação direta de C3 através da ligação em superfície ou hidrólise de C3 e da ligação mediada por properdina (RICKLIN et al., 2016). Embora as vias do complemento difiram na forma como são iniciadas, todas elas resultam na geração de complexos enzimáticos (C3 convertases) capazes de clivar a proteína mais abundante do complemento, a C3. A iniciação das etapas finais da ativação do complemento ocorre quando são geradas as C5-convertases culminando na formação do complexo de ataque à membrana (MAC). O MAC é responsável por formar poros nas membranas plasmáticas que permitem a livre circulação de água e íons entre o meio intra e extracelular. A entrada de água resulta em ruptura das células em cuja superfície o MAC foi depositado, levando à sua lise (FIGURA 5) (ABBAS et al., 2015).

A ativação do complemento iniciada principalmente pela via clássica parece ter como gatilho o aumento de complexos imunes circulantes como o

FR e o anti-CCP, no entanto, as vias alternativa e das lectinas também estão envolvidas na patogenia da AR (EPP BOSCHMANN et al., 2016).

FIGURA 5. VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



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).

A via das lectinas é desencadeada pela ligação de moléculas de reconhecimento de padrões que podem ser: lectina ligante de manose (MBL), colectina-11 (CL-K1) e ficolinas. Essas lectinas se ligam aos chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) na superfície de agentes patogênicos, células apoptóticas ou necróticas. Entre as moléculas que constituem os PAMPs estão: D-manose, N-acetil-D-glicosamina e grupos acetilados. A MBL circulante, as colectinas e as ficolinas formam complexos com dois dímeros de MASP: MASP-1 e MASP-2. Após a ligação desses complexos (MBL/MASPs, CL-K1/MASPs e ficolina/MASPs) aos seus alvos, a MASP-1 pode ativar e acionar automaticamente a MASP-2, levando à clivagem de C4 e C2, formando a C3 convertase (C4b2b) que ativa C3 desencadeando a cascata do complemento (BELTRAME et al., 2015).

A ativação do complemento envolve um grau de amplificação potente e, portanto, necessita de um sistema eficaz de moléculas reguladoras capaz de efetuar o equilíbrio homeostático, assegurar a eficiente destruição dos agentes patogênicos bem como o reconhecimento de auto componentes (DUNKELBERGER; SONG, 2009). A formação das C3 e C5 convertases é particularmente controlada por proteínas da família de "reguladores de ativação

do complemento" (RACs). Essas proteínas modulares são compostas por domínios que controlam o complemento, impedem a formação dos complexos das convertases e desestabilizam as já existentes. Eles também atuam como cofatores para o fator de serina protease I (FI) permitindo a degradação de C3b e/ou C4b. Entre os membros da família RAC, o CR1 associado à membrana é particularmente potente, uma vez que atua sobre as convertases C3 e C5 e medeia a clivagem total de C4b e C3b. Outros membros da família RAC associados à membrana conferem atividade de cofator (proteína do cofator de membrana, também conhecida como CD46) ou atividade de decaimento da convertase (fator de aceleração do decaimento, também conhecido como CD55). Ao controlar fortemente a opsonização e a formação da convertase, os RACs inibem a ativação de C3 e C5 impedindo a geração de proteínas efetoras nas células hospedeiras (RICKLIN et al., 2016).

A presença de autoanticorpos na circulação ligados/depositados nos tecidos também pode desencadear inflamação e danos por meio de ativação inadequada do complemento. Por exemplo, complexos imunes presentes no LES causam consumo de componentes do complemento na circulação e deposição de produtos de ativação no rim (nefrite lúpica) e outros órgãos levando a injúria tecidual. Mecanismos similares estão envolvidos na síndrome de anticorpos antifosfolipídicos, na miastenia gravis e em outras doenças autoimunes (RICKLIN et al., 2016).

Outro mecanismo pelo qual o complemento é ativado inadvertidamente é através da falha na remoção de debris, mecanismo que pode contribuir para a ocorrência de doenças relacionadas à idade. O envelhecimento, fatores de estilo de vida e o estresse oxidativo podem levar à formação de depósitos e/ou placas detectados pelos receptores de reconhecimento de padrão (RRPs), e o envolvimento do complemento neste processo é complexo. Durante os primeiros estágios do início da doença, o complemento tem um papel importante na depuração de debris celulares e consequente prevenção da progressão da doença. Uma vez que os destroços começam a se acumular e não podem ser eliminados de forma eficiente, a ativação perpétua da cascata do complemento induz inflamação e danos nos tecidos que conduzem a processos degenerativos (RICKLIN et al., 2016).

Deficiências hereditárias de quase todos os componentes do sistema complemento e de proteínas reguladoras e receptores têm sido detectadas em seres humanos. Acredita-se que algumas dessas deficiências possam levar às doenças inflamatórias. O complemento pode ser ativado nos tecidos por meio dos complexos imunes e de fosfolípidos e proteínas mitocondriais, expostos após isquemia tecidual e reperfusão. Após a ativação nos sítios de injúria tecidual o complemento causa dano pela deposição do MAC e de ligantes como C4b e C3b, que ativam leucócitos com receptores de complemento. Células e tecidos necróticos não apresentam as moléculas regulatórias que previnem a ativação do complemento. Também os complexos imunes podem não ser eliminados e o complemento se tornar cronicamente ativado, promovendo a inflamação (UTIYAMA et al., 2004).

No LES a ativação do complemento por complexos imunes que se depositam em vários órgãos está diretamente ligada à fisiopatogenia da doença. Ainda, a deficiência homozigótica hereditária de C1q, C1r, C1s, C4 e C2 estão fortemente associadas à susceptibilidade ao LES. Outras doenças mediadas por complexos imunes, como AR, glomerulonefrites e vasculites, também apresentam mecanismos semelhantes a esses na sua patogenia (UTIYAMA et al., 2004).

Considerando o papel do complemento na fisiopatogenia das doenças autoimunes, novos estudos são importantes para avaliar a função destas proteínas na AR.

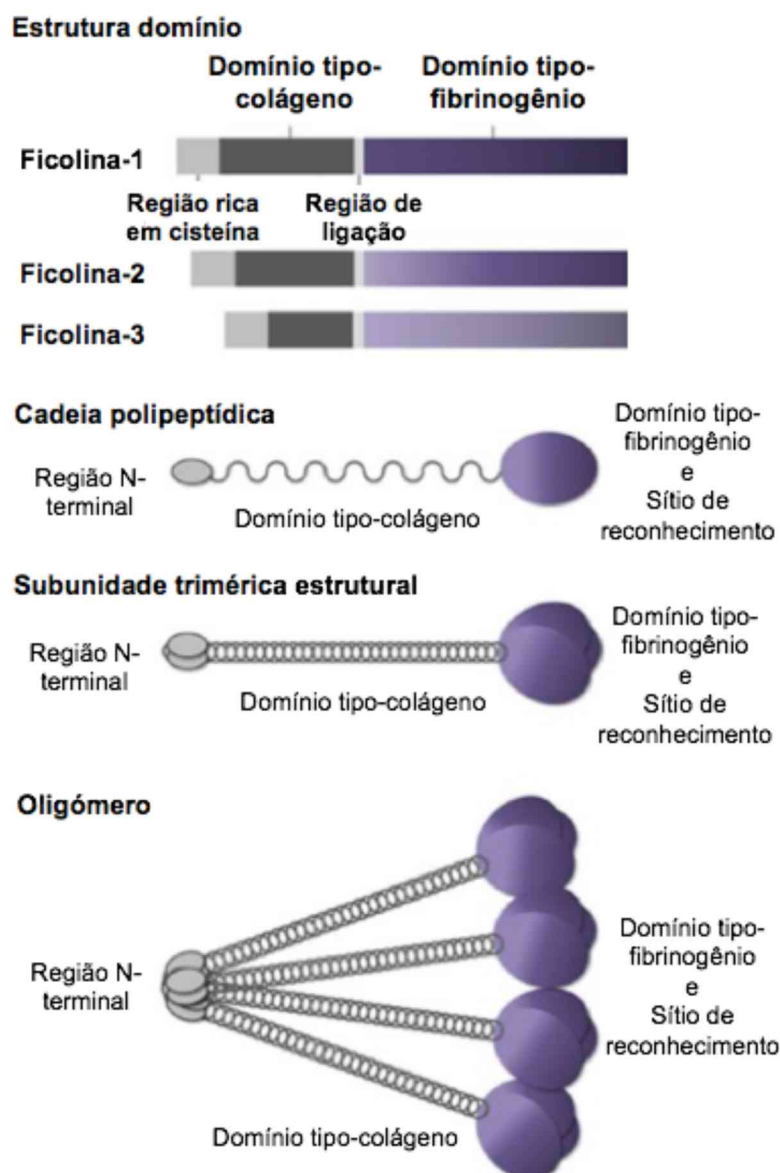
### 3.8 FICOLINAS

As ficolinas compreendem uma família de proteínas que compartilham estrutura caracterizada por dois domínios principais, um domínio N-terminal do tipo colágeno e um domínio C-terminal do tipo fibrinogênio (FIGURA 6). Em 1991, as ficolinas  $\alpha$  e  $\beta$ , os dois primeiros membros dessa família, foram isoladas a partir de um fator de crescimento transformador, (TGF)- $\beta$ 1-proteínas ligantes, de membranas de útero porcino (ICHIJOS et al., 1993).

A primeira ficolina humana isolada do plasma foi a ficolina-L ou ficolina-2. Outra ficolina, inicialmente reportada como antígeno Hakata, foi identificada como uma proteína sérica termolábil que precipitava autoanticorpos de pacientes com LES. Essa ficolina ficou conhecida como ficolina-H ou ficolina-3.

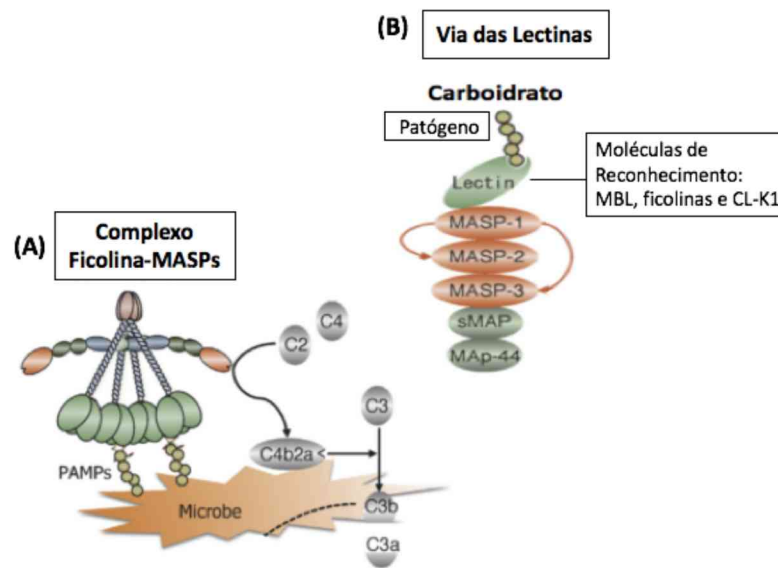
Uma terceira ficolina foi identificada em humanos e subsequentemente nomeada como ficolina-M ou ficolina-1. As ficolinas 1, 2 e 3 são codificadas pelos genes *FCN1*, *FCN2* e *FCN3*, respectivamente. Essas três ficolinas são capazes de formar complexos com as MASPs e ativar o complemento através da via das lectinas (FIGURA 7), no entanto, com eficiência variável (GARRED et al., 2016). Em ratos, duas ficolinas foram identificadas, denominadas A e B. A ficolina B é homologa a ficolina-1 humana (ENDO et al., 2015).

FIGURA 6. ESTRUTURA MOLECULAR DAS FICOLINAS



Nesta figura está representada a estrutura proteica codificada pelos genes *FCN1*, *FCN2* e *FCN3*. Os polipeptídeos codificados são semelhantes consistindo em 4 regiões: uma região N-terminal que contém dois resíduos de cisteína, um domínio tipo colágeno com repetições variáveis de trípteros Gly-Xaa-Yaa, uma região de ligação e um domínio C-terminal tipo fibrinogênio (adaptado de GARRED et al., 2016).

## FIGURA 7. ATIVAÇÃO DA VIA DAS LECTINAS MEDIADA PELAS FICOLINAS



(A) O início da via das lectinas se dá pelo complexo MBL-ficolinas-MASPs. Ao reconhecer os PAMPs em micróbios através de MBL e das ficolinas, as MASPs ativam C4 e C2 para gerar C4b2a, que por sua vez ativa C3 para gerar C3b. (B) Via das lectinas: as lectinas (MLB, ficolinas e CL-K1) reconhecem os PAMPs e desencadeiam o processo de ativação do complemento (adaptado de ENDO et al., 2015).

Estudos mostram que as ficolinas possuem distribuição tecido-dependente, sugerindo que suas funções sejam também tecido-específicas. As ficolinas têm sido extensivamente caracterizadas como PRMs (MATSUSHITA, 2009), sendo que o sítio ligante está localizado no domínio tipo fibrinogênio. As três ficolinas compartilham afinidade comum a compostos acetilados, no entanto, diferem na especificidade de ligação a esses compostos (GARRED et al., 2016), sugerindo que cada ficolina tenha uma função específica (ENDO et al., 2015).

Cada ficolina é capaz de se ligar a um espectro diferente de microrganismos, incluindo alguns vírus e parasitas. Foi demonstrado que todas as ficolinas se ligam ao vírus da Influenza A (PAN et al., 2012; VERMA et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2013). As ficolinas 2 e a 3 se ligam ao vírus das hepatites e ao *Trypanosoma cruzi* (ENDO et al., 2015).

Além disso, as ficolinas estão envolvidas na remoção de células apoptóticas, necróticas (KURAYA et al., 2005) e de mitocôndrias (BRINKMANN et al., 2013), indicando um papel na homeostase endógena. Ainda, estudos recentes demonstraram que as ficolinas são capazes de interagir com outras proteínas além das MASPs, sugerindo assim que elas possam colaborar com

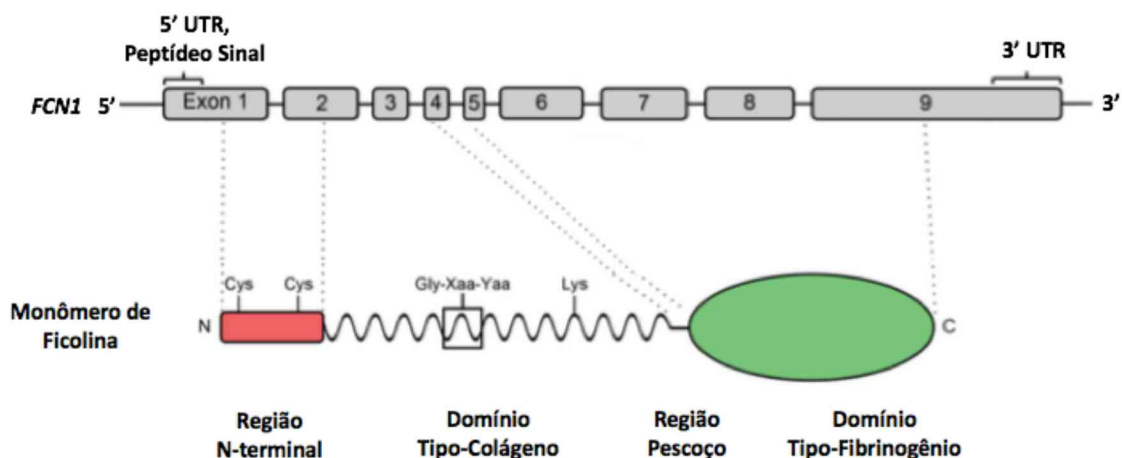
proteínas efetoras tais como pentraxina 3 e proteína C reativa para amplificar, modular e regular suas funções (ENDO et al., 2015).

Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) já foram identificados nos genes das três ficolinas, sendo a frequência de alelos, genótipos e haplótipos dependentes das características étnicas das populações estudadas. Essas variações genéticas têm sido verificadas em todas as partes do gene incluindo a região promotora, exons e introns. Algumas dessas variantes estão relacionadas com a estrutura e função das ficolinas e afetam sua concentração sérica e capacidade de ligação aos PAMPs (GARRED et al., 2016).

### 3.8.1 Ficolina-1

A ficolina-1 humana foi identificada em 1996 e temporariamente nomeada como proteína P35. Sendo renomeada posteriormente como ficolina M ou ficolina-1. O gene *FCN1* está localizado no braço longo do cromossomo 9 na posição 9q34, possui 9 exons e expressa um mRNA de 1,4 kb que varia conforme o tecido em que está expresso. A organização exon-intron desse gene é altamente conservada. Os dois primeiros exons codificam o peptídeo sinal, a região N-terminal da proteína madura com dois resíduos de cisteína e a parte N-terminal do domínio tipo colágeno. Os quatro últimos exons codificam o domínio tipo fibrinogênio (FIGURA 8) (ENDO et al., 2015).

FIGURA 8. ESTRUTURA DO GENE *FCN1*



Na figura está representado o gene *FCN1*. Os retângulos representam os exons. Os exons 1 e 2 codificam a região N-terminal, os 2, 3 e 4 o domínio tipo-colágeno, os 4 e 5 a região pescoço e os 6, 7, 8 e 9 o domínio tipo-fibrinogênio (adaptado de MASON; TARR, 2015).

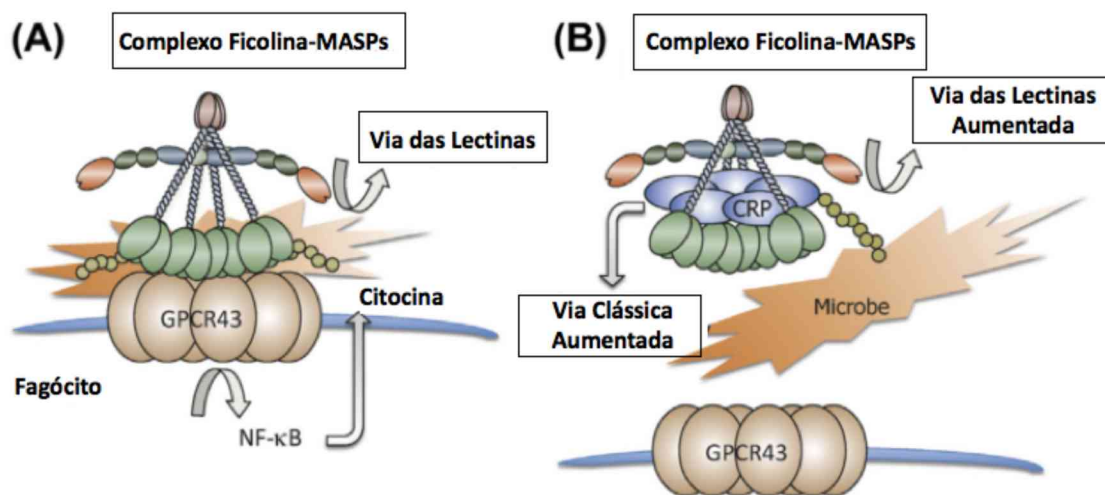
O gene *FCN1* é expresso em leucócitos do sangue periférico, células derivadas da medula óssea e em menor extensão no baço e no pulmão. Acredita-se que a ficolina-1 exerça principalmente sua função durante a inflamação onde pode ser secretada por monócitos, macrófagos e granulócitos (GARRED et al., 2016). Essa ficolina encontra-se associada à membrana celular dessas células provavelmente pela interação com ácido siálico (HONORÉ et al., 2010) e sua concentração sérica na circulação é baixa (em média de 1,07 µg/ml) (ENDO et al., 2015).

A ficolina-1 é capaz de se ligar a carboidratos acetilados como N-acetilglicosamina e N-galactosamina de forma dependente de cálcio e do pH e apresenta capacidade única, assim como a ficolina-B de ratos, de se ligar ao ácido siálico. Essa ficolina tem capacidade de interagir com uma variedade de proteínas endógenas não pertencentes ao complemento. Há relatos da sua interação com a proteína C reativa, um marcador de fase aguda do processo inflamatório, através de condições fracamente ácidas e concentrações ligeiramente baixas de  $Ca^{2+}$ . Essa interação ativa tanto a via clássica quanto a via das lectinas, pois a proteína C reativa reconhece uma variedade de ligantes nos microrganismos iniciando a via clássica pela interação com C1q (ENDO et al., 2015). Zhang et al., 2010, sugerem que a ficolina-1 encontra-se associada constitutivamente a um receptor transmembranar, receptor 43 acoplado à proteína G (GPCR43) de monócitos em condições fisiológicas (FIGURA 9A). Quando a ficolina-1 reconhece os PAMPs em microrganismos, o GPCR43 ativa a cascata de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB) e aumenta a produção de IL-8. A leve acidose durante a infecção induz mudança conformacional da ficolina-1 provocando forte interação com a proteína C reativa (FIGURA 9B). Este evento diminui inversamente a interação de ficolina-1-GPCR43 e, portanto, reduz a produção de IL-8, impedindo assim o aumento desnecessário da inflamação (ZHANG et al., 2010).

Recentemente foi reportado que tanto a ficolina-1 quanto a ficolina-2 são capazes de reconhecer a mitocôndria, sugerindo assim que a via das lectinas esteja envolvida na depuração homeostática das mitocôndrias liberadas para a circulação (BRINKMANN et al., 2013). Outra função relatada da ficolina-1 é o fato de se ligar à leucosialina, principal sialoproteína de membrana dos neutrófilos, também conhecida como CD43. Essa ligação induz a adesão dos

neutrófilos, fato importante no processo inflamatório agudo. Essa função da ficolina-1, de mediar a adesão de neutrófilos, pode ser explicada pelo fato da leucosialina ser uma proteína com propriedades antiaderentes (ENDO et al., 2015). Ainda, MA et al., 2013 relataram que a ficolina-1 é importante para mediar a remoção de células apoptóticas e debris celulares através da interação do seu domínio tipo-fibrinogênio com a pentraxina 3. Além disso, foi verificado que a formação de complexo entre a pentraxina 3 e a ficolina-1 regula negativamente a liberação de IL-8.

FIGURA 9. UM MODELO DE INTERAÇÃO pH-DEPENDENTE DO COMPLEXO FICOLINA-MASP<sub>S</sub> COM A PROTEÍNA C REATIVA E GPCR43



(A) Interação predominante do complexo ficolina-1-MASP com GPCR43 em pH fisiológico. Após a ligação da ficolina-1 ao patógeno alvo, o GPCR43 aumenta a produção de citocinas via sinalização de NF-κB em monócitos. (B) Interação predominante do complexo ficolina-1-MASP com proteína C reativa em pH levemente ácido. Na ligação da ficolina-1 ao alvo, um efeito sinérgico entre a ficolina-1 e a proteína C reativa aumenta a via da lectina e a via clássica (adaptado de ENDO et al., 2015).

### 3.8.1.1 Polimorfismos no gene *FCN1*

A análise genotípica do gene *FCN1* identificou 19 polimorfismos na região promotora e 26 polimorfismos na região codificadora. Essa análise foi realizada em amostras de pessoas provenientes da Dinamarca, Japão, Gana, Moçambique e Argentina. Desses polimorfismos avaliados, verificou-se que 11 deles estão presentes em todos grupos étnicos incluindo os SNPs -542 da região promotora e o +33 da região codificadora. Já o SNP -144 não está presente na população japonesa e o -399 só está presente nas populações africanas avaliadas. Esse estudo concluiu que as frequências genotípicas

variam entre as populações e podem explicar as diferenças genéticas encontradas entre populações relacionadas a determinadas doenças. Além disso, verificou-se que polimorfismos na região promotora podem afetar a regulação do gene e, portanto, alterar a concentração da proteína codificada (HUMMELSHOJ et al., 2008).

Munthe-fog et al., 2012, genotiparam os SNPs -1981 (rs2989727), -542 (rs10120023), -144 (rs10117466) e avaliaram sua influência na expressão da ficolina-1. Esse trabalho mostrou que os alelos principais de -542G>A (rs10120023) e -144C>A (rs10117466) estão associados à baixa concentração de ficolina-1, enquanto os alelos menores estão associados a alta concentração da proteína. Além disso, a homozigose desses dois SNPs foi associada ao desfecho fatal de pacientes com inflamação sistêmica (MUNTHE-FOG et al., 2012).

Ainda, Ammitzboll, et al., 2012, demonstraram associação de oito SNPs com concentração sérica da ficolina-1. O genótipo AA do polimorfismo -144C>A (rs10117466) foi associado a um aumento da concentração da ficolina-1. No entanto, outras mutações como Ala218Thr (rs148649884) e Asn289Ser (rs138055828) foram associadas a uma menor concentração de ficolina-1. Verificou-se que a mutação Ser268Pro (rs150625869) levou à falha na produção de ficolina-1 (AMMITZBOLL, et al., 2012). Todavia, até o momento não foram reportados casos de deficiência da ficolina-1 (ENDO et al., 2015).

Já foi verificado que SNPs no gene *FCN1* estão relacionados a doenças como fibrose cística, artrite reumatoide, hanseníase e inflamação sistêmica (ENDO et al., 2015). Cruyssen et al., 2007 relataram que dois SNPs do gene *FCN1* foram associados ao desenvolvimento da AR em pacientes da Bélgica, com aumento do alelo A do SNP -1981 (rs2989727) da região promotora do gene *FCN1* e G do SNP rs1071583 no exon 9. No entanto, outro estudo realizado na população brasileira avaliando esses dois SNPs não encontrou associação com a AR (ADDOBBATI et al., 2016). Ammitzboll et al., 2013, mostraram que elevada concentração de ficolina-1 circulante foi associada a maior atividade da doença em pacientes com AR e que os níveis basais da proteína estavam relacionados a baixa atividade da doença. Pelos resultados encontrados, os autores sugeriram que a ficolina-1 poderia ser considerado um biomarcador para a AR (AMMITZBØLL et al., 2013). Esses SNPs foram

também avaliados em relação ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) em crianças e adolescentes, a qual mostrou seu envolvimento com proteção à DMT1 e do SNP rs1071583 com idade precoce de diagnóstico (ANJOSA et al., 2016).

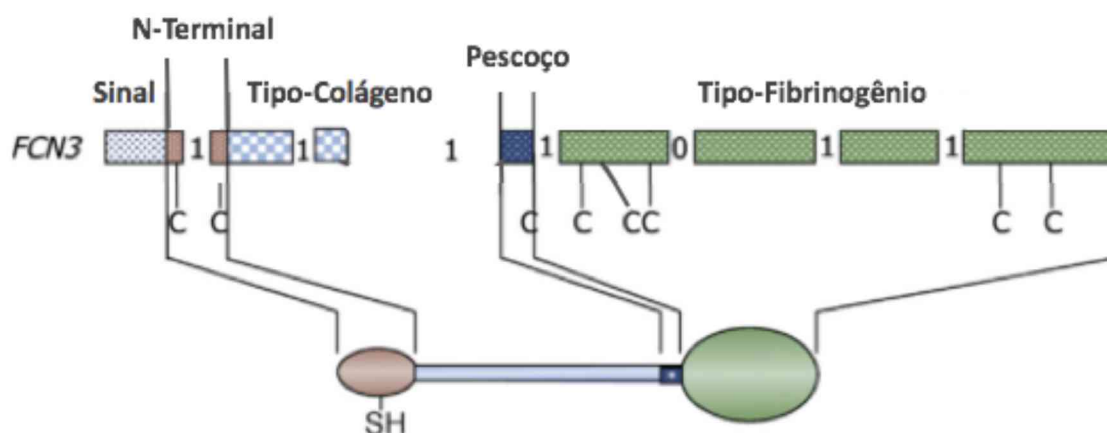
Em pacientes com fibrose cística, o alelo menor dos dois SNPs da região promotora (rs2989727 e rs1071583) e o exon 9 (Gln275Gln, rs1071583) do gene *FCN1* foram associados à colonização precoce por *P. aeruginosa* (ENDO et al., 2015). Outro estudo relaciona os polimorfismos da ficolina 1 com a hanseníase (BOLDT et al., 2013).

Em um estudo com pacientes com câncer, a concentração de ficolina-1 se mostrou mais baixa em pacientes que desenvolveram infecção grave (AMEYE et al., 2012). Já a concentração de ficolina-1 em plasma e líquido sinovial de pacientes com AR e osteoartrite foi maior no plasma do que no líquido sinovial tanto na AR quanto na osteoartrite (AMMITZBOLL, et al., 2012).

### 3.8.2 Ficolina-3

Essa ficolina foi inicialmente identificada no soro de pacientes com LES, sendo denominada antígeno Hakata. Atualmente é conhecida como ficolina-3 ou ficolina-H. Codificada pelo gene *FCN3* localizado no braço curto do cromossomo 1 na posição 1p35.3, expressa 1,3 kb mRNA. O gene *FCN3* é composto por oito exons e é altamente conservado (FIGURA 10) (ENDO et al., 2015).

FIGURA 10. ESTRUTURA DO GENE *FCN3*



Na figura está representado o gene *FCN3*. Os retângulos representam os exons. Cada cor mostra a região de codificação que codifica o respectivo domínio da ficolina. Os números 0 e 1 entre os retângulos representam a fase de inserção do intron. A letra C representa a posição do resíduo de cisteína conservado (adaptado de ENDO et al., 2015).

A ficolina-3 é considerada uma ficolina do tipo plasma/soro, com seus mRNA presentes no fígado e isoformas proteicas produzidas pelas células epiteliais do ducto biliar e hepatócitos, secretadas na bile e no soro para a circulação sanguínea. Além do fígado, essa ficolina também é expressa no pulmão (HUMMELSHOJ et al., 2008), pelas células epiteliais brônquicas ciliadas e pelas células epiteliais alveolares tipo II sendo secretada no interior dos brônquios e alvéolos (MATSUSHITA, 2009). A ficolina-3 é a mais abundante no soro, sua concentração média é de 25 µg/ml (GARRED et al., 2016), sendo esta bem superior a de MBL (ENDO et al., 2015).

Foi demonstrado que a ficolina-3 se liga aos seguintes carboidratos: N-acetilglicosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc) e fucose (MATSUSHITA, 2009). Apresentando um espectro de ação diferente das outras ficolinas, ela é capaz de se ligar ao *Aerococcus viridans*. Ficolina-3 se liga ao vírus Influenza A e ao parasita *Trypanosoma cruzi* (ENDO et al., 2015).

Ainda, a ficolina-3 pode se ligar a células apoptóticas e necróticas, levando à ativação do complemento através da via das lectinas. Também é capaz de se associar a calreticulina (CRT), conduzindo à depuração de células não inflamatórias alteradas por fagocitose. Estudos sugerem que esse mecanismo pode ser muito importante para evitar o desenvolvimento da autoimunidade desencadeada por autoantígenos provenientes de células alteradas. A CRT é uma proteína multifuncional identificada em muitas estruturas celulares como: retículo endoplasmático, citoplasma, membrana celular e matriz extra-celular (ENDO et al., 2015).

Foi verificado também que o anticorpo IgG natural (nIgG) interage com o domínio tipo fibrinogênio da ficolina-3, em condições de acidose e hipocalcemia induzidas por infecção ou inflamação. Dessa forma, o complexo nIgG-ficolina-3 faz a interligação entre a imunidade inata e adaptativa (ENDO et al., 2015).

Poucos estudos avaliaram a ficolina-3 na AR. Roy et al., 2013, compararam plasma de pacientes com AR recente e controles saudáveis e observaram uma fucosilação alterada e elevados níveis de ficolina-3, indicando que essa possa estar envolvida na AR.

### 3.8.2.1 Polimorfismos no gene *FCN3*

Munthe-fog et al., 2008, observaram que a concentração de ficolina-3 estava diminuída em pessoas heterozigóticas para o polimorfismo +1637delC (rs28357092). No ano seguinte, foi reportado o primeiro caso de deficiência de ficolina-3 congênita, onde o paciente apresentava homozigose para a mutação +1637delC (rs28357092). Essa mutação levou a formação de uma ficolina-3 anormal que não possuía a maior parte do domínio do tipo fibrinogênio, sendo, portanto, não detectada no soro deste paciente, o qual também não apresentou atividade do complemento, através da via das lectinas, a partir da ficolina-3. Esse paciente tinha graves episódios de pneumonia e fibrose pulmonar (MUNTHE-FOG et al., 2009). Outros dois pacientes que também possuíam deficiência de ficolina-3 congênita apresentaram enterocolite necrosante grave. Esses dados sugerem que a ficolina-3 possa estar envolvida também com a homeostase do tecido intestinal (ENDO et al., 2015).

Outro estudo avaliou os SNPs +1637delC (rs532781899), +3524\_+3532insTATTTGGCC (rs28362807) e +4473C>A (rs4494157) no gene *FCN3* e as concentrações de ficolina-3 em pacientes com hanseníase. A conclusão desse estudo foi de que os polimorfismos do gene *FCN3* podem cooperar com um aumento na concentração de ficolina-3 contribuindo assim para a susceptibilidade a infecção pelo *M. leprae* (ANDRADE et al., 2017).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo constitui uma investigação de caráter interinstitucional, realizado por meio de uma parceria entre a Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná e o Laboratório de Imunopatologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Esse estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba, cujo número do parecer é 1.669.709 (ANEXO).

### 4.2 PACIENTES E CONTROLES

Foram estudados um total de 308 amostras de sangue, compreendidas em dois grupos: grupo controle - 160 indivíduos saudáveis (sem AR); e grupo

de pacientes - 148 indivíduos com diagnóstico de AR. As 160 amostras do grupo controle foram selecionadas de indivíduos saudáveis de três diferentes locais: sendo 90 do banco de sangue do Hemeepar, 28 do Biobanco do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e 42 de voluntários pertencentes à colônia de Witmarsum. As 148 amostras de pacientes com AR foram coletadas no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba.

Os pacientes diagnosticados com AR atenderam a pelo menos 4 dos critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia relacionados a seguir: 1) rigidez matinal 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 FR 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.

Todos os pacientes tinham mais de 18 anos e com idade de início da doença superior ou igual a 16 anos. Ainda, visando à caracterização dos participantes da pesquisa, foram levantadas as seguintes informações: idade, gênero, origem étnica, quantificação dos marcadores sorológicos, presença de comorbidades, uso do tabaco, ocorrência de aborto espontâneo, presença de nódulos, idade do início da doença, duração da doença e classe funcional.

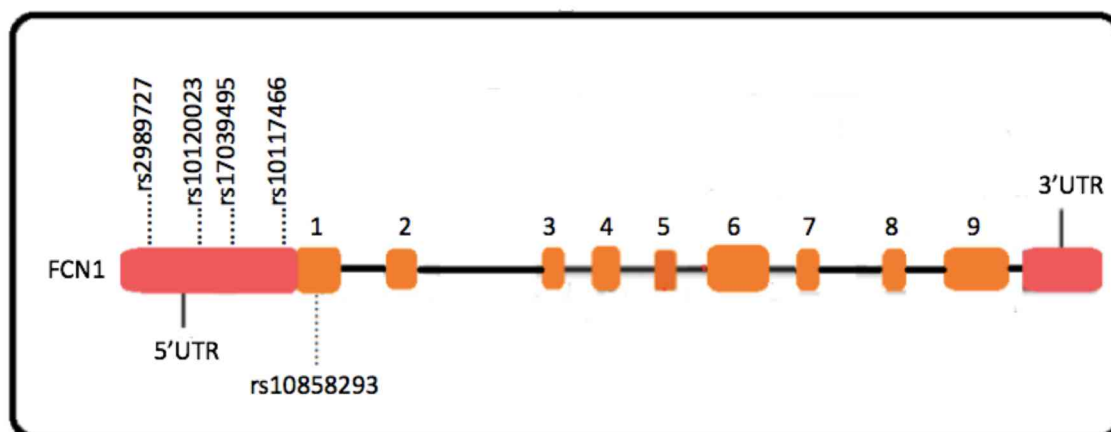
#### 4.3 GENOTIPAGEM

Todas as amostras tiveram seu DNA extraído da camada leucocitária utilizando o reagente DNAzol® Genomic DNA Isolation Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). 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.

### 4.3.1 Genotipagem dos polimorfismos no gene *FCN1*

As amostras de DNA de 148 pacientes e 160 controles foram genotipadas para os SNPs: rs2989727 (-1981G>A), rs10120023 (-542G>A), rs17039495 (-399G>A), rs10117466 (-144C>A) na região promotora e rs10858293 (+33T>G) no exon 1 do gene *FCN1* (FIGURA 11) através de amplificação alélica por PCR sequência-específica (PCR-SSP).

FIGURA 11. SNPs AVALIADOS NO GENE *FCN1*



Na figura está representado o gene *FCN1* e indicado a localização dos polimorfismos estudados. Quatro deles estão presentes na região promotora do gene que está representada pelo primeiro retângulo vermelho e um deles está localizado no exon1 (primeiro retângulo alaranjado). Os introns estão representados pelos traços em preto (adaptado de AMMITZBOLL et al., 2012).

Três reações de PCR-SSP abrangendo todos os polimorfismos de interesse e previamente padronizadas foram utilizadas para a genotipagem dos SNPs de *FCN1*. Essas reações estão descritas a seguir. Os iniciadores utilizados nas reações constam na TABELA 2.

O SNP -1981 foi avaliado através dos primers *FCN1\_Prom-1981Af* e *FCN1\_Prom-1981Gf* que foram conjugados com o iniciador reverso *FCN1\_Prom\_r* para gerar um fragmento de 729 pb. As condições da PCR foram as seguintes: 0,2  $\mu$ M de primers iniciadores SSP, 1X de tampão PCR CoralLoad (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,1 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5% de glicerol, 0,2 mM desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/ $\mu$ L de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,1  $\mu$ g/ml de DNA e água ultrapura para 15  $\mu$ l. O protocolo de amplificação começou com um passo de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s

a 94°C, 30s a 56°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 52°C e 30s a 72°C, concluindo com 5 min a 72°C no passo final de extensão do DNA.

Os SNPs -542 e -144 foram avaliados juntos, através dos primers *FCN1\_Prom-542Af* e *FCN1\_Prom-542Gf* que foram conjugados com os primers *FCN1\_Prom-144Ar* e *FCN1\_Prom-144Cr* para gerar um fragmento de 434 pb. As condições da PCR foram as seguintes: 0,6 µM de primers iniciadores SSP, 1X de tampão CoralLoad PCR (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,2 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,5% de glicerol, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/uL de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,1 µg/ml de DNA e água ultrapura para 15 µl. O protocolo de amplificação começou com um passo de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 57°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30 s a 55°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 53°C e 30s a 72°C, concluindo com 5 min a 72°C no passo final de extensão do DNA.

Os SNPs -399 e +33 foram avaliados juntos através dos primers *FCN1\_Prom-399Af* e *FCN1\_Prom-399Gf* que foram conjugados com os primers *FCN1\_Prom + 33Gr* e *FCN1\_Prom + 33Tr* para gerar um fragmento de 470 pb. As condições da PCR foram as seguintes: 0,4 µM de iniciadores SSP, 1X de tampão CoralLoad PCR (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,25 mM de MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,5% de glicerol, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/uL de Taq platinum, 0,1 µg/ml de DNA e água ultrapura para 15 µl. O protocolo de amplificação começou com um passo de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguido de 5 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 58°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 56°C e 30s a 72°C; 15 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 54°C e 30s a 72°C, concluindo com 5 min a 72°C no passo final de extensão do DNA.

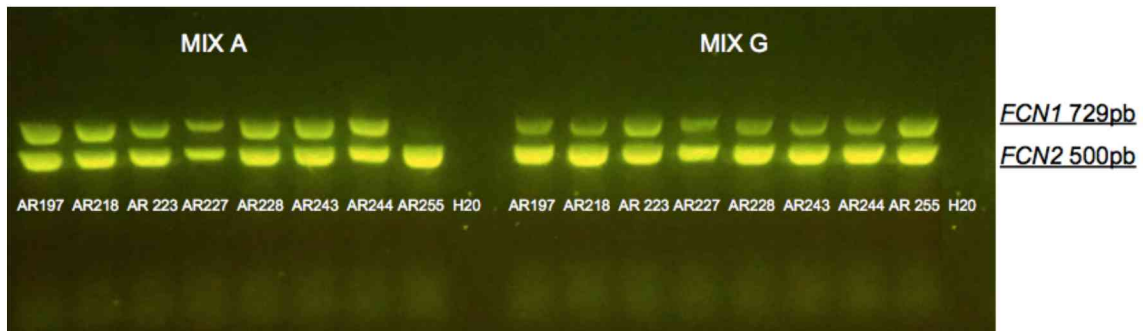
Cada PCR foi acompanhada de controles negativos, que são soluções de reação completas, sem o DNA, e controles de DNA sabidamente positivos ou negativos para os genótipos procurados. O resultado foi observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5 % corado com SYBR® Safe (Invitrogen). Em todos os casos, a genotipagem foi baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados (FIGURAS 12, 13 e 14).

TABELA 2. SEQUÊNCIA DE INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DE *FCN1*

Iniciador Direto*	Sequência 5'-3'	Iniciador Reverso*	Sequência 5'-3'	Fragmento (pb)
<i>FCN1</i> Prom_-1981Af	CCCATGAGCCTGGTTATCA	<i>FCN1</i> Promr	ACCTCCTCTTCCTTGCAACA	729
<i>FCN1</i> Prom_-1981Gf	CCCATGAGCCTGGTTATCG			
<i>FCN1</i> Prom_-542Af	CAAAATAATTTACTCCACCA	<i>FCN1</i> Prom_-144Ar	ACCAACAGGAGGTATGAT	434
<i>FCN1</i> Prom_-542Gf	CAAAATAATTTACTCCACCG	<i>FCN1</i> Prom_-144Cr	ACCAACAGGAGGTATGAG	
<i>FCN1</i> Prom_-399Af	GTCCGACTCCTGGCTCCA	<i>FCN1</i> Ex1_+33Gr	ACTAGCAGGACAGCGAGC	470
<i>FCN1</i> Prom_-399Gf	GTCCGACTCCTGGCTCCG	<i>FCN1</i> Ex1_+33Tr	ACTAGCAGGACAGCGAGA	
<i>FCN2</i> ex8 <sup>fe</sup>	GCCAGGCCTCAGGTATAAAG	<i>FCN2</i> Ex8 <sup>ra</sup>	AAAGGGTTGATTGCGGAAAC	500
<i>MBL2</i> Promf <sup>b</sup>	ATGGGGCTAGGCTGCTGAG	<i>MBL2</i> rev+270 <sup>b</sup>	CCAACACGTACCTGGTTCCC	1059

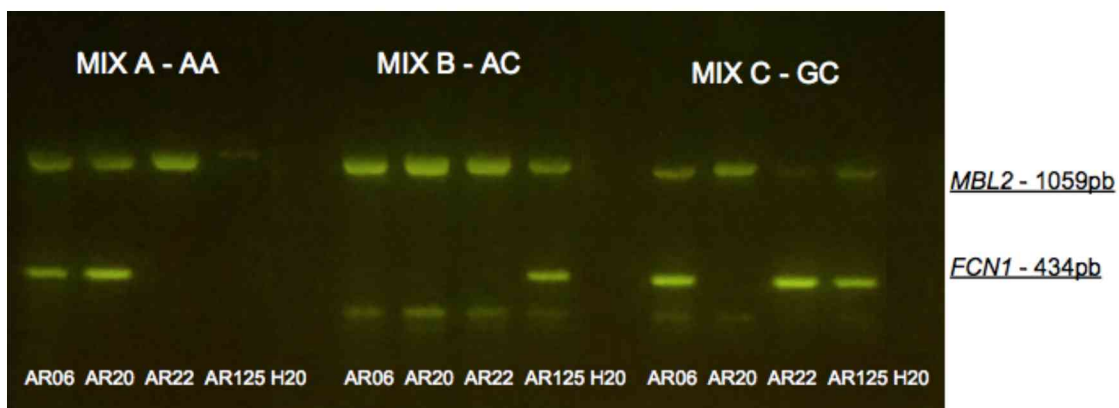
LEGENDA: a = iniciadores utilizados na amplificação do controle endógeno (gene *FCN2*); b = iniciadores utilizados na amplificação do controle endógeno (gene *MBL2*); f = forward; r = reverse; pb = pares de base; Prom = promotor; Ex = exon; em negrito: nucleotídeo variante. A PCR-SSP -1981 incluiu a coamplificação de um fragmento específico para a variante -1981 A>G no promotor do gene *FCN1* (ficolina-1). \* = nomenclatura dos iniciadores: nome do gene + localização da variante (Ex = exon, Prom = promotor) + variante identificada pelo iniciador.

FIGURA 12. PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2989727 (-1981G>A) DO GENE *FCN1*



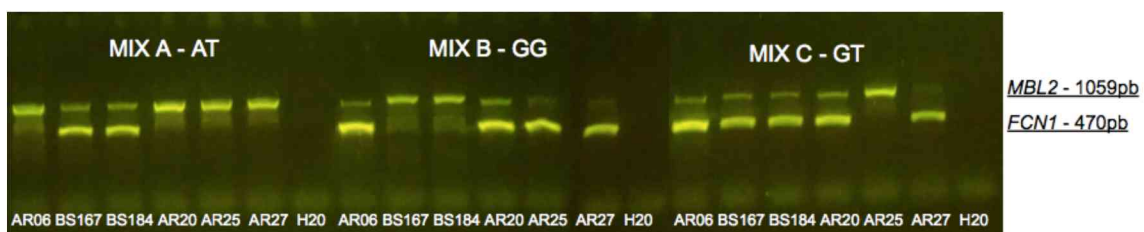
As bandas de 729 pares de base (pb) correspondem ao produto amplificado do gene *FCN1*. As bandas de 500 pb são produtos da amplificação do controle endógeno da reação, do gene *FCN2*. O MIX A contém iniciadores específicos que amplificam o fragmento contendo o alelo adenina do SNP -1981A (729 pb), e o MIX B contém iniciadores específicos que amplificam o mesmo fragmento (729 pb) contendo o alelo guanina (-1981G). A amostra AR255 possui genótipo -1981GG e as demais -1981AG.

FIGURA 13. PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs10120023 (-542G>A) E rs10117466 (-144C>A) DO GENE *FCN1*



As bandas 434 pb correspondem ao produto amplificado do gene *FCN1*. As bandas de 1059 pb são produtos da amplificação do controle endógeno da reação, do gene *MBL2*. O MIX A contém iniciadores específicos amplificam o fragmento contendo o alelo adenina nos dois SNPs avaliados; o MIX B contém iniciadores específicos amplificam o fragmento contendo o alelo adenina no SNP -542 e o alelo citosina no SNP -144; por fim, o MIX C contém iniciadores específicos que amplificam o fragmento contendo o alelo guanina no SNP-542 e o alelo citosina no SNP -144. As amostras possuem os seguintes genótipos: AR06 -542AG/-144AC, AR20 -542AA/-144AA, AR22 -542GG/-144CC e AR125 -542AG/-144CC.

FIGURA 14. PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs17039495 (-399G>A) E rs10858293 (+33T>G) DO GENE *FCN1*



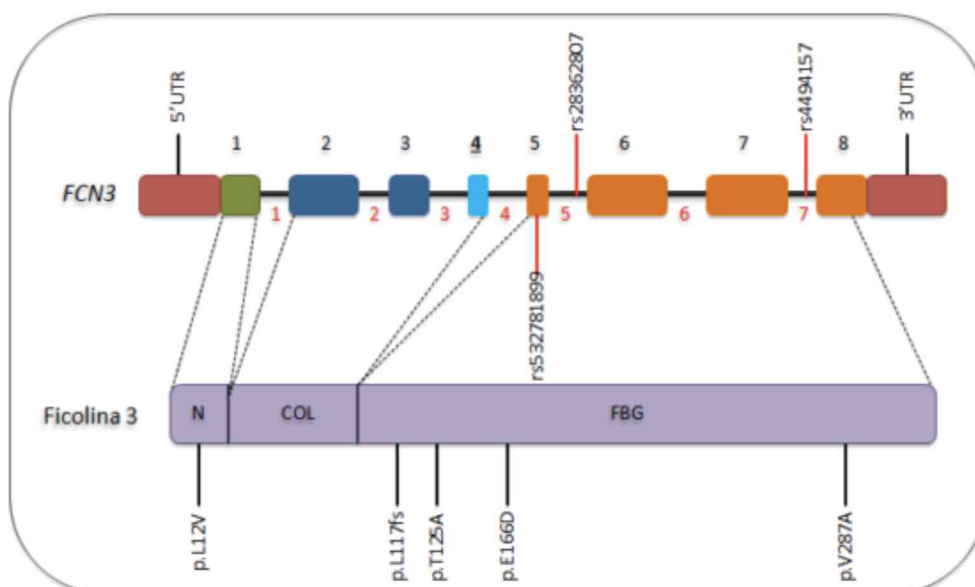
As bandas 470 pb correspondem ao produto amplificado do gene *FCN1*. As bandas de 1059 pb são produtos da amplificação do controle endógeno da reação, do gene *MBL2*. O MIX A contém iniciadores

específicos amplificam o fragmento contendo o alelo adenina no SNP -399 e o alelo timina no SNP +33; o MIX B contém iniciadores específicos que amplificam o fragmento contendo o alelo guanina nos dois SNPs avaliados; por fim, o MIX C contém iniciadores específicos que amplificam o fragmento contendo o alelo guanina no SNP -399 e o alelo timina no SNP +33. As amostras possuem os seguintes genótipos: AR06 -399GG/+33GT, BS167 e BS184 -399AG/+33TT, AR20 e AR27 -399GG/+33GT e AR25 -399GG/+33GG.

#### 4.3.2 Genotipagem dos polimorfismos no gene *FCN3*

As amostras dos 148 pacientes e 160 controles foram genotipadas para os SNPs rs532781899 (+1637delC) do exon 5, rs28362807 (+3524\_+3532delTATTTGGCC) do intron 5 e rs4494157 (+4479C>A) do intron 7 do gene *FCN3* (FIGURA 15), através da amplificação alélica por PCR sequência-específica (PCR-SSP).

FIGURA 15. ESTRUTURA GÊNICA E POLIMORFISMOS DO GENE *FCN3*, RELACIONADOS AOS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA



NOTA: o SNP rs532781899 (+1637del) representa uma deleção que causa uma mudança no quadro de leitura; o SNP rs28362807 caracteriza a deleção ou a inserção de pares de bases (+3532del ou +3532TATTTGGCC) e o SNP rs4494157 representa uma citosina ou uma adenina (+4479 C ou +4479 A). LEGENDA: Os exons estão representados por retângulos numerados em preto, exons que codificam o mesmo domínio aparecem com cores similares (verde: exon que codifica região aminoterminal rica em cisteína, azul: exon que codifica domínio semelhante a colágeno, laranja: exon que codifica o domínio de fibrinogênio; exon 1 e 8 estão acrescidos da região não traduzida, em marrom); o exon 4, o qual está sublinhado e destacado na cor azul clara é alternativo; os introns estão indicados com a numeração vermelha e os SNPs investigados estão apontados em vermelho. Os tamanhos dos exons e introns não são proporcionais. NCOL: colágeno. FBG: domínio de fibrinogênio, UTR: não traduzido (BINI et al., 2015).

Duas reações de PCR-SSP abrangendo todos os polimorfismos de interesse e previamente padronizadas foram utilizadas para a genotipagem dos SNPs de *FCN3*. Essas reações estão descritas a seguir. Os iniciadores utilizados nas reações constam na TABELA 3.

TABELA 3. SEQUÊNCIA DE INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DE *FCN3*

Iniciador Direto*	Sequência 5'-3'	Iniciador Reverso*	Sequência 5'-3'	Fragmento (pb)
FCN3 Exon5_f	TAGGGTGGGATCTCTGCTTG	FCN3 Exon 5_ +1637delr FCN3 Exon 5_ +1637Cr	TGTCACAAAAGACTGGGAGGC TGTCACAAAAGACTGGGAGGG	748
FCN3 Int5_ +3524 +3532delr	GCCACCAAGCGTTCTTGG	FCN3 Int7_ +4479Cr	GAGGAGGAAAAGCTGAGGCTCAG	984
FCN3 Int5_ +3524_ +3532TATTTGGCCf	CCACCAAGCGTGGCCAAA	FCN3 Int7_ +4479Ar	GAGGAGGAAAAGCTGAGGCTCAT	500
FCN2 ex8f <sup>b</sup>	GCCAGGCCTCAGGTATAAAG	FCN2 Ex8r <sup>b</sup>	AAAGGGTTGATTGCCGGAAC	431
HGH <sup>b</sup>	TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA	HGH <sup>b</sup>	CCACTCACGGATTCTGTGTTTC	

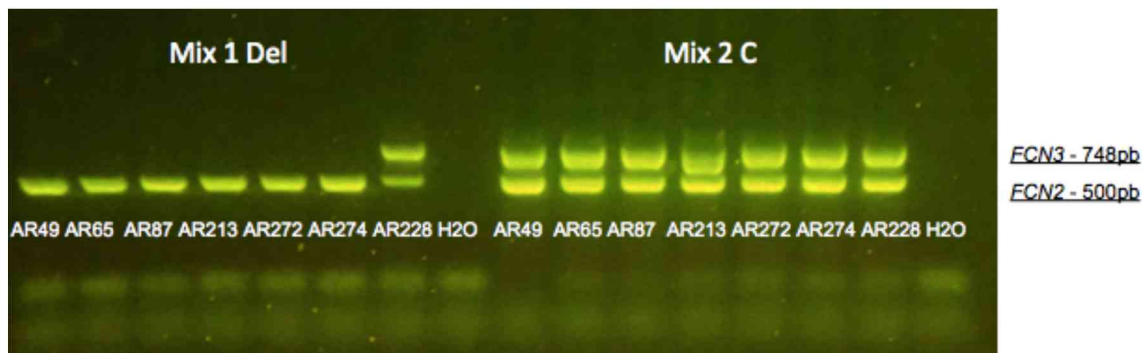
LEGENDA: a = iniciadores utilizados na amplificação do controle endógeno (gene *FCN2*); b = iniciadores utilizados na amplificação do controle endógeno (gene *HGH*); f = forward; r = reverso; Ex = exon; Int = intron; del = deleção; em negrito: nucleotídeo variante, \* = nomenclatura dos iniciadores: nome do gene + localização da variante (Int = intron, Ex = exon) + variante identificada pelo iniciador.

O SNP referente ao exon 5 foi avaliado através do primer *FCN3* Exon5\_f que foi conjugado com os primers *FCN3* Exon 5\_+1637delr e *FCN3* Exon 5\_+1637Cr para gerar um fragmento de 748 pb. As condições da PCR foram as seguintes: 0,7 µM de primers iniciadores SSP, 1X de tampão PCR CoralLoad (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,5% de glicerol, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Hilden, Alemanha), 0,2 mM dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,05 U/µL de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,1 µg/ml de DNA e água ultrapura para 15 µl. O protocolo de amplificação começou com um passo 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.

Os SNP referentes aos introns 5 e 7 foram avaliados juntos através dos primers *FCN3* Int5\_+3524\_+3532delf e *FCN3* Int5\_+3524\_+3532TATTTGGCCf que foram conjugados com os primers *FCN3* Int7\_+4479Cr e *FCN3* Int7\_+4479Ar para gerar um fragmento de 984 pb. As condições da PCR foram as seguintes: 0,2 µM de primers iniciadores SSP, 1X de tampão PCR CoralLoad (Qiagen, Hilden, Alemanha), 1,5% de glicerol, 0,2 mM (para o MIX1) e 0,5 mM (para os MIX 3 e 4) de solução Q, 0,2 mM dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,03 U/µL de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,1 µg/ml de DNA e água ultrapura para 15 µl. O protocolo de amplificação começou com um passo de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 58°C e 30s a 72°C; 10 ciclos de 20s a 94°C, 30s a 56°C e 30s a 72°C, concluindo com 5 min a 72°C no passo final de extensão do DNA.

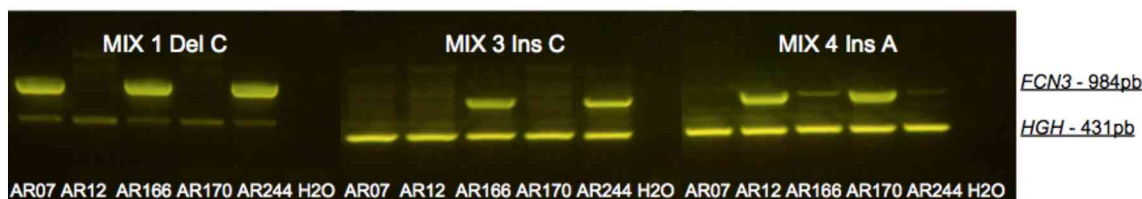
Cada PCR foi acompanhada de controles negativos, que são soluções de reação completas, sem o DNA, e controles de DNA sabidamente positivos ou negativos para os genótipos procurados. O resultado foi observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5 % corado com SYBR® Safe (Invitrogen). Em todos os casos, a genotipagem foi baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados (FIGURAS 16 e 17).

FIGURA 16. PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO rs532781899 DO EXON 5, DO GENE *FCN3*



As bandas 748 pb correspondem ao produto amplificado do gene *FCN3*. As bandas de 500 pb são produtos da amplificação do controle endógeno da reação, do gene *FCN2*. O MIX 1 contém iniciadores específicos amplificam o fragmento contendo a deleção no SNP exon 5; o MIX 2 contém iniciadores específicos amplificam o fragmento contendo o alelo citosina do SNP exon 5. A amostra AR228 possui o genótipo exon5*DELC*, as demais exon5*CC*.

FIGURA 17. PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs28362807 DO INTRON 5 E rs4494157 DO INTRON 7, DO GENE *FCN3*



As bandas 984 pb correspondem ao produto amplificado do gene *FCN3*. As bandas de 431 pb são produtos da amplificação do controle endógeno da reação, do gene *HGH*. O MIX 1 contém iniciadores específicos amplificam o fragmento contendo a deleção no SNP intron 5 e o alelo citosina no SNP intron 7; o MIX 3 contém iniciadores específicos amplificam o fragmento contendo a inserção no SNP intron 5 e o alelo citosina no SNP intron 7; por fim, o MIX 4 contém iniciadores específicos que amplificam o fragmento contendo a inserção no SNP intron 5 e o alelo adenina no SNP intron 7. As amostras possuem os seguintes genótipos: AR07 intron5*DELDEL*/intron7*CC*, AR12 e AR170 intron5*INSINS*/intron7*AA*, AR166 intron5*DELINS*/intron7*CC* e AR244 intron5*DELINS*/intron7*CC*.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FICOLINA-1

A concentração de ficolina-1 nas amostras controle foi avaliada em outro trabalho. A quantificação foi feita por ELISA (SEA786Hu Cloud-Clone Corp, Texas, USA).

#### 4.5 ANÁLISE *IN SILICO*

O banco de dados UCSC Human Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) foi utilizado para avaliar se os SNPs de *FCN1* estudados teriam potencial para alterar a afinidade de proteínas regulatórias à região promotora do gene. A ferramenta utilizada neste banco de dados mostra

quais proteínas se ligam à região promotora do gene de interesse, bem como o local de sua ligação através de resultados de Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina. As proteínas são identificadas através de anticorpos específicos, enquanto o DNA é avaliado por sequenciamento. Além disso, os dados do GTEx (Genotype-Tissue Expression) ([www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org)) foram utilizados para observar a expressão de mRNA do gene *FCN1* com relação aos SNPs -542G>A e -144C>A no sangue total, tecido mamário e adiposo.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genóticas foram determinadas através de contagem direta e os haplótipos foram inferidos através dos algoritmos EML e EBL utilizando o programa ARLEQUIM v.3.1. Para avaliar se era possível agrupar as amostras de controle provenientes de diferentes origens foi realizado um teste de diferenciação populacional também no programa ARLEQUIM v.3.1 - Teste Exato de Diferenciação de Amostras Baseado em Frequências Genóticas - de Raymond e Rousset (1995). 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, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. As comparações entre médias foram feitas através do teste 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, RF, habito de fumar e duração da doença 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 foram considerados significativos. Para auxiliar a análise estatística deste trabalho foi utilizado o programa “GraphPad Prism – versão 3.0” e Excel.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES COM AR E CONTROLES

As características demográficas, étnicas (autodeclarados) e clínicas dos pacientes e controles avaliados estão descritas na TABELA 4. Não houve diferença de idade, sexo e etnia entre controles e pacientes.

Os pacientes foram divididos em quatro classes funcionais: I, II, III e IV que indicam a gravidade da doença. Os pacientes das classes III e IV foram agrupados devido ao baixo número de amostras. A mediana da idade do início da doença foi de 44 anos (variando entre 16 a 71 anos).

Entre os pacientes, a concentração média de Anti-CCP encontrada foi de 113,92 U/ml e a do FR observada foi de 330,48 U/ml. A frequência de positividade para Anti-CCP ( $\geq 20$  U/ml) e FR ( $\geq 30$  U/ml) foi de 76,0% e 70,5%, respectivamente. A frequência de positividade para Anti-CCP foi menor em pacientes da classe I (67,6%) quando comparados com pacientes da classe II (84,7%) ( $p = 0,0262$ ). Já a frequência de positividade para FR para essas classes foi 63,4% e 76,3%, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa na análise do FR. Para as classes III e IV, a frequência de positividade ficou em 81,25%, tanto para o anti-CCP quanto para o FR.

A presença de nódulos foi superior nos pacientes da classe II (10,2%) em relação aos das classes I e III + IV (4,2% e 6,3%, respectivamente). Síndrome de Sjogren estava presente em 35,8% e 37,8% dos pacientes Anti-CCP e FR positivos, respectivamente, enquanto a presença de doenças cardiovasculares foi de 7,2% e 5,8% nestes pacientes. Os casos de infecção recorrente apresentaram frequência de 13,1% e 14,3% pacientes Anti-CCP e FR positivos, respectivamente. Pacientes com presença de nódulos tiveram maior frequência de casos de aborto (14,3%) quando comparados com pacientes Anti-CCP positivo (4,3%) e pacientes com FR positivo (1,2%). Pacientes com anti-CCP positivo e FR positivo faziam menor uso do tabaco (39,6% e 37,9%, respectivamente) enquanto que 70% dos pacientes com presença de nódulos eram tabagistas. No entanto, nenhuma dessas características avaliadas (Sjogren, presença de doenças cardiovasculares,

infecção recorrente, presença de aborto, tabagismo) atingiu significância estatística.

TABELA 4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES COM AR E CONTROLES AVALIADOS

<b>Características</b>	<b>Controles</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Anti-CCP (≥20 U/ml)</b>	<b>FR (≥30 U/ml)</b>	<b>Presença de Nódulos</b>
<b>Número Amostral (n)</b>	160	148	111	103	10
<b>Idade (média)</b>	49,3	50,3	51,8	51,2	50,1
<b>Sexo (masc./fem.)</b>	(34/125)	(23/123)	(17/94)	(16/87)	(3/7)
<b>Etnia</b>					
<b>Afrodescendente</b>	19	36	28	27	4
<b>Euro-descendente</b>	138	109	82	75	6
<b>Indígena</b>	2	1	1	1	0
<b>Oriental</b>	1	0	0	0	0
<b>Sjögren (não/sim)</b>		(74/32)	(52/29)	(46/28)	(5/1)
<b>Doença Cardiovascular (não/sim)</b>		(138/8)	(103/8)	(97/6)	(10/0)
<b>Infecção Recorrente (não/sim)</b>		(115/20)	(93/14)	(84/14)	(7/1)
<b>Aborto (não/sim)</b>		(118/5)	(90/4)	(86/1)	(6/1)
<b>Tabagismo (não/sim)</b>		(88/58)	(67/44)	(64/39)	(3/7)
<b>Idade de Início da Doença (&lt;40 anos/≥40 anos)</b>		(58/88)	(42/69)	(40/63)	(6/4)
<b>Classe Funcional I</b>		71	48	45	3
<b>Classe Funcional II</b>		59	50	45	6
<b>Classe Funcional III e IV</b>		16	13	13	1

NOTA: Dois dos 148 pacientes avaliados não possuem informações clínicas. LEGENDA: FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico;

Quanto ao início da doença, os pacientes da classe I tiveram a doença diagnosticada aos 42 anos e da classe II aos 43 anos de idade. Já para classes III e IV, quase metade dos pacientes (56,3%) teve diagnóstico antes dos 40 anos de idade. Todavia, a idade de início da doença não apresentou significância estatística.

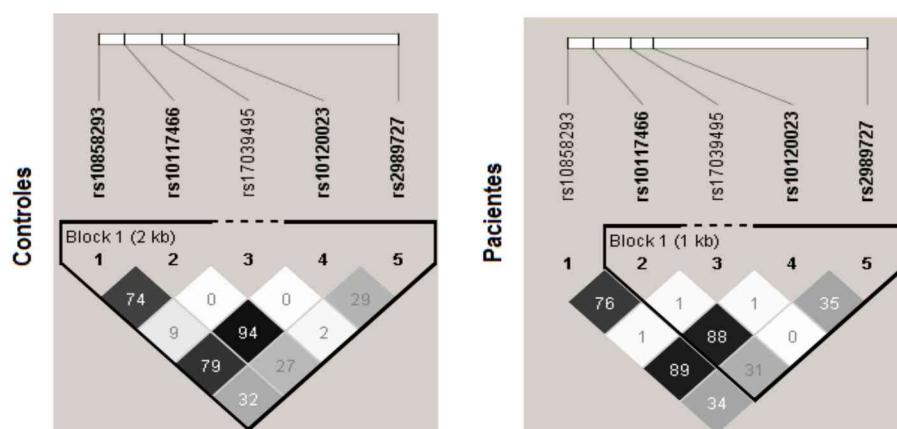
## 5.2 POLIMORFISMOS DO GENE *FCN1*

Foi realizado o teste de diferenciação populacional e não foi encontrada diferença significativa entre os três grupos controle coletados, indicando que poderiam ser agrupados. A distribuição genotípica dos SNPs de *FCN1* não foi diferente da esperada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg em controles e pacientes. 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, indicando que os resultados de genotipagem são confiáveis.

Observamos também que a frequência dos genótipos entre amostras de afro e euro-descendentes não foi diferente em pacientes e controles. Da mesma forma, não houve diferença significativa entre pacientes e controles euro-descendentes assim como entre pacientes e controles afrodescendentes. Desta forma, as etnias foram agrupadas para as análises de associação.

A análise de desequilíbrio de ligação (DL) entre os polimorfismos de *FCN1* indicou que o mais significativo DL se observou entre os SNPs rs10120023 (-542G>A) e rs10117466 (-144C>A), tanto em controles como em pacientes, como indicado pelos valores de coeficientes de correlação ( $r^2$ ) na FIGURA 18. Uma evidência de recombinação foi encontrada entre o SNP rs10858293 (+33T>G) do exon 1 e as variantes da região promotora em pacientes. O SNP rs17039495 (-399G>A) parece não estar em DL com os demais polimorfismos avaliados.

FIGURA 18. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs DE *FCN1* AVALIADOS



O DL foi calculado com base nos dados para controles e pacientes com AR. Os quadrados pretos representam alto DL, enquanto os brancos representam baixo DL, conforme mensurado pelo  $r^2$  entre os SNPs, valores os quais estão indicados dentro dos quadrados. A identificação e posição relativa dos SNPs estão nas abscissas.

### 5.2.1 Associação de polimorfismos do gene *FCN1* com a AR

A TABELA 5 apresenta os resultados de frequência genotípica e alélica dos polimorfismos de *FCN1* avaliados. Observou-se que as frequências do genótipo GG e alelo G do SNP -542G>A foram maiores em pacientes que em controles ( $p=0,025$  OR=1,69 {1,07 - 2,69} e  $p=0,041$  OR=1,47 {1,02 - 2,121}, respectivamente), indicando uma associação de risco com a doença. Além disso, o genótipo -144CC também se apresentou mais frequente em pacientes que em controles, embora após correção por regressão logística binária a significância foi limítrofe ( $p = 0,055$  OR = 1,57 {0,99 - 2,51}). Todos os valores de significância foram corrigidos por regressão logística binária.

TABELA 5. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE *FCN1* EM PACIENTES E CONTROLES

Polimorfismos da <i>FCN1</i>	Controles (%)	Pacientes (%)	Anti-CCP ( $\geq 20$ U/ml) (%)	FR ( $\geq 30$ U/ml) (%)	Presença de Nódulos (%)	Controles vs. Pacientes
<b>rs2989727 -1981G&gt;A</b>	n = 159	n = 148	n = 111	n = 103	n = 10	
Genótipo						
GG	23,9	23,6	20,7	20,4	20,0	ns
AG	44,7	55,4	57,7	60,2	50,0	ns
AA	31,4	21	21,6	19,4	30,0	ns
Alelo						
A	53,8	48,6	50,5	49,5	55,0	ns
G	46,2	51,4	49,5	50,5	45,0	ns
<b>rs10120023 -542G&gt;A</b>	n = 157	n = 146	n = 109	n = 102	n = 10	
Genótipo						
GG	46,5	60,3	55	58,8	50,0	p=0,025 OR=1,69 {1,07 - 2,69}
AG	47,8	34,9	41,3	38,2	40,0	ns
AA	5,7	4,8	3,7	3,0	10,0	ns
Alelo						
G	70,4	77,7	75,7	77,9	70,0	p=0,041 OR=1,47 {1,02 - 2,12}
A	29,6	22,3	24,3	22,1	30,0	

Polimorfismos da <i>FCN1</i>	Controles (%)	Pacientes (%)	Anti-CCP ( $\geq 20$ U/ml) (%)	FR ( $\geq 30$ U/ml) (%)	Presença de Nódulos (%)	Controles vs. Pacientes
<b>rs17039495 -399G&gt;A</b>	n = 155	n = 148	n = 111	n = 103	n = 10	
Genótipo						
GG	98,7	94,6	94,6	94,2	90,0	ns
AG	1,3	5,4	5,4	5,8	10,0	ns
AA	0	0	0	0	0,0	ns
Alelo						
G	99,4	97,3	97,3	97,1	95,0	ns
A	0,6	2,7	2,7	2,9	5,0	ns
<b>rs10117466 -144C&gt;A</b>	n = 157	n = 146	n = 109	n = 102	n = 10	
Genótipo						
CC	51	62,3	57,8	61,8	50,0	p=0,055 OR=1,57 {0,99 - 2,51}
AC	43,9	32,9	38,5	35,3	40,0	ns
AA	5,1	4,8	3,7	2,9	10,0	ns
Alelo						
C	72,9	78,8	77,1	79,4	70,0	ns
A	27,1	21,2	22,9	20,6	30,0	ns
<b>rs10858293 +33G&gt;T</b>	n = 155	n = 148	n = 111	n = 103	n = 10	
Genótipo						
GG	49	56,1	50,5	52,4	40,0	ns
GT	43,9	40,5	46,8	44,7	50,0	ns
TT	7,1	3,4	2,7	2,9	10,0	ns
Alelo						
G	71	76,4	73,9	74,8	65,0	ns
T	29	23,6	26,1	25,2	35,0	ns

NOTA: Valor do intervalo de confiança indicado entre chaves. Dois dos 148 pacientes avaliados não possuem informações clínicas. LEGENDA: FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; n: número de indivíduos; ns: valor de p não significativo; OR: odds ratio.

Os cinco polimorfismos de *FCN1* avaliados resultaram na combinação de sete haplótipos (*GGGCG*, *AAGAT*, *AGGCG*, *AAGCT*, *AAGAG*, *AGACT*, *AGGCT*). Com a exceção do haplótipo *AGGCT*, presente apenas em pacientes, todos os demais foram observados em pacientes e controles, sendo que o haplótipo *GGGCG* foi o mais frequente em ambos os grupos. O haplótipo *FCN1* *AAGAG* foi associado a ausência de FR (<30 U/ml), (p= 0,0065 OR=0,04173 {0,002–0,8}). Os demais haplótipos de *FCN1* não foram significativamente associados à susceptibilidade à AR, classes funcionais e

apresentação clínica da doença. As frequências dos haplótipos nos grupos avaliados estão apresentadas na TABELA 6.

TABELA 6. FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DE *FCN1* EM PACIENTES COM AR E CONTROLES

Haplótipos de <i>FCN1</i>	Controles % n = 306	Pacientes % n = 292	Anti-CCP (≥20 U/ml) (%) n = 218	FR (≥30 U/ml) (%) n = 204	Presença de Nódulos (%) n = 20	FR >30 vs. FR ≥30 U/ml
<b>GGGCG</b>	45,8	50,7	48,6	50,0	45	ns
<b>AAGAT</b>	25,8	19,9	22	20,6	30	ns
<b>AGGCG</b>	23,5	24,0	23,9	24,5	20	ns
<b>AAGCT</b>	2,6	1,0	1,4	1,5	0	ns
<b>AAGAG</b>	1,6	1,4	0,9	0,0	0	p = 0,0065 OR=0,0417 {0,002 – 0,8}
<b>AGACT</b>	0,7	2,7	2,7	2,9	5	ns
<b>AGGCT</b>	0,0	0,3	0,5	0,5	0	ns

NOTA: Valor do intervalo de confiança indicado entre chaves. Dois dos 148 pacientes avaliados não possuem informações clínicas. LEGENDA: FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; n: número de cromossomos; ns: valor de p não significativo; OR: odds ratio.

Considerando o alto DL entre os SNPs -542G>A e -144C>A, essas variantes foram avaliadas em conjunto. Nas TABELAS 7 e 8 estão descritas as frequências dos genótipos e diplótipos considerando ambos os SNPs. O genótipo -542G-144C/-542G-144C e diplótipo -542G;-144C foram associados à susceptibilidade à AR com maior frequência nos pacientes do que em controles (p=0,025 OR=1,69 {1,07 - 2,69} e p=0,050 OR=1,47 {0,99 - 2,18}, respectivamente), embora, a correção por regressão logística binária tenha enfraquecido a significância para o diplótipo -542G;-144C. Os demais genótipos e haplótipos avaliados não apresentaram resultados significativos.

As frequências de genótipos, alelos e haplótipos de *FCN1* em pacientes ainda foram avaliadas quanto à dupla positividade para os anticorpos Anti-CCP e para o FR, porém não foram observados valores significativos após correção por regressão logística (TABELA 9). A ocorrência de síndrome de Sjögren, doenças cardiovasculares, infecções recorrentes, aborto espontâneo, presença de nódulos, assim como o uso do tabaco, idade de início da doença e sua

duração também não apresentaram relação com os polimorfismos de *FCN1* avaliados.

TABELA 7. EFEITO ADITIVO DOS GENÓTIPOS DOS SNPs -542G>A E -144C>A EM PACIENTES COM AR E CONTROLES

Genótipos	Controles %	Pacientes %	Anti-CCP (≥20 U/ml) (%)	FR (≥30 U/ml) (%)	Presença de Nódulos (%)	Controles vs. Pacientes
	n = 157	n = 146	n = 109	n = 102	n = 10	
-542A-144A/ -542A-144A	5,1	4,8	3,7	2,9	10,0	ns
-542A-144A/ -542G-144C	43,3	32,9	38,5	35,3	40,0	ns
-542A-144A/ -542A-144C	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	ns
-542A-144C/ -542G-144C	4,5	2,0	2,8	2,9	0,0	ns
-542G-144C/ -542G-144C	46,5	60,3	55,0	58,9	50,0	p=0,025 OR=1,69 {1,07 - 2,69}

NOTA: Valor do intervalo de confiança indicado entre chaves. Dois dos 148 pacientes avaliados não possuem informações clínicas. LEGENDA: FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; n: número de indivíduos; ns: valor de p não significativo; OR: odds ratio.

TABELA 8. FREQUÊNCIA DOS DIPLÓTIPOS DOS SNPs -542G>A E -144C>A

Diplótipos	Controles %	Pacientes %	Anti-CCP (≥20 U/ml) (%)	FR (≥30 U/ml) (%)	Presença de Nódulos (%)	Controles vs. Pacientes
	n = 306	n = 292	n = 218	n = 204	n = 20	
-542G; -144C	69,9	77,8	75,7	77,9	70,0	p=0,050 OR=1,47 {0,99 - 2,18}
-542A; -144A	27,5	21,2	22,9	20,6	30,0	ns
-542A; -144C	2,6	1,0	1,4	1,5	0,0	ns

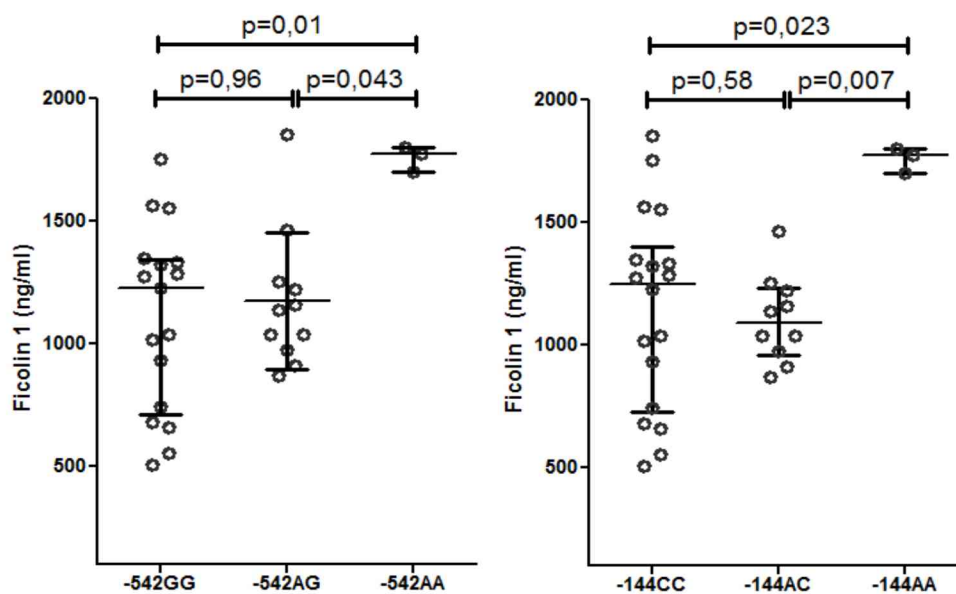
NOTA: Valor do intervalo de confiança indicado entre chaves. Dois dos 148 pacientes avaliados não possuem informações clínicas. LEGENDA: FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; n: número de cromossomos; ns: valor de p não significativo; OR: odds ratio.

TABELA 9. FREQUÊNCIA DE PACIENTES DUPLO POSITIVOS PARA OS ANTICORPOS ANTI-CCP E FR PARA OS POLIMORFISMOS DE *FCN1*

Polimorfismos da <i>FCN1</i>	Duplo Positivo (%)	Demais Classes (%)
<b>rs2989727 -1981G&gt;A</b>		
GG	19,2	30,8
AG	60,6	46,1
AA	20,2	23,1
<b>rs10120023 -542G&gt;A</b>		
GG	55,9	68,6
AG	40,9	23,5
AA	3,2	7,9
<b>rs17039495 -399G&gt;A</b>		
GG	94,7	94,2
AG	5,3	5,8
AA	0,0	0,0
<b>rs10117466 -144C&gt;A</b>		
CC	59,2	68,6
AC	37,6	23,5
AA	3,2	7,9
<b>rs10858293 +33G&gt;T</b>		
GG	50	67,3
GT	46,8	28,8
TT	3,2	3,9

### 5.2.2 Concentração de ficolina-1 em controles

FIGURA 19. CONCENTRAÇÃO DE FICOLINA-1 EM RELAÇÃO AOS GENÓTIPOS -542 E -144 NO GRUPO CONTROLE

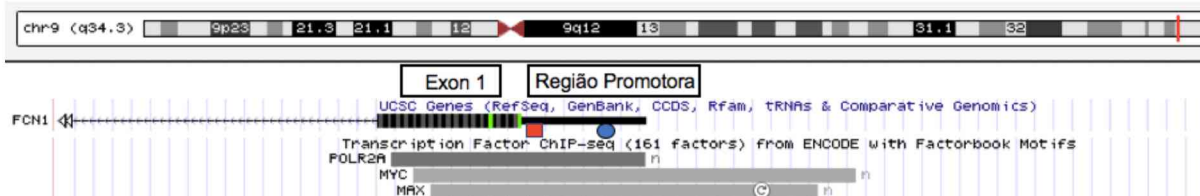


A concentração de ficolina-1 foi avaliada em 31 controles, sendo que a média de ficolina-1 no soro foi de 1208 ng/mL, variando entre 488-2852 ng/mL. Quando a concentração de ficolina-1 foi avaliada quanto aos polimorfismos de *FCN1*, observamos que os genótipos -542GG e -542AG, bem como -144CC e -144AC, foram associados a menores concentrações de ficolina-1 quando comparado aos genótipos -542AA e -144AA, respectivamente ( $p=0,01$  e  $p=0,043$ ;  $p=0,023$  e  $p=0,007$ , respectivamente), FIGURA 19. Não foi observada associação com os demais SNPs.

### 5.2.3 Análise *in silico*

Como os polimorfismos de *FCN1* avaliados pertencem à região promotora do gene, esses podem estar relacionados à alteração na afinidade de ligação de proteínas que atuam na regulação do gene, o que poderia resultar em alteração na expressão da ficolina-1. A análise *in silico*, realizada através do UCSC Human Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>), mostrou que diferentes proteínas reguladoras como a RNA polimerase II, c-Myc (homólogo ao retroviral *v-myconcogene*) e MAX se ligam à região promotora do gene *FCN1*, conforme observado pelo ensaio de imunoprecipitação da cromatina (FIGURA 20).

FIGURA 20. ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA

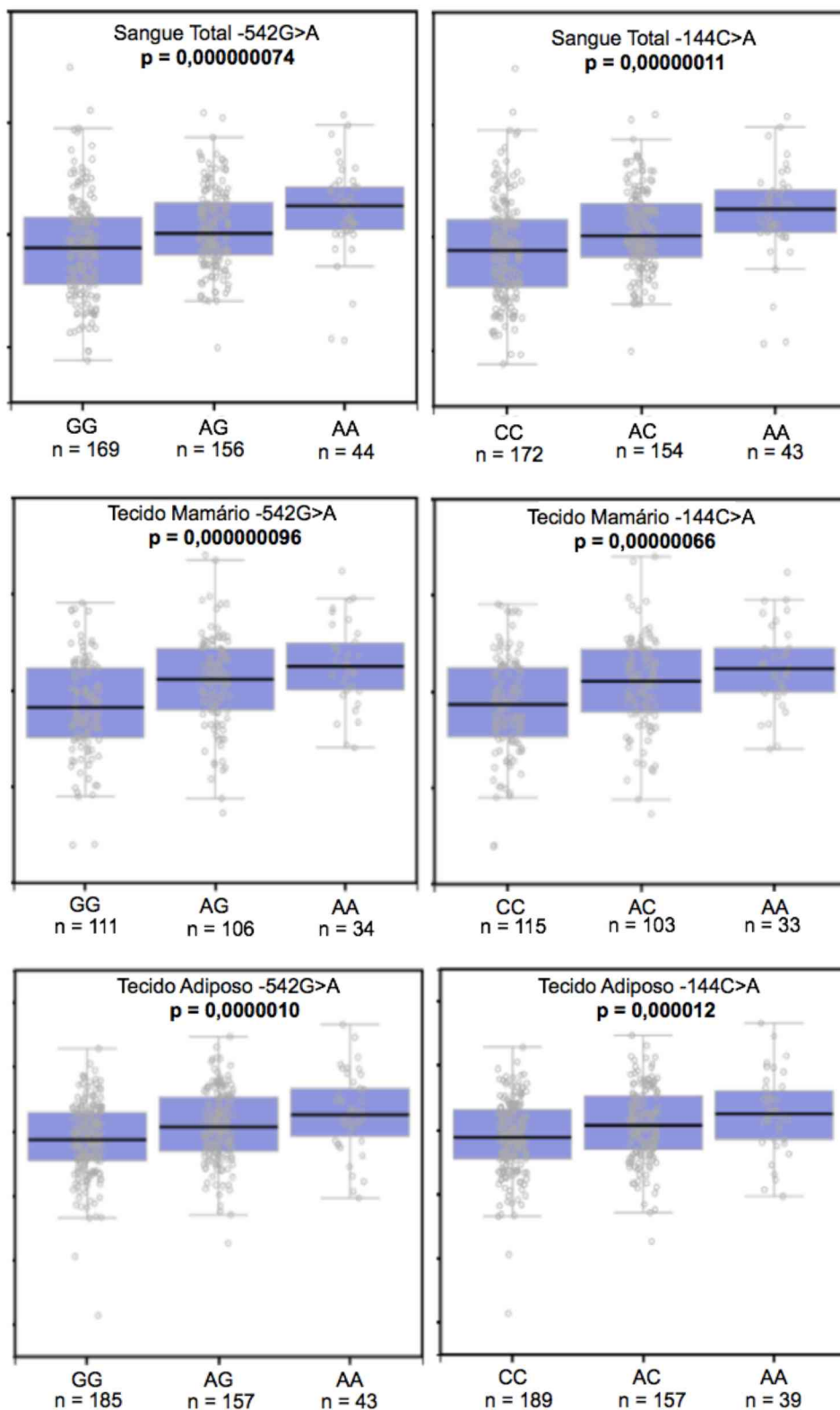


Representação gene *FCN1* que está localizado no cromossomo 9. Diferentes proteínas reguladoras se ligam à região promotora do gene, são elas: POLR2A (RNA polimerase II), MYC (homólogo ao retroviral *v-myconcogene*) e MAX (UCSC HumanGenome Browser). O círculo azul representa a posição do SNP -542 e o quadrado vermelho, do SNP -144.

Usando o banco de dados do GTEx (Genotype-Tissue Expression) avaliamos a expressão de mRNA do gene *FCN1* com relação aos SNPs -542G>A e -144C>A no sangue total, tecido mamário e adiposo ([www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org)). Nesses tecidos a concentração de mRNA encontra-se diminuída em amostras com genótipo -542GG e -144CC em relação aos genótipos -542AA e -144AA (FIGURA 21), corroborando a hipótese de que a

ficolina-1 deve estar diminuída em pacientes com AR, já que os genótipos -542GG e -144CC foram relacionados à AR.

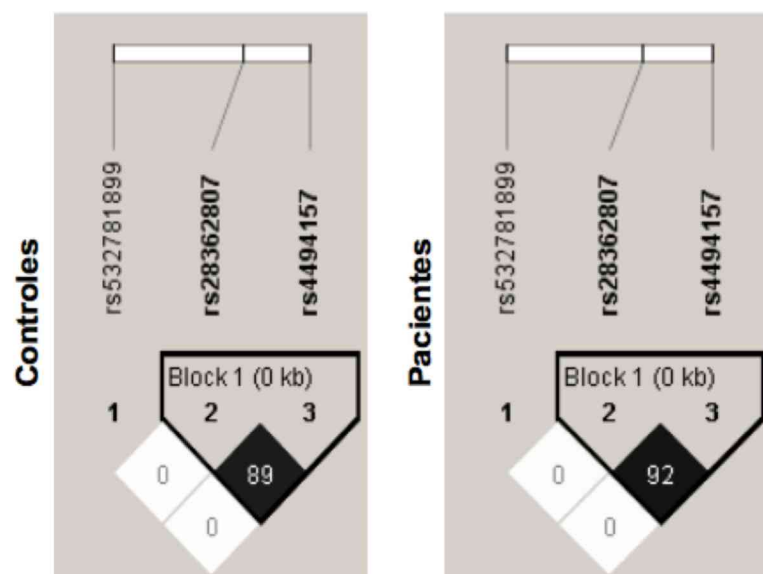
FIGURA 21. EXPRESSÃO DE mRNA DO GENE *FCN1* EM DIFERENTES TECIDOS EM RELAÇÃO AOS SNPs -542 E -144



### 5.3 POLIMORFISMOS DO GENE *FCN3*

Foi realizado o teste de diferenciação populacional e não foi encontrada diferença significativa entre os três grupos controle coletados, indicando que poderiam ser agrupados. A distribuição genotípica dos SNPs de *FCN3* está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em controles e pacientes. E a frequência de genótipos e alelos dos SNPs avaliados não foi diferente da descrita no banco de dados do Ensembl para os controles, indicando que os resultados de genotipagem são confiáveis. Observamos também que a frequência dos genótipos entre amostras de afro e euro-descendentes não foi diferente em pacientes e controles, bem como entre pacientes e controles euro-descendentes assim como entre pacientes e controles afrodescendentes. Portanto, afro e euro-descendentes foram agrupados para as análises de associação.

FIGURA 22. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs DE *FCN3* AVALIADOS EM PACIENTES COM AR E CONTROLES



O DL foi calculado com base nos dados para controles e pacientes com AR. Os quadrados pretos representam alto DL, enquanto os brancos representam baixo DL, conforme mensurado pelo  $r^2$  entre os SNPs, valores os quais estão indicados dentro dos quadrados. A identificação e posição relativa dos SNPs estão nas abscissas.

A análise de DL entre os polimorfismos de *FCN3* indicou um forte DL entre os SNPs rs28362807 (g.3524\_3532insTATTTGGCC) no intron 5 e rs4494157 (g.4473C>A) no intron 7, tanto em controles e em pacientes

(FIGURA 22). Uma evidência de recombinação foi encontrada entre o SNP rs532781899 (g.1637delC) do exon 5 e as demais variantes.

### 5.3.1 Associação dos polimorfismos e haplótipos do gene *FCN3* com AR

TABELA 10. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs DE *FCN3* EM PACIENTES COM AR E CONTROLES

<i>FCN3</i> SNPs	Controles %	Pacientes %	Anti-CCP (≥20 U/ml) (%)	FR (≥30 U/ml) (%)	Presença de Nódulos (%)
<b>rs532781899 C&gt;DEL Exon 5</b>	<b>n = 160</b>	<b>n = 148</b>	<b>n = 111</b>	<b>n = 103</b>	<b>n = 10</b>
Genótipo					
CC	95,6	95,9	95,5	95,1	100
DELC	4,4	4,1	4,5	4,9	0,0
Alelo					
C	97,8	98	97,7	97,6	100
DEL	2,2	2	2,3	2,4	0,0
<b>rs28362807 DEL&gt;INS Intron 5</b>	<b>n = 151</b>	<b>n = 147</b>	<b>n = 110</b>	<b>n = 103</b>	<b>n = 10</b>
Genótipo					
DELDEL	60,3	50,4	52,7	49,5	60,0
DELINS	32,4	40,8	37,3	40,8	40,0
INSINS	7,3	8,8	10	9,7	0,0
Alelo					
DEL	76,5	70,7	71,4	69,9	80,0
INS	23,5	29,3	28,6	30,1	20,0
<b>rs4494157 C&gt;A Intron 7</b>	<b>n = 151</b>	<b>n = 147</b>	<b>n = 110</b>	<b>n = 103</b>	<b>n = 10</b>
Genótipo					
CC	64,2	53,1	54,4	53,4	70,0
CA	28,5	38,8	36,4	37,9	30,0
AA	7,3	8,1	9,1	8,7	0,0
Alelo					
C	78,5	72,4	72,7	72,3	85,0
A	21,5	27,6	27,3	27,7	15,0

NOTA: Dois dos 148 pacientes avaliados não possuem informações clínicas. LEGENDA: FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; n: número de indivíduos.

Não encontramos associação entre os genótipos e alelos do gene *FCN3* com valores de Anti-CCP e FR positivos, presença de nódulos ou susceptibilidade à AR (TABELA 10). Os três SNPs de *FCN3* avaliados resultaram na combinação de quatro haplótipos (*C del C*, *C insA*, *C ins C* e *del del C*), observados em controles e pacientes, sendo que o haplótipo *C del C* foi o mais frequente em ambos os grupos. As frequências dos haplótipos nos grupos avaliados estão apresentadas na TABELA 11.

Além disso, os genótipos/alelos e haplótipos de *FCN3* avaliados não apresentaram relação com fatores clínicos como a síndrome de Sjögren, doenças cardiovasculares, infecções recorrentes, aborto espontâneo, uso do tabaco, idade de início e duração da doença.

TABELA 11. FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS SNPS DE *FCN3* EM PACIENTES COM AR E CONTROLES

Haplótipos <i>FCN3</i>	Controles %	Pacientes %	Anti-CCP (≥20 U/ml) (%)	FR (≥30 U/ml) (%)	Presença de Nódulos (%)
	n = 302	n = 294	n = 220	n = 206	n = 10
<i>C del C</i>	74,5	68,7	69,0	67,5	80,0
<i>C ins A</i>	21,5	27,6	27,3	27,7	15,0
<i>C ins C</i>	2,0	1,7	1,4	2,4	5,0
<i>del del C</i>	2,0	2,0	2,3	2,4	0,0

NOTA: Dois dos 148 pacientes avaliados não possuem informações clínicas. LEGENDA: FR: fator reumatoide; Anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico; n. número de cromossomos.

## 6 DISCUSSÃO

A AR é uma doença altamente incapacitante, os pacientes acometidos têm sua expectativa de vida significativamente reduzida (TURESSON; MATTESON, 2009) e aproximadamente 50% deles perdem a capacidade laboral após 10 anos do diagnóstico da doença (GOELDNER et al., 2011). O diagnóstico precoce por meio de marcadores sorológicos é de fundamental importância para prevenção de agravos. Atualmente, os marcadores sorológicos utilizados no diagnóstico são o FR e o anti-CCP. No entanto, esses marcadores têm suas limitações e não podem ser utilizados para o monitoramento da atividade da doença. Assim, exames clínicos, físicos,

radiográficos e de avaliação da limitação funcional são utilizados para avaliar a progressão da AR (MOTA et al., 2011). Portanto, a busca de novos conhecimentos tanto para diagnóstico quanto para o acompanhamento da doença é fundamental.

O sistema complemento é um componente chave da imunidade inata e desempenha um papel significativo no desenvolvimento e apresentação clínica da AR (BELTRAME et al., 2014; GOELDNER et al., 2014). Entre as funções do complemento estão a lise de patógenos, a capacidade de auxiliar na remoção de complexos imunes, debris celulares e células apoptóticas, além de estar associado à reparação tecidual. No entanto, o complemento pode ser ativado inadvertidamente através da falha na remoção de debris, mecanismo que pode contribuir para a ocorrência de doenças relacionadas à idade. Durante os primeiros estágios do início da doença, o complemento tem um papel importante na depuração de debris celulares e consequente prevenção da progressão da doença. Uma vez que os destroços começam a se acumular e não podem ser eliminados de forma eficiente, a ativação perpétua da cascata do complemento induz inflamação e danos nos tecidos que conduzem a processos degenerativos (RICKLIN et al., 2016).

As ficolinas são capazes de ativar o complemento através da via das lectinas. Estudos mostram que elas possuem distribuição tecido dependente, compartilham afinidade comum a compostos acetilados, no entanto, diferem na especificidade de ligação à esses compostos (GARRED et al., 2016), sugerindo que cada ficolina tenha uma função específica (ENDO et al., 2015). Além disso, as ficolinas estão envolvidas na remoção de células apoptóticas (KURAYA et al., 2005). Um estudo recente mostrou que a ficolina-1 é capaz de reconhecer mitocôndrias (BRINKMANN et al., 2013), enquanto a ficolina B de rato (ortóloga a ficolina-1 humana) reconhece células apoptóticas e necróticas (SCHMID et al., 2012), indicando que a ficolina-1 também teria um papel na remoção de debris celulares e na manutenção da homeostase (GARRED et al., 2016). MA et al., 2013, observaram que a ficolina-1 é importante para mediar a remoção de células apoptóticas e debris celulares através da sua interação com a pentraxina 3. Esses dados sugerem um papel das ficolinas na patogênese de doenças autoimunes.

Na AR, níveis elevados de ficolina-1 foram associados a maior atividade da doença (AMMITZBOLL et al., 2013), enquanto os resultados de associação com polimorfismos de *FCN1* e AR são controversos. Um estudo em pacientes da Bélgica relatou que dois SNPs da ficolina-1 foram associados ao desenvolvimento da AR, com aumento do alelo A do SNP -1981 (rs2989727) da região promotora do gene *FCN1* e do alelo G do SNP rs1071583 no exon 9 (CRUYSSSEN et al., 2007). No entanto, outro estudo realizado na população brasileira avaliando esses dois SNPs não encontrou associação com a AR (ADDOBBATI et al., 2016). Essa diferença provavelmente se deve ao fato de que as frequências genotípicas variam entre diferentes populações conforme relatado por Hummelshoj et al., 2008.

A concentração sérica da ficolina-1 está relacionada à diferentes SNPs do gene *FCN1*. O genótipo AA do polimorfismo -144C>A (rs10117466) foi associado ao aumento da concentração da ficolina-1. No entanto, outras mutações como Ala218Thr (rs148649884) e Asn289Ser (rs138055828) foram relacionadas à menor concentração da proteína, sendo que Ser268Pro (rs150625869) leva à perda da produção de ficolina-1 (AMMITZBOLL, et al., 2012).

O presente trabalho avaliou cinco SNPs do gene *FCN1* presentes na região promotora e exon 1 do gene, bem como, três polimorfismos de *FCN3*. Todos os SNPs avaliados foram previamente descritos e associados com a alteração na expressão proteica de ficolina 1 e 3 (MUNTHER-FOG et al., 2008; AMMITZBOLL, et al., 2012; ANDRADE et al., 2017). Sendo este o primeiro trabalho a investigar a relação dos SNPs -542G>A, -399G>A, -144C>A e +33G>T de *FCN1* e g.1637delC, g.3524\_3532insTATTTGGCC e g.4473C>A de *FCN3* com AR.

Observamos que os genótipos -542GG, -144CC e -542G-144C/-542G-144C, bem como o alelo -542G do gene *FCN1*, mostraram-se associados com a susceptibilidade à AR, porém não com as classes funcionais ou outras características clínicas da doença, e o diplótipo -542G;-144C também foi mais frequente em pacientes do que em controles, embora a correção por regressão logística tenha enfraquecido a significância. Os valores de associação com a AR foram mais fortes quando o SNP -542 foi avaliado isolado, contudo, diante do alto valor de DL observado entre as variantes -542 e -144, bem como os

resultados das análises combinando os SNPs, não podemos dispensar a hipótese de que ambos tenham relação com a AR. Uma amostragem maior seria necessária para conclusões definitivas.

Estudos prévios já apontaram um papel dos SNPs -542G>A e -144C>A na susceptibilidade à degeneração macular relacionada à idade e à Hanseníase (ANDERSON et al., 2010; BOLDT et al., 2013). BOLDT et al., 2013, observaram que o alelo -542G está associado com a susceptibilidade a Hanseníase, enquanto o alelo -144C mostrou-se relacionado à proteção para a doença. Por outro lado, os alelos -542A e -144A foram associados à diminuição de sobrevida em pacientes com inflamação sistêmica (MUNTHER-FOG et al., 2012).

No presente trabalho os genótipos -542GG e -144CC foram associados a níveis mais baixos de ficolina-1 no soro de controles, enquanto os genótipos -542AA e -144AA foram relacionados a níveis altos de proteína. Os dados obtidos através do banco GETx para a expressão de mRNA de *FCN1* no sangue total, tecido mamário e adiposo também apresentaram associação nesse mesmo padrão, corroborando nossos achados. Outros trabalhos também observaram o mesmo padrão de resultado em amostras de doadores de sangue (AMMITZBOLL, et al., 2012; MUNTHER-FOG et al., 2012), indicando um possível papel funcional para esses dois SNPs.

A análise *in silico* indicou que diferentes proteínas regulatórias se ligam à região onde ocorre os polimorfismos -542G>A e -144C>A. Existem evidências de que pelo menos 11 fatores de transcrição reconhecem essa região (MUNTHER-FOG et al., 2012; BOLDT et al., 2013). MUNTHER-FOG et al., 2012, sugeriram que os genótipos -542AA e -144AA poderiam facilitar a ligação de certos fatores de transcrição, o que resultaria na amplificação da expressão de *FCN1*. Assim, considerando nossos resultados e os descritos na literatura, podemos supor que os genótipos -542GG e -144CC de *FCN1*, associados à susceptibilidade à AR, poderiam resultar em menores concentrações de ficolina-1 também no soro dos pacientes com AR. A avaliação da concentração de ficolina-1 nesses pacientes em trabalhos futuros poderá confirmar esta hipótese.

Considerando o papel da ficolina-1 na depuração de debris celulares (SCHMID et al., 2012; MA et al., 2013; BRINKMANN et al., 2013; GARRED et

al., 2016), pode-se sugerir que baixas concentrações de ficolina-1 em pacientes com AR resultam em menor remoção de células apoptóticas bem como com consequente produção de autoantígenos e ativação da resposta inflamatória. Assim, -542GG e -144CC estariam associados à AR provavelmente por alterar a expressão de ficolina-1. Baixas concentrações de ficolina-1 foram observadas em pacientes com LES (TROLDBORG et al., 2015) e em pacientes com câncer hematológico que desenvolveram infecção grave após a quimioterapia (AMEYE et al., 2012).

No entanto, a hipótese levantada aqui deve ser interpretada com cuidado, uma vez que a avaliação dos níveis de ficolina-1 em pacientes não foi realizada. Além disso, níveis elevados de ficolina-1 em pacientes com AR quando comparado a controles foram observados por Ammitzboll et al., 2013. Contudo esses pacientes não foram avaliados quanto aos polimorfismos de *FCN1* (AMMITZBOLL et al., 2013). Dessa forma, estudos futuros com dosagem de ficolina 1 e avaliação dos SNPs -542 e -144 em pacientes com AR poderão elucidar se essa hipótese está correta.

Interessantemente, o haplótipo *FCN1* AAGAG foi associado a ausência de FR (< 30 U/ml), o qual está relacionado à menor gravidade da doença (MOTA et al., 2011). O haplótipo AAGAG apresenta os dois alelos associados a altas concentrações de ficolina-1 em controles (-542A e -144A). Esses resultados estão de acordo com a hipótese sugerida aqui, de que baixas concentrações de ficolina-1 resultam em menor remoção de células apoptóticas, reforçando a hipótese de que a ficolina-1 teria um papel na depuração de debris celulares na AR.

Já os SNPs *FCN1* -1981G>A, -399G>A e +33T>G não se apresentaram associados à susceptibilidade ou apresentação clínica da AR, o que nos leva a sugerir que estas variantes não estão envolvidas na patogênese da doença. Nossos resultados para o SNP -1981G>A foram divergentes dos encontrados por Cruyssen, et al., 2007, que observaram associação entre o alelo -1981A e a susceptibilidade à AR em pacientes da Bélgica. Recentemente, foi publicado outro estudo na população brasileira que não encontrou relação significativa entre o SNP -1981G>A e a AR, confirmando nossos achados (ADDOBBATI et al., 2016). Além disso, deve se considerar que os resultados discrepantes podem ser consequência de diferentes background étnicos, já que foi

demonstrado que as frequências genóticas variam entre as diferentes populações (HUMMELSHOJ et al., 2008).

Com relação aos polimorfismos de *FCN3* avaliados, embora eles tenham sido previamente associados com susceptibilidade a infecções de repetição, bem como com a modulação da expressão de ficolina-3 (MUNTHER-FOG et al., 2009; ANDRADE et al., 2017), nossos resultados indicam que esses não estão associados com a AR. Como a concentração de ficolina-3 não foi avaliada, não pode-se excluir a hipótese de associação. Este foi o primeiro estudo abordando polimorfismos de *FCN3* em pacientes com AR. Portanto, estudos futuros abordando a ficolina-3 em diferentes populações poderão elucidar a questão da associação ou não com a AR.

## 7 CONCLUSÕES

- Observamos uma associação entre os SNPs do gene *FCN1* -542G>A e -144C>A e a susceptibilidade à AR. Os genótipos -542GG e -144CC estão associados à AR provavelmente por impactar na regulação da expressão do gene, resultando em menor concentração de ficolina-1, refletindo em uma menor remoção de células apoptóticas, produção de autoantígenos e ativação da resposta inflamatória nestes pacientes. Já os SNPs *FCN1* -1981G>A, -399G>A e +33G>T não se apresentaram associados com a susceptibilidade ou apresentação clínica da AR
- Com relação aos polimorfismos do gene *FCN3*, não encontramos associação com AR. No entanto, a avaliação desses polimorfismos é inédita na literatura.
- Encontramos ainda associação entre o haplótipo *FCN1* AAGAG e a ausência de FR, o qual está relacionado à menor gravidade da doença. Esse resultado reforça a hipótese de que a ficolina-1 teria um papel na depuração de debris celulares na AR.
- Portanto, são necessários mais estudos, com maior número de amostras, bem como a quantificação de ficolina-1 nos pacientes para confirmar nossos achados. A ausência de associação dos polimorfismos da ficolina-3 com AR sugere que as ficolinas 1 e 3 desempenham diferentes papéis na doença.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2**. 2015.
- ADDOBBATI, C.; AZEVÊDO SILVA, J. DE; TAVARES, N. A. C.; et al. Ficolin Gene Polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. **Annals of Human Genetics**, v. 80, n. 1, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ahg.12129>>. Acesso em: 8/9/2016.
- AGGARWAL, R.; LIAO, K.; NAIR, R.; RINGOLD, S.; COSTENBANDER, K. H. Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Care & Research**, v. 61, n. 11, p. 1472–1483, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.24827>>. Acesso em: 26/7/2016.
- ALETAHA, D.; NEOGI, T.; SILMAN, A. J.; 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, 2010. Disponível em: <[https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/2010\\_revised\\_criteria\\_classification\\_ra.pdf](https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/2010_revised_criteria_classification_ra.pdf)>. Acesso em: 10/1/2018.
- AMEYE, L.; PAESMANS, M.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C.; AOUN, M. M-ficolin levels are associated with the occurrence of severe infections in patients with haematological cancer undergoing chemotherapy. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 167, n. 2, p. 303–308, 2012. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2011.04512.x>>. Acesso em: 10/12/2017.
- AMMITZBOLL, C. G.; KJAER, T. R.; STEFFENSEN, R.; et al. Non-Synonymous Polymorphisms in the FCN1 Gene Determine Ligand-Binding Ability and Serum Levels of M-Ficolin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- AMMITZBOLL, C. G.; THIEL, S.; ELLINGSEN, T.; et al. Levels of lectin pathway proteins in plasma and synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatology international**, v. 32, n. 5, p. 1457–63, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00296-011-1879-x/fulltext.html>>. Acesso em: 6/1/2016.
- AMMITZBØLL, C. G.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C.; et al. M-ficolin levels reflect disease activity and predict remission in early rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 65, n. 12, p. 3045–50, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022747>>. Acesso em: 6/1/2016.
- ANDERSON, D. H.; RADEKE, M. J.; GALLO, N. B.; et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: Hypothesis re-visited. **Progress in Retinal and Eye Research**, 2010.
- ANDRADE, F. A.; BELTRAME, M. H.; BINI, V. B.; et al. Association of a new FCN3 haplotype with high ficolin-3 levels in leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005409, 2017. Public Library of Science. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28241035>>. Acesso em: 10/12/2017.

ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A.; et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 31, n. 3, p. 315–24, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3358796>>. Acesso em: 11/7/2016.

BALLANTI, E.; PERRICONE, C.; MUZIO, G. DI; et al. Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: Relationship with anti-TNF inhibitors. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 10, p. 617–623, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21549221>>. Acesso em: 8/1/2018.

BELTRAME, M. H.; CATARINO, S. J.; GOELDNER, I.; BOLDT, A. B. W.; MESSIAS-REASON, I. J. DE. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Frontiers in pediatrics**, v. 2, p. 148, 2014. Frontiers Media SA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25654073>>. Acesso em: 20/11/2017.

BINI, V. B.; BOLDT, A. B. W.; ANDRADE, F. A. ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE FCN3 DA VIA DAS LECTINAS DO COMPLEMENTO COM O PÊNFIGO FOLIÁCEO. **Igarss 2014**, , n. 1, p. 1–5, 2015.

BOLDT, A. B. W.; SANCHEZ, M. I. N.; STAHLKE, E. R. S.; et al. Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 210–219, 2013.

BRINKMANN, C. R.; JENSEN, L.; DAGNÆS-HANSEN, F.; et al. Mitochondria and the lectin pathway of complement. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 12, p. 8016–27, 2013. American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23378531>>. Acesso em: 7/1/2018.

CAMPOS, A. P. R.; SILVA, C. M.; CASTO, S. S. DE; GRAMINHA, C. V. Depressão e qualidade de vida em indivíduos com artrite reumatoide e indivíduos com saúde estável: um estudo comparativo. **Fisioter Pesq**, v. 2, p. 401–407, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fp/v20n4/v20n4a16.pdf>>. Acesso em: 19/7/2016.

CHANG, K.; YANG, S. M.; KIM, S. H.; et al. Smoking and rheumatoid arthritis. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 12, p. 22279–95, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4284707&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7/5/2016.

CHEN, M.; DAHA, M. R.; KALLENBERG, C. G. M. The complement system in systemic autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. 276–286, 2010.

CRUYSSSEN, B.; NUYTINCK, L.; BOULLART, L.; et al. Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 46, n. 12, p. 1792–1795, 2007.

CRUYSSSEN, B. VANDER; NUYTINCK, L.; BOULLART, L.; et al. Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 46, n. 12, p. 1792–5, 2007. Disponível em:

<<http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/46/12/1792.long>>. Acesso em: 6/1/2016.

DEANE, K. D. Preclinical rheumatoid arthritis (autoantibodies): an updated review. **Current rheumatology reports**, v. 16, n. 5, p. 419, 2014. NIH Public Access. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24643396>>. Acesso em: 9/1/2018.

DEANE, K. D.; NORRIS, J. M.; HOLERS, V. M. Preclinical rheumatoid arthritis: identification, evaluation, and future directions for investigation. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 213–41, 2010. NIH Public Access. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510231>>. Acesso em: 7/2/2018.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement in host immunity 34 Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Nature**, v. 20, n. 20, p. 34–5034, 2009. Disponível em: <[www.nature.com/cr](http://www.nature.com/cr)>. Acesso em: 22/7/2016.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. New Insights into the Role of Ficolins in the Lectin Pathway of Innate Immunity. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 316, n. 1, p. 48–110, 2015. Disponível em: <pm:21190483>. .

EPP BOSCHMANN, S.; GOELDNER, I.; FRANCISCO TUON, F.; et al. Mannose-binding lectin polymorphisms and rheumatoid arthritis: A short review and meta-analysis. **Molecular Immunology**, v. 69, p. 77–85, 2016.

GARRED, P.; GENSTER, N.; PILELY, K.; et al. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 74–97, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12468>>. Acesso em: 20/11/2017.

GARRED, P.; HONORÉ, C.; MA, Y. J.; et al. The genetics of ficolins. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 3–16, 2009.

GIUSEPPE, D. DI; WALLIN, A.; BOTTAI, M.; ASKLING, J.; WOLK, A. Long-term intake of dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study of women. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 11, p. 1949–1953, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940215>>. Acesso em: 9/1/2018.

GOELDNER, I.; SKARE, T.; BOLDT, A. B. W.; et al. Association of MASP-2 levels and MASP2 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in patients and their relatives. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, I. T. DE M.; UTIYAMA, S. R. DA R. Rheumatoid arthritis: a current view. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 495–503, 2011. SBPC, SBP, SBC. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442011000500002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442011000500002&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 11/5/2016.

HAMBURG, J. P. VAN; TAS, S. W. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, 2017. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841117308016?via%3Dihub>>. Acesso em: 10/1/2018.

HOLSBACH BELTRAME, M.; CATARINO, S. J.; GOELDNER, I.; et al. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. , 2015.

HONORÉ, C.; RØRVIG, S.; HUMMELSHØJ, T.; et al. Tethering of Ficolin-1 to cell surfaces through recognition of sialic acid by the fibrinogen-like domain. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 1, p. 145–158, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.1209802>>. Acesso em: 7/2/2018.

HUMMELSHØJ, T.; FOG, L. M.; MADSEN, H. O.; SIM, R. B.; GARRED, P. Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen). **Molecular Immunology**, v. 45, n. 6, p. 1623–1632, 2008.

HUMMELSHØJ, T.; MUNTHE-FOG, L.; MADSEN, H. O.; GARRED, P. Functional SNPs in the human ficolin (FCN) genes reveal distinct geographical patterns. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 9, p. 2508–2520, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589008000114>>. Acesso em: 20/11/2017.

ICHIJOS, H.; HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Molecular Cloning and Characterization of Ficolin, a Multimeric Protein with Fibrinogen-and Collagen-like Domains\*. , v. 268, n. 19, p. 14505–14513, 1993. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/268/19/14505.full.pdf>>. Acesso em: 29/4/2018.

KURAYA, M.; MING, Z.; LIU, X.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. **Immunobiology**, v. 209, n. 9, p. 689–697, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15804047>>. Acesso em: 7/1/2018.

MA, Y. J.; DONI, A.; ROMANI, L.; et al. Ficolin-1–PTX3 Complex Formation Promotes Clearance of Altered Self-Cells and Modulates IL-8 Production. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 191, p. 1324–1333, 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/191/3/1324>>. Acesso em: 6/5/2018.

MASON, C. P.; TARR, A. W. Human lectins and their roles in viral infections. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2229–2271, 2015.

MATSUSHITA, M. Ficolins: Complement-activating lectins involved in innate immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 24–32, 2009.

MOTA, L. M. H. DA; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 207–219, 2011. Sociedade Brasileira de Reumatologia. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042011000300002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042011000300002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 26/7/2016.

MOTA, L. M. H. DA; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; 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.

MOTA, L. M. H. DA; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; et al. Segurança do uso de terapias biológicas para o tratamento de artrite reumatoide e espondiloartrites. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 3, p. 281–309, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbr/v55n3/0482-5004-rbr-55-03-0281.pdf>>. Acesso em: 29/4/2018.

MUNTHE-FOG, L.; HUMMELSHOJ, T.; HONORÉ, C.; et al. Variation in FCN1 affects biosynthesis of ficolin-1 and is associated with outcome of systemic inflammation. **Genes and Immunity**, v. 13, n. 7, p. 515–522, 2012a. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/gene.2012.27>>. Acesso em: 1/10/2017.

MUNTHE-FOG, L.; HUMMELSHOJ, T.; HONORÉ, C.; et al. Variation in FCN1 affects biosynthesis of ficolin-1 and is associated with outcome of systemic inflammation. **Genes and Immunity**, v. 13, n. 7, p. 515–522, 2012b. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/gene.2012.27>>. Acesso em: 20/11/2017.

MUNTHE-FOG, L.; HUMMELSHØJ, T.; HONORÉ, C.; et al. Immunodeficiency Associated with *FCN3* Mutation and Ficolin-3 Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 25, p. 2637–2644, 2009. Massachusetts Medical Society. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0900381>>. Acesso em: 15/8/2016.

MUNTHE-FOG, L.; HUMMELSHØJ, T.; MA, Y. J.; et al. Characterization of a polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a Ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 9, p. 2660–2666, 2008.

ORTONA, E.; PIERDOMINICI, M.; MASELLI, A.; et al. Sex-based differences in autoimmune diseases. **Ann Ist Super Sanità**, v. 52, n. 2, p. 205–212, 2016. Disponível em: <[http://www.iss.it/binary/publ/cont/ANN\\_16\\_02\\_12.pdf](http://www.iss.it/binary/publ/cont/ANN_16_02_12.pdf)>. Acesso em: 9/1/2018.

PAN, Q.; CHEN, H.; WANG, F.; et al. L-Ficolin Binds to the Glycoproteins Hemagglutinin and Neuraminidase and Inhibits Influenza A Virus Infection Both in vitro and in vivo. **Journal of Innate Immunity**, v. 4, n. 3, p. 312–324, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399010>>. Acesso em: 7/2/2018.

PEREIRA DOS ANJOSA, Z.; MARIA SILVA SANTOS, M.; JAVORSKI RODRIGUES, N.; et al. Polymorphism in ficolin-1 (FCN1) gene is associated with an earlier onset of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents from northeast Brazil. .

REGO-PÉREZ, I.; FERNÁNDEZ-MORENO, M.; CARREIRA-GARCÍA, V.; BLANCO, F. J. Polimorfismos genéticos y farmacogenética en la artritis reumatoide. **Reumatología Clínica**, v. 5, n. 6, p. 268–279, 2009. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1699258X09000163>>. Acesso em: 19/7/2016.

RICKLIN, D.; REIS, E. S.; LAMBRIS, J. D. Complement in disease: a defence system turning offensive. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 7, p. 383–401, 2016. Nature Research. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneph.2016.70>>. Acesso em: 8/8/2016.

ROY, S.; BISWAS, S.; SAROHA, A.; SAHU, D.; DAS, H. R. Enhanced expression and fucosylation of ficolin3 in plasma of RA patients. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 1–2, p. 160–3, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912012006066>>. Acesso em: 6/1/2016.

SCHMID, M.; HUNOLD, K.; WEBER-STEFFENS, D.; MÄNNEL, D. N. Ficolin-B marks apoptotic and necrotic cells. **Immunobiology**, v. 217, n. 6, p. 610–615, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22119501>>. Acesso em: 7/1/2018.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.

SENNA, É. R.; BARROS, A. L. P. DE; SILVA, E. O.; et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, p. 594–7, 2004.

SILVA, I. G. DA. Concentrações séricas e polimorfismo de MBL e MASP-2 em pacientes com artrite reumatóide e familiares. **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná**, p. 166, 2013.

SPARKS, J. A.; COSTENBADER, K. H. Genetics, environment, and gene-environment interactions in the development of systemic rheumatic diseases. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 40, n. 4, p. 637–57, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4250576&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7/5/2016.

STEINBROCKER, O.; TRAEGER, C. H.; BATTERMAN, R. C. THERAPEUTIC CRITERIA IN RHEUMATOID ARTHRITIS. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 140, n. 8, p. 659, 1949. American Medical Association. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1949.0290043001001>>. Acesso em: 10/1/2018.

TAKAHASHI, K.; MOYO, P.; CHIGWESHE, L.; et al. Efficacy of recombinant chimeric lectins, consisting of mannose binding lectin and L-ficolin, against influenza A viral infection in mouse model study. **Virus research**, v. 178, n. 2, p. 495–501, 2013. NIH Public Access. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24140629>>. Acesso em: 7/2/2018.

TROLDBORG, A.; THIEL, S.; JENSEN, L.; et al. Collectin liver 1 and collectin kidney 1 and other complement-associated pattern recognition molecules in systemic lupus erythematosus. **Clinical and experimental immunology**, v. 182, n. 2, p. 132–8, 2015. Wiley-Blackwell. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26154564>>. Acesso em: 10/12/2017.

TURESSON, C.; MATTESON, E. L. Vasculitis in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 21, n. 1, p. 35–40, 2009. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00002281-200901000-00007>>. Acesso em: 18/10/2016.

UTIYAMA, S. R. DA R.; REASON, I. T. DE M.; KOTZE, L. M. DA S. O sistema complemento nas doenças: genética e patogenia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 4, p. 277–286, 2004. Sociedade Brasileira de Reumatologia. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042004000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042004000400006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 5/4/2016.

VERMA, A.; WHITE, M.; VATHIPADIEKAL, V.; et al. Human H-ficolin inhibits replication of seasonal and pandemic influenza A viruses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 5, p. 2478–87, 2012. NIH Public Access. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851708>>. Acesso em: 7/2/2018.

ZHANG, J.; YANG, L.; ANG, Z.; et al. Secreted M-ficolin anchors onto monocyte transmembrane G protein-coupled receptor 43 and cross talks with plasma C-reactive protein to mediate immune signaling and regulate host defense. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 11, p. 6899–910, 2010. American Association of Immunologists. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037097>>. Acesso em: 13/1/2018.

ZHANG, R.; LUAN, M.; SHANG, Z.; et al. RADB: a database of rheumatoid arthritis-related polymorphisms. **Database: the journal of biological databases and curation**, v. 2014, 2014. Oxford University Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228593>>. Acesso em: 19/7/2016.

## ANEXO

SOCIEDADE EVANGÉLICA  
BENEFICENTE DE CURITIBA -  
PR



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Proteínas e Genes da Imunidade Inata na Artrite Reumatóide

**Pesquisador:** Renato Mitsunori Nisihara

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 57674716.1.0000.0103

**Instituição Proponente:** Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

**Patrocinador Principal:** CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.669.709

#### Apresentação do Projeto:

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, associada à sinovite de articulações periféricas. Cerca de 1% da população mundial é afetada, sendo duas a três vezes mais prevalente em mulheres. Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da AR, sendo que 60% desse risco está associado a contribuição genética. O sistema imune inato está persistentemente ativado na AR devido a estímulos de citocinas derivadas de macrófagos como TNF, IL-1, IL-6. O sistema complemento é um mecanismo efetor da imunidade inata e apresenta um papel importante na patogenia da AR já que atua no processo inflamatório e na remoção de complexos imunes circulantes e células apoptóticas. Respostas autoimunes, relacionada a AR, podem ocorrer quando há o acúmulo desses complexos imunes na circulação. Considerando a alta prevalência da AR e seu poder incapacitante, que pode levar à invalidez econômica e social, a busca por marcadores preditores da doença é imprescindível e pode contribuir para melhor compreensão da fisiopatologia da AR, além de possibilitar um diagnóstico precoce e evitar possíveis complicações devido à falta de tratamento adequado no início da doença. Assim, o presente projeto tem por objetivo buscar marcadores da imunidade inata que indiquem susceptibilidade ou proteção a artrite reumatoide em pacientes do Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba.

Metodologia Proposta:

**Endereço:** Rua Padre Anchieta, 2770

**Bairro:** Bigorriho

**CEP:** 80.730-000

**UF:** PR **Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3240-5570

**Fax:** (41)3240-5584

**E-mail:** comite.etica@fepar.edu.br

SOCIEDADE EVANGÉLICA  
BENEFICENTE DE CURITIBA -  
PR



Continuação do Parecer: 1.669.709

Serão estudados no presente projeto um total de 357 amostras de sangue, as quais estarão divididas em dois grupos: grupo controle - 200 indivíduos saudáveis (sem AR); e grupo de pacientes - 157 indivíduos com diagnóstico de artrite reumatóide. As 200 amostras de sangue do grupo controle, já foram colhidas de doadores de sangue do Biobanco do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR) e estão armazenadas no Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC/UFPR, conforme aprovação do CEP com o parecer número 290.505. As amostras de sangue do grupo de pacientes também já foram coletadas no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba, oriundas do projeto 8520/10 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba.

Os pacientes diagnosticados com AR atenderam 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).

Além disso, os pacientes tem mais de 18 anos e a idade de início da doença é maior ou igual a 16 anos. Ainda, visando à caracterização dos participantes da pesquisa, foram levantadas as seguintes informações: idade, gênero, origem étnica, uso do tabaco, idade do início da doença, duração da doença, classe funcional e presença de manifestações extra-articulares.

**Metodologia de Análise de Dados:**

O DNA será extraído a partir de leucócitos do sangue periférico, empregando método de salting out. As amostras de DNA serão quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e diluídas a 100 ng/ul e armazenadas a -20°C.

Os polimorfismos de genes do sistema imune serão determinados com a técnica de amplificação alélica por PCR sequência-específica (PCRSSP), em que serão projetados iniciadores de 18-25 nucleotídeos para finalizar no nucleotídeo variante da fita-molde. Os iniciadores SSP também devem ser compatíveis com um par de iniciadores genéricos que amplificam o controle endógeno da PCR, que será padronizada para cada marcador, e o resultado observado por eletroforese em gel de agarose.

A concentração sérica das proteínas que atuam no sistema imune serão avaliadas através de ensaio de imunoadsorção ligado à enzima, ELISA, (Enzime-Linked immunosorbent Assay).

**Endereço:** Rua Padre Anchieta, 2770

**Bairro:** Bigorriho

**CEP:** 80.730-000

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3240-5570

**Fax:** (41)3240-5584

**E-mail:** comite.etica@fepar.edu.br

Continuação do Parecer: 1.669.709

Quanto a análise estatística, as frequências alélicas e genótípicas serão determinadas através de contagem direta e os haplótipos serão inferidos através dos algoritmos EML e EBL utilizando o programa Arlequin. Para as análises de associação serão realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes qui-quadrado com correção de Yates ou teste de Fisher bicaudal. Quando apropriado, será calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. A estatística descritiva em relação às concentrações plasmáticas avaliadas será apresentada em mediana e percentis. As comparações entre médias serão feitas através dos testes não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Valores de p menores que 0,05 serão considerados significativos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Buscar marcadores da imunidade inata que indiquem susceptibilidade ou proteção a artrite reumatóide em pacientes do Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba.

Objetivo Secundário:

Investigar associação entre polimorfismos de genes da imunidade inata e as concentrações séricas de suas respectivas proteínas com a susceptibilidade, perfil clínico e gravidade da artrite reumatóide.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Essa pesquisa apresenta risco mínimo aos pacientes. Todas as amostras a serem avaliadas já foram previamente coletadas em projetos anteriores aprovados, como consta no item metodologia. As amostras estão identificadas por códigos e os pacientes não receberão nenhum tipo de resultado das análises, já que se trata de uma pesquisa básica para identificação de marcadores de susceptibilidade à AR.

Benefícios:

A AR é uma doença autoimune que afeta aproximadamente 1% da população mundial. No Brasil, a prevalência varia de 0,2 a 1,0% (SILVA, 2013). Por ser uma doença progressiva e incapacitante, é imprescindível à busca por marcadores preditores da doença. Pesquisas científicas envolvendo a busca e identificação de marcadores como proposto neste estudo, podem contribuir para um melhor entendimento da doença, além de possibilitar um diagnóstico precoce e evitar possíveis complicações devido à falta de tratamento adequado no início da doença. Novas descobertas poderão contribuir para maior compreensão da fisiopatologia da AR.

**Endereço:** Rua Padre Anchieta, 2770

**Bairro:** Bigorriho

**CEP:** 80.730-000

**UF:** PR **Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3240-5570

**Fax:** (41)3240-5584

**E-mail:** comite.etica@feapar.edu.br

SOCIEDADE EVANGÉLICA  
BENEFICENTE DE CURITIBA -  
PR



Continuação do Parecer: 1.669.709

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não há

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não há

**Recomendações:**

Não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba, de acordo com as atribuições definidas na Resolução 466/12 CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da pesquisa.

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento do projeto, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_740234.pdf	27/07/2016 10:49:15		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	08/07/2016 16:05:14	Cristhine Pieczarka	Aceito
Folha de Rosto	plataforma.pdf	02/07/2016 20:38:40	Cristhine Pieczarka	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Comite_de_etica_8520.pdf	02/07/2016 20:37:40	Cristhine Pieczarka	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_concordancia.pdf	02/07/2016 20:35:18	Cristhine Pieczarka	Aceito

**Endereço:** Rua Padre Anchieta, 2770

**Bairro:** Bigorriho

**CEP:** 80.730-000

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3240-5570

**Fax:** (41)3240-5584

**E-mail:** comite.etica@fepar.edu.br

SOCIEDADE EVANGÉLICA  
BENEFICENTE DE CURITIBA -  
PR



Continuação do Parecer: 1.669.709

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 09 de Agosto de 2016

---

**Assinado por:**

**Carmen Australia Paredes Marcondes Ribas  
(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Padre Anchieta, 2770

**Bairro:** Bigorriho

**CEP:** 80.730-000

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3240-5570

**Fax:** (41)3240-5584

**E-mail:** comite.etica@fepar.edu.br