



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA LUISA BERTI GUIMARÃES SELLA

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO *FOXP3* -3279 C/A
(rs3761548) E SUA ASSOCIAÇÃO COM NÍVEIS
PLASMÁTICOS DE CITOCINAS, ATIVIDADE E
PROGNÓSTICO DA ARTRITE REUMATÓIDE**

ANA LUISA BERTI GUIMARÃES SELLA

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO *FOXP3* -3279 C/A
(rs3761548) E SUA ASSOCIAÇÃO COM NÍVEIS
PLASMÁTICOS DE CITOCINAS, ATIVIDADE E
PROGNÓSTICO DA ARTRITE REUMATÓIDE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S467p Sella, Ana Luísa Berti Guimarães.
Polimorfismo genético do FOXP3 -3279 C/A (rs3761548) e sua associação com níveis plasmáticos de citocinas, atividade e prognóstico da artrite reumatoide / Ana Luísa Berti Guimarães Sella. - Londrina, 2019.
70 f. : il.

Orientador: Andréa Name Colado Simão.
Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Artrite reumatóide - Tese. 2. Polimorfismo (Genética) - Tese. 3. Citocinas - Tese. I. Simão, Andréa Name Colado. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 616

ANA LUISA BERTI GUIMARÃES SELLA

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO *FOXP3* -3279 C/A (RS3761548) E
SUA ASSOCIAÇÃO COM NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS,
ATIVIDADE E PROGNÓSTICO DA ARTRITE REUMATÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado
Simão
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa Dra Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa Dra Sayonara Rangel Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 05 de abril de 2019.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Guilherme e filha Maria Augusta, pela paciência, colaboração, carinho e o amor com que permeiam meu dia a dia.

À minha mãe, pelo incentivo, apoio e correções de estilo, desde o maternal.

Ao meu pai, que como um sopro, foi-se embora no meio desta pequena aventura, orgulhoso sempre foi, orgulhoso estaria.

Aos pacientes, que depositam em nós sua confiança e esperança, consulta após consulta.

À minha colega Tamires Flauzino, que tanto me ajudou nos meandros dos polimorfismos.

À minha orientadora, Andréa Name Colado Simão, pela valiosa orientação, pela incrível paciência e pela dedicação a cada pequeno aspecto dessa pesquisa.

Meu muito obrigada!

“Não há nada nobre em ser superior ao seu semelhante.
A verdadeira nobreza é ser superior ao seu antigo eu”.

Ernest Hemingway (1899 – 1961)

1 SELLA, Ana Luísa Berti Guimarães. **Polimorfismo genético do *FOXP3* -3279 C/A**
2 **(rs3761548) e sua associação com níveis plasmáticos de citocinas, atividade e**
3 **prognóstico da Artrite Reumatoide.** 70 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia
4 Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

5
6
7
8
9
10 **Introdução.** Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica
11 multissistêmica, associada à hipertrofia, hiperplasia e angiogênese do tecido sinovial
12 que pode levar a destruição articular. Tem sido demonstrado que fatores genéticos,
13 imunológicos e ambientais estão envolvidos em sua etiopatogênese. Sabe-se do
14 envolvimento das células T reguladoras (Treg) no mecanismo de tolerância
15 imunológica e desencadeamento da resposta inflamatória na AR. Tais células
16 expressam, em sua superfície, o fator de transcrição *forkhead box proteína 3*
17 (Foxp3). Esta proteína é codificada pelo gene *FOXP3* e atua como ativador
18 transcricional para outros genes. O polimorfismo do *FOXP3* -3279 C/A pode alterar a
19 expressão desta proteína, sendo associada à susceptibilidade a diversas doenças
20 autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, doença de Graves, doença de
21 Crohn, psoríase e AR. **Objetivo.** Avaliar a associação entre a variante genética do
22 *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) e a susceptibilidade à AR, prognóstico e atividade
23 de doença, bem como níveis plasmáticos de citocinas. **Sujeitos e Métodos.** Foram
24 recrutados 251 pacientes com AR diagnosticada de acordo com os critérios do
25 Colégio Americano de Reumatologia e 183 indivíduos saudáveis. O DNA genômico
26 foi extraído de leucócitos para a análise do polimorfismo do *FOXP3* -3279 C/A
27 (rs3761548) e amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
28 Após amplificação de uma sequência de 155 pares de bases do gene *FOXP3*, a
29 mesma foi submetida à digestão com a enzima de restrição *Pst*I. Os produtos da
30 digestão foram analisados pela metodologia de Polimorfismos no Comprimento dos
31 Fragmentos de Restrição (RFLP,) utilizando gel de poliacrilamida (10%) e corados
32 com nitrato de prata. O alelo C foi definido com fragmentos de 80 e 75 pb, enquanto
33 que o alelo A não sofre clivagem permanecendo com 155pb. Os níveis séricos de
34 anticorpo anti-peptídeo citulinado cíclico (anti-CCP) foram determinados por
35 quimioluminescência em micropartículas, e os níveis de fator reumatoide e proteína
36 C reativa foram determinados por imunoturbidimetria. Os níveis plasmáticos das
37 citocinas IL-10, IL-17A, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e do fator
38 transformador do crescimento beta (TGF- β) foram avaliados por imunofluorimetria
39 utilizando a plataforma Luminex®. Atividade de doença foi avaliada pelo escore
40 DAS 28-VHS (*Disease Activity Score*) que avalia 28 articulações e utiliza a
41 velocidade de hemossedimentação (VHS) como proteína de fase de aguda. Foi
42 considerada doença em atividade quando DAS 28-VHS >2,6 **Resultados.** Pacientes
43 com AR apresentaram aumento dos níveis de TNF- α (p=0,021) e IL-10 (p< 0,001) e
44 diminuição dos níveis de TGF- β , quando comparados ao grupo controle. O genótipo
45 CC (no modelo dominante) foi associado à diminuição de TGF- β em pacientes
46 portadores de AR (p=0,027), mas não nos controles, independente do sexo e etnia.
47 Além disso, pacientes portadores do alelo C, em homozigose ou heterozigose,
48 demonstraram maior frequência de pacientes com doença em atividade (p=0,042)
49 quando comparado ao grupo em homozigose para o alelo A. **Conclusão.** Este
50 trabalho demonstrou que o polimorfismo -3279 C/A (rs3761548) não foi

1 significativamente associado com susceptibilidade à AR na população do sul do
2 Brasil. Entretanto, pacientes com AR e com a presença do alelo C, em homozigose
3 ou heterozigose, apresentaram níveis plasmáticos reduzidos de TGF- β e maior
4 frequência de pacientes com doença em atividade, sugerindo um possível papel
5 deletério do alelo C na fisiopatologia da doença.

6
7 **Palavras-Chave:** Artrite reumatoide. Polimorfismo *FOXP3* -3279 C/A. Células T
8 regulatórias. Fator transformador do crescimento beta.
9 Interleucina 10.

10

1 SELLA, Ana Luísa Berti Guimarães. **Genetic polymorphism of *FOXP3* C/A**
2 **(rs3761548) and its association with Rheumatoid Arthritis cytokine plasma**
3 **levels, activity and prognosis in rheumatoid arthritis.** 70 p. Dissertation (Master's
4 Degree in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – Universidade Estadual de
5 Londrina, Londrina, 2019.

6 7 8 **ABSTRACT**

9
10
11 **Introduction:** Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic, multi-systemic, inflammatory
12 disease, related to hypertrophy, hyperplasia and angiogenesis of the synovial tissue
13 that lead to joint destruction. It has been shown that genetic, immunologic and
14 environmental factors are related to its pathogenesis. The enrollment of the T
15 regulatory (Treg) cells in the immunologic tolerance mechanism and triggering of
16 inflammatory response in RA is known. Such cells manifest the transcription factor
17 forkhead box p3 (Foxp3) in its surface. This protein encoded by the *FOXP3* gene
18 acts as a transcriptional activator to other genes. The *FOXP3* -3279 C>A
19 polymorphism may change the protein expression, being associated to autoimmune
20 diseases susceptibility, such as systemic lupus erythematosus, Graves's Disease,
21 Crohn's Disease, psoriasis and RA. **Objective:** Evaluate the association between
22 *FOXP3* -3279 C>A polymorphism (rs3761548) and RA susceptibility, prognosis and
23 disease activity, and cytokine levels. **Subjects and methods:** 251 subjects with the
24 diagnosis of RA, using the criteria defined by American College of Rheumatology
25 (ACR) and 183 healthy subjects were recruited. Peripheral leucocyte genomic DNA
26 was extracted, to *FOXP3* -3279 C/A (rs3761548) polymorphism analysis and
27 amplified using polymerase chain reaction (PCR). After amplification of a sequence
28 of 155 base pairs (bp) of *FOXP3*, that was digested using restriction enzyme PstI.
29 The products of the digestion were analyzed according to the restriction Fragment
30 length polymorphism (RFLP) by electrophoresis in polyacrylamide gel (10%) and
31 stained with silver nitrate. The C allele was defined with fragments of 80 and 75 bp,
32 while the A allele did not undergo cleavage remaining with 155 bp. The serum levels
33 of antibody anti-citrullinated protein (anti-CCP) were assessed using
34 chemoluminescence, while rheumatoid factor (RF) and C-reactive protein (CRP)
35 were determined by immunoturbidimetry. Cytokine levels as IL-10, IL-17A, tumoral
36 necrosis factor alfa (TNF- α) and transforming growth factor beta d (TGF- β) were
37 evaluated by immunofluorometry using Luminex® platform. Disease activity was
38 assessed using Disease Activity Score 28 (DAS 28) with erythrocyte sedimentation
39 rate (ESR) as acute phase biomarker. Disease activity was considered when DAS28-
40 ESR>2.6. **Results:** RA patients had higher levels of TNF- α (p=0.021) e IL-10
41 (p<0.001) and lower levels of TGF- β , when compared to the control group. The CC
42 genotype (in the dominating model) was associated to the decrease of TGF- β in RA
43 subjects (p=0.027), but not in the control subjects, regardless to sex or ethnicity.
44 Furthermore, those who expressed the C allele in homozygosis or heterozygosis
45 demonstrated higher frequency of DAS 28 VHS in mild to severe activity (p=0.042)
46 when compared to allele A. **Conclusion:** This paper demonstrated that the -3279
47 C>A (rs3761548) polymorphism was not significantly associated to the susceptibility
48 to RA, in a south-brazilian population. However, in those patients with RA and C
49 genotype, in homozygosis or heterozygosis, The levels of TGF- β were lower and
50 had worst disease parameters suggesting a deleterious role of the C allele in the

1 disease activity.

2

3 **Key Words:** Rheumatoid arthritis. FOXP3 -3279 C/A polymorphism. T regulatory
4 cells. Interleukin-10. Transforming growth factor beta.

5

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Desenvolvimento e progressão da artrite reumatoide	17
Figura 2 –	Fisiopatologia da artrite reumatoide	19
Figura 3 –	Gel de acrilamida com leituras de pares de bases.....	34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Critérios de classificação do ACR/EULAR 2010 para artrite reumatoide14
- Tabela 2** - Classificação da atividade da doença de acordo com os critérios Propostos pelo *Disease Activity Score 28* (DAS 28)15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i> (Colégio Americano de Reumatologia)
AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
ANTI-CCP	<i>Anti-citrulinated cyclic peptide</i> (Anti-peptídeos cíclicos citrulinados)
AR	Artrite Reumatóide
CTLA-4	<i>Cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4</i> (antígeno citotóxico 4 associado a linfócito)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Epítipo compartilhado
EPD	Erro padrão da média
FAN	Fator anti-nuclear
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i> (receptor de superfície associado a morte celular)
FCGR	<i>Fc fragment of IgG receptor</i> (fragment Fc do receptor de IgG)
FOXP3	<i>Forkhead Box Protein 3</i>
FR	Fator Reumatóide
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
IFN- γ	Interferon gama
IG	Imunoglobulinas
IL	Interleucinas
IL-1	Interleucina 1
IL-17A	Interleucina 17A
IL-6	Interleucina 6
iTreg	Células T reguladoras induzíveis
IMC	Índice de massa corpórea
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LT	Linfócitos T
MHC	<i>Major Histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)

MIF	<i>acrophage migration inhibitory factor</i> (fator inibitório de migração macrofágica)
MMP	Metaloproteinases de matriz
nTreg	Células t reguladoras naturais
NK	<i>Natural killers</i> (células matadoras naturais)
PAD-4	<i>Peptidyl arginine deiminase 4</i> (deiminase da peptidil arginina)
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PXK	<i>Phox domain containing serine-threonine kinase</i> (quinase da serina-treonina contendo um domínio Phox)
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear fator kappa-B ligand</i> (Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa b)
RFLP	<i>Restriction fragment lenght polymorphism</i> (Polimorfismos no Comprimento dos Fragmentos de Restrição)
SLE	Systemic lupus erythematosus (lupus eritematoso sistêmico)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de peptídio único)
STAT-4	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	<i>Transforming growth fator beta</i> (fator transformador de crescimento beta)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (fator de necrose tumoral alfa)
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	1. INTRODUÇÃO	13
1	1.1 FISIOPATOLOGIA DA AR	16
	1.2 AR E PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA	20
2	2. JUSTIFICATIVA	27
3	3. OBJETIVO	28
3.1	3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	4. SUJEITOS E MÉTODOS	29
4.1	4.1 ASPECTOS ÉTICOS	30
4.2	4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	30
4.3	4.3 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS	30
4.4	4.4 EXAMES LABORATORIAIS	25
4.4.1	Coleta de sangue	25
4.4.2	Biomarcadores imunológicos e inflamatórios	25
4.4.3	Polimorfismo genético do gene <i>FOXP3</i> -3279 C/A (rs3761548)	
4.4.3.1	Extração do DNA	
4.4.3.2	Reação em cadeia da polimerase para o polimorfismo	
4.4.3.3.	Polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição para o polimorfismo	25
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.	CONCLUSÕES	59
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
8.	REFERÊNCIAS	61

9.	APÊNDICES	66
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	66
	APÊNDICE B – Ficha de Avaliação.....	68
10.	ANEXOS	70
	ANEXO A – Documento de Aprovação do Comitê de Ética da UEL	70

1. INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica multissistêmica, de etiologia desconhecida, na qual hipertrofia, hiperplasia e angiogênese do tecido sinovial contribuem para a destruição articular (ALAMANOS et al., 2006). É observada em todos os grupos étnicos e em ambos sexos (ALAMANOS; DROSOS, 2005), sendo predominante no sexo feminino e caucasianos, sobretudo em pacientes entre a quarta e a sexta décadas de vida (SILMAN; PEARSON, 2002). Atinge mais mulheres do que homens na proporção 2 a 3 para um e a prevalência é de cerca de 1% da população adulta. A incidência varia entre 16,5 e 38 casos por 100.000 habitantes (MYASOEDOVA et al., 2010), sendo a prevalência na população brasileira estimada entre 0,2 e 1% (SENNÁ et al, 2004).

Na história natural da doença podem existir flutuações de sua intensidade inflamatória, mas existe evolução na maioria dos casos para deformidade e incapacidade articular (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

Tem sido demonstrado que fatores genéticos, imunológicos e ambientais estão envolvidos na etiologia e desencadeamento da AR (ALAMANOS et al., 2006). Possivelmente, indivíduos geneticamente suscetíveis iniciem a sinovite poliarticular, que se torna autoperpetuável com a evolução da doença (SILMAN; PEARSON, 2002).

Os fatores ambientais devem ser considerados, embora tenham mecanismos ainda não completamente elucidados. O envolvimento do tabagismo na fisiopatologia da AR está bem estabelecido, estando fortemente associado à presença de fator reumatoide (FR) e anticorpos anticitrulinados cíclicos (anti-CCP), dois autoanticorpos utilizados para o diagnóstico e prognóstico da AR (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

As características clínicas da AR incluem dor, edema e limitação dos movimentos das articulações acometidas; o acometimento poliarticular (mais de 4 articulações); acometimento dos punhos, articulações metacarpofalangeanas e interfalangeanas proximais; artrite simétrica e aditiva; rigidez matinal caracterizada por enrijecimento e sensação de inchaço percebida, sobretudo, pela manhã, com duração de mais de 1 hora (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

O curso da AR varia desde leve até a forma agressiva. Como consequências em longo prazo ocorrem significativa morbidade, perda da capacidade funcional e aumento da mortalidade (MOTA et al., 2011).

O diagnóstico da AR é estabelecido considerando-se achados clínicos e exames laboratoriais, tais como as provas inflamatórias como velocidade de hemossedimentação (VHS) e proteína C reativa (PCR) e a identificação de autoanticorpos como anti-CCP e FR (SMOLEN et al., 2018) O diagnóstico e tratamento precoce reduzem a destruição articular, preservam a função e melhoram a sobrevida. Sendo assim, é fundamental a pesquisa de biomarcadores que auxiliem a identificação da evolução da doença, sua gravidade, assim como novos alvos terapêuticos.

Para a inclusão de um paciente em estudo científico, são utilizados os critérios classificatórios do Colégio Americano de Reumatologia (CAR) /Liga europeia contra o reumatismo (EULAR) (ALETAHA et al., 2010), que compreendem 4 domínios: número e tipo das articulações afetadas, presença de FR e/ou anti-CCP, proteínas de fase aguda (VHS e PCR) e duração dos sintomas (tabela 1).

Tabela 1 - Critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (CAR) /Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) de 2010 para o diagnóstico de artrite reumatoide

População-alvo (quem deve ser testado?)

Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema). * Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença.

*Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriásica e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.

Envolvimento articular

1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	2
4-10 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	3
10 articulações (pelo menos 1 pequena articulação)	5

Sorologia

FR negativo e AACP negativos	0
------------------------------	---

FR positivo em título baixo ou AACP positivo em título baixo	2
FR positivo em título alto ou AACP positivo em título alto	3

Provas de fase aguda (pelo menos 1 é requerida)

PCR normal e VHS normal	0
PCR anormal ou VHS anormal	1

Duração dos sintomas

< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

1 Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR. O
2 domínio acometimento articular refere-se a qualquer articulação dolorosa ou inchada (excluindo
3 interfalangeanas distais do pé ou da mão, primeira metatarsfalangeana e primeira
4 carpometacarpeana). Evidência adicional obtida por exames de imagem pode ser utilizada para
5 confirmação dos achados clínicos. Consideram-se, para fins de classificação, como pequenas
6 articulações as metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, metatarsfalangeanas (segunda a
7 quinta), primeira interfalangeana e punhos, e como grandes articulações ombros, cotovelos, quadril,
8 joelhos, tornozelos. Articulações adicionais (temporomandibular, esternoclavicular, acromioclavicular,
9 entre outras) podem ser contadas, na avaliação de “mais de 10 articulações”, desde que uma pequena
10 articulação (ao menos) esteja acometida.

11 No domínio sorologia, considera-se o resultado de fator reumatoide ou de anticorpos anti-
12 peptídeos/proteínas citrulinadas negativo se o valor encontrado for igual ou menor ao limite superior da
13 normalidade para o respectivo laboratório; positivo baixo se o valor encontrado for maior que o limite
14 superior da normalidade, mas menor ou igual a três vezes o limite superior da normalidade; e positivo
15 alto quando o valor encontrado for superior a três vezes o limite superior da normalidade.

16 O domínio duração dos sintomas se refere ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos
17 sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da avaliação.
18 Já as provas de atividade inflamatória (velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa) são
19 consideradas normais ou anormais de acordo com o valor de referência do laboratório utilizado.

20 ACPA: *anti-citrullinated protein antibodies*; ACR: *American College of Rheumatology*; EULAR:
21 *European League Against Rheumatism*; FR: fator reumatoide; PCR: proteína C reativa; VHS:
22 velocidade de hemossedimentação

23 **Fonte:** ALETAHA et al., 2010 (tradução nossa)

24

25 O DAS 28 é um escore validado para determinação de atividade de AR ,
26 utilizado tanto na prática clínica quanto em ensaios clínicos. Consiste na contagem
27 de 28 articulações (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos,
28 cotovelos, ombros e joelhos, bilateralmente) e determina um valor numérico para
29 atividade da AR (tabela 2) (PREVOO et al., 1995). Esse valor numérico é calculado
30 pela fórmula matemática: $0,56 \times \sqrt{NAD28} + 0,28 \times \sqrt{NAE28} + 0,70 \times \ln VHS +$
31 $0,014 \times AGS$, onde NAD28 é o número de articulações dolorosas dentre 28 pré
32 determinadas, NAE28 é o número de articulações edemaciadas dentre 28
33 articulações pré determinadas, Ln é o logaritmo natural do valor do VHS e AGS é
34 avaliação global de saúde. Pode ser facilmente calculado com auxílio de programas
35 disponíveis na internet. As definições de doença em remissão, baixa, moderada e alta
36 atividade referem-se aos valores obtidos com o índice (tabela 2).

Tabela 2 - Classificação da atividade da doença de acordo com os critérios propostos pelo *Disease Activity Score 28 (DAS 28)*

Estado de atividade	DAS28
Remissão	≤2,6
Baixa	≤3,2
Moderada	≤5,1
Alta	>5,1

Fonte: Prevoo.(1995)

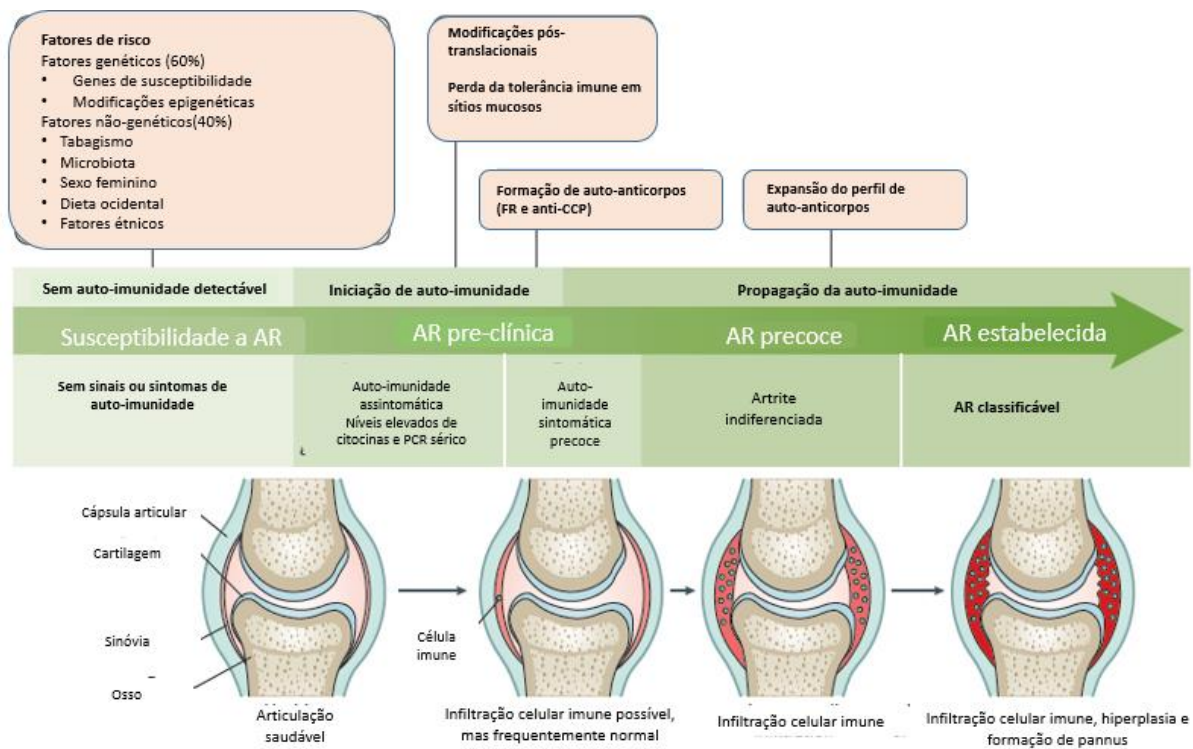
1.1 FISIOPATOLOGIA DA AR

Em muitos indivíduos, a patogênese da AR se inicia muitos anos antes da lesão inicial, embora um início agudo refletindo alteração imune também seja possível (ALETAHA; SMOLEN, 2018). O desenvolvimento da AR é determinado por um genótipo predisponente em que fatores ambientais e genéticos combinados resultam em ativação imune, com resposta inflamatória e ativação sinovial (SMOLEN et al., 2018). Ainda que os fatores ambientais associados ao desenvolvimento de AR não estejam completamente elucidados, alguns mecanismos têm sido determinados. Tem sido demonstrado, por exemplo, que o tabaco causa uma conversão pós-translacional do aminoácido arginina em citrulina em diversas proteínas, incluindo proteínas intracelulares e proteínas de matriz extracelular, o que caracteriza o processo de citrulinação (MAKRYGIANNAKIS et al., 2008), o que pode induzir a produção dos anticorpos anti-CCP. Também está bem estabelecido o papel da *Porphyromonas gingivalis*, bactéria comum na doença periodontal, que expressa enzimas e pode induzir o processo de citrulinação (DISSICK et al., 2010). Pode-se citar ainda a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que produz uma toxina que aumenta o influxo de cálcio em neutrófilos resultando também em citrulinação peptídica (KONIG et al., 2016).

A citrulinação, ou outras alterações pós-translacionais, gera peptídeos modificados, que se ligam a moléculas do Complexo maior de histocompatibilidade ou antígeno leucocitário humano de classe II. Por conseguinte, a ligação ao MHC leva à apresentação de antígenos a células TCD4⁺ virgens (*naïves*) com suporte de

1 moléculas coestimulatórias, alterando a tolerância a antígenos próprios e induzindo
 2 uma resposta imune por células Th1 e Th17. Ocorre, então, a estimulação de células
 3 B, que após diferenciação em plasmócito, sintetizam diversos anticorpos que
 4 reconhecerão proteínas próprias, incluindo o FR, imunoglobulina contra a Fc das IgG
 5 e o anti-CCP, contra peptídeos citrulinados (TAN; SMOLEN, 2016). Os autoanticorpos
 6 se ligam aos respectivos autoantígenos, formando imunocomplexos na sinóvia, onde
 7 esses autoantígenos se acumulam. Tais imunocomplexos estimulam outras células B
 8 a formarem mais FR, o que aumenta a ativação do sistema complemento e a secreção
 9 de citocinas pró-inflamatórias (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

Figura 1 – Desenvolvimento e progressão da artrite reumatoide.



10 A figura ilustra o desenvolvimento e progressão da AR. Tanto fatores de risco genéticos e não
 11 genéticos contribuem para o desenvolvimento da AR, e múltiplos fatores de risco são necessários
 12 antes de um limiar ser atingido no qual o gatilho será iniciado. A progressão da doença envolve
 13 iniciação e propagação da autoimunidade contra proteínas próprias, o que pode ocorrer anos antes
 14 do início de uma sinovite subclínica e sintomas clínicos. ACPA, anti-CCP, CRP, proteína C reativa;
 15 RF. Fator reumatoide.

16 **Fonte :** Smolen et al. (2018) (tradução nossa)

17

18

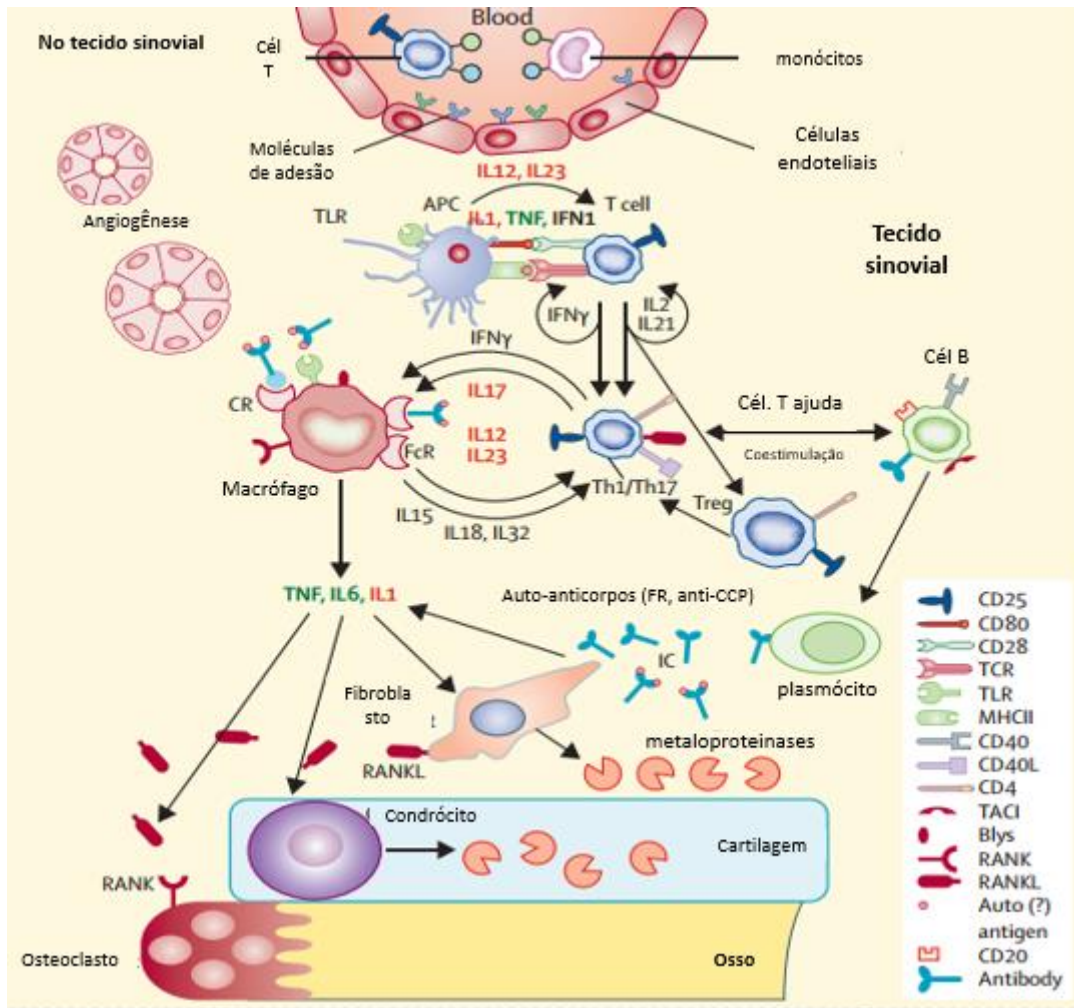
18 Embora a AR seja uma doença sistêmica e uma série de alterações imunes
 19 ocorra em tecidos linfóides secundários e superfícies mucosas, a lesão base ocorre
 20 na membrana sinovial. A lesão inicial na AR é caracterizada pela infiltração no tecido
 21 sinovial de múltiplas articulações pelas células TCD4⁺, células B e monócitos, com

1 ativação estromal precoce. Esse processo é precedido por ativação endotelial e
2 neoangiogênese. Segue-se expansão sinovial de fibroblastos e macrófagos que
3 levam ao espessamento da camada sinovial, sendo chamado de *pannus* (MCINNES;
4 SCHETT, 2011).

5 Duas alterações patogênicas caracterizam a membrana sinovial em pacientes
6 com AR. A primeira alteração é a expansão exagerada da sinóvia com ativação dos
7 sinoviócitos que são uma fonte de citocinas e proteases. Os sinoviócitos macrófago-
8 *like* produzirão uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e IL-6, fator
9 de necrose tumoral alfa (TNF- α), além de sua ativação por interferon-gama (IFN- γ) ou
10 IL-17. A segunda alteração é que os sinoviócitos fibroblastos-*like* expressam IL-6, mas
11 principalmente, uma grande quantidade de metaloproteinases (MMP) e mediadores
12 como prostaglandinas e leucotrienos, bem como expressam padrões de micro-RNAs
13 que podem contribuir para o fenótipo ativado (STANCZYK et al., 2008). Ressalta-se
14 ainda o papel do Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa (RANKL).
15 Expresso pelo fibroblasto e, na presença de citocinas pró-inflamatórias, ativa
16 macrófagos para se diferenciarem via pré-osteoclastos em osteoclastos, que
17 reabsorverão o osso periarticular (REDLICH; SMOLEN, 2012).

18 As células T regulatórias (Treg) têm um papel fundamental no mecanismo de
19 tolerância imunológica e desencadeamento das doenças autoimunes como a AR
20 (BUCKNER, 2008). Está bem estabelecido que as células Treg que expressam as
21 moléculas CD4 (CD4⁺) e CD25 (CD25⁺, receptor da cadeia α da IL-2) e o fator de
22 transcrição Foxp3. As células Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ previnem autoimunidade e
23 mantêm a homeostasia imune, bem como controlam a resposta de células T
24 (SAKAGUCHI et al., 2006). Em modelos murinos e humanos com deficiência do fator
25 de transcrição Foxp3 em Treg, há maior prevalência de doenças autoimunes
26 multissistêmicas (BUCKNER, 2008). Estudos em modelos animais de artrite
27 demonstraram que as Treg são capazes de modificar o curso da doença, sendo
28 encontradas em cartilagem sinovial de ratos, líquido sinovial e linfonodos (MORGAN
29 et al., 2005).

30
31
32
33
34

1 **Figura 2- Fisiopatologia da Artrite Reumatóide.**

2 A figura ilustra mecanismos fisiopatogênicos da artrite reumatoide dentro da membrana sinovial.
 3 *Adhesion molecules*: moléculas de adesão. *Angiogenesis*: angiogênese. *T cell help co-stimulation*:
 4 Células T auxiliam a coestimulação. *Autoantibody* (RF, ACPA, anti-RA33) : autoanticorpos (fator
 5 reumatoide, anticorpo anti-peptídeo citrulinado, anti – RA33). *Blood*: sangue. *Bone*: osso. *Cartilage*:
 6 cartilagem. *Chondrocyte*: condrócito. *Endothelial cells*: células endoteliais. *Macrophage*: macrófago.
 7 *Matrix metalloproteinases*: metaloproteases da matriz. *Monocyte*: monócito. *Osteoclast*: osteoclasto.
 8 *Plasma cell*: plasmócito. *RANK*: Receptor ativador do fator nuclear kappa B. *RANKL*: ligante do receptor
 9 ativador do fator nuclear kappa B. *Synovial fibroblast*: fibroblasto sinovial. *Synovium tissue*: tecido
 10 sinovial

11 **Fonte:** Smolen, 2016 (tradução nossa)
 12
 13

14 Foxp3 é o único marcador específico das células Treg, sendo importante no
 15 desenvolvimento das células Treg naturais (nTreg) no timo, provenientes de LT CD4⁺
 16 cujos receptores reconheceram antígenos próprios durante o processo de seleção
 17 tímica. As células nTreg são potencialmente capazes de suprimir a ativação, a
 18 proliferação e/ou a função efetora dos linfócitos T CD4⁺, TCD8⁺ e, possivelmente,
 19 células *natural killers* (NK), além de células B e células dendríticas. As nTReg são
 20 comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos autorreativos nos
 21 tecidos periféricos e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na

1 regulação negativa da resposta imune também diante de antígenos exógenos e
2 autoantígenos (CHEN et al., 2005). A aquisição de um fenótipo nTreg requer uma
3 expressão alta e persistente de Foxp3 para estabilizar e amplificar a resposta. Além
4 disso, as nTreg são necessárias para manter a função supressiva das células T
5 reguladoras induzíveis (iTReg), células que podem ser induzidas na periferia por ação
6 de fatores solúveis específicos sobre células *naive* recém egressas do timo, com
7 função semelhante às nTreg (CRUVINEL et al., 2008).

8 9 1.2 AR E PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA

10
11 De acordo com estudos de base familiar os fatores genéticos contribuem com
12 cerca de 60% da probabilidade de desenvolver AR (ALAMANOS et al., 2006). A AR
13 trata-se de doença poligênica, cujos principais *loci* associados à susceptibilidade são
14 o *MHC* ou *HLA* (SMOLEN et al, 2018). Existe forte associação entre AR e o alelo do
15 *HLADRB1*, e o *HLA DRB1*0404*, é o principal marcador genético de susceptibilidade
16 e encontra-se associado à produção de anti-CCP. No entanto, os genes *HLA*
17 perfazem somente um terço da suscetibilidade genética à doença com a presença de
18 outros fatores genéticos não *HLA* associados ao desenvolvimento de AR
19 (CHATZIKYRIAKIDOU et al., 2008).

20 Os genes *HLADRB1* codificam uma sequência de aminoácidos dos códons 67-
21 74 das moléculas DRB comuns à variação denominadas de Epítipo compartilhado
22 (EC) (WEYLAND et al., 1992). Os EC estão relacionados à suscetibilidade do
23 indivíduo à AR e são responsáveis pela maior gravidade da doença (DIAZ-PEÑA;
24 CASTRO-SANTOS, 2016). A presença deste EC sugere que os alelos HLA que o
25 contêm se ligam ao mesmo antígeno, postulam a apresentação de autopeptídeos
26 artritogênicos ou o mimetismo molecular com antígenos estranhos ou moldam o
27 repertório de linfócitos T-antígeno específico. (LA CAVA et al., 1997). Os alelos
28 *HLADRB1* com EC estão fortemente associados à AR com anti-CCP positivo. A
29 hipótese dos EC permanece controversa, porque sugere a existência de um peptídeo
30 autoantigênico que ainda não foi identificado. Embora os alelos *HLADRB1* que contêm
31 o EC sejam fatores de risco genético estabelecidos na AR, as implicações
32 imunológicas precisas de sua expressão ainda não são claras. Além disso, tem sido
33 demonstrado que os alelos de EC no *locus* HLA-DRB1 não explicam completamente
34 a associação da região MHC com a doença (DIAZ-PEÑA; CASTRO-SANTOS, 2016).

1 Diversas possibilidades do envolvimento do EC na gênese da AR são postuladas e a
2 maioria delas se concentra no reconhecimento antigênico por células T maduras e/ou
3 diferenciação de repertório de células T (FOX, 2006).

4 Além do HLA, estudos genômicos têm identificado um grande número de outros
5 fatores genéticos que podem estar associados à AR como, por exemplo, variantes
6 nos genes que codificam diferentes moléculas, tais como: antígeno citotóxico
7 associado a linfócito (CTLA-4), molécula expressa em células T e que possui papel
8 fundamental na inibição da ativação celular e tolerância periférica; *Signal transducer*
9 *and activator of transcription 4* (STAT4), um fator transcricional importante na
10 sinalização intracelular para ativação da célula T por diversas citocinas, como IL-12,
11 IL-23, IL-27 e IFN- γ ; *Phox domain containing serine-threonine kinase* (PDK),
12 responsável pelo controle de bomba Na/K; Peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4),
13 responsável pela citrulinização proteica; *Fc fragment of IgG receptor* (FCGR) ; *Fas cell*
14 *surface death receptor* (FAS); bem como a variante de *FOXP3* (PRAHALAD, 2006).
15 As variantes destes diferentes fatores podem ser preditores ou não de suscetibilidade
16 à AR, e muitas das proteínas codificadas por esses genes poderão ser utilizadas como
17 alvo terapêutico (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

18 Polimorfismos de base única (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) têm sido
19 descritos em várias regiões no gene *FOXP3*, tais como região promotora, região
20 intrônica ou não codificante e região exônica ou codificante, com diferentes
21 consequências para diferentes patologias (HIRATA et al, 2012).

22 A variante genética do *FOXP3*, que regula a expressão da proteína Foxp3, tem
23 sido de interesse na investigação da susceptibilidade e desenvolvimento de doenças
24 autoimunes tais como: diabetes melitus tipo I (CUCCA et al., 2008), esclerose múltipla
25 (EBERS et al., 1996), doença de Graves (IMRIE et al., 2001; TAYLOR et al., 2006),
26 lúpus eritematoso sistêmico (LES) (LIN et al., 2011) e AR (PARADOWSKA-GORICKA
27 et al., 2014; HASHEMI et al., 2018). A proteína Foxp3, codificada pelo gene *FOXP3*
28 localizado no cromossomo Xp11.23, o qual contém 11 éxons pertence à família de
29 fatores de transcrição *forkhead/winged helix box-containing* com um único domínio
30 tipo *forkhead* (CHATILA et al., 2000). Tal domínio é necessário para a localização e
31 ligação com DNA, que leva à ativação ou repressão de produção de citocinas pelas
32 células T. Schubert e colaboradores (2001) demonstraram que o *FOXP3/Scurfin*
33 mostrada um papel crítico na manutenção e função de células T. Um gene defeituoso
34 apresenta que codifica a proteína Foxp3 causa doença linfoproliferativa mediadas por

1 células CD-4 positivas em humanos e ratos (CHATILA et al., 2004), enquanto uma
2 superexpressão do mesmo gene resulta em defeito na bioatividade dos linfócitos CD4,
3 como afetando a produção de citocinas, como IL-2 ou proliferação celular. Portanto, o
4 controle da expressão gênica em células T, é importantante para a homeostase do
5 sistema imune. (BASSUNY et al, 2004).

6 Cabe citar ainda que, em humanos, mecanismos genéticos ligados ao X podem
7 ter efeitos benéficos como aumento da expectativa de vida ou melhores desfechos de
8 sobrevivência em episódios de choque comparando mulheres com homens
9 (ALBERTSMEIER et al, 2014). Porém, ao tratarmos de doenças autoimunes observa-
10 se um aumento de susceptibilidade como em AR, Síndrome de Sjogren ou LES.
11 (PINHEIRO et al, 2011). Em AR, mulheres são três vezes mais expostas do que o
12 sexo masculino. Muitos fatores têm papel importante em vieses de sexo, como fatores
13 hormonais e de estilo de vida, mas algumas diferenças podem advir diretamente de
14 diferenças genéticas. No cromossomo X, muitos genes estão direta ou indiretamente
15 ligados em resposta imune, incluindo *FOXP3* e, mais recentemente, fatores
16 epigenéticos, como a presença de miRNA, envolvendo mecanismos moleculares da
17 resposta imune (KHALIFA et al., 2016).

18 A *FOXP3* age como ativador transcricional para genes que são
19 sobrerregulados em nTregs, enquanto reprime citocinas de resposta Th1 e Th2 (HORI
20 et al., 2003). Tem sido demonstrado que o polimorfismo do *FOXP3* -3279 C>A
21 (rs3761548) pode alterar a expressão da proteína *FOXP3*, sendo associado à
22 susceptibilidade a doenças autoimunes em asiáticos e não caucasianos (LEE et al.,
23 2015).

24 Em 2012, foi realizado estudo no norte do Paraná, para avaliar as frequências
25 dos polimorfismos e que demonstrou 8,70% do genótipo AA, 49,56% eram AC e
26 41,74% eram CC, para o polimorfismo -3279, enquanto para o polimorfismo -924,
27 34,78% dos indivíduos eram genótipo AA, 28,70% AG e 36,52% GG. Em relação aos
28 alelos para o polimorfismo -3279, 33,48% dos indivíduos apresentaram o alelo A e
29 66,52% possuíam o alelo C. Enquanto para o polimorfismo -924, 49,13% dos
30 indivíduos possuíam o alelo A e 50,87% apresentaram o alelo G. Neste mesmo estudo
31 não foi realizada associação com nenhuma doença. (HIRATA et al, 2012)

32 Park e colaboradores (2005) estudaram 10 diferentes polimorfismos do gene
33 *FOXP3* em uma população de 93 pacientes com doença de Crohn, 82 pacientes
34 femininos com cirrose biliar primária e 108 controles saudáveis. As variantes

1 estudadas foram -6054,ATT (rs590234), -5906 T>A (rs2869211), -3499 A>G
2 (rs3761547), - 3279 A>C (rs3761548), -2383 C>T (rs3761549), -383 C>T (rs2232364),
3 - 294 A>G (rs2232365), IVS1+87 G>T (rs2232366), IVS5-20 G>A (rs2232368),
4 IVS9+459 A>G (rs2280883), tendo sido encontrada associação de apenas um deles,
5 o IVS9+459, com cirrose biliar primária (16% nos controles vs 38% doentes
6 $p=0,003$).(PARK et al., 2005).

7 Posteriormente, Lin e colaboradores (2011) avaliaram a correlação de cinco
8 polimorfismos de *FOXP3* e a ocorrência de LES e suas manifestações clínicas, em
9 uma população de 172 pacientes com LES e 181 controles saudáveis em Taiwan.
10 Foram avaliados os seguintes polimorfismos: -6054del>ATA (rs3060515), -3499A>G
11 (rs3761547), -3279C/A (rs3761548), -2383C>T (rs3761549) e IVS9+459P
12 (rs2280883). Importante citar que o grupo LES foi estratificado pela presença de
13 nefrite e por marcadores imunológicos (incluindo anti-DNAs, fator anti-núcleo, C3,
14 C4). Os autores demonstraram uma associação entre o alelo *FOXP3* -6054 ATA com
15 menor risco de nefrite lúpica (36,3% com alelo ATA vs 63,6% com deleção do alelo),
16 e *FOXP3* -3279C/A com níveis mais baixos de anti-dsDNA em mulheres com LES.
17 (LIN et al, 2011).

18 Em 2015, Zheng e colaboradores avaliaram a associação de quatro variantes
19 da *FOXP3*: -2383C/T (rs3761549), -3279C/A (rs3761548) e o -3499A/G (rs3761547)
20 na região promotora, e o IVS9+459P no íntron, com a susceptibilidade à doença de
21 Graves em uma população chinesa Han (maior grupo étnico chinês, seguido pela
22 minoria Manchu). Os autores encontraram uma associação positiva entre os genótipos
23 AA+CA do -3279C>A (rs3761548) e o genótipo CC do IVS9+459P (ZHENG et al.,
24 2015) e a presença de doença de Graves. A presença do alelo -3279 A foi
25 significativamente mais alta em pacientes com doença de Graves comparada aos
26 controles (21,4% vs 15,0%, $p= 0,004$), sendo o genótipo AA+CA o mais
27 frequente.(36,4% vs 26,5 %, $p= 0,008$). Quando usado o genótipo CC como
28 referência, foi encontrado que o genótipo CA estava associado a um maior risco da
29 doença, sendo o genótipo AA associado a risco *borderline*. Já avaliando os genótipos
30 AA+CA, foi encontrada susceptibilidade aumentada. Para o polimorfismo IVS9 +459P,
31 as frequências dos genótipos CC, CT e TT foram 8,4%, 17,9% e 73,7% em doença
32 de Graves e 3,3%, 21,6% e 75,1 % em indivíduos controles, com diferença
33 estatisticamente significativa ($p=0,017$). Quando usado genótipo TT como referência,

1 foi encontrado que o genótipo CC estava associado ao maior risco de doença (OR
2 2,781 IC 95% 1,322-6,187 p=0,017).

3 Em relação à estudos em AR, os dados são ainda muito escassos. Até o
4 presente momento, apenas 2 estudos avaliaram o envolvimento do polimorfismo do
5 *FOXP3* -3279C/A na suscetibilidade à AR (PARADOWSKA-GORICKA et al., 2014;
6 HASHEMI et al., 2018).

7 Paradowska-Goricka e colaboradores (2014) avaliaram na população
8 polonesa, a associação de 2 polimorfismos do gene *FOXP3*, -3279C>A (rs3761548)
9 e -924 A/G (rs2232365), e a susceptibilidade e gravidade da AR. Foram incluídos 530
10 participantes, dos quais 274 eram pacientes com AR e 295 indivíduos saudáveis. Para
11 a análise do polimorfismo -3279C/A foram utilizados quatro modelos genéticos, a
12 saber: modelo codominante CC/CA/AA, modelo dominante CC/CA+AA, modelo
13 recessivo CC+CA/AA e modelo sobredominante CC+AA/CA. Os resultados revelaram
14 que, no modelo codominante, a frequência de genótipos CA e AA foi
15 significativamente maior em pacientes com AR comparada a controles (p=0,0004 e
16 p=0,037, respectivamente). De forma semelhante, no modelo dominante (CA+AA vs
17 CC) a associação com a AR também foi significativa. Já no modelo sobredominante,
18 a frequência do genótipo CA foi mais alta (47% vs 35% p=0,003) no grupo AR. No
19 modelo recessivo, as distribuições genotípicas não diferiram entre os grupos. Já para
20 o polimorfismo -924 A/G, pacientes com AR demonstraram genótipo e distribuição
21 alélica significativamente diferente do grupo controle. Para o modelo dominante (AA
22 vs AG+GG) a associação também foi significativa bem como para o sobredominante
23 com aumento de susceptibilidade para todos os modelos. A análise estatística revelou
24 que ambos os alelos -3279 A e -924 G foram associados com chance aumentada de
25 AR na população polonesa (p:0,003 e p:0,004, respectivamente), quando comparados
26 com o tipo selvagem -3279 C e -924 A. Não houve associação destes polimorfismos
27 com parâmetros clínicos dos pacientes (escala visual analógica para dor, sexo e
28 escore de Larsen), laboratoriais (creatinina, presença de FR, PCR), bem como com a
29 atividade da doença avaliada pelo DAS 28. Os autores observaram que os níveis
30 séricos da proteína *Foxp3* eram significativamente maiores em pacientes com AR que
31 apresentaram o genótipo AA e AG referente ao polimorfismo do *FOXP3* -924, em
32 comparação a controles saudáveis com o mesmo genótipo. Desta forma, os autores
33 concluíram que a expressão de ambos os genótipos pode levar à alteração da

1 transcrição de proteínas intracelulares, bem como à alteração de função das Treg na
2 homeostase imune, podendo levar à atividade de doença.

3 Recentemente, Hashemi e colaboradores (2018) demonstraram uma
4 associação positiva entre a presença do polimorfismo -3279 C/A (rs3761548) e o risco
5 da AR em uma população iraniana. Foram avaliados 240 pacientes com AR (32
6 homens e 208 mulheres) e 240 controles (78 homens e 162 mulheres). Os genótipos
7 CA e AA no modelo codominante foram mais frequentes em pacientes com AR
8 quando comparados a indivíduos saudáveis. Para o modelo dominante, foi observada
9 associação significativa na frequência de CA+AA vs CC ,para o modelo
10 sobredominante a frequência de CA foi estatisticamente mais alta e também para o
11 modelo recessivo a presença do alelo AA em homozigose também apresentou maior
12 distribuição na população AR do estudo (45% vs 31% IC 95% 1,6 (1,3-2,1) p=0,02).
13 Demonstraram também que o alelo -3279 A foi associado a risco aumentado de AR
14 nesta população. Na análise de associação do polimorfismo com parâmetros clínicos,
15 foram obtidas diferenças significativas em deformidade, duração, atividade de doença,
16 FR e níveis de Anti-CCP entre genótipos CA+AA e CC, demonstrando associação
17 com maior gravidade da doença do genótipo CA+AA. Pacientes com AR
18 apresentaram menor frequência de células Treg quando comparados a indivíduos
19 controles, sendo a frequência de Treg ainda menor em pacientes com genótipo AA
20 quando comparada aos pacientes com genótipo CC e CA. Os níveis séricos de TGF-
21 β e IL-10 estavam diminuídos no grupo AR quando comparados ao grupo controle ,
22 assim como pacientes com o genótipo AA apresentaram níveis séricos
23 significativamente menores de TGF- β e IL-10 quando comparados com o CC. Esses
24 achados sugerem que o genótipo AA está associado à diminuição funcional das Tregs
25 e aumento da susceptibilidade à AR na população iraniana.

2. JUSTIFICATIVA

1 Os resultados quanto à frequência da variante do *FOXP3* -3279 C>A
2 (rs3761548) e a sua associação com doenças autoimunes são múltiplos e
3 controversos, sendo ausentes na população brasileira com AR. Poucos estudos
4 avaliaram a associação entre o polimorfismo do *FOXP3* -3279 C/A (rs3761548) e a
5 susceptibilidade a AR, e somente um deles investigou a associação dessa variante
6 genética com os níveis de TGF- β e IL-10.

7 Desta forma, este estudo poderá fornecer informações inéditas quanto à
8 frequência bem como quanto a sua associação com a susceptibilidade da AR e a sua
9 gravidade, assim como com os níveis de TGF- β e IL-10, podendo contribuir para a
10 identificação de um novo biomarcador genético que poderá ser investigado em
11 estudos futuros de associação quanto à resposta terapêutica.

3. OBJETIVOS

1

3.1 OBJETIVO GERAL

2

3

4

5

6

7

8

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

10

- Comparar a frequência da variante genética do *FOXP3* -3279C>A (rs3761548) em pacientes com AR e em indivíduos controle;

11

12

13

- Avaliar se a variante genética do *FOXP3* -3279C>A (rs3761548) está associada com a atividade da doença determinada pelo DAS28-VHS;

14

15

16

- Verificar se a variante genética do *FOXP3* -3279C>A (rs3761548) está associada com a presença e os níveis de anticorpos relacionados ao prognóstico da doença;

17

18

19

20

- Determinar se a variante genética do *FOXP3* -3279C>A (rs3761548) está associada com os níveis de citocinas em pacientes com AR, tais como: TNF- α , IL-10, IL-17A e TGF- β .

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

4. SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE. 06405812.1.0000.5231), Parecer CEP/UEL nº 205.175 (ANEXO A). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos ou de seus responsáveis (APÊNDICE A). Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas na Declaração de Helsinque.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Participaram deste estudo caso-controle 434 indivíduos de ambos os sexos, sendo 251 pacientes com AR, selecionados do Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina e 183 indivíduos controles selecionados entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina. Os indivíduos controles não estavam em tratamento com anti-inflamatórios ou antibióticos e não relataram doenças cardíacas, tireoidianas, renais, hepáticas, gastrointestinais, oncológicas ou outras doenças autoimunes. Informações referentes a estilo de vida e histórico médico foram obtidas a partir de avaliação clínica de cada paciente (APÊNDICE B)

O diagnóstico da AR foi realizado a partir dos critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia e da Liga Europeia Contra o Reumatismo, de 2010 (ALETAHA, 2010) e a atividade da doença foi determinada pelo escore DAS28-VHS (PREVOO et al., 1995). Foi considerada remissão quando $\leq 2,6$, baixa atividade quando $\leq 3,2$, moderada $\leq 5,1$ e alta $> 5,1$.

Inicialmente, pacientes com AR e controles foram divididos em dois grupos de acordo com a presença da doença. Foi realizada comparação entre os resultados desses grupos para diversos parâmetros clínicos e laboratoriais, incluindo a comparação na distribuição da variante do *FOXP3* -3279C/A (rs3761548). Posteriormente, foi realizado um novo delineamento no qual os pacientes com AR foram alocados em dois grupos de acordo com o modelo dominante (CC vs. CA+AA)

1 para o polimorfismo *FOXP3* -3279C>A (rs3761548) e comparados os diversos
2 parâmetros clínicos e laboratoriais.

5 **4.3 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS**

6
7 O peso corporal foi avaliado com aproximação de 0,1 kg utilizando uma balança
8 eletrônica e com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da
9 manhã e a altura foi medida com precisão de 0,1 cm, utilizando-se um estadiômetro.
10 O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado como peso (kg) dividido pela altura
11 (m) ao quadrado.

13 **4.4 EXAMES LABORATORIAS**

15 4.4.1 Coleta de sangue

16
17 Amostras de sangue periférico dos indivíduos envolvidos na pesquisa foram
18 obtidas de acordo com protocolo de Teunissen e colaboradores (2011). As amostras
19 foram coletadas com o sistema de coleta a vácuo em tubos com EDTA como
20 anticoagulante e em tubos sem anticoagulante após 12 horas de jejum. Após a coleta,
21 as amostras foram identificadas com números sequenciais para garantir a
22 confidencialidade e o material foi imediatamente centrifugado. Plasma, soro e *buffy-*
23 *coat* foram aliquotados em tubos tipo *ependorf* e armazenados em *freezer* -80°C para
24 posterior análise.

26 4.4.2 Biomarcadores Imunológicos e inflamatórios

27
28 Os níveis de anticorpos anti-CCP foram determinados por quimioluminescência
29 em micropartículas (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os níveis
30 de FR e proteína c reativa ultrasensível (usPCR) foram determinados por
31 imunoturbidimetria (c8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). O VHS foi
32 determinada por método automatizado (Alipax, United States of America).

1 Os níveis plasmáticos de IL-10, IL-17A e TNF- α foram determinados por
2 imunofluorometria utilizando kit multi-PLEX customizado e o TGF- β utilizando kit
3 single-PLEX (Novex Life Technologies, Frederick, United States of America) para
4 plataforma Luminex®.

6 4.4.3 Polimorfismo genético do gene *FOXP3* -3279 C/A (rs3761548)

8 O Polimorfismo *FOXP3* -3279 C/A foi avaliado por reação em cadeia da
9 polimerase (PCR) seguida por análise dos fragmentos de restrição (RFLP).

11 4.4.3.1 Extração do DNA

12 A extração do DNA genômico a partir do *buffy-coat* de ambos os grupos foi
13 realizada utilizando o método de separação em coluna com reagentes
14 comercialmente disponíveis (*Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brasil*),
15 segundo as instruções do fabricante.

16 A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de
17 agarose 1%, aplicando-se 5 μ L da amostra de DNA extraído e 5 μ L do corante xileno
18 cianol (X-C). A eletroforese foi realizada a 100 V, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)
19 1x (*Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Após a
20 corrida de 45-60 minutos, o gel foi submerso em uma cuba com tampão TAE 1x
21 (*Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) contendo
22 brometo de etídio (20 mg/mL) por 20 minutos e a imagem do gel foi capturada e
23 armazenada pelo sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (*Locus Biotecnologia,*
24 *Cotia, SP, Brasil*). Em cada eletroforese realizada, foi incluído um controle de DNA,
25 com concentração de 100 ng/ μ L, para análise comparativa com o DNA das amostras
26 do estudo.

28 4.4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o polimorfismo (rs3761548)

29 Aproximadamente 100 ng de DNA foram utilizados para amplificar uma
30 sequência de 155 pares de base (pb) do gene da *FOXP3* utilizando a PCR. Os *primers*
31 utilizados para a amplificação da sequência de 155 pb do gene *FOXP3* foram
32 sintetizados de acordo com a sequência do *GenBank* número NT_079573 (GAO et
33 al., 2010). O *primer forward* é formado pela sequência 5' GGC AGA GTT GAA ATC

1 CAA GC 3' e o *primer reverse* é formado pela sequência 5' CAA CGT GTG AGA AGG
2 CAG AA 3'.

3 A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 0,25 mM
4 de cada *primer*, 1,50 mM de MgCl₂, 0,10 mM de dNTP (*Invitrogen™, Life*
5 *Technologies, Carlsbad, CA, USA*), 1,25 U da enzima DNA polimerase recombinante
6 diluída em seu tampão (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), e 100
7 ng da amostra de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador
8 (*Applied Biosystems Veriti™ 96-well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City,*
9 *CA, USA*), com um ciclo de desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C; seguido por 35
10 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 65°C para o
11 anelamento e 30 segundos a 72°C para extensão; e 10 minutos a 72°C para a
12 extensão final. Todas as reações foram realizadas com um controle negativo
13 (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucleicos.

14 Para a análise do produto da PCR, 5 µL do produto obtido na reação em cadeia
15 da polimerase e 5 µL do corante X-C foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%,
16 realizada a corrida de 60 minutos (100 V) com posterior coloração do gel com nitrato
17 de prata. Em cada eletroforese foi incluído o controle negativo, com ausência de DNA.
18 Em cada eletroforese foi aplicado, também, 4 µL do *ladder* de 100pb (*Invitrogen™,*
19 *Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 5 µL do corante X-C para determinar o
20 tamanho do fragmento de DNA amplificado.

21

22 4.4.3.3 *Polimorfismos no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) para o*
23 *polimorfismo (rs3761548)*

24

25 A enzima de restrição *Pst*I (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA,*
26 *USA*) é purificada de *Providencia stuartii* e tem como sítio de restrição a seguinte
27 sequência de nucleotídeos:

28

29

30



31

32 A troca de bases (C>A) na sequência do gene *FOXP3* elimina o sítio de

1 sequência a base citosina (C) apresenta o sítio de restrição para a enzima, enquanto
2 que o alelo que possui a base adenina (A) perde esse sítio de restrição.

3 A partir dos produtos de amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase,
4 foi realizada a digestão enzimática com a enzima de restrição *PstI*. Cinco microlitros
5 do produto da reação em cadeia da polimerase foi completamente digerido com 0,3µL
6 de enzima *PstI* 10U/µL overnight a 37°C em termobloco.

7 Os produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em
8 gel de poliacrilamida 10%, aplicando-se 5 µL do produto de digestão enzimática de
9 cada amostra e 5 µL de corante X-C no gel para a visualização dos fragmentos
10 formados. A eletroforese foi realizada a 100 V durante 60 minutos e o gel corado com
11 nitrato de prata conforme descrito anteriormente. A análise das bandas eletroforéticas
12 permitiu a caracterização dos três possíveis genótipos do polimorfismo rs3761548.

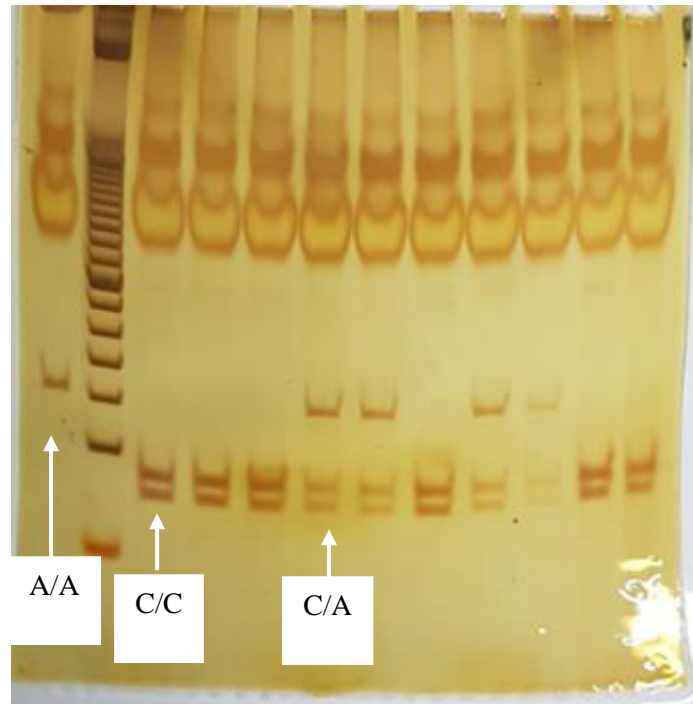
13 Esse polimorfismo apresenta em sua sequência um único sítio polimórfico
14 de restrição para a enzima, que somente será clivado quando não houver a troca da
15 base C pela A. Com isso, o alelo C sempre será clivado devido à presença do sítio
16 polimórfico, formando dois fragmentos de tamanhos diferentes. O alelo A não sofre a
17 ação da enzima, pois não apresenta o sítio para clivagem (ocorre a perda do sítio
18 polimórfico), com a formação de um único fragmento. Portanto, os três genótipos
19 possíveis foram identificados da seguinte maneira:

- 20 • CC representa o genótipo na ausência de mutação e apresenta duas bandas
21 eletroforéticas, com 75 pb e 80 pb (provenientes da clivagem do sítio
22 polimórfico).
- 23 • CA representa o genótipo com mutação em heterozigose, contendo três
24 bandas eletroforéticas, com 75 pb e 80 pb (provenientes da clivagem do sítio
25 polimórfico presente no alelo C) e 155 pb (proveniente do alelo T que não
26 sofre a ação da enzima).
- 27 • AA representa o genótipo com mutação em homozigose, apresentando
28 somente uma banda eletroforética com 155 pb (que não sofre a ação da
29 enzima).

30
31 A Figura 3 apresenta os resultados obtidos pela eletroforese em gel de
32 poliacrilamida 10% após coloração com nitrato de prata. A análise eletroforética dos

1 produtos de digestão enzimática possibilitou a caracterização dos genótipos
2 encontrados na população em estudo.

3
4 **Figura 3** - Gel de acrilamida com leituras de pares de bases.



20 Análise dos produtos da digestão enzimática em 11 amostras de pacientes. Eletroforese em gel de
21 poliarilamida 10% após coloração com nitrato de prata caracterizando os três perfis genéticos após
22 a digestão com a enzima de restrição *Pst*I. L: *ladder* de DNA com 50 pb; genótipo AA (presença de
23 uma única banda com 155 pb); genótipo CC (presença de duas bandas com 80 e 75 pb); Genótipo
24 CA (presença de três bandas com 155, 80 e 75pb).

25 Fonte: próprio autor.

26 27 28 **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

29
30 Os dados categóricos foram avaliados por teste de qui-quadrado e os dados
31 foram expressos em número absoluto e percentagem. Foi calculado a razão de
32 chance (odds ratio - OD) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Para verificar a
33 normalidade da distribuição dos dados foi realizado o teste de Komogorov-Smirnov e
34 para testar a homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Levene. Os dados
35 que não apresentaram normalidade foram transformados em logaritmo natural (Ln) e

1 re-testados para o teste de normalidade. Dados paramétricos foram avaliados pelo
2 teste t de Student e os dados expressos como media (\pm SD). Dados não paramétricos
3 foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e os dados expressos como mediana e
4 percentis (25%-75%). O valo de p foi ajustado para variáveis confundidoras por teste
5 de regressão logística binária. Foi considerada significância estatística quando
6 $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS
7 versão 22.0 (IBM, USA).

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2
3 Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um
4 artigo científico, intitulado: "**FOXP3 POLYMORPHISMS -3279 C/A (rs3761548) IN**
5 **PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: ASSOCIATION WITH DISEASE**
6 **ACTIVITY AND TGF- β PLASMA LEVELS**", que foi submetido ao periódico Clinical
7 and Experimental Medicine, com fator de impacto de 2,789.

1 **FOXP3 POLYMORPHISM -3279 C/A (rs3761548) IN PATIENTS WITH**
2 **RHEUMATOID ARTHRITIS: ASSOCIATION WITH DISEASE ACTIVITY AND TGF- β**
3 **PLASMA LEVELS**

4
5 Ana Luisa Berti Guimarães Sella^{1,2}, Tamires Flauzino¹, Tatiana Mayumi Veiga
6 Iriyoda², Neide Tomimura Costa³, Karen Brajão de Oliveira⁴, Marcell Alysson Batisti
7 Lozovoy⁵, Isaias Dichi³, Edna Maria Vissoci Reiche^{1,5}, Andréa Name Colado Simão^{1,5}

8
9 ¹ Laboratory of Research in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina,
10 PR, Brazil

11 ² Department of Rheumatology – PUC, Pontifícia Universidade Católica, Londrina,
12 Paraná,

13 ³Department of Internal Medicine – University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

14 ⁴ Laboratory of molecular genetics and immunology, Department of Pathological
15 Science, Londrina State University, Londrina, PR, Brazil

16 ⁵Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Laboratory of Research
17 in Applied Immunology, University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

18
19
20 *Corresponding author: Andréa Name Colado Simão

21 Postal address: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Rua
22 Robert Koch, n 60. University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440.

23 Tel.: +55- 43-3371-2321; Fax: +55-43-3371-2619.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1 ABSTRACT

2
3 There is evidence indicating the critical role of regulatory T cells (Tregs) in the
4 Rheumatoid Arthritis (RA) pathogenesis. Polymorphism of the transcription factor
5 Forkhead Box Protein 3 (*FOXP3*) could affect Foxp3 expression and Treg function in
6 patients with RA. The aim of this study is evaluating the *FOXP3* polymorphism -3279
7 C/A (rs37611548) and its association with RA, disease activity, prognosis and cytokine
8 plasma levels in Southern Brazilian population. This is a case-control study, which 251
9 RA patients and 183 health subjects were recruited. Activity disease was consider
10 when Disease Activity Score 28 (DAS-28)>2.6. The polymorphism was studied using
11 PCR-RFLP and cytokine plasma levels by immunofluorimetry. The frequency of the
12 CC, CA and AA genotypes did not differ between patients with RA and control (47.5%,
13 41.0%, and 11.5%% vs 48.6%, 39.6%, and 12.0%; p= 0.131 and p=0.095),
14 respectively. However, the CC genotype was associated with decreased TGF- β in RA
15 patients (p=0.027), but not control. Patients with C allele, in homozygosis or
16 heterozygosis, demonstrated higher frequency of patients with DAS 28>2.6 (p=0.042).
17 In conclusion, our data demonstrated that *FOXP3* polymorphism -3279 C/A was not
18 associated with susceptibility and prognosis in RA Brazilian patients. However,
19 patients with C allele demonstrated decreased TGF- β plasma levels (in homozygosis)
20 and higher frequency of patients with active disease (in homo or heterozygosis). These
21 data suggest that the C-allele of *FOXP3* -3279 C/A polymorphism may be associated
22 with the quantitative or functional alteration of Treg cells, which could be one of the
23 factors involved in active disease.

24
25
26 **Key words:** Rheumatoid arthritis; *FOXP3* Polymorphism (rs37611548); T regulatory
27 cell, transforming growth factor beta, disease activity score
28
29
30
31
32
33
34

1 INTRODUCTION

2
3 Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, inflammatory joint disease of
4 autoimmune nature, characterized by destruction of the joint cartilage and bone. RA is
5 associated with inflammation and pathological infiltration of lymphocytes in the
6 synovium [1] and presence of autoantibodies such as rheumatoid factor (RF) and anti-
7 citrullinated protein antibodies (anti-CCP) [2] The etiology of RA is unknown but genetic
8 and environmental factors can contribute to its development.

9 Although the immunopathogenesis of RA remains elusive, the main reason
10 seems to be the breakdown of tolerance and dysregulated lymphocyte activation [3].
11 T cell has many subtypes involved in RA pathogenesises, including T helper 1 (Th1),
12 Th2, Th17, and regulatory T cells (Treg) with different functional properties [4]. It has
13 been reported that Treg serve an important role in the pathogenesis of RA by
14 regulating autoimmunity and inflammation [5,6]. Tregs were revealed to be crucial for
15 peripheral self-tolerance, as they actively suppress auto-reactive lymphocytes as well
16 as other immune cells and express suppressive cytokines, including interleukin 10 (IL-
17 10) and transforming growth factor beta (TGF- β) [7]. They are a cellular population
18 derived from the thymus and characterized by high constitutive expression of the IL-2
19 receptor alpha chain (CD 25) and the transcription factor Forkhead Box Protein 3
20 (FOXP3) [8].

21 Foxp3 is the main lineage-specific transcription factor for Tregs and plays an
22 important role in the development of these cells in thymus. *FOXP3* gene is located on
23 chromosome Xp11.23, belongs to forkhead/winged helix box-containing transcription
24 factor family, with a unique forkhead domain. This gene is a transcriptional activator
25 and regulates gene expression normally unregulated in normal Tregs [9]. Its
26 expression is necessary for acquiring the Treg phenotype and amplifying a Treg
27 genetic program [10]. The transcription factor Foxp3, a 47 kDa protein, belongs to the
28 fork-winged helix family and is encoded by the *FOXP3* gene. Polymorphism of *FOXP3*
29 -3279 C/A (rs3761548), mostly affect Foxp3 expression and activity [11]. Changes in
30 Foxp3 protein production is involved in many diseases including autoimmune disease
31 RA [12].

32 Recently, surveys in Polish and Turkish populations have studied some
33 polymorphisms of *FOXP3* gene, and its relation with RA. There is evidence indicating
34 the critical role of Tregs and its functioning in the RA pathogenesis. However,

1 controversial results make it difficult to have a precise conclusion in this issue [12, 13].
2 It is well-known that ethnicity influences polymorphisms in various genes, which may
3 cause controversial results in different populations, that is why is important to survey
4 this relation in different countries. Thus, the aim of this study is evaluating the *FOXP3*
5 polymorphism -3279 C/A (rs37611548) and its association with RA, disease activity,
6 prognosis (evaluated by autoantibodies presence), and cytokine plasma levels in
7 Southern Brazilian population.

9 **SUBJECTS AND METHODS**

11 **Subjects**

13 This study recruited 434 individuals. Two hundred and fifty one patients with
14 RA were selected from the Ambulatory of Rheumatology of the University
15 Hospital of Londrina, Paraná, Brazil and 183 were healthy controls. The diagnostic
16 was determined by American College of Rheumatology / European League Against
17 Rheumatism (ACR/EULAR) classification criteria for RA [14]. Exclusion criteria were
18 acute or chronic infectious, oncological and other autoimmune diseases. Information
19 on lifestyle factors and medical history was obtained at clinical evaluation. The
20 individuals of both groups self-reported that they did not drink alcohol regularly. RA
21 diagnosis was performed using the 2010 ACR/EULAR criteria and disease activity was
22 measured by DAS28 ESR. Remission was considered with DAS-ESR<2.6, low
23 activity:2.6 - 3.1, moderate activity 3.2 - 5.0 and high activity ≥ 5.1 [15].

24 This study was conducted according to the guidelines of Declaration of
25 Helsinki and all procedures involving human subjects/patients were approved by the
26 Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil
27 (CAAE:06405812.1.0000.5231). Written informed consent was obtained from all
28 subjects.

30 **Anthropometric Measurements**

32 Anthropometric measurements were assessed. Body weight was measured
33 to the nearest 0.1 kg in the morning by using an electronic scale, with individuals
34 wearing light clothing and no shoes; height was measured to the nearest 0.1 cm by

1 using a stadiometer. Body mass index was calculated as weight (kg) divided by
2 height (m) squared.

4 **Genotyping**

5
6 Approximately 100 ng of DNA was use to amplify the -3279 C/A polymorphism
7 using primers synthesized according to the sequence deposited on GenBank under
8 accession number NT_079573 (GAO et al., 2010). Initially, a denaturation step
9 consisted of 4 min at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 30seg, 65°C for 30 sec
10 and 72°C for 30 sec, with final extension of 10min at 72°C. After amplification of a 155
11 bp fragment of the *FOXP3* gene, it was digested with restriction enzyme Pst-I
12 according to the manufacturer's instructions. The products of the digestion were
13 analyzed according to the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) by
14 electrophoresis in polyacrylamide gel (10%) and stained with silver nitrate. The C allele
15 was defined with fragments of 80 and 75 bp, while the A allele did not undergo
16 cleavage remaining with 155 bp.

19 **Immunologic and Inflammatory Biomarkers**

20
21 After fasting for 12 h, venous blood was withdrawn with
22 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) using sterile tubes (BD Vacutainer
23 UltraTouch; Franklin Lakes, NJ, USA). Whole blood was centrifuged at 3000 rpm
24 for 15 min and plasma samples were separated and divided into aliquots and then
25 stored at -80 °C for subsequent analysis. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody
26 (Anti-CCP) was performed by chemiluminescence (Architech™, Abbott Laboratory,
27 Abbott Park, IL, USA). Rheumatoid factor (RF) was assessed by imunoturbidimetry
28 (C8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Erythrocyte sedimentation rate
29 (ESR) was assessed by automatized method. Plasma levels of tumoral necrosis
30 factor alpha (TNF- α), IL-17A, and IL-10 was performed using kit multiplex and TGF- β
31 using kit single-Plex by Procarta (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena Austria),
32 both for Luminex® platform.

1 **Statistical Analysis**

2
3 Categorical variables were evaluated using the chi-square test and the data
4 were expressed in absolute number (%).Odds ratio and 95% confidence interval were
5 calculated. To verify the distribution of the data, the Komogorov-Smirnov normality test
6 was used. To evaluate the homogeneity of the variances, a Levene test was used.
7 Data that did not show normal distribution or homogeneity of the variance were
8 transformed into natural logarithm (Ln) and retested for normality. Mann-Whitney test
9 was used when data not show not normal distribution. Data were expressed as median
10 and percentile range (25%-75%). The p value was adjusted by extraneous variables
11 by binary logistic regression. Statistical difference was considered when $p < 0.05$. All
12 statistical analyzes were analyzed using statistical software SPSS version 22.0 (IBM,
13 USA).

14 15 16 **RESULTS**

17 18 **Demographic, clinical and laboratory characteristics**

19
20 Clinical and laboratory characteristics of the RA patients were shown in Table
21 1. The RA patients had 10 (4-19) years of median of disease duration and ESR of
22 18mm (3-32). Most of the RA patients (46.6%) were in a moderate activity by DAS 28
23 index, 51.3% had positive RF, and 58.6% had a positive ACPA. Extra-articular
24 manifestations were observed in only 10.4% of patients. About the treatment, 68.6%
25 patients used corticosteroids, 67.3% methotrexate, 40.6% leflunomide, 25.1% TNF- α
26 inhibitors, and 37.8% hydroxichloroquine.

27 A patients and controls did not differ in gender ($p= 0.771$) and ethnicity ($p=$
28 0.294). However, RA patients had higher frequency of tobacco use ($p=0.032$) and were
29 older ($p<0.001$) and with higher BMI ($p<0.001$) when compared with health control.
30 After adjusted p value by ethnicity, age, BMI, and tobacco, RA patients show reduced
31 TGF- β plasma levels ($p=0.024$), and higher IL-10 ($p<0.001$) and TNF- α ($p=0.021$) than
32 control, but IL-17A plasma levels not differ ($p=0.353$) between the groups (Table 2).

33 In the current study, three genetic models were used to assess the association
34 of SNP within the *FOXP3* gene and RA susceptibility including dominant, codominant

1 and recessive. The results demonstrated that the frequency of the CC, CA and AA
2 genotypes (codominant model) did not differ between patients with RA and control
3 (47.5%, 41.0%, and 11.5%% vs 48.6%, 39.6%, and 12,0%; $p= 0.131$ and $p=0.095$),
4 respectively. When dominant model was evaluated in RA patients and control group,
5 no significant association was observed in the frequency of the CC vs. CA+AA (47.5%
6 and 52.5% vs 48.2% and 51.8%, $p=0.778$), respectively. Furthermore, in the recessive
7 model, the frequency of CC + CA vs AA did not also differ (88.5% and 11.5% vs 88.0%
8 and 12.0%, $p= 0.092$). There was no difference between allele frequency (C vs A;
9 $p=0.8650$) (Table 3). We also evaluated the polymorphism frequency in male and
10 female groups, but the results did not change. The distribution of genotypes and allelic
11 frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls (chi-square
12 test; $p > 0.05$).

13 In the Table 4, we evaluated whether the genotyping, using the dominant model
14 (CC vs CA+AA), could be associated with cytokine plasma levels and DAS 28 in both
15 studied groups. In control group, there was no difference between genotypes by sex
16 ($p=0.269$), tobacco ($p=0.967$), age ($p=0.582$), and BMI ($p=0.553$). However, the group
17 with CC genotype had higher frequency of non-Caucasian individuals ($p=0.024$). After
18 adjusted by sex and ethnicity, there were no difference between genotypes groups in
19 the levels of TGF- β ($p=0.379$), IL-10 ($p=0.327$), IL-17 ($p=0.516$), and TNF- α ($p=0.411$).
20 When RA patients were evaluated, the genotype frequency did not differ about tobacco
21 use ($p=0.693$), age ($p=0.749$), and BMI ($p=0.522$). However, CC genotype had higher
22 frequency of man ($p=0.005$) and not Caucasian ($p=0.001$) patients. In addition, after
23 adjusted by sex and ethnicity patients with CC genotype showed lower levels of TGF-
24 β ($p=0.027$) when compared with those carrying CA+AA. However, the groups did not
25 differ about other cytokines, such as IL-10 ($p=0.241$), IL-17A ($p=0.647$), and TNF- α
26 ($p=0.246$) plasma levels. In addition, the groups also not differ about DAS 28 ESR
27 ($p=0.220$), positivity of RF ($p=0.220$) and anti-CCP ($p=0.926$), as well as medication
28 use.

29 In the Table 5, we used the recessive model for the evaluation (CC+CA vs AA).
30 In control group, there was significant difference according to sex ($p<0.001$), with a
31 higher frequency of male in genotype AA ($p<0.001$). No differences were found by
32 ethnicity ($p=0.835$), tobacco use ($p=0.969$), age ($p=0.126$), BMI ($p=0.126$), and
33 cytokine plasma levels: TGF- β ($p=0.808$), IL-10 ($p=0.525$), IL-17A ($p=0.605$) and TNF-
34 α ($p=0.604$). When RA patients were evaluated, the genotypes distribution by sex kept

1 differing, with higher frequency of genotype AA in male group as well ($p < 0.001$). The
2 CC+CA genotype was implicated in a higher frequency of RA patients distributed in a
3 moderate to severe activity of DAS 28 (77.37% vs 60% $p: 0.042$), although, the groups
4 did not differ about the studied cytokines: TGF- β ($p=0.850$), IL-10 ($p=0.921$), IL-17A
5 ($p=0.551$), and TNF- α ($p=0.457$). About medication use, the groups did not differ,
6 except by a statistic trend in higher prednisone use in CC+CA group ($p=0.056$).

7 8 **DISCUSSION**

9
10 The major finding was that the groups did not differ about *FOXP3* -3279 C/A
11 genotype (codominant, dominant, and recessive model) and allele frequency. There
12 was not also association between genotypes/alleles and autoantibodies presence (RF
13 and anti-CCP). However, CC genotype (in dominant model) was associated with
14 decreased TGF- β in RA patients, but not control, independently of sex and ethnicity.
15 In addition, RA patients with C allele, in homozygosis or heterozygosis, demonstrated
16 higher frequency of patients with DAS 28 $>2,6$ when compared those without this allele.

17 The central feature of RA is the imbalance of cytokine production with a relative
18 excess of proinflammatory molecules, including IL-1, IL-6, IL-17 and TNF α , compared
19 with anti-inflammatory mediators like IL-10 or TGF- β [8]. In the present study we
20 demonstrated higher TNF- α plasma levels. Our data are in agreement with previous
21 studies that also demonstrated high levels of proinflammatory cytokines, such as TNF-
22 α have been widely reported in patients with RA [16,17] and evidence supports that a
23 pivotal role of TNF as a potent paracrine cytokine that may be able to induce the
24 release of other proinflammatory molecules in joints.

25 In addition, our data demonstrated higher IL-10 plasma levels in patients than
26 controls. However, reports on IL-10 showed contradictory results, with both elevated
27 and reduced levels reported [8, 18]. IL-10 is a potent inhibitor of the production of
28 proinflammatory mediators by macrophages and was considered to mediate potent
29 downregulation of the proinflammatory response in RA, and could be found in higher
30 levels in RA patients in an attempt of mitigating immune response, but frequently these
31 levels are insufficient to do it [2, 8] .

32 In relation to TGF- β , our data are in agreement with studies that also showed
33 decreased plasma levels in RA patients [8, 13]. TGF- β is well-known for its
34 immunosuppressive and antiinflammatory properties, modulating the expression of

1 other molecules with its levels varying in different studies showing decrease in RA
2 patients like our study [7]. It is important to remember that the expression of cytokines
3 can be altered by the controlling of Tregs, that exert their regulatory functions in part
4 through secretion of these antiinflammatory cytokines, so indirectly we are
5 demonstrating the role of Tregs in RA [4].

6 The polymorphism of *FOXP3* gene can change its role functionally or
7 quantitatively, resulting to lack of functional CD4⁺CD25⁺Tregs and subsequently
8 chronically activated CD4⁺ T cells which express increased levels of cytokines [8].
9 Although several studies have implied the critical role of Tregs in RA pathogenesis,
10 controversial results emerged that may be related to the polymorphisms of Treg-
11 lineage specific transcription factor. In the Paradowska-Goricka et al. [12] survey the
12 *FOXP3* -3279 A and -924 G alleles were associated with serum levels of Foxp3 higher
13 in patients than the controls, in which the underlying mechanism is still difficult to
14 explain, but reflects transcriptional processes and consequently the function of Tregs.
15 Hashemi et al. [13] found a decreased frequency of Tregs in the RA patients compared
16 to controls.

17 The *FOXP3* polymorphism -3279 C/A has been largely studied in autoimmune
18 disease such as autoimmune thyroid disease [19], multiple sclerosis [20], vitiligo [21],
19 diabetes mellitus type I [11, 22] and systemic lupus erythematosus [23]. And may
20 potentially alter gene expression by changing the binding of the transcription factor and
21 subsequently lead to defective transcription of Foxp3 [24]. However, until now, only
22 two studies evaluated this polymorphism in RA patients [12, 13]. In the present study,
23 there were no differences about genotype and allele frequency of *FOXP3*
24 polymorphism -3279 C/A between RA patients and control group. Our data are in
25 disagreement with previous studies [12, 13]. Paradowska-Goricka et al. [12]
26 demonstrated that Polish subjects carrying the A allele were at a higher risk for RA
27 than those carrying the -3279 C, showing a putative RA risk in that population.
28 Posteriorly, the Iranian study also showed that the A allele was associated with
29 significantly increased risk of RA compared to C allele [13]. Discrepancies in genotype
30 and allele frequencies between reports may be explained by the ethnicity differences,
31 genotyping methodologies used and sample size [25].

32 In the present study, CC genotype (in dominant model) was associated with
33 decreased TGF- β in RA patients, but not in control group, independently of sex and
34 ethnicity. However, an only previous study that evaluated TGF- β plasma level

1 according genotype of *FOXP3* polymorphism -3279, demonstrated that AA genotype
2 had lower TGF- β plasma levels than CC genotype in RA [13] In addition, in the present
3 study, RA patients with C allele (homozygosis or heterozygosis) demonstrated higher
4 frequency of patients with active disease, suggesting that AA genotype could have a
5 protective role. In contrast, Hashemi et al. [13] demonstrated that A allele presence
6 increases the severity of disease. The AA genotype causes the loss of binding with
7 some transcription factors, such as E47 and C-MyB, resulting in defective transcription
8 of *FOXP3*. In addition, the A allele of this polymorphism is associated with a dramatic
9 reduction in luciferase activity compared with the C allele [26]. A reduction of the
10 luciferase activity may be implicated in decreasing expression of a gene, in this case
11 the *FOXP3* gene in autoimmune diseases like Graves' disease [27]. Zheng describes
12 also that for -3279 polymorphism, the genotypes of AA and CA appeared to increase
13 the risk of many diseases such as SLE [23], vitiligo [21], and acute coronary syndrome
14 (ACS) [28]. But there was no robust evidence that such polymorphism was contributed
15 to susceptibility to Graves' disease. These investigations have shown that the
16 association between *FOXP3* SNPs and autoimmune diseases was different in various
17 populations, what can justify the differences between our study and previous reports
18 in other population worldwide.

19 The main limitation of our study is that this is a case-control study, which does
20 not allow inferences on causal relationships. In addition, the ethnicity of the subjects
21 was self-reported, and the study design was based on a single basal cytokines
22 measurement and a specific SNP determination, which precludes the assessment of
23 how other factors may impact on the complex relationship between *FOXP3* genotype,
24 cytokine levels, and disease activity. However, this study has some strength such as
25 adjusting of variables for many confounding variables including age, sex, ethnicity and
26 tobacco use. In addition, to our knowledge, this is the first study to investigate the
27 relationship between *FOXP3* polymorphisms and the risk of the development of RA in
28 Brazil.

29 In conclusion, our data demonstrated that *FOXP3* polymorphism -3279 C/A was
30 not associated with susceptibility and prognosis in RA Brazilian patients. However,
31 patients with C allele demonstrated decreased TGF- β plasma levels (in homozygosis)
32 and higher frequency of patients with active disease (in homo or heterozygosis). These
33 data suggest that the C-allele of *FOXP3* -3279 C/A polymorphism may be associated
34 with the quantitative or functional alteration of Treg cells, which could be one of the

1 factors involved in active disease. More studies are necessary to elucidate the complex
2 interaction between *FOXP3* polymorphism -3279 C/A, cytokines levels and disease
3 activity.

4 5 6 **ACKNOWLEDGEMENTS**

7
8 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de
9 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001. This study was also
10 supported by the National Council of Brazilian Research-CNPq and by Araucária
11 Foundation from the state of Paraná. We thank the University Hospital of State
12 University of Londrina and HUTECH Foundation for technical and administrative
13 supports.

14 15 16 **COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS**

17 **CONFLICTS OF INTEREST**

18 The authors declare that they have no competing interests.

19 20 **ETHICAL APPROVAL**

21 All procedures performed in studies involving human participants were in
22 accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research
23 committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or
24 comparable ethical standards.

25 26 **INFORMED CONSENT**

27 All the participants included in this study provided written informed consent.

28 29 **AUTHOR CONTRIBUTION**

1 TF performed the laboratory analysis; ALBGS, TMVI and NTC: enhanced patient care;
2 ANCS: performed the statistical analysis; MABL, EMVR, ID, and ANCS: did the study
3 design, discussed and interpreted the results obtained the results; ALBGS and ANCS:
4 they wrote the manuscript

6 REFERENCES

- 8 1. Aletaha D, Smolen J. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A
9 review. *JAMA*. 2016; 320: 13.
- 10
- 11 2. Smolen D, Aletaha D, Barton A, et al. Rheumatoid Arthritis. *Nat Rev Dis*
12 *Primers*. 2018; 4: 18001
- 13
- 14 3. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*.
15 2011; 365: 2205-2219.
- 16
- 17 4. Wang Y, Souabni A, Flavell RA, Wan YY. An intrinsic mechanism predisposes
18 FOXP3-expressing regulatory T cells to Th2 conversion in vivo. *J Immunol*.
19 2010; 185: 5983-5992.
- 20
- 21 5. Chatila, TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C,
22 Bowcock AM. JM2 encoding a fork head-related protein is mutated in X-linked
23 autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*. 2000; 106: 75-81.
- 24
- 25 6. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer La, Fox DA. Cells of the synovium in Rheumatoid
26 arthritis. T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(1):
27 202
- 28 7. Chen DY, Hsieh TY, Chen YM, Hsieh CW, Lan JL, Lin FJ. Proinflammatory
29 cytokine profiles of patients with elderly-onset rheumatoid arthritis: a
30 comparison with younger-onset disease. *Gerontology*. 2009; 55: 250-258.
- 31
- 32 8. De Paz B, Alperi-López M, Ballina-Garcia FJ, Prado C, Gutiérrez C, Suarez
33 A. Cytokines and Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Their

- 1 Relationship with Response to Corticosteroids. *The Journal of Rheumatology*.
2 2010; 37(12): 2502–2510.
3
- 4 9. Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Lambropoulos A, Drosos AA. Genetics in
5 rheumatoid arthritis beyond HLA genes: What meta-analyses have shown.
6 *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2013; 34:29-38.
7
- 8 10. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ natural
9 regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease.
10 *Immunol. Rev.* 2008; 212: 8-27.
11
- 12 11. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, et al. A functional polymorphism in the
13 promoter/enhancer region of the FOXP3 region of the FOXP3/Scurfin gene
14 associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics*. 2003; 55: 149-156.
15
- 16 12. Paradowska-Goricka A, Jorkowska M, Felis-Giemska A, et al. Genetic
17 polymorphisms of FOXP3 in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*.
18 2014; 42: 170-80.
19
- 20 13. Hashemi V, Farrokhi AS, Tanomand A, et al. Polymorphism of FOXP3 affects
21 the frequency of regulatory T cells and disease activity in patients with
22 rheumatoid arthritis in iranian population. *Immunol Letters*. 2018; 204: 16-22.
23
- 24 14. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification
25 criteria: An American College of Rheumatology/European League Against
26 Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism*. 2010; 62: 2569–
27 2581.
- 28 15. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van
29 Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts.
30 *Arthritis & Rheumatism*. 1995; 38: 44–48.
- 31 16. Chen Y, Cuda C, Morel L. Genetic determination of T cell help in loss of
32 tolerance to nuclear antigens. *J Immunol*. 2005; 174: 7692-7702.

- 1 17. Sivalingam SP, Thumboo J, Vasoo S, Thio ST, Tse C, Fong KY. In vivo pro-
2 and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis.
3 Ann Acad Med Singapore. 2007; 36: 96-99.
4
- 5 18. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin
6 10. Annu Rev Immunol. 1993; 11: 165-190.
7
- 8 19. Imrie H, Vaidya B, Perros P, et al. Evidence for a Graves disease susceptibility
9 locus at chromosome Xp11 in a United Kingdom population. J Clin Endocrinol
10 Metab. 2001; 86(2): 626-630.
11
- 12 20. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, et al. A full genome search in multiple
13 sclerosis. Nat. Genet. 1996; 13: 472-476.
14
- 15 21. Jahan P, Cheruvu R, Tippisetty S, Komaravalli PL, VAlluri V, Ishaq M.
16 Association of FOXP3 (rs3761548) promoter polymorphism with
17 nondermatomal vitiligo: a study from India. J Am Acad Dermatol. 2013; 69: 262-
18 266.
19
- 20 22. Cucca F, Goy JV, Kawaguchi Y, et al. A male-female bias in type 1 diabetes
21 and linkage to chromosome Xp in MHC HLADR3-positive patients. Nat Genet.
22 2008; 19(3): 301-2.
23
- 24 23. Lin YC, Lee JH, Wu ASH. Association of single-nucleotide polymorphisms in
25 FOXP3 gene with systemic lupus erythematosus susceptibility: a case-control
26 study. Lupus. 2011; 137-143.
- 27 24. Oda JMM, Hirata BKB, Guembarovski RL, Watanabe NAE. Genetic
28 polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and
29 development of human diseases. J Genet. 2013; 92: 163-171.
30

- 1 25. He Y, Na H, Li Y, Qiu Z, Li W. FOXP3 rs3761548 polymorphism predicts
2 autoimmune disease susceptibility: a meta-analysis. *Hum Immunol.* 2013; 74:
3 1665-71.
4
- 5 26. Shen Z, Chen L, Hao F, Wang G, Liu Y. Intron-1 rs3761548 is related to the
6 defective transcription of FOXP3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb
7 binding. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 226-241.
8
- 9 27. Zheng L, Wang X, Xu L et al. FOXP3 polymorphisms and haplotypes associate
10 with susceptibility of Graves' disease in Chinese Han population. *Int*
11 *Immunopharmacol.* 2015; 25: 425-31.
12
- 13 28. Yang Q, Chen Y, Yong W. FOXP3 genetic variant and risk of acute coronary
14 syndrome in Chinese Han population. *Cell Biochem Funct.* 2013; 31: 599-602.
15
16
17
18 .
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Table 1: Clinical and laboratory parameters of patients with Rheumatoid Arthritis (RA)

Characteristics	n = 251
Disease duration (years)	10 (4-19)
CRP (mg/L)	4.0 (2.0-10.0)
ESR (mm)	18 (9-32)
DAS 28-ESR	4.0 (3.0-5.0)
Remission: (DAS < 2.6)	57 (22.7)
Low activity : (DAS 2.6 - 3.1)	31 (12.35)
Moderate activity: (DAS 3.2 – 5.0)	117 (46.6)
High activity: (DAS ≥ 5.1)	41 (16.3)
Positive RF (%)	129 (51.3)
RF (U/L)	33 (15-112)
Positive Anti-CCP (%)	147 (58.56)
Anti-CCP	15 (0-126)
Extrarticular Manifestation (%)	26 (10.35)
Treatment	
Prednisone (%)	172 (68.5)
Prednisone (mg/day)	5 (0-5)
Metotrexate (%)	169 (67.3)
Metotrexate (mg/day)	10 (0-15)
TNF α inhibitor (%)	63 (25.0)
Leflunomide (%)	102 (40.6)
Hydroxichloquine (%)	95 (37.84)

Chi-square test. Data were expressed as median (interquartile range) and the categorical were expressed by absolute number (%). CPR: C reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; DAS:disease activity score RF: rheumatoid factor; Anti-CCP: anti-citrullinated protein antibody; TNF- α : tumoral necrosis factor alfa.

Table 2. Clinical and cytokines plasma levels in healthy controls (HC) and rheumatoid arthritis (RA) patients.

	HC (n= 183)	RA (n = 251)	P value
Gender (F/M)	155 (84.7)/28(15.3)	210(83.7)/41(16.3)	0.771
Ethnicity (C/NC)	136 (74.3)/47 (25.7)	175 (69.7)/76(30.3)	0.294
Tobacco (Y/N)	17(9.3)/166(90.7)	41(16.3)/209(83.7)	0.032
Age (years)	37 (28-47)	57 (47-63)	<0.001
BMI (cm/Kg ²)	24.0 (22.0-28.0)	27.4 (23.8-31.6)	<0.001
TGF- β (pg/mL)	843 (418-2116)	759 (497-1113)	0.024*
IL-17A (pg/mL)	0.32 (0.06-1.14)	0.041 (0.01-1.59)	0.353*
IL-10 (pg/mL)	0.010 (0.010-0.179)	1.535 (0.780-0.952)	<0.001*
TNF- α (pg/mL)	3.00 (1.00-5.00)	21.38 (11.59-54.16)	0.021*

Chi-square test. Data were expressed by absolute number (%). Mann-Whitney test. Data were expressed as median (25%-75%). BMI: body mass index ;TGF- β : transforming growth factor beta. IL: interleukin; TNF- α : tumoral necrosis factor alfa. *p adjusted by ethnicity, age, BMI, and tobacco.

Table 3 – Distribution of genotypes and allele frequencies of *FOXP3* -3279 C/A among Brazilian patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy controls (HC).

Model	Genotype	HC (n=183)	RA (n=251)	OR (95% IC)	P value
Codominant	CC	87 (47.5)	121 (48.2)	1	Reference
	CA	75 (41.0)	100(39.8)	1.030 (0.694-1.567)	0.314*
	AA	21 (11.5)	30(11.8)		
Dominant	CC	87 (47.5)	121(48.2)	1	Reference
	CA + AA	96 (52.5)	130(51.7)	1.027 (0.701-1.504)	0.778*
Recessive	CC+CA	162 (88.5)	221(88.1)	1	Reference
	AA	21 (11.5)	30(11.8)	0.899 (0.497-1.626)	0.095*
Alleles	C	249 (68)	342 (68)	1	Reference
	A	117 (32)	160 (32)	0.996 (0.746-1.329)	0.976

Chi-square test. Data were expressed by absolute number (%). *p adjusted by ethnicity, age, BMI, and tobacco. The distribution of genotypes and allelic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls (chi-square test; $p > 0.05$).

TABLE 4: Demographic data, clinical and laboratory variables in relation to *FOXP3* -3279 C/A dominant model for rheumatoid arthritis (RA) and healthy controls (HC).

	HC (n= 183)			RA (n=251)		
	CC (n=87)	CA+AA (n=96)	P value	CC (n=121)	CA+AA N=130)	P value
Sex (F/M)	71(81.6)/ 16(18.4)	84(87.5)/ 12(12.5)	0.269	93 (76.9) /28 (23.1)	117(90.0)/ 13(10.0)	0.005
Ethnicity (C/NC)	58(66.7)/ 29 (33.3)	78 (81.3)/ 18 (18.7)	0.024	72 (59.5)/ 49 (40.5)	103(79.2)/ 27(20.3)	0.001
Tobacco (%)	8 (9.2)	9 (9.3)	0.967	21(17.3)	20 (15.3)	0.693
Age (years)	36.0 (29.0-44.00)	39.0 (28.0-47.0)	0.582	57 (47-64)	58 (48-63)	0.749
BMI (cm/Kg ²)	24.0 (22.0-27.0)	25.0 (22.0-28.0)	0.553	27.0 (24.0-32.0)	27.0 (24.0-31.0)	0.522
TGF- β (pg/mL)*	1274 (719-2112)	789 (403-1195)	0.379	618 (482-881)	837 (505-1224)	0.027
IL-10 (pg/mL)*	0.010 (0.010-0.619)	0.010 (0.010- 0.179)	0.327	1.535 (0.780- 3.197)	1.535 (0.780- 2.952)	0.241
IL-17A (pg/mL)*	0.59 (0.06-1.14)	0.23 (0.06-1.14)	0.516	0.32 (0.01-1.48)	0.042 (0.04-1.60)	0.647
TNF- α (pg/mL)*	2.00 (1.00-4.00)	3.00 (0.00-5.00)	0.411	27.32 (13.04- 62.68)	20.04 (11.59- 50.20)	0.246
DAS 28 (ESR) \geq 2.6 (%)	---	---	---	94 (77.69)	95 (73.07)	0.220

Positive RF (%)	---	---	---	64 (52.9)	65 (50.0)	0.926
Positive Anti-CCP (%)	---	---	---	74 (61.2)	73 (56.2)	0.190
Prednisone (%)	---	---	---	84 (69.4)	88 (67.7)	0.768
Chloroquine (%)	---	---	---	47 (38.8)	48 (36.9)	0.754
Metotrexate (%)	---	---	---	82 (67.7)	87 (66.9)	0.887
TNF-inhibitor (%)	---	---	---	31 (25.6)	32 (24.6)	0.854
Leflunomide (%)	---	---	---	8 (6.6)	54 (41.5)	0.763
Rituximab (%)	---	---	---	1 (0.8)	2 (1.5)	0.604

Chi-square test. Data were expressed by absolute number (%). Mann-Whitney test. Data were expressed as median (25%-75%) BMI: body mass index TGF- β : transforming growth factor beta. IL: interleukin DAS28: disease activity index RF: rheumatoid factor ACPA: anti-citrullinated protein antibody. TNF- α : tumoral necrosis factor alpha. TNF- α inhibitor: tumoral necrosis factor alpha inhibitor. *p adjusted by ethnicity, age, BMI, and tobacco.

Tabela 5: Demographic data, clinical and laboratory variables in relation to FOXP3 -3279 C/A recessive model for rheumatoid arthritis (RA) and healthy controls (HC).

	HC (n= 183)			RA (n=251)		
	CC+CA (n=162)	AA (n=21)	P value	CC+Ca (n=221)	AA (n=30)	P value
Sex (F/M)	146(90.1)/ 16 (9.9)	9(42.8)/ 12 (57.2)	<0.001	192 (86.8)/ 29 (13.1)	18(60.0)/ 12 (40.0)	<0.001
Ethnicity (C/NC)	120(74.0)/ 42 (25.9)	16 (76.1)/ 5 (23.8)	0.835	153 (69.2)/ 68 (30.7)	22 (73.3)/ 8(26.7)	0.646
Tobacco (%)	15 (9.2)	2 (9.5)	0.969	34 (15.3)	7 (23.3)	0.274
Age (years)	37.0 (28.0-46.0)	47.0 (30.0-50.0)	0.126	56.0 (47.0-63.0)	59.0 (52.0-67.0)	0.100
BMI (cm/Kg ²)	24.0 (22.0-28.0)	26.0 (23.0-29.0)	0.126	27.0 (24.0-32.0)	27.0 (24.0-31.0)	0.887
TGF- β (pg/mL)	843 (569-2025)	965 (403-2269)	0.808*	772 (503-1099)	709 (358-1447)	0.850 [#]
IL-10 (pg/mL)	0.010 (0.010-0.179)	0.010 (0.010-1.350)	0.525*	1.535 (0.780-2.996)	1.535 (0.913-2.952)	0.921 [#]
IL-17 (pg/mL)	0.36 (0.06-1.14)	0.15 (0.04-0.37)	0.605*	0.32 (0.01-1.59)	1.03 (0.01-1.50)	0.551 [#]
TNF- α (pg/mL)	2.50 (0.50-4.50)	6.00 (2.00-26.00)	0.604*	24.98 (11.59-54.42)	18.08 (11.05-22.42)	0.457 [#]
DAS 28- ESR \geq 2.6	---	---	---	171 (77.3)	18 (60.0)	0.042[#]
Positive RF	---	---	---	114 (51.6)	15 (50.0)	0.885

Positive Anti-CCP	---	---	---	130 (58.8)	17 (56.7)	0.728
Prednisone	---	---	---	156 (68.77)	16 (53.3)	0.056
Chloroquine	---	---	---	86 (38.9)	9 (30.0)	0.345
Metotrexate	---	---	---	152 (68.7)	17 (56.6)	0.184
TNF- α inhibitor	---	---	---	55 (24.88%)	8 (26.66%)	0.833
Leflunomide	---	---	---	87 (39.3)	15 (50.0)	0.266
Rituximab	---	---	---	3 (1.35)	0	0.571

Chi-square test. Data were expressed by absolute number (%) Mann-Whitney test. Data were expressed as median (25%-75%). BMI: body mass index TGF- β : transforming growth factor beta. IL: interleukin TNF- α : tumoral necrosis factor alfa DAS28: disease activity index RF: rheumatoid factor ACPA: anti-citrulinated protein antibody. TNF- α inhibitor: tumoral necrosis factor alpha inhibitor. *p adjusted by ethnicity, age, BMI, and tobacco. # p value adjusted by sex, ethnicity, BMI and prednisone use.

6. CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

As principais conclusões desta dissertação são:

- Pacientes portadores de AR apresentaram aumento significativo dos níveis de TNF- α e IL-10 e diminuição dos níveis de TGF- β quando comparados ao grupo controle;
- Os grupos com AR e controles não diferiram quanto à frequência genotípica e alélica da variante -3279 C>A do *FOXP3*;
- Não houve associação entre a variante genética -3279 C>A do *FOXP3* com o prognóstico da doença avaliado pela positividade e níveis de FR e anti-CCP;
- Quando avaliado o modelo dominante, o genótipo CC foi associado a menores níveis plasmáticos de TGF- β apenas em pacientes com AR, mas não em indivíduos saudáveis, independentemente das variáveis confundidoras
- A presença do alelo C, em homozigose ou heterozigose, foi associada a maior frequência de pacientes com doença em atividade (DAS 28>2,6).

1 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

2
3 Este é o primeiro estudo a avaliar a variante -3279 C>A do *FOXP3* em
4 pacientes com AR na população brasileira. Embora não tenha sido demonstrada
5 diferença na frequência genotípica e alélica entre pacientes com AR e indivíduos
6 saudáveis, pode-se demonstrar que a presença do genótipo CC foi associada a menor
7 produção de TGF- β e a presença do alelo C, em homozigose ou heterozigose, está
8 associada a doença em atividade. Estes dados sugerem que o alelo C do polimorfismo
9 -3279C/A do *FOXP3* pode estar associado à alteração quantitativa ou funcional das
10 células Tregs o que poderia ser um dos fatores envolvidos na maior frequência de
11 pacientes com doença em atividade. Mais estudos são necessários para elucidar o
12 complexo envolvimento entre a presença do polimorfismo -3279C/A do *FOXP3*, os
13 níveis de citocinas e a atividade da doença em pacientes com AR.

14 A principal limitação de nosso estudo é que se trata de estudo de caso-
15 controle, o que não permite inferências sobre relações causais. Além disso, a etnia
16 dos pacientes foi auto-declarada e o delineamento foi baseado em uma única medida
17 basal de citocinas e um único polimorfismo, o que exclui outros fatores que poderiam
18 impactar na complexa relação entre o genótipo *FOXP3*, os níveis de citocinas e
19 atividade de doença. Entretanto, temos alguns fatores que fortalecem nosso estudo,
20 como o ajuste de variáveis, incluindo idade, sexo, etnia e tabagismo.

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 8. REFERÊNCIAS

2
3 ALAMANOS, Y. et al. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the
4 1987 American College of Rheumatology Criteria: a systematic review. **Semin.**
5 **Arthritis Rheum.**, v. 36, p. 182-188, 2006.

6
7 ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis.
8 **Autoimmun. Rev.**, v. 4, p. 130-136, 2005.

9
10 ALBERTSMEIER, M.; Pratschke, S.; Chaudry, I.; Angele, M.K. Gender-specific effects
11 on immune response and cardiac function after trauma hemorrhage and sepsis.
12 **Viszeralmedizin** 2014, 30, 91–96.

13
14 ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American
15 College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative
16 initiative. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, 1 set. 2010

17
18 ALETAHA, D.; SMOLEN, J. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A
19 review. **JAMA**, v. 320, n. 13, 2018.

20
21 BASSUNY K. et al. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the
22 FOXP3 region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes.
23 **Immunogenetics**, v. 55, n. 3, p. 149-156, 2003.

24
25 BUCKNER, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)
26 regulatory T cells in human autoimmune diseases. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 849–
27 859, 2008.

28
29 CHATILA, T. A. et al. JM2 encoding a fork head-related protein is mutated in X-linked
30 autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 75-81, 2000.

31
32 CHATZIKYRIAKIDOU, A. et al. Genetics in rheumatoid arthritis beyond HLA genes:
33 What meta-analyses have shown. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 2008.

34

- 1 CHEN, Y. et al. Genetic determination of T cell help in loss of tolerance to nuclear
2 antigens. **J. Immunol.**, v. 174, p. 7692-7702, 2005.
- 3
- 4 CRUVINEL, W. et al. Natural Regulatory T Cells in rheumatic diseases. **Rev. Bras.
5 Reumatol.**, v. 48, n.6, p. 342-355, nov/dez, 2008.
- 6
- 7 CUCCA, F. et al. A male-female bias in type 1 diabetes and linkage to chromosome
8 Xp in MHC HLADR3-positive patients. **Nat. Genet.**, v.19, 2008.
- 9
- 10 DIAZ-PEÑA, R.; CASTRO-SANTOS P. Genetics of rheumatoid arthritis: a new boost
11 is needed in Latin American populations. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 56, n. 6, p. 177-
12 182, mar/abr, 2016.
- 13
- 14 DISSICK, A. et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study.
15 **J. Periodontol.**, v. 81, p. 223–230, 2010.
- 16
- 17 EBERS, G. C. et al. A full genome search in multiple sclerosis. **Nat. Gen.**, v. 13, p.
18 472-476, 1996.
- 19
- 20 FOX D.A. T lymphocytes in rheumatoid arthritis. **Rheumatoid Arthritis**. Edited by
21 Firestein, G. S.; Panayi, G. S.; Wollheim F. A. New York, NY: Oxford University Press,
22 2006, p. 77-94.
- 23
- 24 HASHEMI, V. et al. Polymorphism of FOXP3 affects the frequency of regulatory T cells
25 and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in iranian population.
26 **Immunol. Letters.**, 2018.
- 27
- 28 HIRATA, BKB. et al. Análise do polimorfismo genético do FOXP3 (forkhead box
29 P3[Homo sapiens]) em indivíduos saudáveis da região Norte do Paraná. **Semina:
30 Ciências Biológicas e da Saúde** V33, n2, p 223-230, 2012
- 31
- 32 HORI, S. et al. Control of regulatory T cell development by the transcription factor
33 FOXP3 **Science**, v. 299, p. 1057-1061, 2003.
- 34

1 IMRIE, H. et al. Evidence for a Graves disease susceptibility locus at chromosome
2 Xp11 in a United Kingdom population. **J. Clin. Endocrinol. Met.** P. 626-630, 2001.

3
4 KHALIFA O., Pers, Y.-M., Ferreira, R., Sénéchal, A., Jorgensen, C., Apparailly, F., &
5 Duroux-Richard, I. (2016). X-Linked miRNAs Associated with Gender Differences in
6 Rheumatoid Arthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, 17(11), 1852

7
8 KONIG, M. F. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced
9 hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis.
10 **Sci. Transl Med.**, v. 8, 2016.

11
12 LA CAVA, N. J. L. et al. Genetic bias in immune responses to a cassette shared by
13 different microorganisms in patients with rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 100,
14 p. 658–63, 1997.

15
16 LEE, M. et al. Association between FOXP3 polymorphisms and susceptibility to
17 autoimmune diseases: A meta-analysis. **Autoimmun.**, 2015.

18
19 LIN, Y-C. et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in FOXP3 gene with
20 systemic lupus erythematosus susceptibility: a case-control study. **Lupus**, p. 137-143,
21 2011.

22
23 MAKRYGIANAKIS, A. D. et al. Smoking increases peptydilarginine deiminase 2
24 enzyme expression in human lungs. Smoking increases citrullination in BAL cells. **Ann.**
25 **Rheum. Dis.**, v. 67, p. 1488-1492, 2008.

26
27 MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N. Engl. J.**
28 **Med.**, v. 365, p. 2205-2219, 2011.

29
30 MORGAN, M. E. et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive
31 transfer of CD25+ regulatory T cells. **Arthritis Rheum.**, v. 52, p. 2212–2221, 2005.

32

- 1 MOTA, L. M. H. et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para
2 o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 51, n.
3 3, p. 197-198, 2011.
- 4
- 5 ODA, J. M. M. et al. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-
6 cell role and development of human diseases. **J. Genet.**, v. 92, p. 163-171, 2013.
- 7
- 8 PARADOWSKA-GORICKA, M. et al. Genetic polymorphisms of FOXP3 in Patients
9 with Rheumatoid Arthritis. **Journal Rheumatology**, 2014.
- 10
- 11 PARK, O. et al. Analysis of the Foxp3/Scurfin gene in Crohn´s Disease. **Ann. NY Acad.**
12 **Sci.**, p. 218-228, 2005.
- 13
- 14 PINHEIRO, I.; Dejager, L.; Libert, C. X-chromosome-located micrnas in immunity:
15 Might they explain male/female differences? The X chromosome-genomic context may
16 affect X-located miRNAs and downstream signaling, thereby contributing to the
17 enhanced immune response of females. **Bioessays** 2011, 33, 791–802.
- 18
- 19 PRAHALAD, S. Negative association between the chemokine receptor CCR5-delta32
20 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Genes Immun.**, v. 28, p. 654-
21 660, 2006.
- 22
- 23 PREVOO, M. et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight - joint
24 counts. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 1, p. 44–48, 1995.
- 25
- 26 REDLICH, K.; SMOLEN J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic
27 intervention. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 11, n. 3, p. 234-250, 2012.
- 28
- 29 SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3 +CD4+CD25+ natural regulatory T cells in dominant
30 self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 8-27, 2006.
- 31
- 32 SCHUBERT LA, Jeffrey E, Zhang Y, Ramsdell F, Zeigler SF (2001) Scurfin (FOXP3)
33 acts as a repressor of transcription and regulates T-cell activation. **J Biol Chem**
34 276:37672–37679

- 1 SILMAN A., J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis.
2 **Arthritis Res.**, v. 4, p. 265-72, 2002.
- 3
- 4 SMOLEN D. et al. Rheumatoid Arthritis. **Primer. Nature Reviews**, 2018.
- 5
- 6 STANCZYK, J. et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and
7 synovial tissue in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 58, p. 1001 -1009, 2008.
- 8
- 9 TAN, E. M.; SMOLEN, J. S. Historical observations contributing insights on
10 etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. **J. Exp. Med.**,
11 v. 213, n. 10, p. 1937-1950, 2016.
- 12
- 13 TAYLOR, J. C. et al. A genome-wide screen in 1119 relative pairs with autoimmune
14 thyroid disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, p. 646-653, 2006.
- 15
- 16 WEYLAND, C. M. et al. The influence of HLADRB1 genes on disease severity in
17 rheumatoid arthritis. **Ann. Intern. Med.**, v. 117, n. 10, p. 801, 1992
- 18
- 19 ZHENG L. et al. FOXP3 polymorphisms and haplotypes associate with susceptibility
20 of Graves' disease in Chinese Han population. **Internation Immunopharmacology**,
21 2015.
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

1 APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

3 Título da pesquisa:

4 **“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO**
5 **CARDIOVASCULARES E FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM**
6 **PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE”**

8 Prezado (a) Senhor (a):

9 Gostaríamos de convidá-lo (a) a participara da pesquisa **“AVALIAÇÃO DO**
10 **ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES E**
11 **FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM PACIENTES COM ARTRITE**
12 **REUMATOIDE”**, realizada no Hospital Universitário de Londrina (HU) da
13 Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é identificar os fatores de
14 risco cardiovasculares em pacientes com artrite reumatóide (AR). A sua participação
15 é muito importante e ela se daria da seguinte forma: avaliação clínica pelo médico
16 reumatologista e coleta de sangue. Gostaríamos de esclarecer que sua participação
17 é voluntária, podendo você: recusar-se a participar ou mesmo desistir a qualquer
18 momento sem que isto acarrrrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa.
19 Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta
20 pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a
21 preservar a sua identidade. **Serão realizados testes laboratoriais para a**
22 **confirmação do diagnóstico e prognóstico de artrite reumatóide, determinação**
23 **da atividade da doença, perfil metabólico, resposta imunológica, estresse**
24 **oxidativo e outras análises que se façam necessárias.**

25 Os benefícios esperados são: 1) o conhecimento da prevalência de síndrome
26 metabólica em pacientes com AR, de uma amostra da população brasileira, permite
27 a estratificação de risco cardiovascular, o que implica em manejo mais adequado de
28 acordo com as características da nossa população; 2) o entendimento da
29 fisiopatologia que envolve as alterações do estresse oxidativo e inflamação na AR
30 possibilita melhor monitoramento da doença e desenvolvimento de novas
31 intervenções medicamentosas.

32 Informamos que o (a) senhor (a) não pagará nem será remunerado por sua
33 participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da
34 pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua
35 participação na pesquisa.

36 Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos
37 contatar (médicas reumatologistas Neide Tomimura Costa – telefone 9921-9849 ou
38 Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda telefone 9627-8181) ou procurar o Comitê de Ética em
39 Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na

1 Avenida Robert Koch, 60 ou no telefone 3371-2490 . Este termo deverá ser
2 preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida e
3 assinada entregue a você.

4 Londrina, _____ de _____ de 2013.

5
6
7 _____ (nome por extenso do sujeito de
8 pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa,
9 concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.
10 Assinatura (ou impressão dactiloscópica) : _____
11

12

13 Eu, _____ (nome do membro da equipe que
14 apresentou o TCLE), obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre
15 e Esclarecido do sujeito da pesquisa para a sua participação na mesma.

16 _____

17 (assinatura do membro da equipe que apresentou o TCLE)

18 Pesquisadores responsáveis

19 _____

20 Prof. Dra Andréa Name Colado Simão

21

22 _____

23 Prof. Dr. Isaias Dichi

24

**APÊNDICE B - FICHA DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES COM ARTRITE
REUMATOIDE**

1 NOME: _____

2 RG: _____ telefone: _____ data : _____

3 IDADE OU Data de nascimento: _____

4 Sexo : () feminino () masculino

5 Etnia: () caucasiano () não caucasiano

6 TEMPO DE DIAGNÓSTICO: _____

7 DAS 28: VHS _____ PCR _____

8 Comprometimento sistêmico extra-articular:

9 Pulmonar () vasculite () nódulos reumatóides () cardíaco () SNC ()

10 Outras doenças:

11 HAS () DM () dislipidemia () IAM () AVC () tireóide () ,

12 outros: _____ outra collagenose: _____

13 MEDICAÇÕES

14 () Prednisona dose : _____

15 () Metotrexato dose : _____

16 () Hidroxicloroquina ou cloroquina dose : _____

17 () Sulfassalazina dose : _____

18 () Leflunomida dose : _____

19 () Etanercepte dose : _____ início em : _____

20 () Adalimumabe dose : _____ início em : _____

21 () Infliximabe dose : _____ início em : _____

22 () Tocilizumabe dose : _____ início em : _____

23 () Abatacepte dose : _____ início em : _____

24 () Rituximabe dose : _____ início em : _____

25 () Ciclofosfamida : _____

26 () outros : _____

1 Tabagismo : () sim () não

2

3 Atividade física sim () não ()

4 Tipo: _____ frequência : _____ há quanto tempo:

5 _____

6

7 Dados antropométricos

Altura (cm)	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)	Circunferência abdominal (cm)	Pressão arterial (mmHg)

8

- 1 10. ANEXOS
2 10.1 ANEXO A

<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA - UEL/ HOSPITAL REGIONAL DO NORTE DO</p> 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES E FREQUÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE.
Pesquisador: André Nere Celso Srisão
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 06485812.1.0000.5251
Instituição Proponente: CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas
Fornecedor Principal: Financiamento Próprio
DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 205.175
Data da Realização: 04/02/2013
Apresentação do Projeto:
Trata-se de projeto relevante do ponto de vista científico pois visa avaliar os fatores de risco de doença cardiovascular em pacientes com artrite reumatóide e a doença cardiovascular representa uma importante da mortalidade nestes pacientes. De mesma forma, o conhecimento da frequência da síndrome metabólica e do estresse oxidativo nestes pacientes, poderão trazer subsídios importantes para o cuidado dos mesmos.
Objetivo da Pesquisa:
Avaliar o estresse oxidativo, os fatores de risco cardiovascular, prevalência de síndrome metabólica e síndrome metabólica em pacientes com Artrite Reumatóide. Este estudo também propõem-se a avaliar se a presença de SM e/ou RI aumentam o estresse oxidativo em pacientes com artrite reumatóide.
Avaliação dos Riscos e Benefícios:
- Não há riscos aparentes para os pacientes uma vez que estes passarão por consultas especializadas e coleta de sangue para exames que são rotina no seu atendimento. Além para os controles que são doadores voluntários de sangue.
- não há benefício ou vantagem imediato inadequado para os participantes da pesquisa. Os resultados da pesquisa poderão trazer como benefícios, conhecimentos importantes para o tratamento de pacientes com artrite reumatóide.
<p>Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH 36 Bairro: VILA OPERÁRIA CEP: 06.030-440 UF: PR Município: LONDRINA Telefone: (0332) 31.2418 E-mail: vrp258@uel.br</p>

3

4

1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante do ponto de vista da ética em pesquisa e que teve as pendências levantadas na primeira análise pelo CEP resolvidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de risco: adequada, assinada por uma das docentes participantes da pesquisa e por sua chefe de departamento.
- 2) Há o termo de concordância da Instituição Co-Participante (HRAUEL): adequado.
- 3) TCLE: adequado para os pacientes e controles.
- 4) Cronograma: inadequado pois prevê a coleta de dados a partir de Novembro de 2012, mas foi colocada a ressalva de que a coleta de dados será iniciada apenas após a aprovação pelo CEP.

Recomendações:

- não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto passa a ser considerado aprovado após a regularização das pendências apontadas em análise prévia por este relator e pela plenária do CEP.

LONDRINA, 25 de Fevereiro de 2013.

Assinado por:

Paula Mariza Zedú Alliprandini
(Coordenador)

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 90
Bairro: VILA OPERÁRIA CEP: 86.036-430
UF: PR Município: LONDRINA
Telefones: (45)3371-2400 E-mail: cep06@uel.br

2