# Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Farmacologia

Estudo de associação entre polimorfismos genéticos no *Receptor*de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e o desenvolvimento da

Artrite Reumatóide

**Jhimmy Talbot** 

Ribeirão Preto

#### Jhimmy Talbot

Estudo de associação entre polimorfismos genéticos no *Receptor* de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e o desenvolvimento da

Artrite Reumatóide

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior

Co-orientador: Prof. Dr Fernando de Queiróz

Cunha

Ribeirão Preto

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### Ficha Catalográfica

Talbot, Jhimmy

Estudo de associação entre polimorfismos genéticos no *Receptor de Hidrocarbonetos de Arila (AhR)* e o desenvolvimento da Artrite Reumatóide.

Ribeirão Preto, 2011.

129p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Farmacologia-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Paulo Louzada Júnior

Co-Orientador: Fernando de Queiróz Cunha

Palavras-chave: artrite reumatóide, autoimunidade, Th17, polimorfismos genéticos,

Receptor de hidrocarbonetos de arila, tabagismo.

#### FOLHA DE APROVAÇÃO

Jhimm	v Talbo	ot

Estudo de associação entre polimorfismos genéticos no Receptor de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e o desenvolvimento da Artrite Reumatóide.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 03 de març	o de 2011
Banca Examinadora:	
Prof. Dr. Paulo Louzada Ju	nior
Instituição: FMRP – USP	Assinatura:
Prof. Dr. Wilson Júnior	
Instituição: FMRP – USP	Assinatura:
Prof. Dr. Luis Eduardo Co	elho Andrade
Instituição: UNIFESP	Assinatura:

Trabalho realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do

Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio

financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Tony e Silvia, ao meu irmão querido, Teddy, e a minha princesa Jack, por todo amor, carinho, compreensão e palavras de incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus, pelo dom da vida e por me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha família, que mesmo distante sempre esteve presente me incentivando. Ao meu pai por tudo que me ensinou e ensina. Amo muito vocês!

Ao Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior, pela orientação e confiança em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha, pela sua co-orientação constante, dedicação e competência. Obrigada pelo incentivo e pela confiança em meu trabalho que foram muito importantes para o meu amadurecimento científico. Obrigado também por ter aberto seu laboratório para realização dos experimentos.

Aos Profs. Dr. Wilson Júnior e Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora, por me atenderem prontamente com atenção, engrandecendo as discussões deste trabalho.

Aos meus amigos e colaboradores Thiago Cunha e Zeca, pela dedicação e competência que foram de fundamental importância na realização deste trabalho, mas principalmente pela confiança e paciência. Obrigado pela amizade e apoio.

À minha princesa linda que amo e me ajudou a ter uma vida além laboratório. Jack, você é essencial para tudo que eu faço.

À minha querida amiga e parceira Larissa. Tanta coisa pra agradecer, nem sei por onde começar, só sei que a diversão faz valer a pena trabalhar.

A todo grupo da artrite: Larissa, Rafael (Panda), Jaqueline (Jack) e Rafael (Franca), pela ajuda turbinada para poder terminar as genotipagens, pelas discussões e colaborações, e principalmente por aturarem minhas trapalhadas. rs.

Ao amigo e colega Fabrício, que me ajudou quando cheguei a Ribeirão Preto e ainda me ajuda toda hora. Quase um baiano.

Aos médicos Rene e Sergio, pela ajuda nas coletas das amostras e interpretação dos dados clínicos.

As chefas do laboratório Kátia, Fabiola e Giuliana, tanto pela assessoria técnica quanto pela amizade. Agradeço também a Diva, principalmente pelas risadas. Por aturarem minhas bagunças também. Eu sempre faço isso, sem querer.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Inlfamação e Dor.: Paulinha, Paula Barbim, Fabi, Guilherme, Dani, Jozi, Silvio, Fran, Thiago Garlet, Adriana, Dani Carlos, Dani Nascimento, Daniel, Fernanda, Kanashiro, Maria do Carmo, Poloni, Romualdo, Sabrina, Silvia, Spiller, Walter e Vanessa Carregaro.

Aos excelentes técnicos do laboratório de dor: Ieda e Serginho pela responsabilidade, amizade, dedicação, alegria e ensinamentos que foram de extrema importância para a realização deste trabalho

Ao amigo Acácio, o qual pertubo constantemente.

Aos amigos da Imuno Joni e Diegao pelas conversas e momentos de descontração.

Aos amigos e colegas de pós-graduação do Departamento de Farmacologia, pelo convívio e amizade.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Soninha, Fátima e Ramon pela dedicação, amizade e competência nas resoluções administrativa.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pela competência, dedicação e também pelo convívio.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

## **RESUMO**

TALBOT, J. Estudo de associação entre polimorfismos genéticos no Receptor de Hidrocarbonetos de Arila (AhR) e o desenvolvimento da Artrite Reumatóide. Dissertação de Mestrado — Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Introdução: A artrite reumatóide (AR) é uma artropatia autoimune, de caráter inflamatório, com prevalência em torno de 1% da população. O tabagismo é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento da AR. O receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR), um fator de transcrição intracelular ativado por hidrocarbonetos aromáticos componentes da fumaça do cigarro, foi identificado como alvo de regulação da diferenciação de células Th17. Objetivos: Avaliar se os polimorfismos genéticos do AhR estariam associados ao desenvolvimento da AR, e se este receptor estaria mais expresso em pacientes com AR. Pacientes e Métodos: Nós analisamos sete polimorfismos genéticos por mudança de única base (SNP) por PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan em 138 pacientes com AR e 129 indivíduos saudáveis. A quantificação da expressão do mRNA do AhR em células mononucleares isoladas de pacientes com AR e indivíduos saudáveis foi realizada por PCR em tempo real. **Resultados:** Identificamos que haplótipos formados por SNPs no AhR estariam associados com desenvolvimento da AR, podendo ser fator protetor ou de risco para a doença. Em adição, os pacientes com haplótipos de risco apresentavam doença com índice de atividade elevado, principalmente quando o tabagismo estava presente. De fato, pacientes com AR apresentaram aumento na expressão de AhR (mRNA) em relação a indivíduos saudáveis. Conclusões: Em conjunto estes resultados sugerem que o AhR possui um papel importante para o desenvolvimento da artrite reumatóide. Possivelmente mutações neste receptor podem estar relacionadas com alterações na sua atividade e consequentemente na diferenciação de células Th17 e a susceptibilidade a AR.

**Palavras-Chave:** artrite reumatóide, autoimunidade, Th17, polimorfismos genéticos, Receptor de hidrocarbonetos de arila, tabagismo.

### **ABSTRACT**

TALBOT, J. Association between genetic polymorphisms in the Aryl hydrocarbon receptor and Rheumatoid Arthritis. Thesis (Master) – Department of Pharmacology of the School of Medicine of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP.

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune arthropaty with inflammatory characteristics and prevalence around 1% in the population. Tabagism is the main risk factor to RA development. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is an intracellular transcription factor activated by aromatic hydrocarbons present in smoking, whichwas identified to be a target of regulation of Th17 differentiation **Purpose:** Study the relationship of genetic polymorphisms in AhR with RA development, and if this receptor expression is upregulated in RA patients. Patients and Methods: We analyzed seven genetic single nucleotide polymorphisms by Real-Time PCR using TaqMan probes in 138 patients with Rheumatoid Arthritis and 129 healthy controls. The AhR mRNA quantization in mononuclear cells isolated from AR patients and healthy controls has been done by Realt-Time PCR. **Results:** We identified that AhR haplotypes were associated with RA development and that they could be protector or risk factors to disease. In addition, patients with risk haplotypes showed higher disease activity index, mainly when smoking was present. Indeed, patients with RA showed upregulation in the AhR expression (mRNA) when compared with healthy controls. Conclusions: These results suggest that AhR has an important role in AR development. Probably, mutations in this receptor could be related with alterations in its activity and consequently in the differentiation of Th17 cells and RA susceptibility.

**Key-Words:** rheumatoid arthritis, autoimmunity, Th17, genetic polymorphisms, aryl hydrocarbon receptor, smoking

## **SUMÁRIO**

1.	INTRODUÇÃO
	1.1 Artrite Reumatóide
	1.2 Características Histopatológicas Na Artrite Reumatóide
	1.3 Papel Das Citocinas Na Artrite Reumatóide
	1.4 Características Autoimunes Da Artrite Reumatóide
	1.5 Importância Dos Fatores Genéticos Na Artrite Reumatóide
	1.6 Importância Dos Fatores Ambientais Na Artrite Reumatóide
	1.7 O Receptor De Hidrocarbonetos De Arila (AhR)
2.	OBJETIVOS
3.	MATERIAL E MÉTODOS
	3.1 Recrutamento dos voluntários saudáveis
	3.2 Recrutamento de pacientes com Artrite Reumatóide
	3.3 Coleta das Amostras e Extração de DNA genômico
	3.4 Identificação de substituições de simples nucleotídeos (SNPs)
	3.5 Separação de células mononucleares do sangue periférico de humanos
	3.6 Avaliação da Expressão de genes (quantificação de mRNA)
	3.7Análise Estatística
4.	RESULTADOS
	4.1 Dados descritivos dos pacientes com Artrite Reumatóide
	4.2 Resultados de Associação dos SNPs no AhR com o desenvolvimento da
	Artrite Reumatóide
	4.3 Associação dos SNPs do AhR com o Índice de Atividade da Artrite
	Reumatóide

	4.4 Influência do Tabagismo na relação do haplótipo T-A do bloco 2 com o a	
	Atividade da Artrite Reumatóide (DAS28)	73
	4.5 Expressão de mRNA do AhR está aumentada em células mononucleares dos	
	pacientes com Artrite Reumatóide	75
5.	Discussão	77
2.	Conclusão	86
_		
3.	Referências	88
4		120
4	Anevos	1 70

## 1. INTRODUÇÃO

#### 1. ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide (AR) é uma artropatia autoimune, de caráter inflamatório com prevalência em torno de 1% em populações caucasóides (FELDMANN et al. 1996, ACR GUIDELINE, 1996) e entre 0,2-1% na população brasileira (MARQUES-NETO et al., 1993). Estudos epidemiológicos mostram que a incidência da doença predomina entre 35-65 anos e afeta três vezes mais mulheres do que homens (SYMMONS et al., 1994). Em coorte retrospectivo realizado em quatro hospitais universitários do Estado de São Paulo, a maioria dos pacientes em tratamento encontrava-se entre 30 e 60 anos, sendo a relação entre mulher e homem de 5 para 1 (LOUZADA-JUNIOR et al., 2007). Além de reduzir a qualidade, a AR também leva a redução da expectativa de vida (RIISE et al., 2001). Os eventos cardiovasculares aparecem como a principal causa de morte (WALLBERG-JONSSON et al., 1997; DESSEIN et al., 2005). A AR tem um alto impacto sócio-econômico, pois com a progressão da doença, os pacientes afetados desenvolvem restrição para desenvolver as atividades diárias básicas e profissionais, com impacto significativo na qualidade de vida do paciente (SILMAN, 2002; KOBAYASHY, 2008).

#### 1.1.1 Quadro clínico

Na maioria dos pacientes as manifestações da AR são claras e bem definidas, constituindo-se principalmente nas alterações músculo-esqueléticas. Além destas,

alguns pacientes sofrem das manifestações extra-articulares e, praticamente todos, experimentam algum sintoma geral inespecífico.

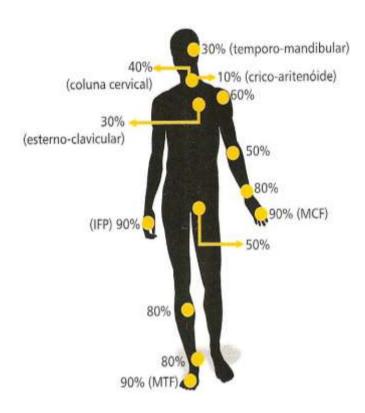
Os sintomas gerais inespecíficos mais comuns são a fadiga, a astenia e a hiporexia, resultados do efeito de citocinas e mediadores inflamatórios (BRASINGTON Jr., 2008). Como conseqüência, ocorre perda ponderal, à custa principalmente da perda de massa muscular (COSTA *et al.*, 2008) . A febre é rara e, quando presente, não é superior a 38°C. Mialgias também são comuns.

A poliartrite crônica e simétrica, aditiva, com envolvimento de pequenas e grandes articulações periféricas é o padrão da AR. A magnitude dos sinais inflamatórios varia entre os indivíduos, desde casos onde edema e calor são discretos, até casos graves, com grande aumento de volume e calor articulares, rigidez persistente e tendência ao rápido aparecimento de deformidades. A Figura 1 mostra as articulações mais afetadas (LAURINDO, 2009). Embora não haja consenso na literatura, o termo artrite reumatóide inicial (ARI) diz respeito àqueles indivíduos onde os sintomas inflamatórios articulares apresentam menos de 12 meses de evolução (TARNER, *et al.*, 2005).

A perpetuação da sinovite reumatóide leva ao envolvimento das estruturas adjacentes – cápsula articular, ligamentos, bainhas tendíneas e enteses – e a combinação entre atrofia e destruição tecidual ocasiona as deformidades características da doença, em especial nas interfalangeanas proximais de mãos (IFP) e pés, nas metacarpofalangenas (MCF), nas metatarsofalangenas (MTF), nos punhos e nos tornozelos.

As manifestações extra-articulares estão presentes em até 40% dos indivíduos (TURESSON *et al.*, 2002) e são quase sempre encontradas em indivíduos com fator reumatóide positivo (GORDON *et al.*, 1973), significando chance maior de doença agressiva. (TURESSON *et al.*, 2003). As manifestações extra-articulares incluem

manifestações cutâneas, oculares, respiratórias, cardíacas, gastrointestinais, renais, hematológicas, neurológicas, osteometabólicas e psiquátricas.



**Figura 1.** Artrite reumatóide – articulações acometidas e respectivas freqüências (MCF – matacarpofalangeanas, IFP – interfalangeanas proximais e MTF – metatarsofalangeanas)

#### 1.1.2 Diagnóstico e Critérios de classificação

#### 1.1.2.1 Critérios para classificação diagnóstica da AR

Até setembro de 2010, o diagnóstico de AR era feito utilizando-se os critérios de classificação estabelecidos em 1987 pelo Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology – ACR) (ARNETT *et al.*, 1988). Esses critérios (Tabela 1) servem como um guia, mas são insuficientes em algumas ocasiões, como os casos oligoarticulares, os com inflamação menos evidente e fator reumatóide negativo e

quando as alterações radiológicas ainda não surgiram. Os critérios contemplam indivíduos com quadro clínico bem estabelecido para AR.

**Tabela 1.** Critérios Revisados do American College of Rheumatology de 1987 para Classificação de Artrite Reumatóide

Rigidez matinal	Rigidez matinal da articulação ou ao redor dela, durando pelo menos 1 hora antes de ocorrer a melhora máxima
Fator reumatóide sérico	Fator reumatóide sérico
Artrite de mãos	No mínimo uma área articular edemaciada como descrito acima na articulação do punho, MCF ou IFP
Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo das mesmas áreas articulares (como definido acima) nos dois lados do corpo (envolvimento bilateral de articulações IFP, MCF ou MTF é aceitável sem simetria absoluta)
Nódulos reumatóides	Nódulos subcutâneos sobre as proeminências ósseas ou superfícies extensoras ou em regiões justa-articulares, observados por um médico
Fator reumatóide sérico	Demonstração de quantidades anormais de fator reumatóide sérico por qualquer método que tenha sido positivo em menos de cinco por cento dos controles normais
Alterações radiográficas	Alterações radiográficas típicas de artrite reumatóide em raio-X póstero-anterior de mãos e punhos, que podem incluir erosões ou descalcificação óssea inequívoca localizada ou mais acentuada em área adjacente às articulações envolvidas

Para fins de classificação, pode-se dizer que um paciente apresenta artrite reumatóide se tiver no mínimo 4 dos critérios acima. Os primeiros quatro devem estar presentes por no mínimo 6 semanas.

#### 1.1.2.2 Novos Critérios para classificação diagnóstica da AR

Em significativa parcela dos indivíduos que desenvolvem sintomas articulares inflamatórios não é possível determinar o diagnóstico nos primeiros três meses de doença. Para essas situações, os critérios de classificação do ACR mostraram-se de pouco valor para o diagnóstico (MACHOLD *et al.*, 2002).

Desta forma, as sociedades internacionais de maior importância na reumatologia (EULAR – Liga européia contra o reumatismos e ACR – Colégio Americano de

Reumatologia) elaboraram novos critérios para o diagnóstico de AR, visando diminuir o tempo para o diagnóstico e a rápida instituição da terapêutica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Novos critérios para diagnóstico de AR (EULAR/ACR, 2009)

Envolvimento articular	
1 articulação média ou grande	0
2 a 10 articulações médias ou grandes	1
1 a 3 pequenas articulações	2
4 a 10 pequenas articulações	3
Mais que 10 pequenas articulações	5
Sorologia	
FR ou anti-CCP negativo	0
FR ou anti-CCP baixos títulos (não maior que 3 vezes limite superior)	1
FR ou anti-CCP altos títulos	
Duração da sinovite	
Menor que 6 semanas	0
Maior que 6 semanas	1
Reagentes de fase aguda	
VHS ou Proteína C-reativa não elevados	0
VHS ou Proteína C-reativa elevados	

Diagnóstico de AR definido por resultado maior ou igual a 6 pontos

#### 1.1.3 Autoanticorpos

O fator reumatóide (FR) é o autoanticorpo clássico da artrite reumatóide. Ele pode ser definido como uma imunoglobulina contra a porção Fc de uma IgG humana, sendo os subtipos IgM e IgA os principais marcadores patogênicos. O fator reumatóide apresenta uma sensibilidade de 60 a 80%, apesar de baixa especificidade, estando presente em outras doenças autoimunes, doenças infecciosas e em indivíduos idosos, sem evidência clínica de AR. Outro autoanticorpo importante é o direcionado contra peptídeos citrulinados (anti-CCP). Embora a maioria dos pacientes anti-CCP positivos

também apresentem fator reumatóide positivo, os anticorpos anti-CCP são mais específicos para o diagnóstico e parecem ser melhores preditores de pior prognóstico. Entre 50 a 80% dos pacientes com AR apresentam positividade para FR, anti-CCP, ou ambos (BRIDGES Jr & DAVIDSON, 2005, MASSON-BASSIERI, *et al.*, 2001, VOSSENAAR, *et al.*, 2004). Indivíduos com AR e que apresentam FR e anti-CCP positivos diferem dos indivíduos com autoanticorpos ausentes, pois apresentam doença mais grave, com maior índice de destruição articular e pior resposta à terapia convencional (KASTIBOM, *et al.*, 2004; FORSLINDT *et al.*, 2004)

#### 1.1.4 Classificação Funcional e Avaliação de atividade da doença

A classificação funcional é necessária para o seguimento em curto e longo prazo na AR. Em curto prazo, uma piora de classe funcional pode significar falha terapêutica e em longo prazo pode significar doença com baixa atividade persistente ou doença controlada, mas onde os métodos de reabilitação e prevenção de deformidades não foram instituídos ou falharam. A Tabela 3 mostra os critérios de classificação funcional, segundo o Colégio Americano de Reumatologia.

**Tabela 3.** Critérios do Colégio Americano de Reumatologia para Classificação de Capacidade Funcional em Artrite Reumatóide (HOCHBERG *et al.*, 1992)

Classe I	Capacidade funcional completa, com possibilidade de realizar todas as atividades habituais (auto-cuidados, laborativas e recreacionais) sem prejuízo.	
Classe II	Capacidade funcional adequada para realizar atividades de auto-cuidados e laborativas, mas limitado em atividades recreacionais.	
Classe III	Capacidade funcional adequada para realizar apenas atividades de autocuidados.	
Classe IV	Dependente para todos os graus de atividade.	

Tão importante quanto avaliar a funcionalidade do paciente é avaliar o grau de atividade da doença, no início do tratamento e, posteriormente, em todas as visitas, a fim de avaliar eficácia terapêutica e necessidade de mudanças de terapia. Até o início de 2005, a medida de atividade pelo DAS28 (EULAR Disease Activity Index – 28 Joints) era a mais comumente empregada. É de rápida execução, embora dependa de calculadora (ver fórmula no anexo 2). Consiste na contagem de articulações dolorosas e articulações edemaciadas entre 28 possíveis (2 interfalangeanas dos polegares, 8 interfalangeanas proximais das mãos, 10 MCF, 2 punhos, 2 cotovelos, 2 ombros e 2 joelhos), na escala visual analógica de avaliação global de saúde pelo paciente (em mm) e no valor do VHS (em mm/1ªhora). Os valores de gradação do DAS28 são mostrados na Tabela 4 (PREVOO *et al.*, 1995).

**Tabela 4.** Valores de referência do DAS28

Atividade da AR	Valores de referência (DAS28)
Elevada	>5,1
Moderada	>3,2 a 5,1
Baixa	>2,6 a 3,2
Remissão	<2,6

# 1.2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLOGICAS NA ARTRITE REUMATÓIDE

A articulação é um conjunto formado por dois ou mais ossos que fazem contato, permitindo o movimento ou provendo suporte mecânico para estes. As articulações são classificadas funcionalmente em três tipos: 1) Sinartroses – permitem pouco movimento (ex. sindesmoses – tíbia e perônio, suturas e gonfoses); 2) Anfiartroses – permitem movimentos limitados e os ossos geralmente estão ligados por fibrocartilagem ou cartilagem hialina (ex. sínfise púbica e sincondroses); 3) Diartrose - articulação móvel que permite muito movimento. Todas as articulações diartroides são estruturalmente articulações sinoviais (ex. joelho/fêmur-tibial, tornozelos/tíbio-tarsal), ou seja, os ossos que compõe essas articulações estão ligados por uma cápsula articular (camada fibrosa exterior e camada sinovial interior) (GRAY HD, 2005). Na junção entre os ossos está a cavidade sinovial que é unida por um denso e irregular tecido conectivo que forma a cápsula articular geralmente associada a ligamentos acessórios. Dentro da cápsula articular existe uma membrana especializada, a sinóvia, a qual define fisicamente o espaço articular. Dentro da cápsula articular, a sinóvia reflete para o tecido ósseo e se estende para a cartilagem articular (DAVIES DV, 1945; GRAY HD, 2005). Em condições fisiológicas, ela é uma membrana delgada composta por uma ou duas camadas celulares superficiais a um estroma de tecido conectivo. Dois tipos celulares compõem a sinóvia, as células da membrana sinovial tipo A (A-SLC) – semelhantes a macrófagos -, e as células da membrana sinovial tipo B (B-SLC) - semelhantes a fibroblastos (REVELL PA, 1989). Uma das funções da sinóvia é produzir o fluido sinovial e prover hialurano (uma proteoglicana lubrificante) e outros nutrientes à

cartilagem e tecido fibroso dentro da articulação (REVELL PA, 1989; DAVIES DV, 1945).

A análise histopatológica das articulações afetadas na AR revela um intenso infiltrado de células do sistema imune (polimorfonucleares, monócitos e linfócitos) no espaço articular e mudanças estruturais articulares como a formação do *pannus*, um tecido formado por aumento da espessura da sinóvia infiltrada por células linfomononucleares e fibroblastos e cujas células foram transformadas e ativadas, adquirindo característica proliferativa e, principalmente, de resistência à apoptose, determinando hiperplasia do tecido sinovial, proliferação de vasos sanguíneos, destruição progressiva articular e aumento da reabsorção do tecido ósseo.

#### 1.3. PAPEL DAS CITOCINAS NA ARTRITE REUMATÓIDE

O processo de formação do *pannus* e lesão articular estão relacionados com a intensa produção de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), algumas Interleucinas (ex. IL-1β, IL-6 e IL-17), enzimas proteolíticas (ex. colagenase e metaloproteinases) e derivados lipídicos do acido araquidônico como o leucotrieno B4 (FELDMANN M *et al*, 1996; SAXNE D *et al*, 1988; BRENNAN FM *et al*, 1989; DINARELLO C *et al*, 2002; FONG KY *et al*, 1994; ITO H *et al*, 2011; CHU *et al*, 1992; van LENT PL, 1995; ALONZI T *et al*, 1998; GOLDRING SR *et al*, 2000; JACKSON CJ *et al*, 1998; MENTZEL K *et al*, 1998; XU S *et al*, 2010). A produção desses mediadores é acionada na sinóvia por várias populações celulares, principalmente pelas células SLC-A ou linfócitos T.

O TNF-α é uma citocina que possui papel central em diversos processos biológicos como crescimento, angiogênese, citotoxicidade e inflamação (CARSWELL

et al, 1975; GAUR et al, 2003). Ele é capaz de induzir a migração de leucócitos por aumentar a expressão de proteínas de adesão nestes e nas células endoteliais, bem como induzir a liberação de IL-1β, IL-6 e fatores quimiotáticos (IL-8, MCP-1) pelas células residentes (van den BERG WB, 1999; MCKAY S, 2000; ZWERINA et al, 2007; MUELLER L, 2010). O TNF-α tem sido relacionado com a inflamação e lesão articular na AR, sendo encontrado em níveis elevados nas articulações afetadas de pacientes com AR (CHOY EH, 2001). Recentemente, tem se incluído no tratamento da AR anticorpos neutralizantes para o TNF-α e receptores solúveis para o TNF, os quais são capazes de reduzir os índices clínicos e inflamatórios, bem como a lesão óssea (KEYSTONE EC, 2004; LIPSKY PE, 2000).

Recentes estudos têm demonstrado que a AR também pode ser controlada por terapias de bloqueio da atividade da IL-1β (VAN DEN BERG, 2001; DINARELLO CA, 2000; BRESNIHAN B, 2001; COHEN S, 2002). Esta interleucina exerce um papel importante na patogênese da AR, incluindo a amplificação do processo inflamatório pela indução da produção de IL-6 (TAN PLJ, 199), RANKL e quimiocinas como MCP-1 (CCL2) e IL-8 (GOLDRING SR, 2002; deMARCO D, 1990), além de ativar condrócitos por vias dependentes de MAP quinases (GENG Y, 1996). Em modelos murinos de artrite induzida por administração de colágeno ou proteoglicana, o uso do antagonista do receptor de IL-1 leva a uma diminuição do infiltrado celular inflamatório (principalmente polimorfonucleares) e confere proteção contra lesão articular (ARNER EC, 1995; KIM JM, 2003; JOOSTEN LA, 2008; DINARELLO CA, 2000).

Outra citocina pró-inflamatória de grande interesse como alvo terapêutico é a IL-6, a qual pode ter sua produção induzida pelo TNF-α e IL-1β e é capaz de ativar macrófagos e osteoclastos (AXMANN R *et al*, 2009; MUSSACHIO E *et al*, 2009). Camundongos deficientes para a IL-6 têm menor susceptibilidade para o

desenvolvimento de doenças autoimunes experimentais como encefalomielite autoimune experimental (EAE) e artrite induzida por colágeno (CIA) (OKUDA Y, 1998; ALONZI T, 1998). Recentemente, foi aprovado pela Agência de Medicina Européia e pela Agência Americana de controle de Alimentos e drogas (FDA) o uso terapêutico do anticorpo solúvel anti-receptor de IL-6 (tocilizumab) em pacientes com artrite reumatóide com atividade da doença moderada e não respondedores ao metrotexato, mostrando-se efetivo na terapia desta doença (MATSUYAMA M, 2007; OLDFIEL V, 2009).

O papel das citocinas na AR não se restringe à inflamação articular, mas elas estão também relacionadas com o processo de geração da resposta auto-imune. A IL-1β parece ter um papel importante neste processo visto que animais deficientes para o antagonista [endógeno] do receptor de IL-1 (IL-1ra) desenvolvem poliartrite espontânea (HORAI R, 2000). A IL-6 também apresenta diversas atividades importantes no contexto da gênese da artrite reumatóide: ela é capaz de induzir a produção de autoanticorpos pelas células B e principalmente participar na ativação e diferenciação de células T CD4 efetoras (MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009).

Apesar de a etiologia da AR permanecer desconhecida, tem se demonstrado que três fatores, e principalmente a interação entre estes, são fundamentais na gênese da AR:

1) a quebra da tolerância imunológica (fase geradora) que pode estar relacionada com a

2) presença de variantes genéticas em moléculas que controlam a resposta imune ou até mesmo iniciada por 3) fatores ambientais, principalmente o tabagismo ou as infecções.

#### 1.4. CARACTERÍSTICAS AUTOIMUNES DA ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide é uma doença autoimune, sendo conseqüência de uma resposta imune exacerbada contra antígenos de tecidos próprios (ROSE, 1993). Em outras palavras, o sistema imunológico ataca as células do próprio organismo, não as reconhecendo como próprias, mas sim como corpos estranhos ou patógenos.

O fenômeno da autoimunidade parece ocorrer devido a uma falha nos mecanismos normais de tolerância, apesar de ainda não estar claro se os estados fisiológicos de tolerância dependem da ausência de células autorreativas ou da supressão ativa por células supressoras antígeno-específicas (SINHA AA *et al*, 1990). A tendência pronunciada para exacerbação espontânea e remissão da artrite reumatóide nos sugere que haja um balanço entre fatores regulatórios positivos e negativos (PETRI, 1989). Dois tipos de linfócitos T CD4 têm sido associados com este balanço da resposta imune na AR: os linfócitos Th17 (auxiliadores, pró inflamatórios) e os linfócitos "T reguladores" (supressores) (BOISSIER *et al*, 2008).

#### 1.4.1. Linfócitos T reguladores

Os linfócitos T reguladores (Treg) modulam a resposta autoimune mediada por linfócitos T, mantendo a tolerância periférica e prevenindo o desenvolvimento da doença autoimune. (VIGNALI et al., 2008, SAKAGUCHI et al., 1995; 2005). As Treg são fenotipicamente determinadas como linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e que possuem o fator de transcrição intracelular FOXP3, essencial para diferenciação e regulação do fenótipo supressor desta célula (HORI S et al, 2003; FONTENOT JD et al, 2003). A deficiência ou ausência de células Treg está relacionada com o desenvolvimento de doenças autoimunes, muitas da quais são Th17-associadas, enfatizando o papel crucial destas células reguladoras em manter a tolerância imunológica (CRISPIN et al., 2003; FURUNO et al., 2004; BALANDINA et al., 2005).

É possível observar que em pacientes com AR a função das células Treg está deficiente, o mesmo sendo observado em modelos experimentais de doenças autoimunes (BOISSIER et al., 2009). A depleção de células Treg pela administração de anti-CD25 em camundongos DBA/1J em um modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) promove aumento da gravidade da doença (MORGAN et al., 2003), enquanto a transferência adotiva de células Treg é efetiva no tratamento da artrite experimental (MORGAN et al., 2005). Entre pacientes com artrite idiopática juvenil, aqueles que apresentam maior gravidade da doença têm menores contagens de células Treg na circulação sanguínea (de KLEER, 2004), o que demonstra um possível papel protetor desta população celular na doença.

#### 1.4.2. Linfócitos Th17

Estudos *in vitro* e em modelos experimentais têm demonstrado que a citocina IL-17A exerce um importante papel na patogênese da RA (LUBBERTS *et al.*, 2005). Foram encontrados altos níveis de IL-17A no fluido sinovial de pacientes com RA (CHABAUD *et al.* 1999; KOTAKE *et al.* 1999) e demonstrou-se que esta citocina induz células sinoviais humanas a produzir IL-6, IL-8 e TNF-α, sugerindo uma possível ação direta da IL-17 nas células do estroma promovendo inflamação (FOISIEZ *et al.*, 1996). Nakae e colaboradores (2003) demonstraram *in vivo* o envolvimento critico da IL-17 no desenvolvimento espontâneo de artrite destrutiva em camundongos deficientes para IL1ra, enquanto havia uma completa prevenção da artrite em animais deficientes para ambos IL-17 e IL-1β. Além disso, o tratamento com anticorpos anti-IL-17A, em modelos murinos de artrite induzida por colágeno, diminui o dano nas articulações, a destruição da cartilagem e do osso, e reduz os níveis séricos de IL6. (LUBBERTS *et al.*, 2004).

A IL-17A é a citocina que caracteriza o mais recente subtipo de células T *helper* CD4+, denominado Th17 (INFANTE-DUARTE *et al.*,2000), sendo pró-inflamatória e podendo estimular fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e macrófagos a produzir quimiocinas, GM-CSF, IL-1β, IL-6, ICAM-1, PGE2, RANTES, metaloproteinases, NOS-2, RANKL, dentre outros mediadores envolvidos com a migração neutrofílica, reabsorção óssea e destruição tecidual (WITOWSKI *et al.* 2004). Logo, tem se relacionado este subtipo de linfócitos T auxiliares produtores da IL-17 (Th17) com um perfil pró-inflamatório e quebra da autotolerância.

As células Th17 exercem um papel crucial na resposta autoimune, podendo transferir a doença para animais não susceptíveis, e sendo importantes no

desenvolvimento destas doenças (LANGRISH *et al.*, 2005, KEBIR *et al.*, 2007, TZARTOS *et al.*, 2008). Além de IL-17A, também produzem IL-17F, IL-21, IL-22 e em humanos, IL-26 (OUYANG, 2008). Demonstrou-se que as células Th17 estão envolvidas na indução da destruição óssea na artrite autoimune por seu papel osteoclastogênico via IL-17 - RANKL (SATO, 2006). Os resultados desses estudos demonstram que a atividade da IL-17 pode contribuir para a erosão do tecido cartilaginoso e ósseo na AR e sugerem que as células Th17 estão relacionadas com o desenvolvimento desta doença.

Embora se acredite que a disfunção das células Treg e a desregulação das células Th17 estejam envolvidos no desenvolvimento da artrite bem como de outras doenças autoimunes, pouco se sabe sobre as vias fisiológicas de diferenciação e geração dessas linhagens celulares. Logo, a identificação de vias que controlam a diferenciação de células Treg e Th17 pode ser crucial no desenvolvimento de tratamentos da artrite.

Recentemente, um possível alvo de regulação da diferenciação de células Treg e Th17 foi identificado. Trata-se do receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR), identificado inicialmente como um mediador intracelular de resposta a xenobióticos (OKEY, 2007). Dois grupos independentes demonstraram o papel importante do AhR na geração das células Th17 e Treg. Quintana *et al.* (2008) demonstraram que o AhR regula tanto a diferenciação Treg quanto Th17 de uma forma dependente do ligante. A ativação do AhR por TCDD, uma dioxina, induziu células Treg que suprimiram a encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos. Por outro lado, a ativação do AhR pelo ligante 6-formilindol [3,2-b] carbazole (FICZ) não interferiu no desenvolvimento de células Treg, mas induziu a diferenciação de células Th17, aumentando a gravidade da EAE e a expressão de IL-17A, IL-17F e IL-22 (VELDHOEN *et al.*, 2008)

Estes resultados demonstram uma atividade dual para o AhR, dependente do tipo de ligante (sintético ou natural). Os ligantes TCDD e FICZ exercem diferentes papéis na diferenciação das células T helper e na patogênese da EAE. Apesar da participação ainda contraditória, a descoberta de que o receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR), um importante sensor intracelular de xenobióticos, está presente no eixo de regulação de diferenciação de células Treg e Th17 abre caminho para a investigação da relação entre a exposição a determinados fatores ambientais e o desenvolvimento da artrite reumatóide.

# 1.5. IMPORTÂNCIA DOS FATORES GENÉTICOS NA ARTRITE REUMATÓIDE

Na maioria das doenças complexas multifatoriais como doenças autoimunes, transtornos mentais e carcinomas pode se observar uma estreita relação entre o seu desenvolvimento e fatores genéticos. Entre os principais fatores genéticos que influenciam a susceptibilidade e o curso de uma doença multifatorial estão os mecanismos epigenéticos, que interferem e controlam a expressão gênica, e as mutações genéticas, que podem alterar a expressão, função ou atividade do produto gênico.

Por definição, um polimorfismo é a coexistência de mais que uma variante genética em uma população que são descritas como: variante selvagem (a forma ancestral) e variante mutante. Polimorfismos resultam da herança de mutações genéticas que se tornam genótipos estáveis em uma população e recebem este termo apenas quando a freqüência da variante é maior que 1% em uma população. Os polimorfismos de um gene são denominados variantes alélicas ou alelos e constituem, isoladamente ou agrupados, nas unidades de herança. Quando se identifica que dois ou mais

polimorfismos estão segregando juntos formando blocos de herança estes são classificados como haplótipos (GRIFFITHS AJF, 2008).

A artrite reumatóide é uma doença complexa multifatorial na qual se observa a presença de um forte componente genético como fator de predisposição para o seu desenvolvimento (SILMAN AJ, 2002). A predisposição genética para artrite reumatóide é evidente em estudos envolvendo gêmeos, os quais demonstram haver um aumento de concordância de quatro vezes no surgimento da AR em gêmeos monozigóticos comparados a gêmeos dizigóticos (MACGREGOR AJ et al, 2000). Os riscos relativos descritos na literatura para o desenvolvimento desta doença em familiares de primeiro grau de pacientes com AR têm valores que vão de 2 a 4 (del JUNCO D et al, 1984; JONES MA et al, 1996; HEMMINKI K et al, 2009) quando comparados ao risco relativo no grupo controle. Apesar do modo de herança da susceptibilidade para a AR não ser Mendeliano, isto demonstra uma tendência de agregação familial da doença.

Os principais fatores de risco genético de susceptibilidade à AR são polimorfismos genéticos no gene que codifica a cadeia beta do complexo de apresentação antigênica HLA-DRB1 (del JUNCO D *et al*, 1984; RAYCHAUDHURI, 2010). A maioria dos alelos do HLA-DRB1 possui um motivo comum de aminoácidos, conhecido como epítopo compartilhado, que está associado com a susceptibilidade a AR. Os alelos do HLA-DRB1 podem conferir altos índices de risco individual (associação alélica com O.R. de 3.5, 95% CI 1.8-6.8 para o DRB1\*0404; e 2.4, 95%CI 0.8-7.8 para o DRB1\*1001) ou de risco genotípico (associação genotípica com O.R. de 17.9, 95% CI 4.2-77.8 quando homozigoto para DRB1\*0404) (SILMAN AJ, 2002). A freqüência dos alelos do HLA-DR que carregam a seqüência do epítopo compartilhado tem freqüências de até 50 em pacientes com AR com ancestralidade caucasiana (BOKI KA *et al*, 1992). Em ameríndios Yakima, a alta prevalência da AR pode ser explicada

pela alta freqüência do alelo HLADRB1\*1402 (80%) o qual confere alto risco para AR (WILIIAM RC *et al*, 1995). Por outro lado, a baixa prevalência da AR em Nigerianos pode ser associado com a ausência virtual da variante do alelo HLA-DR4 na população e a baixa freqüência de alelos carreadores da seqüência do epítopo compartilhado (SILMAN AJ, 1993).

Esta associação de alelos de um complexo de apresentação de antígenos (HLA) com a AR teve um grande impacto sobre as teorias de patogênese molecular da AR, reforçando a idéia do papel central da ativação de linfócitos T e B dependente de MHC nesta doença. Porém, os estudos de associação do HLA e AR em gêmeos revelaram somente 50% da contribuição genética para AR soropositiva para anticorpos anti-CCP pode ser explicada pelo HLA e logicamente outros genes devem compor o quadro de fatores de risco para AR (MACGREGOR AJ *et al*, 2000; van der WOUDE *et al*, 2009).

Em 2004, Begovich *et al* identificaram uma associação entre a AR e um polimorfismo pontual de uma única base nucleotídica (SNPs) no gene que codifica a proteína PTPN22 (proteína tirosina fosfatase, não receptor, tipo 22). Atualmente o SNP rs2476601 (R620W, C1858T) é o segundo maior fator de risco descrito para AR com OR alélico de 1.65 (95% CI 1.23-2.20). O PTPN22 codifica uma tirosina fosfatase citoplasmática homônima que regula negativamente o limiar de ativação de linfócitos T via TCR. O SNP rs2476601 é uma mutação missense e resulta em uma mudança do aminoácido arginina pelo aminoácido triptofano na posição 620 da proteína o que altera a atividade da enzima. (VANG T *et al*, 2005). Isto reforça o argumento da importante influência de variantes genética nos mecanismos de modulação da resposta imune mediada por linfócitos. O agrupamento de dados científicos dos últimos anos indicaram também que os alelos de risco do epítopo compartilhado HLA-DRB1 e do PTPN22 estão associados somente com o subgrupo de pacientes com artrite reumatóide e fator

reumatóide ou anticorpos antiproteína citrulinada positivos. (LEE AT *et al*, 2005; PADUYKOV L *et al*, 2004; KLARESKOG L *et al*, 2006).

Diversos outros polimorfismos em genes cujos produtos protéicos estão associados com o desenvolvimento da resposta imune foram identificados como alelos de risco para o desenvolvimento da AR. Entre eles estão os polimorfismos no: fator associado ao receptor de TNF (TRAF1), importante na transdução de sinal deste receptor e ativação de vias MAP quinases; e no fator de transcrição STAT4 (PLENGE RM et al, 2007; KURREEMAN FA et al, 2007; REMMERS EF et al, 2007). Entretanto, os pequenos valores de OR e risco individual para a maioria destes SNPs os tornam fracos preditores de risco. Em vista disto, alguns estudos tentam criar mapas haplotípicos de risco para o desenvolvimento da AR, principalmente utilizando as novas técnicas de genotipagem que abrangem virtualmente todo o genoma do indivíduo, 'genome-wide'. Estes dados de diversos genes complementares candidatos ao serem agrupados indicam como um conjunto de polimorfismos pode gerar o risco genético para a AR. Ainda, estes estudos tem seu principal valor potencial no sentido de identificar novas vias moleculares pelos quais diversos genes trabalham em conjunto no desenvolvimento da AR.

### 1.6. IMPORTANCIA DOS FATORES AMBIENTAIS NA ARTRITE REUMATÓIDE

Diversos estudos demonstram que a prevalência da artrite reumatóide é aumentada por determinados fatores ambientais que interagem com determinantes genéticos. Entre diversos potenciais fatores ambientais associados com a AR estão as doenças infecciosas, a fumaça de cigarro, poeira de sílica, óleos minerais e aerossóis

poluentes (SVERDRUP B et al, 2005; KLOCKARS M et al, 1987; OLSSON AR et al, 2004).

A fumaça de cigarro é o fator de risco com associação melhor descrita para o desenvolvimento de artrite reumatóide fator reumatóide e o anticorpo antiproteína critulinada (ACPA) positivos (KARLSON EW et al, 1999; VESSEY MP et al, 1987; SYMMONS DP et al, 1997). A principal interação genótipo-ambiente é observada justamente para este tipo de AR entre os alelos de risco do HLA-DR e o habito de fumar. A combinação entre o histórico de fumo e a presença de duas cópias do HLA-DR com epítopo compartilhado aumenta 21 vezes o risco de desenvolver AR comparado com o risco entre não fumantes portadores do epítopo compartilhado (PADYUKOV et al, 2004). Estes estudos demonstram que uma exposição a compostos presentes na fumaça do cigarro pode mudar a magnitude da associação genética em uma doença complexa.

Infelizmente existe uma carência na explicação biológica para estas interações ambiente-genótipo. As principais teorias de associação entre o tabagismo e a AR residem no potencial proinflamatório dos componentes da fumaça do cigarro, principalmente, pelo fato desta conter diversos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (alguns halogenados como as dioxinas) que estão associados com a indução de processos inflamatórios (KOBAYASHI *et al*, 2008).

#### 1.7. O RECEPTOR DE HIDROCARBONETOS DE ARILA (AhR)

O AhR é um fator de transcrição ativado por ligantes, localizado no citosol celular, que após sua ativação transmigra para o núcleo celular, induzindo a expressão de enzimas metabolizadoras de xenobióticos como os citocromos P 450 – CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 – e algumas enzimas de fase II - UDP glucuronosiltransferase 1A e

glutationa-S-transferase A2 – (LEGRAVEREND *et al.*, 1982; KOHLE & BOCK, 2007). Alguns trabalhos indicam que o AhR pode induzir a expressão de enzimas envolvidas em processos inflamatórios como a prostaglandina sintase H2 (que converte acido araquidônico em prostaglandina), IL-6 e IL8. (DENINSON & NAGY, 2003; KOBAYASHI, 2008).

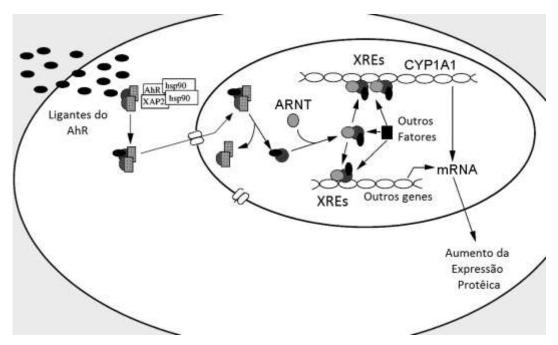
O AhR é conhecido como um sensor celular de poluentes ou receptor de dioxinas, tendo entre seus ligantes principais os hidrocarbonetos aromáticos desta classe. Os ligantes do AhR são divididos em compostos sintéticos e compostos de origem natural (derivado de processos biológicos naturais). Entre os ligantes sintéticos estão as compostos tóxicos já citados- como as dioxinas (2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxin – TCDD) - e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos halogenados. O TCDD, também conhecida como dioxina de Seveso, é um organoclorado altamente tóxico presente em diversos compostos como pesticidas, fundição de cobre, fumaça de tabaco. Interessantemente, estes compostos estão associados com o desenvolvimento de lúpus e esclerose múltipla. Já os ligantes de origem natural incluem substâncias derivadas de plantas, como os flavonóides, e de produtos derivados da conversão de compostos indol presentes na dieta principalmente metabólitos gerados a partir do (indol 3-carbinol e o 6-formilindolo [3,2-b] carbazole) (DENISON &NAGY, 2003). O 6-formilindolo [3,2-b] carbazole (FICZ) é um fotoproduto do triptofano e possui uma estrutura química de significante similaridade com o ICZ, um ligante natural do AhR, com potente atividade indutora de CYP1A1 e CYP1A2 (RANNUG & FRITSCHE, 2006).

#### 1.7.1. Mecanismos de Sinalização

O AhR é um membro da família de reguladores da transcrição bHLH (estrutura básico Hélice-loop-Hélice) — PAS (Per-ARNT-Sim) que controla diversos eventos fisiológicos e de desenvolvimento estrutural como neurogênese, formação dos ductos salivares, metabolismo de xenobióticos, ciclo circadiano e resposta a hipóxia. Ele interage com diversas proteínas reguladoras e de sinalização intracelular, principalmente com o translocador nuclear do AhR (ARNT), um heterodimerizador de proteínas padrão PAS, também conhecido como fator induzido por hipóxia tipo 1b (HIF-1b). Entre outras proteínas estão a chaperona HSP90 (Heat-Shock Protein-90), a Proteína semelhante a Imunofilina (AIP — Proteina que interage com o AhR), a p23, algumas tirosinas quinases, a caseína kinase 2 (CK2), a proteína kinase C (PKC). Adicionalmente, o AhR também interage com as vias de sinalização mediadas pelo receptor de estrógeno (ER) e do NF-Kb (GONZALEX FJ et al, 1998; PUGA A et al, 2002).

No citoplasma, o AhR existe no estado inativo em um complexo protéico formado associação com o HSP90, a proteína associada X tipo 2 (XAP2) também conhecida como AIP, e a co-chaperona p23. Após a ativação pelo ligante, o AhR sofre uma mudança conformacional e expõe a região NLS (sinal de localização nuclear). O HSP90 se dissocia do complexo e o AhR transloca para o núcleo formando um heterodímero com o ARNT. Este heterodímero AhR-ARNT se liga a regiões do DNA conhecidas como XRE (elementos de resposta a xenobióticos), alterando a expressão dos genes controlados por estes acentuadores (*enhancers*) XREs. A seqüência conservada de um XRE "GCGTG" é encontrada em regiões promotoras de diversos genes envolvidos com o metabolismo de xenobióticos (ex. CYP1A1, Citocromo P450)

Familia-1 Subfamilia-A Polipeptideo-1; CYP1A2, Citocromo P450 Familia-1 Subfamilia-A Polipeptideo-2; CYP1B1, Citocromo P450 Familia-1 Subfamilia-B Polipeptideo-1; NAD(P)H-Quinona Oxidoredutase) e inflamação (IL-8, cicloxigenase tipo 2) (POLAND A *et al*, 1994; GONZALEX FJ *et al*, 1998; DENINSON & NAGY, 2003; KOBAYASHI, 2008). Um esquema simples da ativação do AhR se encontra na Figura 2.



**Figura 2.** Diagrama do Mecanismo de ativação do Receptor de hidrocarbonetos de Arila.

#### 1.7.2. Envolvimento do AhR com o Sistema Imunológico

A exposição a ligantes sintéticos do AhR (dioxinas) tem sido associada com mudanças no número e função dos linfócitos (NEUBERT *et al.*, 1993; TONN *et al.*, 1996). Em modelos murinos, o TCDD é capaz de alterar a resposta humoral T-dependente, suprimindo a produção de anticorpos (VECCHI *et al.*, 1980) e diminuindo

a freqüência de células T de memória. (DOOLEY *et al.*, 1988). Nohara e col. (2005) demonstraram que a ativação de AhR pode inibir diretamente a ativação de células T e sua subseqüente diferenciação levando a supressão da proliferação de células T helper e células B.

A ativação do AhR por TCDD induz uma potente supressão da resposta imune adaptativa (FUNATAKE et al., 2004) podendo interferir na expressão do MCH de classe II em algumas células apresentadoras de antígeno (SHEPHERD et al., 2000) e até inibir a atividade de neutrófilos (ACKERMANN et al., 1989). Funatake et al. (2005) sugeriram que a ativação de AhR por TCDD pode levar a imunossupressão em camundongos pela indução de células T reguladoras. Em um modelo de doença aguda de enxerto versus hospedeiro, acredita-se que o composto de baixo peso molecular, VAF347 leve a geração de uma subpopulação de células T CD4+ semelhantes a Treg nas células T do doador por um mecanismo dependente de ativação direta do AhR (HAUBEN E et al, 2008). Porém, muitos autores têm sugerido que o efeito supressor do AhR não esteja relacionado com a geração de células supressoras, mas sim que este receptor esteja ativando prolongadamente células T efetoras a ponto de induzir a sua apoptose e principalmente que o TCDD, mas não outras dioxinas, tem um outro mecanismo de ação independente do AhR (CAMACHO IA et al, 2002; SINGH NP et al, 2008; FUNATAKE CJ et al, 2009).

Esta idéia é reforçada por diversos estudos que demonstram a importância do AhR no desenvolvimento das células Th17. Veldohen e colaboradores (2008) demonstraram que a diferenciação *in vitro* de Th17 é dependente do AhR. O uso de um antagonista do AhR diminui a quantidade de células Th17 diferenciadas. Ainda, Kimura *et al* (2008) demonstraram que a ativação do AhR pelo agonista FICZ aumenta o número de células Th17 e a produção de IL-17 de forma dose-dependente. Células T CD4<sup>+</sup> de animais

deficientes para AhR perdem a capacidade de expressar IL-22 durante a diferenciação para Th17, sugerindo que AhR controla a expressão desta citocina. Interessantemente, um estudo recente demonstra o papel importante da IL-22 na fisiopatologia da artrite experimental induzida por colágeno (GEBOES *et al.*, 2009).

Um possível papel do AhR na artrite reumatóide foi sugerido por Kobayashi (2008(2)), que encontrou altos índices de expressão de AhR no tecido sinovial de pacientes com AR, mas não em pacientes com osteoartrite (OA). Ele também observou que a expressão de AhR nas células sinoviais é aumentada pelo TNF-α, e que a ativação deste receptor aumenta a expressão das citocinas IL-1β, IL-6 e IL-8, por um mecanismo dependente da sinalização das cascatas NF-kb e ERK (Figura 3).

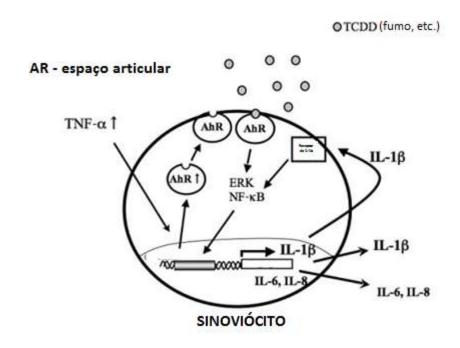


Figura 3. Representação esquemática do papel do AhR na AR sugerido por Kobayashi. Adaptado de Kobayashi et al (2008). O TCDD, principal componente da fumaça do cigarro pode aumentar o processo inflamatório ad AR.

#### 1.7.3. Polimorfismos Genéticos do AhR

Em roedores, variações genéticas no AhR podem alterar a afinidade por seus ligantes ou a função de regulação transcricional (POHJANVIRTA *et al.*, 1998; TUOMISTO *et al.*, 1999). Por exemplo, a afinidade do TCDD pelo AhR citosólico de camundongos C57BL6/J é 10 vezes maior que em camundongos DBA/2. (OKEY *et al.*, 1989). Isto ocorre devido a uma mutação no códon 375 dos animais DBA/2, (CHANG *et al.*, 1993; POLAND, 1994), o que os torna menos sensíveis que os C57BL6/J aos efeitos tóxicos induzidos por ligantes do AhR (NEBERT *et al.*, 1989).

Em humanos o gene que codifica o AhR (*AHR*) está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p15). Em humanos, poucos polimorfismos genéticos funcionais foram identificados no *AhR*. Wong *et al* (2001) identificou uma combinação alélica (haplótipo) da variante Lis554 (rs2066853) com a variante (rs4986826) em Afrodescendentes associada com uma menor indução da expressão de CYP1A1 por TCDD. Ainda, quando o alelo mutante (A) rs2066853 aparece isoladamente (Lis554) este se encontra associado com aumento nos níveis de dano ao DNA em linfócitos do sangue periférico em trabalhadores industriais. (CHEN, 2006).

As mutações no gene *AhR* ocorrem predominantemente no éxon 10, uma região que codifica a maior parte do domínio de transativação do receptor, que é responsável pela regulação da expressão de outros genes. Estas mutações podem estar relacionadas com alterações na capacidade do receptor em modular a diferenciação das células Treg e Th17, o que torna os polimorfismos genéticos no *AhR* importantes alvos de estudo de susceptibilidade a RA.

### 2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi investigar a influência de polimorfismos genéticos no receptor de hidrocarbonetos aril (AhR) com o desenvolvimento da artrite reumatóide.

#### - Objetivos Específicos

- Determinar a frequência alélicas, genotípicas e possíveis haplótipos de sete polimorfismos genéticos (SNPs) no AhR em pacientes com artrite reumatóide comparando os a um grupo controle.
- 2. Avaliar se a presença desses SNPs está associada a dados clínicos como o índice de atividade da doença (DAS28) e prognóstico dos pacientes com AR.
- 3. Identificar se a expressão do AhR está aumentada em células mononucleares dos pacientes com AR em comparação com indivíduos saudáveis.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos conduzidos com humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP-HC-FMRP/USP Processo nº 173/2008). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), ficando claro aos voluntários, como ratificado pela 2ª via do TCLE que lhe foi entregue, que a sua não aceitação, ou retirada do estudo em qualquer etapa do protocolo de estudo, não implicaria em nenhuma alteração do serviço prestado. Todos os indivíduos do grupo controle e do grupo de pacientes pertencem à mesma região geográfica. Cada paciente incluído na pesquisa recebeu as devidas informações sobre a sua participação no projeto.

#### 3.1. Recrutamento dos voluntários saudáveis

Foram selecionados, aleatoriamente, 137 indivíduos saudáveis doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP), sem nenhuma doença de base e/ou com sorologias negativas para doença de Chagas, Hepatite B, Hepatite C e HIV. Esta pesquisa foi descrita e explicada a todos os indivíduos que aparecerem para doar sangue no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e foram selecionados para a doação. Logo após foi realizado o convite de participação na pesquisa a esses indivíduos, e aplicado o termo de Livre Consentimento Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP para seu aceite. Cada indivíduo incluído na pesquisa respondeu a um questionário sócio-econômico-epidemiológico e histórico clínico de doença.

#### 3.2 Recrutamento de pacientes com Artrite Reumatóide

Foram selecionados, aleatoriamente, 138 pacientes com artrite reumatóide provenientes do ambulatório de Doenças Reumáticas da Divisão de Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Todos os pacientes preencheram pelo menos quatro dos sete critérios para classificação diagnóstica da doença, estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (Arnet et al. 1982). Em todos os pacientes foram obtidos os seguintes parâmetros clínicos: idade, sexo, tempo de doença, medicamentos em uso, atividade da doença estabelecida pelo Índice de Atividade da Doença (Disease Activity Score - DAS 28), estado funcional articular, presença de tabagismo, presença de autoanticorpos (fator reumatóide e anticorpos antipeptídeo citrulinado cíclico), presença de epítopo compartilhado (HLA-DRB1\*0401, \*0404, \*0405, \*0101, \*1402, \*10) e resposta a terapia medicamentosa convencional para AR (drogas modificadoras do curso da doença). No anexo 1 está o protocolo clínico de coleta de dados. Foram considerados critérios de exclusão a concomitância com Doença de Chagas, Hepatite B, Hepatite C e/ou infecção pelo HIV. O DAS-28, que inclui dados clínicos como o número de articulações dolorosas, o número de articulações edemaciadas, a nota dada pelo paciente em uma escala visual para sua saúde global e um dado laboratorial, o VHS. A avaliação da atividade da doença está descrita em maiores detalhes no item 1.1.10, sendo sua fórmula descrita no ANEXO 2 e sua variação descrita na tabela 4.

A coleta das amostras foi realizada pelo (a) médico (a) responsável no momento do atendimento, juntamente com os exames de rotina e a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP. Caso o paciente não possuísse condições clínicas suficientes para assinar o

termo, o mesmo foi obtido a partir da autorização de seu representante legal. Foram excluídos os pacientes, por meio de sua própria vontade ou de seu representante legal que não manifestaram interesse em participar do estudo.

#### 3.3 Coleta das Amostras e Extração de DNA genômico (DNAg)

Foram coletados por punção venosa dez (10) mililitros (mL) do sangue dos voluntários em tubos contendo anticoagulante EDTA a 0,01M e as amostras foram processadas imediatamente. Quatro (4) mL da amostra foram utilizados para a extração de DNA genomico e procedimentos de genotipagem enquanto que os outros seis (6) mL do sangue periférico foram utilizados para a purificação de células mononucleares (PBMCs) e quantificação de RNA mensageiro de genes alvo. O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit de extração FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Boston, Mass.,USA), segundo as recomendações do fabricante.

# 3.4 Identificação de substituições de simples nucleotídeos (SNPs) por REAL-TIME PCR

#### 3.4.1 Identificação de SNPs no gene AhR a serem estudados

Foram selecionados sete (7) SNPs no gene *AhR* (NM\_001621.4). Destes sete polimorfismos, quatro SNPs foram selecionados devido ao seu potencial funcional: o *rs35966236* e o *rs17779352*, duas mutações silenciosas; e o *rs4986826* (Abnet *et al.*, 2007) e o *rs2066853* (R554L) (WONG JM *et al.*, 2001), duas mutações missenses, todos localizados no éxon 10, onde se encontra a região codificante do sítio de interação

proteína-DNA do AhR. Adicionalmente selecionamos três (3) *tagSNPs* (*rs7796976*, *rs2237297* e *rs2237298*) no gene *AhR* escolhidos através do Projeto Internacional HAPMAP (http://www.hapmap.org, PHASE 2) com o auxílio do programa Haploview 4.1 (Barret *et al.*, 2005) (Tabela 5). Os *tagSNPs* são polimorfismos representativos de um ou mais haplótipos e que são herdados junto com os polimorfismos que eles representam. Estes vêm sendo utilizados em estudos de associação gene-doença com o objetivo de se obter uma boa cobertura do gene a um custo baixo. Os *tagSNPs* escolhidos tem um valor de r<sup>2</sup>>0.8 e a freqüência do alelo raro > 5% em populações européias do Projeto Internacional HAPMAP.

#### 3.2.1 Reação em Cadeia de Polimerase com sonda TaqMan®

Para realizar a genotipagem foi aplicada a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando sondas fluorescentes TaqMan®. A PCR é uma técnica onde a região gênica de interesse em uma amostra de DNAg é utilizada como molde para através de ciclos térmicos aumentar a quantidade de fragmentos-cópia desta região. Para esta técnica utiliza-se a enzima DNA polimerase é responsável pela síntese das cadeias de DNA-cópia e duas seqüências iniciadoras (primers) que se ligam nos terminais 5'e 3'do fragmento de DNA a ser amplificado delimitando a região a ser copiada. Os ciclos térmicos são compostos por 3 etapas: elevação da temperatura para desnaturação do DNA e separação da fita dupla em fita simples, o que permite a ligação dos iniciadores nas fitas simples do DNA alvo; redução da temperatura para anelamento dos iniciadores às fitas simples de DNA; e elevação para a temperatura ótima de atividade enzimática para a polimerase realizar a extensão da nova fita a partir dos iniciadores.

Tabela 5. Informações referentes aos SNPs utilizados.

SNP	POSIÇÃO*	LOCALIZAÇÃO	ALELOS**	SEQUENCIA	TIPO	ALTERACAO
rs2237298	17234606	Intron	a/g	GTGTA[ <b>A</b> / <b>G</b> ]TTCTC	tagSNP	N
rs17779352	17236113	exon 2	t/c	CTTAA[C/T]ACAGA	silenciosa	N
rs2237297	17246082	Intron	c/t	TTGCT[C/T]TTGTG	tagSNP	N
rs35966236	17253908	exon 4	t/c	ACAGA[ <b>C</b> / <b>T</b> ]GCTTT	silenciosa	N
rs2066853	17265602	exon 10	g/a	AATCA[ <b>G</b> / <b>A</b> ]ACAC	missense	R554K
rs4986826	17265649	exon 10	g/a	GTGAG[ <b>A</b> / <b>G</b> ]TTGAC	missense	V570I
rs7796976	17338430	5`UTR	g/a	ATTT[ <b>A/G</b> ]GGAA	tagSNP	N

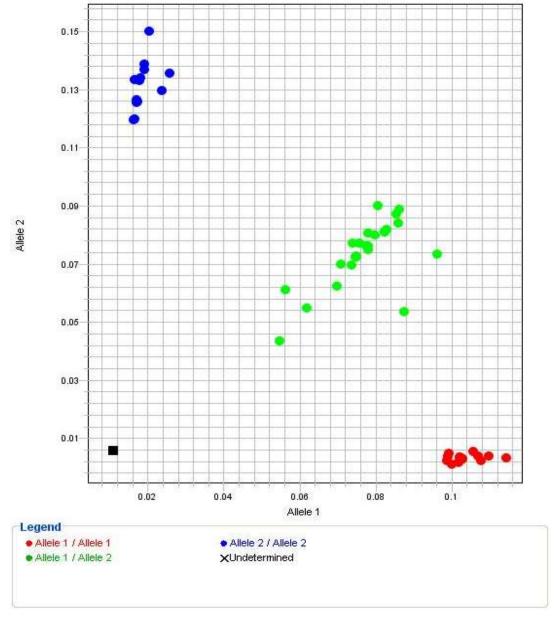
<sup>\*</sup> Group term: alt\_assembly\_8; Group Label: HuRef

O método utilizado de genotipagem consistiu no uso de sondas TaqMan ® (ABI – Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Estas sondas são fragmentos de DNA marcados com fluorocromos que hibridizam em uma molécula específica de DNA alvo amplificada na PCR. Elas apresentam um fluoróforo em uma extremidade, designado repórter, e na outra extremidade uma molécula 'quencher' que, pela proximidade física com o repórter através de uma reação de FRET (transferência de energia por ressonância), absorve a energia em forma de luz liberada e a dissipa. No processo de amplificação, a enzima polimerase, devido a sua atividade exonuclease 5'-3', degrada a sonda TaqMan hibridada no DNA alvo, separando o 'quencher' do repórter e assim aumentando a intensidade da fluorescência liberada pelo fluoróforo. Logo, a fluorescência somente é detectada quando a sonda hibrida especificamente no gene alvo e ocorre a amplificação da seqüência alvo. As sondas utilizadas possuíam dois fluoróforos repórteres: um marcador VIC®, que detecta o alelo 1, com comprimentos de onda de excitação e emissão, 535nm e 590 nm, respectivamente; e um marcador

<sup>\*\*</sup>Ancestral/Mutante

FAM<sup>TM</sup>, que detecta o alelo 2, com comprimentos de onda de excitação e emissão, 485nm e 535nm, respectivamente. Amostras que apresentaram aumento apenas na emissão do comprimento de onda do fluoróforo VIC foram consideradas homozigotas para o alelo 1. Já amostras que apresentaram aumento apenas na emissão do comprimento de onda do fluoróforo FAM foram consideradas homozigotas para o alelo 2. Amostras que apresentaram aumento na emissão dos dois comprimentos de onda dos fluoróforos (VIC e FAM) foram consideradas heterozigotas (Figura 4).

A solução de PCR foi preparada em um volume de 10uL contendo 5uL do Mix Universal para PCR TaqMan ® (*ABI* – Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 0.25 uL das sondas e 4.75 uL de DNA genômico a 6.3 ng/uL. A reação foi realizada com auxilio do equipamento ABI 7500fast, que promove as ciclagens térmicas ao mesmo tempo em que detecta a fluorescência emitida, sendo que cada placa de 96 amostras analisada continha 95 amostras e um controle negativo de reagentes sem amostra. A ciclagem consistiu em um ciclo de 1 minuto a 60°C (pré-PCR, analise da fluorescência basal da reação), um ciclo de 5 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos com 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, cada. Posteriormente uma analise pós-PCR de 1 minuto a 60°C era realizada para a discriminação dos alelos. Dez por cento das amostras foram genotipadas novamente, para todos os SNPs, e não foi encontrado erro de genotipagem e classificação alélica.



**Figura 4. Plot de Discriminação Alélica para os SNPs no AhR.** Figura gerada pelo programa de Analise do PCR- Real time 7500 fast para o SNP rs2066853. **Vermelho**: homozigoto para o alelo selvagem; **Azul**: Homozigoto para o alelo mutante; **Verde**: heterozigoto.

# 3.3 Separação de células mononucleares (PBMC) do sangue periférico de humanos

Sangue periférico foi utilizado para a purificação dos PBMCs através da utilização de soluções de Percoll (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO-USA) nas concentrações de 72%, 63%, 54% e 45%. Dois mililitros destas soluções foram adicionadas em um tubo de 15 mL, na seguinte ordem: 1°) solução a 45%; 2°) solução a 54%; 3°) solução a 63%; e por último, solução a 72%. Por fim, dois mililitros do sangue foram adicionados no topo das soluções de Percoll. Este tubo foi centrifugado a 500 g, por 30 minutos, à temperatura ambiente, e, depois de retirada as camadas superiores de Percoll, a camada rica em PBMC foi cuidadosamente removida e transferida para um tubo distinto. As hemácias foram então lisadas com tampão de lise (ver abaixo). Logo após, estas células foram lavadas com solução de Hanks' por 3 vezes, com centrifugação a 1200 rpm, por 10 minutos. Depois, o sobrenadante foi desprezado e os PBMCs colocados em TRIzol (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) para extração de RNA e realização dos diferentes ensaios de expressão gênica.

#### 3.4 Avaliação da expressão de genes (quantificação de mRNA)

#### 3.4.1 Extração de mRNA

O RNA celular total foi extraído usando o reagente TRIzol segundo recomendações do fabricante. Em seguida, 200 µL de clorofórmio (Gibco BRL) foram adicionados à suspensão, a qual foi centrifugada a 13000g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo. A este tubo foi adicionado

isopropanol na proporção de 1:1 e, após agitado em Vortex, incubou-se por 2 horas minutos à -20 °C, para precipitação do RNA disperso na fase aquosa. Após incubação e centrifugação a 13000g, durante 15 minutos, a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi suspenso em etanol 75% e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi então novamente descartado e o precipitado suspenso em água livre de RNAse. A concentração de RNA foi determinada pela densidade ótica no comprimento de onda de 260 nm, por meio do aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

#### 3.7.2. Síntese do cDNA (RT-PCR)

Um micrograma do RNA total foi transcrito para cDNA por ação da enzima transcriptase reversa Pre-Improm II de acordo com as especificações do fabricante (Promega, Madison, Wisconsin, USA). O RT-PCR foi executado em um volume final da reação de 20 uL em um termociclador nos seguintes parâmetros: 95 °C (10 min); 40 ciclos de 94 °C (1 min), 56 °C (1 min); 72 °C (2 min).

#### 3.7.3. Reação em cadeia de Polimerase em tempo real (PCR-Real-Time)

A reação quantitativa em tempo real foi realizada no aparelho ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR Sequence Detection System usando o sistema de fluorescência SYBR-green (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação das amplificações. A curva de fusão foi analisada (65–95 °C) para verificar se apenas um produto foi amplificado e amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método de 2-ACT. Amostras de RNA sem a

transcrição reversa foram utilizadas para verificar a ausência de DNAg nas amostras. Os pares de iniciadores utilizados em cada reação foram:

Gene	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
AhR	AAC ATC ACC TAC GCC AGT CG	ATT CCT TCA GCT GGG ATT GG
GAPDH	GGG AAG GTG AAG GTC GGA	GCA GCC CTG GTG ACC AG

#### 3.5 Análise Estatística

Os resultados quantitativos de expressão gênica são expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). A análise do nível de significância das médias das variáveis quantitativas entre os grupos foi feita pelo teste de *t-student* ou por ANOVA com correção de Bonferroni com o auxílio do programa GraphPad Prisma 5.0. O nível de significância foi de p<0.05.

Variáveis categóricas e as freqüências genotípicas foram comparadas entre os grupos usando teste de Fisher. As análises de associação alélica e haplotípica foram realizadas com o programa UNPHASED (versão 3.0.13) (DUDBRIDGE, 2008). Este programa estatístico implementa cálculos de probabilidade retrospectiva utilizando uma modelagem logística multinomial. O HAPLOVIEW 4.1 (BARRET *et al.*, 2005) foi utilizado para avaliar desequilíbrio de ligação entre os alelos (SNPs) e montar prováveis haplótipos quando possível, além de examinar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram considerados significantes os resultados com valores de p<0,05.

### 4. RESULTADOS

#### 4.1 Dados descritivos dos pacientes com Artrite Reumatóide

Para investigar a possível associação entre polimorfismos genéticos no *AhR* com a artrite reumatóide foram selecionados duzentos e setenta e cinco (275) indivíduos. Deste total, cento e trinta e sete indivíduos pertenciam ao grupo controle (137) e cento e trinta e oito ao grupo de pacientes com artrite reumatóide (138), sendo todos selecionados de forma aleatória. Os dados demográficos, clínicos e os tratamentos a que os pacientes estavam sendo submetidos no momento da coleta estão sumariados na Tabela 6.

Os pacientes com AR foram divididos em dois grupos, um com a doença inativa e outro com a doença ativa. Estes grupos foram definidos de acordo com o índice de atividade da doença (*DAS*), de forma a melhor caracterizar associações de um determinado marcador genético com o quadro clínico do paciente:

Grupo Inativo: pacientes com DAS  $\leq$  3.2 (doença em remissão ou com baixa atividade)

Grupo Ativo: pacientes com DAS > 3.2 (doença com atividade moderada ou alta).

Mais de dois terços dos indivíduos do grupo controle (C) e dos pacientes com AR eram do sexo feminino (67.15% e 74.63%, respectivamente), com idade média entre 39.5 e 52.45 anos, respectivamente.

Observou-se que pacientes fumantes correspondem a 46% da nossa amostra de AR, sendo que mais da metade apresentara um elevado índice de atividade da doença (52%).

**Tabela 6.** Dados demográficos e clínicos da população estudada

	<b>Controle</b>		Ar	trite Reumatóide		
		AR (Total)		Atividade da	Doença	
			Remissão (DAS≤2.3)	<i>Baixa</i> (2.3 <das<3.2)< th=""><th>Moderada (3.2<das>5.1)</das></th><th>Elevada (DAS&gt; 5.1)</th></das<3.2)<>	Moderada (3.2 <das>5.1)</das>	Elevada (DAS> 5.1)
TOTAL (n)	(n=137)	(n=138)	(n=25)	(n=12)	(N=36)	(n=65)
Sexo (Feminino) %(n)	67.15 (92)	74.63 (103)	100 (25)	83.3 (10)	80.5 (29)	60 (39)
Idade (Anos - M)	39.54	52.45	53.67 (41-70)	55.17 (48-65)	54.13 (34-79)	53.06 (29-70)
Fumantes %(n)	NA	46.37 (64)	*16% (14)	*10% (8)	*23% (16)	*52% (33)
DAS (M (DP))	NA	4.61 (1.885)	1,841 (0,4538)	2,712 (0,3352)	4,129 (0,6416)	6,244(0,877)
Idade de Início da Doença (Anos - M)	NA	46.1	44.89	42.83	42.29	47.28
Fator Reumatóide Presente % (n)	NA	68.11 (94)		NA		
Fator Reumatóide (M + DP)	NA	419.2 <u>+</u> 729.9		NA		
Anti-CCP Presente % (n)	NA	65.2 (90)		NA		
Anti-CCP $(M + DP)$	NA	<i>180.6</i> <u>+</u> 115.6		NA		

NA=Não se aplica; \* Percentual do total de pacientes fumantes com o determinado DAS.

M = Média; DP=Desvio Padrão

## 4.2 Resultados de Associação dos SNPs no AhR com o desenvolvimento da Artrite Reumatóide

#### 4.2.1 Análise de associação alélica e genotípica

Após a genotipagem dos sete SNPs no *AhR* foi realizada uma análise da distribuição de freqüências alélicas nos grupos amostrais controle e pacientes com AR, bem como uma estimativa de associação destes polimorfismos genéticos com o desenvolvimento da AR. Os resultados se encontram na tabela 7. Apenas a mutação missense *rs35966236* (alelo C) não foi detectada na população estudada, tendo um índice de 100% de homozigose para o alelo T (ancestral ou selvagem). Todos os outros 6 SNPs foram detectados nos grupos estudados com freqüências que vão de 4.07% (*rs4986826*) ate 54.55% (*rs2237298*) no grupo controle. Porém, na distribuição das freqüências alélicas de todos os seis SNPs, não foram encontradas diferenças significativas entre pacientes com AR e indivíduos do grupo controle. Não foram encontradas diferenças também na distribuição dos SNPs entre os gêneros.

Todos os sete SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e os valores de probabilidade de HW (HWp) se encontram também na tabela 7. O valor de HWp revela se um SNP está em desequilíbrio de Hardy-Weinberg quando o valor de HWp é <0,05.

Na distribuição genotípica dos SNPs *rs2237298*, *rs2237297*, *rs2066853*, *rs4986826*, *rs7796976* e *rs17779352* também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre pacientes com AR e indivíduos do grupo controle. (tabela 8).

**Tabela 7.** Frequência alélica dos polimorfismos do gene AhR em pacientes com AR e no grupo controle

	•	ca dos polimorfismo				
SNP	Alelos	Controle	<b>A.R.</b>	χ²-global	p-global	HWp
		n= 258	n=276			
rs2237298	A	0.4545	0.481	0.2854	0.5931	0.802
	$G^*$	0.5455	0.519			
rs2237297	C	0.8452	0.8225	0.6674	0.4825	0.161
	Т*	0.1548	0.1775			
	-					
rs35966236	T	1	1	-	-	1
	<b>C</b> *	0	0			
	C	V	O			
rs2066853	G	0.7427	0.7317	0.0701	0.7911	0.056
	A &	0.2572	0.2692			
	<b>A</b> *	0.2573	0.2683			
rs4986826	G	0.9593	0.9674	0.1983	0.6560	1
	<b>A*</b>	0.0407	0.03261			
7706076	G	0.8137	0.768	1.4184	0.2336	0.367
rs7796976	G	0.8137	0.768	1.4164	0.2330	0.307
	$\mathbf{A}^*$	0.1863	0.232			
rs17779352	T	0.9128	0.9489	2.5034	0.1135	1
	C*	0.0871	0.0510			

<sup>\*=</sup> alelo mutante;  $\chi^2$ = valor do teste qui-quadrado; **n**= numero de alelos; **p-global**= valor de significância com grau de liberdade igual a 1 (probabilidade de observar uma associação alélica com  $\chi^2$  de mesma magnitude se a hipótese nula for verdadeira); **HW p-=** valor de p para equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 8.** Distribuição da frequência genotípica dos SNPs do AhR em pacientes com AR e no

grupo controle.

SNP	Genótipo	Controle n=129	<b>A.R.</b> n=138	χ²-global	p-global
	$AA^1$	0.2121	0.2381		
rs2237298	$AG^2$	0.4848	0.4857	0.279643	0.869
	$GG^3$	0.303	0.2762		
	$CC^1$	0.7619	0.6739		
rs2237297	$CT^2$	0.1667	0.2971	2.58	0.1082
	$TT^3$	0.0714	0.0289		
	$GG^1$	0.6019	0.5447		
rs2066853	$GA^2$	0.2816	0.374	2.49	0.2878
	$AA^3$	0.1165	0.0813		
	$GG^1$	0.9186	0.9348		
rs4986826	$GA^2$	0.0814	0.0652	0.2061	0.6498
	$AA^3$	0	0		
	$GG^1$	0.6667	0.608		
rs7796976	$GA^2$	0.2941	0.32	1.517	0.4683
	$AA^3$	0.03922	0.072		
	$TT^1$	0.6019	0.5447		
rs17779352	$TC^2$	0.2816	0.374	2.490	0.2878
	$CC^3$	0.1165	0.0813		

<sup>1=</sup> homozigoto selvagem; 2= heterozigoto; 3= homozigoto mutante;  $\chi^2$ = valor do teste qui-quadrado; **p-global** = valor de significância com grau de liberdade igual a 2 (probabilidade de observar uma associação genotípica com  $\chi^2$  de mesma magnitude se a hipótese nula for verdadeira);

Para um polimorfismo genético qualquer a probabilidade de estar ligado a outros polimorfismos, segregando e sendo herdados em conjunto é proporcional a taxa de recombinação nas regiões entre os polimorfismos, que geralmente na escala populacional é considerada aleatória. Isto significa que há um equilíbrio nas observações de ligações entre polimorfismos genéticos. Porém, em muitos casos, devido à proximidade física entre dois alelos ou outros mecanismos evolutivos, observa-se uma alta frequência de alelos ligados, segregando juntos e formando blocos de herança. Nestes casos os polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação (D). Este fator pode explicar porque um polimorfismo isoladamente não está associado com uma doença ou seu fenótipo predito não está sendo observado, visto que outras variantes genéticas podem estar ligadas a este e sendo responsáveis por compor o fenótipo final. O desequilíbrio de ligação pode ser calculado e tem um valor D que corresponde a diferença entre a freqüência de observação de SNPs (AB) ligados pelo produto das frequências dos alelos individuais (AxB) D= AB - A.B [D= 1, total desequilíbrio de ligação (alelos ligados); e D=0, total equilíbrio de ligação (alelos não ligados)]. Estudos de genética de populações utilizam dois valores para identificar se dois alelos estão ligados, o valor corrigido de D, o D' (lê-se D prime), e o logaritmo do odds de D (LOD). Neste estudo considerou-se que SNPs estavam em forte desequilíbrio de ligação para valores de D'=1 e LOD>3 (razão de 1000:1). Blocos formados por SNPs com valor de D' igual a 1 não foram consideradas em desequilíbrio de ligação quando continham LOD < 3.

Posteriormente então, foi avaliada a presença de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos no *AhR*. Segundo estes critérios foi identificado apenas 1 bloco com

forte desequilíbrio de ligação na amostra da população total saudável (grupo controle) (Tabela 9). O desequilíbrio de ligação foi observado entre a mutação missense rs2066853 e o tagSNP rs7796976, os quais formam o bloco 1 com 72 kilobases (Kb) (Figura 5A). Nos pacientes com AR foram identificados três interações de SNPs em desequilíbrio de ligação formando 3 blocos (Tabela 9). O bloco 1 (rs2066853 e rs7796976) foi identificado também no grupo de pacientes com AR, porém os blocos 2 e 3 estão presentes exclusivamente neste grupo, o que sugere haver uma distribuição de ligação genética distinta dos SNPs do AhR entre os pacientes com AR e a população saudável.

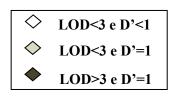
O mapa de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do *AhR* foi gerado com auxílio do programa Haploview 4.0 e pode ser observado na Figura 5, onde os principais blocos gerados em cada grupo estão destacados. Este mapa permite visualizar a estrutura de distribuição e diferenças de ligação SNP-SNP entre os grupos controle e AR (Figura 5A e 5B, respectivamente)

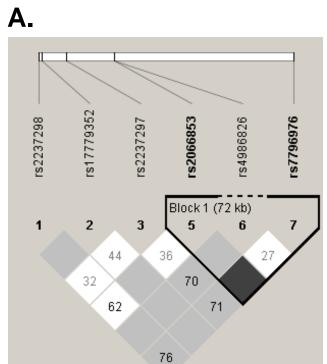
Tabela 9. Valores de desequilíbrio de ligação entre os SNPs para o grupo controle e pacientes com AR

Controle				Artrite Reumatóide										
L1	L2	D'	LOD	$r^2$	LI	LS	dL	D'	LOD	$r^2$	LI	LS	dL	Bloco ID
rs2066853	rs4986826	1.0	2.61	0.118	0.45	1.0	-	0.76	1.28	0.053	0.21	0.93	_	-
rs2237298	rs4986826	1.0	2.16	0.054	0.39	1.0	-	1.0	0.48	0.037	0.07	0.98	-	-
rs2237298	rs17779352	1.0	2.64	0.087	0.47	1.0	-	1.0	1.74	0.047	0.31	1.0	-	-
rs2237297	rs7796976	0.71	0.81	0.025	0.13	0.92	-	1.0	2.62	0.065	0.47	1.0	-	-
rs2066853	rs7796976	1.0	3.67	0.087	0.6	1.0	X	1.0	4.54	0.108	0.66	1.0	X	1
rs2237297	rs2066853	0.36	1.68	0.071	0.14	0.57	-	1.0	21.65	0.578	0.9	1.0	X	2
rs2237298	rs2237297	0.32	0.66	0.026	0.06	0.59	-	1.0	7.92	0.231	0.79	1.0	X	3

L1 e L2= loci em desequilibrio de ligação; D'= Valor de D' engre os dois loci; LOD= log da odds ratio que mede a confiança no valor de D'; r²= coeficiente de correlação entre os dois loci; L1=limite inferior do CI; LS= Limite Superior do CI; Dist= Distancia em pares de base entre os dois loci.; dL= SNPs que estão em Desequilíbrio de Ligação (X - sim).

Não seria o caso de pesquisar o D`de rs2066853e rs2237298?





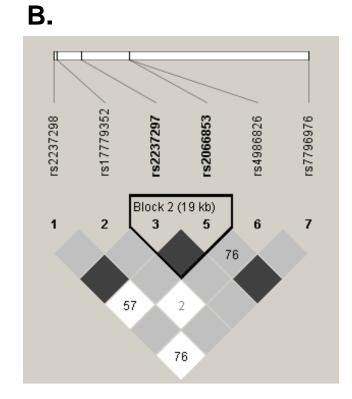


Figura 5. Mapa do Desequilíbrio de Ligação entre os SNPs do *AhR* no grupo controle (A) e em pacientes com AR (B). Os SNPs estão representados esquematicamente de acordo com a posição que ocupam no gene e a distância entre cada um. Os valores de desequilíbrio de ligação (D x 100) estão dentro dos losangos. SNPs com D igual a 1 (100) aparecem em losangos vazios. *Branco – não há* D; *cinza claro –* baixa probabilidade de estarem em D; *cinza escuro* - alta probabilidade de D.

Os haplótipos dos blocos 1 e 3 não apresentaram diferenças significativas na distribuição de freqüências entre os grupos controle e pacientes com AR. Porém, observou-se que três haplótipos do bloco 2 estão associados com o desenvolvimento da AR (*p-global*<0.001) (Tabela 10 e 11). O bloco 2, com 19 kilobases apresentou forte desequilíbrio de ligação com D' igual a 1, LOD de 21.65 e uma correlação de ligação de 0.578 com estreito intervalo de confiança (CI 95%, 0,9-1) em pacientes com AR. Este bloco é formado pelo *rs2237297* (tagSNP) e pelo SNP *rs2066853*, que é uma mutação missense. A freqüência do haplótipo T-A formado pela combinação de alelos mutantes dos dois SNPs deste bloco em pacientes com AR é alta quando comparada ao grupo controle, 17.39% e 7.5%, respectivamente. Em vista disto, avaliou-se a possível associação entre os haplótipos do bloco 2 com o desenvolvimento da AR.

Identificou-se que o haplótipo C-A está mais freqüente no grupo controle (17.4%) que em pacientes com AR (9.4%) (p=0.032), porém este resultado não se manteve significante após o ajuste do valor de p (valor de p acima do valor de pajustado para 0.00297 e do décimo percentil de 0.0185) (Tabela 11). O haplótipo T-A, formado pela combinação do alelo mutante T do rs2237297 com o alelo selvagem G do rs2066853, não foi identificado em pacientes com AR, somente no grupo controle (7.14%, p=0.000239 e p-ajustado=0.002997). Visto que não havia n amostral em pacientes com AR para cálculo do odds ratio (OR) do haplótipo T-G, este foi calculado adicionando 0.5 para cada valor com auxílio do programa GraphPad Prisma 5.0 utilizando o teste de Fisher. Já o haplótipo T-A formado pela combinação de alelos mutantes dos dois SNPs está mais presente em pacientes com AR do que no grupo controle (p=0.00884 e p-ajustado= 0.0185 (10<sup>th</sup> percentil)), com OR de 2.08, sendo um fator de risco para a AR.

Tabela 10. Análise de associação dos haplótipos do bloco 2 com o desenvolvimento da AR

<b>Haplótipo</b> rs2237297 - rs2066853	<i>Controle</i> ( <b>224</b> ) Freq. (n)	AR (276) Freq. (n)	$X^2$ -global (df)	p-global
C-G	0.6741 (151)	0.7282 (201)		
T-G	0.714 (16)	0 (0)	30.5974 (df=3)	<i>p</i> < 0.0001
C-A	0.1741 (39)	0.0942 (26)		
T-A	0.0803/(18)	0.1775 (49)		

T= alelo mutante do rs2237297; G= alelo mutante do rs2066853; **p-global**= analise de valor global de probabilidade;χ²-**global**= qui-quadrado analise global; **df**= grau de liberdade; **Freq.**= Freqüência; **n** = número de haplótipos totais no bloco 2.

**Tabela 11.** Análise de regressão logística dos haplótipos do bloco 2 com o desenvolvimento da AR para identificação dos haplótipos associados

<b>Haplótipo</b> rs2237297 - rs2066853	OR (CI 95%)	$\chi^2$	p-valor	$p^c$	
C-G	1	0.5965	0.4399	-	
T-G	0.02278 (0.001355-0.3830)	-	0.000239	0.002997	
C-A	0.4907 (0.2741-0.8785)	4.578	0.03238	N	
T-A	2.08 (1.116-3.877)	6.855	0.00884	0.0185*	

T= alelo mutante do rs2237297; G= alelo mutante do rs2066853; OR= odds ratio, razao de chance estimada para este genótipo; (CI 95%)= intervalo de confiança para a OR;  $\chi^2$ = qui-quadrado score; **p-valor**= valor de p; **p**<sup>c</sup>= valor de p ajustado por 1000 permutações. \* 10<sup>th</sup> percentil do melhor valor de p ajustado 0.002997. *N*= valor de p acima do melhor valor de p-ajustado e do 10<sup>th</sup> percentil deste (0.0185).

#### 4.2.3 Analise de associação haplotípica

Os resultados anteriores demonstram que haplótipos formados pela combinação de SNPs do *AhR* podem estar associados com a artrite reumatóide. Porém a identificação de haplotipos de risco requer uma análise completa da combinação entre os SNPs e o risco associado à presença destes. Um segundo passo foi a avaliação de outros haplótipos formados pela combinação de mais de dois SNPs no gene do *AhR*. Na tabela 13 estão descritos apenas os haplótipos que possuem freqüências estatisticamente diferentes entre o grupo controle e os pacientes com AR.

Cada haplótipo foi identificado com uma letra a fim de facilitar a discussão sendo: *AhR 1*= A-**T-A**-G-G-T; *AhR 2*= A-C-**A**-G-G-T; e o *AhR 3*= **G-T**-G-G-T. Os valores de *p*, odds ratio (OR) e risco relativo (RR) foram calculados utilizando teste de Fisher para os haplótipo *AhR 1*, *AhR 2* e *AhR 3* em relação ao somatório dos haplótipos que não possuíam diferenças estatísticas significantes, sendo o tamanho amostral destes haplótipos de 196 para o grupo controle e 221 para os pacientes com AR.

Os três haplotipos identificados com diferença estatística entre pacientes com AR e o grupo controle apresentam como combinações alélicas-chave aquelas presentes no bloco 2 (T-A para *AhR 1*; e C-A para *AhR 2*) e uma combinação entre os alelos mutantes do rs2237298 e do rs2237297 (G-T para *AhR 3*) presente no bloco 3.

A freqüência do haplótipo *AhR 1* foi maior em pacientes com AR do que no grupo controle, 17.15% e 8.62%, respectivamente (p=0.0174). O *AhR 1* foi identificado como haplótipo de risco para o desenvolvimento da AR com risco relativo de 1.522 (IC 95%, 1.051-2.203). Porém este haplótipo não permaneceu significativamente associado após o ajuste do valor de p (0.091). Já os haplótipos *AhR 2* e *AhR 3* têm freqüências menores em pacientes com AR quando comparadas as freqüências no grupo controle

(tabela 12). Os cálculos de risco relativo revelaram que estes haplótipos conferem uma proteção para o desenvolvimento da AR, tendo RR de 0.6432 para o *AhR* 2 e RR de 0.517 para o *AhR* 3. As associações dos haplótipos AhR 2 e AhR 3 com a AR permaneceram significantes após o ajuste do valor de p (tabela 12).

**Tabela 12.** Frequências haplotípicas dos SNPs no AhR no grupo controle e em pacientes com AR

Haplótipos	SNPs*						<b>Controle</b> n=(196)	<b>RA</b> n=(221)	p	<b>OR**</b> (IC 95%)	<b>RR**</b> (IC 95%)	<b>p</b> <sup>c</sup>
	1	2	3	4	5	6	freq ( <b>n</b> )	freq (n)				
AhR 1	A	T	A	G	G	T	0.0846 (21)	0.1702 (47)	0,0174	1.985 (1.146-3.438)	1.522 (1.051-2.203)	0.0993
AhR 2	A	C	A	G	G	T	0.077 (19)	0.025 (7)	0,0139	0.3267 (0.1345-0.7940)	0,6432 (0.4986-0.8297)	0.032
AhR 3	G	Т	G	G	G	T	0.040 (10)	0.003 (1)	0,0040	0,08869 (0.0112-0.6994)	0,5170 (0.4179-0.6397)	0.021

<sup>\*</sup>SNPs: (1) rs2237298; (2) rs2237297; (3) rs2066853; (4) rs4986826; (5) rs7796976; (6) rs17779352;

<sup>\*\*</sup> valores calculados em relação ao somatório dos haplótipos sem diferenças estatísticas significantes.

+ Em negrito os alelos mutantes de cada lócus; χ²= qui-quadrado score; **n**= somatório de todos os haplótipos em cada grupo; **p**= valor de p obtido utilizando teste de fisher; **OR**= odds ratio; **RR**= Risco Relativo; **p**<sup>c</sup>= valor de p ajustado por 1000 permutações

### 4.3 Associação dos SNPs do AhR com o Índice de Atividade da Artrite Reumatóide

#### 4.3.1 Analise de associação alélica e genotípica com o DAS

Para as análises de associação dos SNPs do *AhR* e a atividade da doença dividiram-se os pacientes com AR em dois grupos: pacientes com DAS menor ou igual a 3.2 (doença inativa ou com atividade baixa) e pacientes com DAS maior que 3.2 (atividade moderada e atividade alta). O valor de DAS é calculado levando em consideração o numero de articulações inflamadas, o numero de articulações dolorosas, a velocidade de hemossedimentação (VHS) e a dor relatada pelo paciente utilizando uma escala visual analógica de dor.

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas (tabela 13) e genotípicas (Tabela 14) dos SNPs no *AhR* nos dois grupos de pacientes.

**Tabela 13.** Frequência alélica dos polimorfismos do gene *AhR* de acordo com a atividade da doença.

SNP	Alelos	$DAS \leq 3.2$	DAS > 3.2	χ²-global	p-global
rs2237298	$\mathbf{G}$	0.522	0.418	0.161	0.6882
rs2237297	T	0.203	0.162	0.379	0.5381
rs2066853	A	0.220	0.259	0.219	0.6397
rs4986826	A	0.031	0.015	0.406	0.5239
rs7796976	A	0.250	0.300	0.348	0.5553
rs17779352	C	0.048	0.059	0.069	0.7923

 $\mbox{negrito}=$  alelo mutante;  $\mbox{p-valor}=$  valor de p (probabilidade de observar uma associação semelhante com  $\chi^2$  de mesma magnitude se a hipótese nula for verdadeira);  $\chi^2=$  qui-quadrado score;  $\mbox{HW p-=}=$  valor de p para equilibrio de Hardy-Weinberg.

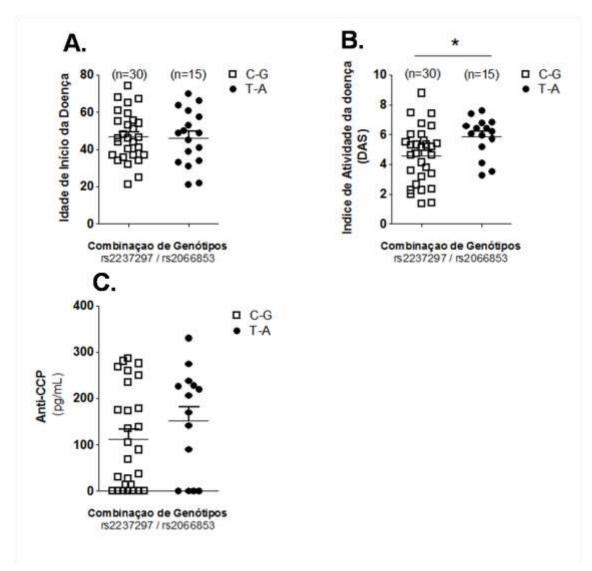
**Tabela 14.** Distribuição da freqüência genotípica dos SNPs do *AhR* de acordo com a atividade da doenca

SNP	Genótipo	$DAS \leq 3.2$	DAS > 3.2	χ²-global	p-global
	$AA^1$	0.2609	0.2222		
rs2237298	$AG^2$	0.4348	0.5926	0.965896	0.3257
	$GG^3$	0.3043	0.1852		
	$CC^1$	0.625	0.7059		
rs2237297	$CT^2$	0.343	0.2647	0.0018	0.9652
	$TT^3$	0.031	0.02941		
	$GG^1$	0.6	0.5517		
rs2066853	$GA^2$	0.36	0.3793	0.2198	0.6391
	$AA^3$	0.04	0.0689		
	$GG^1$	0.9375	0.9706		
rs4986826	$GA^2$	0.0625	0.0294	0.416	1
	$AA^3$	0	0		
	$GG^1$	0.5385	0.5		
rs7796976	$GA^2$	0.4231	0.4	0.8374	0.3601
	$AA^3$	0.0384	0.1		
	$\mathrm{TT}^1$	0.9032	0.8824		
rs17779352	$TC^2$	0.0967	0.1176	0.06	1
	$CC^3$	0	0		

<sup>1=</sup> homozigoto selvagem; 2= heterozigoto; 3= homozigoto mutante; χ2= valor do teste qui-quadrado; **p-global** = valor de significância com grau de liberdade igual a 1 (probabilidade de observar uma associação genotípica com χ² de mesma magnitude se a hipótese nula for verdadeira);

Também não foi possível realizar uma análise de associação da gravidade da doença com os haplótipos *AhR1*, *AhR2* e *AhR3*, visto que a divisão da amostra em subgrupos de estudo somada à fragmentação da análise destes em diversos haplótipos também presentes tornava o número amostral insuficiente para gerar resultados significativos.

Decidiu-se então avaliar se havia alguma diferença nos valores quantitativos do índice de atividade da doença entre os pacientes portadores ou não dos haplótipos presentes no bloco 2. Identificou-se que pacientes com AR heterozigotos para o haplótipo mutante T-A possuem uma média do índice de atividade da doença maior do que pacientes homozigotos selvagens portadores do haplótipo C-G (DAS =  $5.865 \pm 0.3387$  vs DAS =  $4.583 \pm 0.3447$ , p=0,0232, F=2.071) (Figura 6 B). Foram analisadas outras características clínicas quantitativas como a idade de início da doença e valores séricos do anti-CCP, porém não foram detectadas diferenças para o mesmo haplótipo (Figura 6A e 6C).

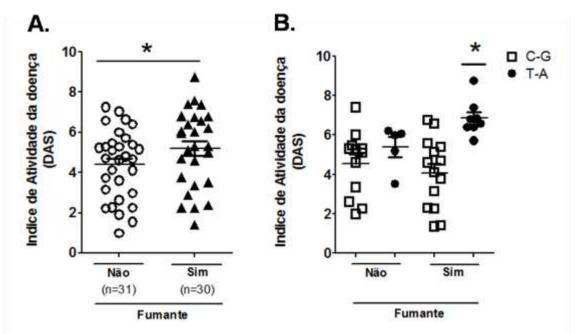


**Figura 6.** Analise de associação do haplótipo T-A (rs2237297-rs2066853) com dados clínicos dos pacientes. *A.* Relação haplotipo T-A com o DAS. *B.* Relação haplotipo T-A com a idade de inicio da doença. *C.* Relação haplotipo T-A com valores séricos de anti-CCP.

## 4.4 Influência do Tabagismo na relação do haplótipo T-A do bloco 2 com o a Atividade da Artrite Reumatóide (DAS28)

Considerando que o hábito de fumar é um fator de risco para o desenvolvimento da AR e que muitos dos compostos presentes na fumaça do cigarro são ligantes do AhR, avaliou-se a influência do tabagismo e do haplótipo T-G do bloco 2 na atividade da AR, medida pelo DAS28. Como pode ser observado na Figura 7A, pacientes fumantes do nosso grupo amostral apresentam um índice de atividade da doença maior do que os não fumantes (DAS= $5.204 \pm 0.370$ , para fumantes, e DAS= $4.405 \pm 0.3061$ , para não fumantes; p=0.0495).

A análise da relação do haplótipo T-A com a atividade da doença entre os grupos de pacientes fumantes e não fumantes revelou que o grupo de fumantes portadores do haplotipo T-A tem um índice de atividade da doença maior que pacientes fumantes ou não fumantes portadores do haplotipo selvagem C-G. Porém, pacientes com o haplótipo T-A não fumantes não apresentavam DAS aumentado ao grupo C-G. (Figura 7B e tabela 15). Isto sugere que existe uma interação entre o haplótipo T-A e o fator 'fumante' na composição da gravidade da artrite reumatóide.



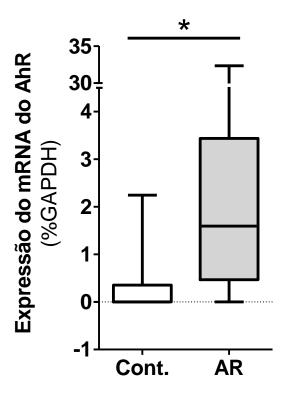
**Figura 7.** Análise de associação do haplótipo T-A (rs2237297-rs2066853) com DAS e hábito de fumar. **A.** Comparação da media de atividade da doença entre pacientes fumantes e não-fumantes (*t-student*). **B.** Comparação da média de atividade da doença entre pacientes portadores ou não do haplotipo T-A fumantes (*ANOVA* com correção de bonferroni). p<0.002 apenas para T-A fumante comparado a C-G fumante e C-G não fumante.

Tabela 15. Média e Desvio Padrão dos grupos referentes à figura 7B.

	Não-Fu	umante	Fun	p	
	C-G	T-A	C-G	T-A	
<b>DAS</b> (Média + Desvio Padrão)	4,076 <u>+</u> 1,778	5,392 <u>+</u> 1,653	4,553 <u>+</u> 1,119	6,853 <u>+</u> 0,9037	0,002

# 4.5 Expressão de mRNA do AhR está aumentada em células mononucleares dos pacientes com Artrite Reumatóide

Para avaliar se a expressão de AhR estava aumentada em pacientes com AR isolaram-se células mononucleares da circulação sanguínea de 25 pacientes e foi realizada a quantificação relativa da expressão do mRNA que codifica o AhR em relação a pacientes controles (n=10). Como pode ser observado na figura 8, a expressão do AhR está aumentada em pacientes com artrite reumatóide ( $4.332 \pm 1.572$  vs  $0.3664 \pm 0.2518$  N=10, p=0.0197) ( $teste\ t$  com correção de Welch para amostras não pareadas).



**Figura 8.** Expressão do mRNA do AhR está aumentada em pacientes com artrite reumatóide (AR) em relação a indivíduos saudáveis (Cont). Porcentagem relativa ao gene utilizado como controle endógeno GAPDH (Média+Erro Padrão Médio; teste t com correção de Welch, p < 0.05)

### 5. DISCUSSÃO

A artrite reumatóide é uma doença complexa onde a predisposição resulta da interação entre características genéticas do indivíduo e a exposição a fatores ambientais. Apesar do hábito ativo de fumar cigarro ser o fator de risco ambiental melhor descrito associado ao desenvolvimento da AR ainda não está determinado o mecanismo pelo qual os compostos presentes na fumaça do cigarro podem ativar a auto-reatividade do sistema imunológico de um individuo (SAAG KG et al, 1997; MASDOTTIR B et al, 2000; PAPADOPOULOS NG et al, 2005; NYHALL-WAHLIN BM et al, 2006). Entre os principais compostos presentes na fumaça do cigarro estão os óxidos de nitrogênio, o monóxido de carbono, o hidrogênio cianida e os hidrocarbonetos aromáticos (KASAI A et al, 2006). Estes últimos são compostos tóxicos com capacidade mutagênica e inflamatória, cujo principal receptor intracelular é o receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR). Este receptor está significativamente presente e ativo em linfócitos Th17, que são células pró-inflamatórias com relação estabelecida em diversas doenças autoimunes, incluindo a AR (VELDOHEN et al, 2008). No presente estudo obteve-se pela primeira vez evidências genéticas de que o AhR está associado com o desenvolvimento da AR, colocando-o na linha de frente do reconhecimento de fatores ambientais e risco de desenvolver AR.

O AhR é um fator de transcrição ativado por ligantes relacionados com indução do metabolismo de xenobióticos. Este receptor funciona como um sensor intracelular de contaminantes ambientais como os hidrocarbonetos aromáticos halogenados (incluindo as dioxinas) e hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (PAH, incluindo o 3-metilcloranteno) induzindo a expressão de enzimas que metabolizam estes compostos (CYP1A1, CYP1A2, GSTs). Estes ligantes são formados geralmente através de pirólise de material orgânico, especialmente combustão incompleta em ambientes com concentrações baixas de oxigênio (O<sub>2</sub>), ou estão presentes em pesticidas e outros

contaminantes ambientais. As dioxinas são hidrocarbonetos aromáticos de arila classificados como poluentes orgânicos persistentes e que estão presentes também na fumaça do cigarro, gerados após a pirólise de compostos bifenil policlorados (PAKDEL e ROY, 1991; MASTRAL & CALLEAN 2000; BAEK et al. 1991; RICHTER and HOWARD, 2000; LEDESMA et al. 2002). Estudos toxicológicos relataram que a interação do AhR com seus ligantes está envolvida com uma variedade de efeitos biológicos tecido-específicos, como defeitos em recém nascidos, imunotoxicidade, neurotoxicidade, letalidade, promoção de tumores e indução enzimática (SHIMIZU Y et al, 2000, GASSMANN K et al, 2010).

O principal representante das dioxinas, e o composto mais potente do ponto de vista toxicológico, é o 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD), conhecido contaminante do agente laranja (herbicida utilizada na guerra do Vietnam) (WESTING A, 1984; STONE R, 2007). Em 1949 foi realizada a primeira descrição de exposição coletiva a compostos químicos contaminados com TCDD que ocorreu após a explosão de um reator de triclorofenol em Nitro, West Virginia, EUA. Porém, o caso mais famoso aconteceu em 1976 em Seveso na Itália (o acidente de Seveso), quando um acidente industrial contaminou a área residencial da cidade com altas concentrações de TCDD afetando mais de 45 mil pessoas. Diversos estudos demonstraram que estes indivíduos apresentavam freqüências aumentadas de infertilidade, neoplasias, distúrbios cardiovasculares e imunológicos (HOMBERGER E, 1979; POCCHIARI et al, 1979; BACCARELLI A et al, 2002). Todos estes efeitos tóxicos do TCDD foram demonstrados serem mediados via AhR (SEWALL CH et al, 1995; GONZALEZ FJ et al, 1998).

Interessantemente, diversas doenças autoimunes inclusive a artrite reumatóide tem sido relacionadas à exposição a poluentes presentes na fumaça do cigarro, a

pesticidas ou a exposição a solventes tóxicos sofrida por trabalhadores industriais (PARKS CK et al, 2006, COLOSIO C et al, 1999). Um recente estudo de meta-análise de exposição a solventes e risco de desenvolver esclerose múltipla descreveu uma razão de risco de 2.6% (95% CI, 2.0-3.3) (NIETER PJ et al, 2000). Ainda, indivíduos que trabalham com pintura manual, utilizando tintas que formam aerossóis (sprays) ou com verniz têm risco duas vezes aumentado de desenvolver artrite reumatóide. Alguns trabalhos demonstram um pequeno aumento no risco de desenvolvimento da AR em trabalhadores rurais e de horticulturas (OR 1.3-1.9) (OLSSON AR et al, 2004). Com relação à fumaça do cigarro, um estudo de coorte que acompanhou indivíduos Finlandeses por cinco anos demonstrou que homens fumantes têm risco relativo de desenvolver AR positiva para o fator reumatóide de 3.8 (95% CI, 2-6.9) em comparação com homens que nunca fumaram (HELIOVAARA M et al, 1993). Em conjunto, diversos estudos epidemiológicos demonstram que o risco conferido pelo fumo é maior em homens (OR entre 1.9-4.4, em seis estudos caso controle) comparado a mulheres (OR 0.6-2.5), sendo fortes preditores de risco para AR a intensidade e o tempo de uso do cigarro, permanecendo o risco elevado mesmo vinte anos após o individuo parar de fumar. (STOLT P et al, 2003) Além disto, indivíduos com AR que fumam são menos propensos a responder às terapias com metrotexato e inibidores de TNF (SAEVARSDOTTIR S et al, 2011). Porém o mecanismo pelo qual estes compostos podem estar ativando o sistema imunológico e induzindo as doenças autoimunes ainda não está totalmente descrito.

Veldohen (2008) lançou uma luz sobre esta incógnita quando demonstrou que células especializadas relacionadas com o desenvolvimento da AR, os linfócitos Th17, expressam o AhR em grandes quantidades e quase seletivamente dentro da linhagem de linfócitos T 'helper'. Interessantemente, foi determinado que a ativação do AhR estaria

relacionada com o aumento da diferenciação deste subtipo linfocitário e do processo inflamatório na encefalomielite auto imune experimental. Logo, pela primeira vez identificou-se um possível mecanismo de amplificação da resposta autoimune através de um receptor de poluentes hidrocarbonetos aromáticos.

Diversos autores relataram associações entre polimorfismos no gene que codifica o AhR e o desenvolvimento de neoplasias. Kim JH *et al* (2007) demonstraram que polimorfismos genéticos no *AhR* exercem um papel importante no desenvolvimento do câncer de pulmão, tendo como fator de risco a presença do haplótipo GGG formado por dois alelos selvagens do rs7796976 (G) e do rs2074113 (G), mais o alelo mutante do rs2066853 (A) (OR=1.4,95% CI,1.08-1.76). Chen *et al* (2010) demonstram que o genótipo homozigoto AA do polimorfismo rs2066853 aumentou o risco de desenvolver câncer de pulmão em indivíduos que fumam mais de 30 pacotes de cigarro por ano (OR 3.36, CI 95%, 1.07-10.55). Porém, até o presente momento, não há nenhum estudo que tenha realizado associação de polimorfismos genéticos no *AhR* com o risco de desenvolver uma doença autoimune. Este trabalho é a primeira demonstração do envolvimento do AhR com o desenvolvimento da artrite reumatóide.

No presente estudo, a distribuição alélica dentro da população controle seguiu padrões interessantes. A freqüência do rs2066853 (A) na população controle brasileira (25.73%) foi menor que as observadas em japoneses e africanos (43 e 53%, respectivamente) (KAWAJIRI *et al*, 1995; WONG *et al*, 2001) e maior que em franceses (8.6%) (CAUCHI, 2001). Já as freqüências do alelo mutante do rs17779352 foram semelhantes àquelas detectadas em uma população controle canadense utilizada em um estudo de associação com linfoma não-Hodgkin (8.7 e 8.1%) (NG CH *et al*, 2010). Entretanto, não foram observadas diferenças nas freqüências alélicas e genotípicas dos SNPs no *AhR* entre pacientes com AR e indivíduos saudáveis.

Segundo os dados do Projeto Internacional HapMap, o SNP rs2066853 está em desequilíbrio de ligação com os SNPs intrônicos rs2237298 e rs2237297, o que significa que estes polimorfismos podem estar segregando em bloco. Desta forma, o efeito individual de um polimorfismo poderia mascarar o efeito de outro, sendo o fenótipo final uma composição do fenótipo gerado individualmente por cada SNP. Na nossa população controle, não foi observado desequilíbrio de ligação entre os SNPs rs2066853, rs2237298 e rs2237297, como a identificada no HapMap, mas apenas entre o rs2066853 e o rs7796976 (bloco 1), cujo haplótipo acima citado foi identificado em associação com câncer de pulmão (KIM JH *et al*, 2007).

Em pacientes com AR, quatro SNPs foram identificados em diferentes desequilíbrios de ligação formando 3 blocos. O bloco 1 também foi identificado em pacientes com AR, porém não houve diferença quando as freqüências foram comparadas ao grupo controle. Os haplótipos do bloco 2, formados pelos alelos nos loci do rs2237297 e do rs2066853 tiveram os resultados mais promissores de associação com AR. Um haplótipo deste bloco confere proteção aos seus portadores, enquanto um haplotipo é fator de risco para a AR. O haplótipo de risco é formado pela combinação entre os dois alelos mutantes (T-A), enquanto o haplótipo protetor é formado pela presença de apenas um alelo mutante do rs2237297 com o alelo selvagem do rs2066853 (T-G), demonstrando que o fenótipo final é formado pela combinação do efeito dos SNPs e não pelo efeito individual. Não existem estudos sobre a influência do polimorfismo rs2237297 na atividade ou expressão do AhR, porém sabe-se que SNPs intrônicos podem ter um impacto sobre a proteína codificada se eles alterarem a regulação da expressão ou o *splicing* de um gene, alterando o potencial risco associado à proteína para o desenvolvimento da doença.

Em seguida, analisou-se o papel dos haplótipos no AhR formados pela combinação de todos os seis SNPs. Foi identificado que os haplótipos *AhR 2 e AhR 3* são haplótipo protetores para a AR. Já o alelo mutante A do rs2066853, quando aparece juntamente com o alelo mutante T do rs2237297 formando o haplótipo *AhR 1* é um fator de risco para o desenvolvimento da AR, semelhante ao haplótipo T-A do bloco 2. Entretanto, este resultado não permaneceu significante após o ajuste do valor de p após 1000 permutações. Apesar disto, nossa hipótese é de que o haplótipo T-A é um fator de risco para AR porque a mutação missense rs2066853 pode aumentar a atividade do AhR e assim potencializar a resposta Th17-dependente na AR. Alguns autores têm relatado que o alelo mutante A do rs2066853 pode conferir uma maior vulnerabilidade para a exposição ambiental à carcinógenos por aumentar a atividade do AhR (CHEN Y *et al*, 2006). Não há nenhum relato na literatura sobre a influência do rs2237297 na atividade do AhR, nem do haplótipo T-G do bloco 2, identificado nas nossas análises como protetor.

Tão importante quanto identificar genes de risco para a AR, é identificar genes envolvidos com o prognóstico e outros dados clínicos do paciente. Brenol *et al* (2009), demonstraram que o polimorfismo T-786C, no gene que codifica a oxido nítrico sintase endotelial (eNOS) está associado com o desenvolvimento de manifestações extra-articulares na AR. Correlações positivas também são identificadas entre os polimorfismos do HLA-DRB1 e a atividade inflamatória em pacientes com AR inicial (SEIDL C *et al*, 1997). Nós identificamos que pacientes com o haplótipo T-A do bloco 2 têm uma média de DAS28 maior que pacientes com o haplótipo selvagem C-G (Figura 6). Este resultado pode indicar que o AhR estaria associado não apenas com o desenvolvimento da AR, mas também com a gravidade desta. Considerando este achado, somado ao fato de que há uma correlação positiva entre o número de células

Th17 em pacientes com AR e a atividade da doença, nós sugerimos que este haplótipo pode gerar um ganho de função (atividade) para o AhR e um aumento no número de células Th17 amplificadoras da resposta autoimune.

Estudos prévios têm demonstrado que existe uma interação entre o fumo, a presença de genótipos do HLA-DRB1 e a gravidade da artrite reumatóide, sendo que pacientes fumantes tem um pior prognóstico na AR anti-CCP positiva (KALLBERG H et al, 2007; KLARESKOG L et al, 2006). Nós observamos o mesmo em nossas amostras, visto que pacientes com AR fumantes apresentam DAS maior que os não fumantes. Não somente isto, mas pacientes portadores do haplótipo T-A do bloco 2 têm DAS significantemente maior que pacientes com o haplótipo C-G (fumantes ou não fumantes). Isto não foi observado para pacientes não fumantes com haplótipo T-A, indicando haver uma interação entre este haplótipo e o tabagismo na formação do fenótipo de atividade aumentada da artrite reumatóide.

Por fim, detectou-se que pacientes com AR apresentam uma expressão aumentada do AhR (mRNA) quando comparados a indivíduos saudáveis, mostrando que este receptor tem um papel importante na AR. Kobayashi (2008) também demonstrou que o AhR estava presente em pacientes com AR, identificando o aumento da expressão deste receptor na sinóvia de pacientes com AR, bem como aumento da produção de IL-8 e IL-6 por sinoviócitos secundária a ativação do AhR. Entretanto, nós identificamos a presença deste receptor em células isoladas da circulação sanguínea (mononucleares), o que demonstra o possível papel deste receptor na geração da resposta autoimune de forma sistêmica e não apenas localizada na articulação.

Em conjunto estes resultados demonstraram pela primeira vez um papel do AhR no desenvolvimento da artrite reumatóide e a interação deste receptor com o fator ambiental fumo. Não está claro ainda como os polimorfismos e haplótipos descritos

podem realmente influenciar a atividade do AhR. Para isto tornam-se necessários estudos de caracterização funcional e da atividade dos polimorfismos e haplótipos encontrados bem como a influência destes na diferenciação de células Th17 e Treg.

Com base nos resultados apresentados pode-se sugerir que o receptor de hidrocarbonetos de arila, um sensor endógeno de poluentes, está associado com o desenvolvimento da artrite reumatóide e que polimorfismos genéticos que alteram a atividade deste receptor podem conferir diferentes riscos para esta doença. Ainda, sugere-se que o AhR pode estar associado com o aumento da AR induzido pela exposição a fatores ambientais como o cigarro, sendo um importante alvo para estudos de interação do genótipo e do ambiente com a AR. Adicionalmente estes resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos de geração e amplificação da resposta autoimune dependente de células Th17 e influência do ambiente. Caso os resultados do presente estudo venham a ser confirmados ao longo dos anos e seja descrito que a ativação do receptor de hidrocarbonetos de arila pode potencializar a AR aumentando o número de Th17 circulantes, seria plausível sugerir que o uso de antagonistas do AhR possam ser utilizados na terapêutica desta doença. Ainda mais, cria-se a necessidade da geração de mapas de interação entre a exposição a fatores ambientais como a fumaça do cigarro e polimorfismos genéticos quando se forem realizar estudos para estabelecer o prognóstico de pacientes com AR.

### 6. CONCLUSÃO

Genes envolvidos na regulação de ativação de linfócitos T autorreativos têm sido os principais candidatos para estudos de associação genética na Artrite Reumatóide. Porém poucos destes estudos envolvem uma proposta de interação ambiente-genótiposistema imunológico. O receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR) é um alvo interessante de estudo visto que está relacionado com o desenvolvimento de células Th17 e pode ser ativado por hidrocarbonetos aromáticos poluentes. Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que o AhR está associado com o desenvolvimento da artrite reumatóide. Apesar de não terem sido identificadas associações alélicas e genotípicas dos SNPs individuais do AhR com a AR, dois haplótipos formados pelos SNPs rs2237297 e rs2066853 estiveram associados com alterações no risco de desenvolver AR, sendo o haplótipo T-G protetor e o haplótipo T-A de risco. Ainda, o haplótipo de risco T-A esteve também associado com elevados índices clínicos de atividade da doença, principalmente em pacientes fumantes quando comparado a indivíduos com AR portadores do haplótipo selvagem C-G. Por fim, detectou-se que pacientes com AR apresentam aumentos nos níveis de expressão de mRNA do AhR quando comparados a indivíduos saudáveis.

#### 7. REFERÊNCIAS

ACKERMANN MF, GASIEWICZ TA, LAMM KR, GERMOLEC DR, LUSTER MI. Selective inhibition of polymorphonuclear neutrophil activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Toxicol Appl Pharmacol**. 101:470–480. 1989

ACR Clinical Guidelines Committee Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 39:713-722. 1996

ALONZI T, FATTORI E, LAZZARO D et al. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. **J. Exp. Med**. 187: 461–468. 1998

ARNER EC, HARRIS RR, DIMEO TM, COLLINS RC, GALBRAITH W. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits proteoglycan breakdown in antigen induced but not polycation induced arthritis in the rabbit. **J Rheumatol**. 22:1338-46. 1995

ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 31:315-324. 1988

AXMANN R, BÖHM C, KRÖNKE G, ZWERINA J, SMOLEN J, SCHETT G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. **Arthritis Rheum.** 60:2747-56. 2009

BACCARELLI A, PAOLO MOCARELLI, DONALD G PATTERSON, JR, MATTEO BONZINI, ANGELA C PESATORI, NEIL CAPORASO, AND MARIA TERESA LANDI. Immunologic effects of dioxin: new results from Seveso and comparison with other studies. **Environmental Health Perspectives**. 12:110, 2002.

BAEK, S.O., FIELD, R.A., GOLDSTONE, M.E., KIRK, P.W., LESTER, J.N., PERRY, R. 1991. Review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. **Water, Air and Soil Pollution**. 60:279-300. 1991

BALANDINA A, LECART S, DARTEVELLE P, et al. Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. **Blood**. 105:735-41. 2005

BARRETT JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. 15:263-5. 2005

BEGOVICH AB, CARLTON VE, HONIGBERG LA, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet**. 75:330–337. 2004

BOISSIER MC, ASSIER E, BITON J, DENYS A, FALGARONE G, BESSIS N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: The changing rheumatoid arthritis paradigm. **Joint Bone Spine**. 76:10-4. 2009

BOKI KA, PANAYI GS, VAUGHAN RW, DROSOS AA, MOUTSOPOULOS HM, LANCHBURY JS. HLA class II sequence polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Greeks. The HLA-DR beta shared-epitope hypothesis accounts for the disease in only a minority of Greek patients. **Arthritis Rheum**. 35:749-55. 1992.

BRASINGTON JR RD. Clinical features of rheumatoid arthritis. In: Hochberg MC. Rheumatology. Fourth Edition. Philadelphia: Elsevier. 763-771. 2008.

BRENNAN, F. M., CHANTRY, D., JACKSON, A., MAINI, R., AND FELDMANN, M. Inhibitory effect of TNF antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. **Lancet**. 2: 244–247. 1989

BRENOL CV, CHIES JA, BRENOL JC, MONTICIELO OA, FRANCISCATTO P, BIRRIEL F, NEVES AG, XAVIER RM. Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. Clin Rheumatol. 28:201-5. 2009

BRESNIHAN B, ALVARO-GARCIA JM, COBBY M, DOMLJAN Z, EMERY P, NUKI G, PAVELKA K, RAU R, ROZMAN B, WATT I, WILLIAMS B, AITCHINSON R, MCCABE D, MUSIKIC P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin receptor antagonist. **Arthritis Rheum**. 41:2196-2204, 1998.

BRIDGES JR SL, DAVIDSON A. Rheumatoid Factor. In: KOOPMAN WJ. **Arthritis** and allied conditions: a textbook of rheumatology. Fifteenth Edition. Philadelphia. Lippincott, Williams & Wilkins, 2005. 1227-1247.

CAMACHO IA, NAGARKATTI M, NAGARKATTI PS. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces Fas-dependent activation-induced cell death in superantigen-primed T cells. **Arch Toxicol**. 76:570-80. 2002.

CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 72: 3666–70. 1975.

CHABAUD M, DURAND JM, BUCHS N, FOSSIEZ F, PAGE G, FRAPPART L, MIOSSEC P. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. **Arthritis Rheum**. 42:963-970. 1999.

CHANG, C.-Y., SMITH, D. R., PRASAD, V. S., SIDMAN, C. L., NEBERT, D. W., AND PUGA, A. Ten nucleotide differences, five of which cause amino acid changes, are associated with the Ah receptor locus polymorphism of C57BL/6 and DBA/2 mice.

Pharmacogenetics 3:312–321. 1993

CHEN Y, BAI Y, YUAN J, CHEN W, SUN J, WANG H, LIANG H, GUO L, YANG X, TAN H, SU Y, WEI Q, WU T. Association of polymorphisms in AhR, CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 genes with levels of DNA damage in peripheral blood

lymphocytes among coke-oven workers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 15:1703-7. 2006.

CHENA D, TIAN TIAN, HAIFENG WANG, HONGLIANG LIU, *et al.* Association of human aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms with risk of lung cancer among cigarette smokers in a Chinese population. **Pharmacogenetics and Genomics**. 19:25–34. 2009.

CHOY EH, PANAYI GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**. 344:907. 2001.

CHU CQ, FIELD M, ALLARD S, ABNEY E, FELDMANN M, MAINI RN. Detection Of Cytokines At The Cartilage/Pannus Junction In Patients With Rheumatoid Arthritis:Implications For The Role Of Cytokines In Cartilage Destruction And Repair.

British Journal of Rheumatology. 31:653-661. 1992.

COHEN S, HURD E, CUSH J, SCHIFF M, WEINBLATT ME, MORELAND L, KREMER J, BEAR MB, RICH WJ, MCCABE D. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: Results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum**. 46:614-624, 2002.

COLOSIO C, CORSINI E, BARCELLINI W, MARONI M. Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives.

Toxicol Lett. 108:285–295. 1999

COSTA AFC, BRASIL MAA, PAPI JA *et al.* Depressão, ansiedade e atividade de doença na artrite reumatóide. **Rev Bras Reumatol**. 48:7-11. 2008.

CRISPIN JC, MARTINEZ A, ALCOCER-VARELA J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **J Autoimmun**. 21:273-6. 2003

DAVIES, DV. Anatomy and Physiology of Diarthrodial Joints. **Ann Rheum Dis.** 5: 29–35. 1945.

de KLEER IM, WEDDERBURN LR, TAAMS LS, et al. CD4+CD25+ bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. **J Immunol**.172:6435. 2004.

del JUNCO D, LUTHRA HS, ANNEGERS JF, et al. The familial aggregation of rheumatoid arthritis and its relationship to the HLA-DR4 association. **Am J Epidemiol**.119:813–829. 1984.

deMARCO D, KUNKEL SL, STRIETER RM, BASHA M, ZURIER RB. Interleukin-1 induced gene expression of neutrophil activating protein (interleukin-8) and monocyte chemotactic peptide in human synovial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications L**. 174:411-416. 1991.

DENISON MS, NAGY SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. 43:309–334. 2003.

DESSEIN PH, JOFFE BI, VELLER MG *et al.* Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**. 32:435-442. 2005.

DINARELLO CA. The role of the interleukin-1 receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. **N Engl J Med**. 343:732-734. 2000.

DOOLEY RK, HOLSAPPLE MP. Elucidation of cellular targets responsible for tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced suppression of antibody responses. I: The role of the B lympho- cyte. **Immunopharmacology**. 16:167-180. 1988.

DUDBRIDGE F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. **Hum Hered**. 66:87-98. 2008.

ELLIS H, SUSAN S, GRAY, HD. **Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice**. St. Louis, Mo: Elsevier Churchill Livingstone. p38. 2005.

FELDMANN M, BRENNAN FM, MAINI RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu Rev Immunol**. 14:397-440. 1996.

FELDMANN M, BRENNAN FM, MAINI RN. Rheumatoid arthritis. Cell. 85:307–310. 1996.

FONG KY, BOEY ML, KOH WH, FENG PH. Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: correlation with bony erosions. **Clin Exp Rheumatol**. 12:55-58. 1994.

FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A. & RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunol**. 4, 330–336. 2003.

FORSLIND K, AHLMÉN M, EBERHARDT K et al. Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). **Ann Rheum Dis**. 63:1090-1095. 2004.

FOSSIEZ, F., DJOSSOU, O., CHOMARAT, P., FLORES-ROMO, L., AIT-YAHIA, S., MAAT, C., PIN, J.J., GARRONE, P., GARCIA, E., SAELAND, S. BLANCHARD D, GAILLARD C, DAS MAHAPATRA B, ROUVIER E, GOLSTEIN P, BANCHEREAU J, LEBECQUE S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J. Exp. Med.** 183:2593–2603. 1996.

FUNATAKE CJ, AO K, SUZUKI T, MURAI H, YAMAMOTO M, FUJII-KURIYAMA Y, KERKVLIET NI, NOHARA K. Expression of constitutively-active aryl hydrocarbon receptor in T-cells enhances the down-regulation of CD62L, but does

not alter expression of CD25 or suppress the allogeneic CTL response. **J Immunotoxicol**. 6:194-203. 2009.

FUNATAKE CJ, DEARSTYNE EA, STEPPAN LB, SHEPHERD DM, SPANJAARD ES, MARSHAK-ROTHSTEIN A, KERKVLIET NI. Early consequences of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on the activation and survival of antigen-specific T cells. **Toxicol Sci.** 82:129-42. 2004.

FUNATAKE, C. J., MARSHALL, N. B., STEPPAN, L. B., MOURICH, D. V. & KERKVLIET, N. I. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+ CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. **J. Immunol**. 175:4184–4188. 2005.

FURUNO K, YUGE T, KUSUHARA K, et al. CD25+CD4+ regulatory T cells in patients with Kawasaki disease. **J Pediatr**. 145:385-90. 2004

GASSMANN K, ABEL J, BOTHE H, THOMAS HAARMANN-STEMMANN, HANS F. MERK, KIM N. QUASTHOFF, THOMAS DINO ROCKEL, TIMM SCHREIBER, ELLEN FRITSCHE. Species-Specific Differential AhR Expression Protects Human Neural Progenitor Cells against Developmental Neurotoxicity of PAHs. **Environ Health Perspect**. 118:1571-1577. 2010.

GAUR U, AGGARWAL BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochem. Pharmacol.** 66: 1403–8. 2003.

GEBOES L, DUMOUTIER L, KELCHTERMANS H, SCHURGERS E, MITERA T, RENAULD JC, MATTHYS P. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. **Arthritis Rheum**. 60:390-395. 2009.

GOLDRING SR AND GRAVALLESE EM. Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis: diagnosis and therapeutic implications. **Arthritis Res**. 2:33-37. 2000.

GOLDRING SR. Bone and Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis: What Is Really Happening? **J Rheumatol**. 65:44-48. 2002.

GONZALEZ FJ, FERNANDEZ-SALGUERO P. The aryl hydrocarbon receptor studies using the ahr-null mice. drug metabolism and disposition. **Drug Metab Dispos**. 26:1194-8. 1998.

GORDON DA, STEIN JL, BRODER I. The extra-articular features of rheumatoid arthritis: a systematic analysis of 127 cases. **Am J Med**. 54:445-452. 1973.

GRIFFITHS AJF, WESSLER SR, LEWONTIN RC, GELBART WM, SUZUKI DT. Introdução a Genética. Editora Guanabara Koogan. 8ª edição.

HAUBEN E, GREGORI S, DRAGHICI E, MIGLIAVACCA B, OLIVIERI S, WOISETSCHLÄGER M, RONCAROLO MG. Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. **Blood**. 112:1214-22. 2008.

HELIÖVAARA M, AHO K, AROMAA A, KNEKT P, REUNANEN A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**. 20:1830-5. 1993.

HEMMINKI K, LI X, SUNDQUIST J, SUNDQUIST K. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. **Arthritis Rheum**. 60:661–668. 2009.

HOCHBERG MC, CHANG RW, DWOSH I, LINDSEY S, PINCUS T, WOLFE F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 35:498-502. 1992.

HOMBERGER, E., REGGIANI, G., SAMBETH, J., WIPF, H. K. The Seveso Accident: Its Nature, Extent and Consequences. **Ann. Occup. Hyg** (Pergamon Press) 22: 327–370. 1979.

HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**. 299:1057–1061. 2003.

IAJ. Introductory Anatomy: Joints. http://www.leeds.ac.uk/chb/lectures/anatomy4.html. Retrieved 2010-01-12.

INFANTE-DUARTE C, HORTON HF, BYRNE MC, KAMRADT T: Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. **J Immunol**. 165:6107-6115. 2000

ITO H, YAMADA H, SHIBATA TN, MITOMI H, NOMOTO S, OZAKI S. Dual role of interleukin-17 in pannus growth and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**. 13:14. 2011.

JACKSON CJ, ARKELL J, NGUYEN M. Rheumatoid synovial endothelial cells secrete decreased levels of tissue inhibitor of MMP (TIMP1). **Ann Rheum Dis.** 57:158-61. 1998.

JONES MA, SILMAN AJ, WHITING S, *et al.* Occurrence of rheumatoid arthritis is not increased in the first degree relatives of a population based inception cohort of inflammatory polyarthritis. **Ann Rheum Dis**. 55:89–93. 1996.

JOOSTEN LA, HELSEN MM, VAN DE LOO FA, VAN DEN BERG WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1alpha/beta and IL-1Ra. **Arthritis Rheum**. 58:110-22. 2008.

KALLBERG H, PADYUKOV L, PLENGE RM, RONNELID J, GREGERSEN PK, VAN DER HELM-VAN MIL AH, TOES RE, HUIZINGA TW, KLARESKOG L, ALFREDSSON L. Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis study group. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet**. 80:867–875. 2007.

KARLSON EW, LEE IM, COOK NR, MANSON JE, BURING JE, HENNEKENS CH. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. **Arthritis Rheum**. 42:910–17. 1999.

KASAI, A., HIRAMATSU, N., HAYAKAWA, K., YAO, J., MAEDA, S., KITAMURA, M. High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by in vitro and in vivo biosensing. **Cancer Res**. 66:7143-50. 2006.

KASTBOM A, STRANDBERG G, LINDROOS A *et al.* Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). **Ann Rheum Dis.** 63:1085-1089. 2004.

KAWAJIRI K, WATANABE J, EGUCHI H, NAKACHI K, KIYOHARA C, HAYASHI S. Polymorphisms of human Ah receptor gene are not involved in lung cancer. **Pharmacogenetics**. 5:151–158. 1995.

KEBIR, H., KREYMBORG, K., IFERGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A., CAYROL, R., BERNARD, M., GIULIANI, F., ARBOUR, N., BECHER, B., AND PRAT, A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nat. Med.** 13:1173–1175. 2007.

KEYSTONE EC, KAVANAUGH AF, SHARP JT, *et al.* Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant

methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. **Arthritis Rheum**. 50:1400. 2004.

KIM JH, KIMH, LEE KY, KANG JW, LEE KH, PARK SY, et al. Aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms affect lung cancer risk. **Lung Cancer**. 56:9–15. 2007.

KIM JM, J-G JEONG, S-H HO, W HAHN, E-J PARK, S KIM, S S YU, Y-W LEE AND S KIM. Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist. **Gene Therapy**. 10, 1543–1550. 2003.

KIMURA A, NAKA T, NOHARA K, FUJII-KURIYAMA Y, KISHIMOTO T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. **Proc Natl Acad Sci U.S.A**. 105:9721-6. 2008.

KLARESKOG L, STOLT P, LUNDBERG K, *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis Rheum**. 54: 38–46. 2006.

KLOCKARS M, KOSKELA RS, JARVINEN E, KOLARI PJ, ROSSI A. Silica exposure and rheumatoid arthritis: a follow up study of granite workers 1940–81. **BMJ** 294:997–1000. 1987.

KOBAYASHI S, MOMOHARA S, KAMATANI N, OKAMOTO H. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. **FEBS J**. 275:4456-62. 2008.

KOBAYASHI S, OKAMOTO H, IWAMOTO T, TOYAMA Y, TOMATSU T, YAMANAKA H, MOMOHARA S. A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis.. **Rheumatology (Oxford)**. 47:1317-22. 2008.

KOHLE C., BOCK K.W. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. **Biochemical Pharmacology**. 73:1853–1862. 2007.

KOTAKE S, UDAGAWA N, TAKAHASHI N, MATSUZAKI K, ITOH K, ISHIYAMA S, SAITO S, INOUE K, KAMATANI N, GILLESPIE MT, et al.: IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **J Clin Invest**. 103:1345-1352. 1999.

KURREEMAN FA, PADYUKOV L, MARQUES RB, *et al.* A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. **PLoS Med**. 4:278. 2007

LANGRISH CL, CHEN Y, BLUMENSCHEIN WM, MATTSON J, BASHAM B, SEDWICK JD, MCCLANAHAN T, KASTELEIN RA, CUA DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J Exp Med**. 201:233–40. 2005

LAURINDO IMM. Artrite reumatóide. In: VOLTARELLI JC. Imunologia clínica na prática médica. São Paulo. Editora Atheneu, 623-636. 2009.

LEDESMA E.B., MARSH N.D., SANDROWITZ A.K., WORNAT M.J. Global Kinetic Rate Parameters for the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from the Pyrolysis of Catechol, A model Compound Representative of Solid Fuel Moieties. **Energy and Fuels**. 1331-1336. 2002.

LEE AT, LI W, LIEW A, *et al.* The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. **Genes Immun.** 6: 129–33. 2005.

LEGRAVEREND C, HANNAH RR, EISEN HJ, OWENS IS, NEBERT DW, HANKINSON O. Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of receptor mutants among mouse hepatoma clones. **J. Biol. Chem**. 257:6402–6407. 1982.

LIPSKY PE, VAN DER HEIJDE DM, ST CLAIR EW *et al.* Anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study group. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. **N Engl J Med.** 343:1594-1602. 2000

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method. Methods**. 25(4):402-8. 2001

LOUZADA-JR P, CICCONELLI R, SOUZA BDB *et al.* Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no Estado de São Paulo. **Rev Bras Reumatol**. 47:84-90. 2007.

LUBBERTS E, KOENDERS MI, OPPERS-WALGREEN B, VAN DEN BERSSELAAR L, COENEN-DE ROO CJJ, JOOSTEN LAB, van den BERG WB: Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 anti-body after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. **Arthritis Rheum**, 50:650-659. 2004.

LUBBERTS E, KOENDERS MI, van den BERG WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. **Arthritis Res**. 7:29-37. 2005.

MACGREGOR AJ, SNIEDER H, RIGBY AS *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis Rheum**. 43:30–7. 2000.

MACHOLD KP, STAMM TA, EBERL GJ *et al.* Very recent onset arthritis—clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease. **J Rheumatol**. 29:2278–2287. 2002.

MARQUES NETO JF. GONCALVES ET. BARROS EFO *et al.* Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. **Rev. Brás Reumatol**. 33:169-173. 1993.

MASDOTTIR B, JONSSON T, MANFREDSDOTTIR V, *et al.* Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. 39:1202-5. 2000.

MASSON-BESSIERE C, SEBBAG M, GIRBAL-NEUHAUSER E *et al.* The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. **J Immunol**. 166:4177-4184. 2001.

MASTRAL A., CALLEAN M. A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Emissions from Energy Generation. **Environmental Science & Technology**. 34: 3051, 2000.

MATSUYAMA M, SUZUKI T, TSUBOI H, *et al*. Anti-interleukin-6 receptor antibody (tocilizumab) treatment of multicentric Castleman's disease. **Intern. Med**. 46: 771–4. 2007.

MCKAY, S., S. J. HIRST, M. BETRAND-DE HAAS, J. C. DE JONGSTE, H. C. HOOSTEDEN, P. R. SAXENA, AND H. S. SHARMA. Tumor necrosis factor-alpha enhances mRNA expression and secretion of interleukin-6 in cultured human airway smooth muscle cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**. 23: 103-111. 2000.

MENTZEL K, BRÄUER R. Matrix metalloproteinases, IL-6, and nitric oxide in rat antigen-induced arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. 16:269-76. 1998.

MORGAN ME, FLIERMAN R, van DUIVENVOORDE LM, et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. **Arthritis Rheum**. 52:2212-21. 2005.

MORGAN ME, SUTMULLER RP, WITTEVEEN HJ, et al. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**. 48:1452-60. 2003.

MUELLER L, VON SEGGERN L, SCHUMACHER J, GOUMAS F, WILMS C, BRAUN F, BROERING DC. TNF-alpha similarly induces IL-6 and MCP-1 in fibroblasts from colorectal liver metastases and normal liver fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun**. 397:586-91. 2010.

MUSACCHIO E, VALVASON C, BOTSIOS C, OSTUNI F, FURLAN A, RAMONDA R, MODESTI V, SARTORI L, PUNZI L. The tumor necrosis factoralpha-blocking agent infliximab inhibits interleukin 1beta (IL-1beta) and IL-6 gene expression in human osteoblastic cells. **J Rheumatol**. 36:1575–1579. 2009.

NAKAE S, SAIJO S, HORAI R, SUDO K, MORI S, IWAKURA Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. **Proc Natl Acad Sci USA**. 100:5986–90. 2003

NEBERT, D. W. The Ah locus: Genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects. **Crit. Rev. Toxicol**. 20, 153–157. 1989.

NEUBERT R, MASKOW L, WEBB J, JACOB MULLER U, NOGUEIRA AC, DELGADO I, HELGE H, NEUBERT D. Chlorinated dibenzo-p-diox-ins and dibenzofurans and the human immune system. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens. **Life Sci.** 53:1995-2006. 1993.

NG CH, JANOO-GILANI R, SIPAHIMALANI P, GALLAGHER RP, GASCOYNE RD, CONNORS JM, WEBER JP, LAI AS, LEACH S, LE ND, BROOKS-WILSON AR, SPINELLI JJ. Interaction between organochlorines and the AHR gene, and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Causes Control**. 21:11-22. 2010

NIETER PJ, SILVER RM. systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. **Curr Opin Rheumatol**. 12:520-6. 2000.

NOHARA K, PAN X, TSUKUMO S, et al. Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. **J Immunol**. 174:2770-2777. 2005.

NYHALL-WAHLIN BM, JACOBSSON LT, PETERSSON IF, *et al.* Smoking is a strong risk factor for rheumatoid nodules in early rheumatoid arthritis. **Ann Rheum. Dis.** 65:601-6. 2006.

OKEY AB. An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI. **Toxicol Sci.** 98:5-38. 2007.

OKUDA Y, SAKODA S, BERNARD CC, FUJIMURA H, SAEKI Y, KISHIMOTO T, YANAGIHARA T. IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. **Int Immunol**. 10:703-8. 1998.

OLDFIELD V. DHILLON S. PLOSKER GL. Tocilizumab: A Review of its Use in the Management of Rheumatoid Arthritis. **Drugs**. 69:609-632. 2009.

OLSSON AR, SKOGH T, AXELSON O, WINGREN G. Occupations and exposures in the work environment as determinants for rheumatoid arthritis. **Occup Environ Med**. 61: 233–38. 2004.

OLSSON AR, T SKOGH, O AXELSON, G WINGREN. Occupations and exposures in the work environment as Determinants for rheumatoid arthritis. **Occup Environ Med**. 61:233–238. 2004.

OUYANG, W., KOLLS, J.K., AND ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 effector cytokines in inflammation. **Immunity**. 28, 454–467. 2008

PADYUKOV L, SILVA C, STOLT P, ALFREDSSON L, KLARESKOG L. A geneenvironment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 50:3085–92. 2004.

PAKDEL H., ROY C. Hydrocarbon Content of Liquid Products of Tar from Pyrolysis and Gasification. **Energy & Fuels**. 1991, 427-436. 1991.

PAPADOPOULOS NG, ALAMANOS Y, VOULGARI PV, et al. Does cigarette smoking influence disease expression, activity and severity in early rheumatoid arthritis patients. **Clin Exp Rheumatol**. 23:861-6. 2005.

PARKS CG, E GS COOPER. Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus:a review of the evidence and exposure assessment methods in population- and clinic-based studies 2. **Lupus**. 15:728–736. 2006.

PLENGE RM, SEIELSTAD M, PADYUKOV L, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis: a genomewide study. **N Engl J Med**. 357:1199–209. 2007.

POCCHIARI F, SILANO V, ZAMPIERI A. Human health effects from accidental release of tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) at Seveso, Italy. **Ann N Y Acad Sci**. 320:311–320. 1979.

POHJANVIRTA, R., WONG, J. M. Y., LI, W., HARPER, P. A., TUOMISTO, J., AND OKEY, A. B. Point mutation in intron sequence causes altered carboxyl-terminal structure in the aryl hydrocarbon receptor of the most 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinresistant rat strain. **Mol. Pharmacol.** 54:86–93. 1998.

POLAND, A., PALEN, D., AND GLOVER, E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. **Mol. Pharmacol**. 46: 915–921. 1994.

PREVOO ML, VAN'T HOF MA, KUPER HH *et al.* Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 38:44-48. 1995.

PUGA A, XIA Y, ELFERINK C. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. **Chemico-Biological Interactions**. 141:117–130. 2002.

QUINTANA FJ, BASSO AS, IGLESIAS AH, *et al.* Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**. 453:65-71. 2008.

RANNUG A, FRITSCHE E. The aryl hydrocarbon receptor and light. **Biol. Chem**. 387:1149–1157. 2006.

RAYCHAUDHURI S. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol. 22:109–118. 2010.

REMMERS EF, PLENGE RM, LEE AT, *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med.** 357: 977–86. 2007.

REVELL PA. Synovial lining cells. **Rheumatology International.** 9:49-51, 1989.

RICHTER H., HOWARD J.B. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot-a review of chemical reaction pathways. **Progress in Energy and Combustion Science**. 26:565-608. 2000.

RIISE T, JACOBSEN BK, GRAN JT *et al.* Total mortality is increased in rheumatoid arthritis. A 17-year prospective study. **Clin Rheumatol**. 20:123-127. 2001.

ROSE NR, BONA C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). **Immunol. Today**. 14:426–30. 1993.

SAAG KG, CERHAN JR, KOLLURI S, *et al.* Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. **Ann Rheum Dis**. 56:463-9. 1997.

SAEVARSDOTTIR S, WEDRÉN S, SEDDIGHZADEH M, BENGTSSON C, WESLEY A, LINDBLAD S, ASKLING J, ALFREDSSON L, KLARESKOG L. Patients with early rheumatoid arthritis who smoke are less likely to respond to treatment with methotrexate and tumor necrosis factor inhibitors: observations from the Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis and the Swedish Rheumatology Register cohorts. **Arthritis Rheum**. 63:26-36. 2011.

SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, ASANO M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**. 155:1151-64.1995.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol**. 6:345–352. 2005.

SATO K, SUEMATSU A, OKAMOTO K, YAMAGUCHI A, MORISHITA Y, KADONO Y, TANAKA S, KODAMA T, AKIRA S, IWAKURA Y, CUA DJ, TAKAYANAGI H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **J Exp Med**. 203:2673–82. 2006.

SAXNE, T., PALLADINO, M. A., JR., HEINEGARD, D., TALAL, N., AND WOLLHEIM, F. A. Detection of tumor necrosis factor but not tumor necrosis factor in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. **Arthritis Rheum**. 31:1041–1045. 1988.

SEIDL C, KOCH U, BUHLEIER T, *et al*: HLA-DRB1\*04 subtypes are associated with increased inflammatory activity in early rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**. 36:941-944. 1997.

SEWALL CH, LUCIER GW. Receptor-mediated events and the evaluation of the Environmental Protection Agency (EPA) of dioxin risks. **Mutat Res**. 333:111–122. 1995.

SHEPHERD DM, STEPPAN LB, HEDSTROM OR, KERKVLIET NI. Anti-CD40 Treatment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-exposed C57Bl/6 mice induces activation of antigen presenting cells yet fails to overcome TCDD-induced suppression of allograft immunity. **Toxicol Appl Pharmacol**. 70:10-22. 2001.

Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii Kuriyama Y, Ishikawa T. Benzo [a] pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. **Proc.Natl.Acad.Sci. USA.** 97:779. 2000.

SILMAN A.J., PEARSON J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res**. 4:265-272. 2002.

SILMAN AJ, OLLIER W, HOLLIGAN S, BIRRELL F, ADEBAJO A, ASUZU MC, THOMSON W, PEPPER L. Absence of rheumatoid arthritis in a rural Nigerian population. **J Rheumatol**. 20:618-622. 1993.

SINGH NP, NAGARKATTI M, NAGARKATTI P. Primary peripheral T cells become susceptible to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated apoptosis in vitro upon activation and in the presence of dendritic cells. **Mol Pharmacol**. 73:1722-35. 2008.

SINHA AA, LOPEZ MT, MCDEVITT HO. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. **Science**. 15.248(4961):1380-8. 1990.

STOLT P, BENGTSSON C, NORDMARK B, LINDBLAD S, LUNDBERG I, KLARESKOG L, ALFREDSSON L. and the other members of the EIRA study group. Quantification of the influence of cigarette smoking on Rheumatoid arthritis: results from a population based. **Ann Rheum Dis**. 62:835–841. 2003

STONE, R. Epidemiology: Agent Orange's bitter harvest. Science. 315:176–179. 2007.

SVENDSEN AJ, HOLM NV, KYVIK K, *et al.* Relative importance of genetic effects in rheumatoid arthritis: historical cohort study of Danish nation wide twin population. **BMJ**. 324:264–266. 2002.

SVERDRUP B, KALLBERG H, BENGTSSON C, *et al.* Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study. **Arthritis Res Ther.** 7:1296–303. 2005.

SYMMONS DP, BANKHEAD CR, HARRISON BJ, *et al.* Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. **Arthritis Rheum**. 40:1955–61. 1997.

SYMMONS DPM. BARRET EM. BANKHEAD CR. SCOTT DGI. SILMAN AJ. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk arthritis register. **Br J Rheumatol**. 33: 735-739. 1994.

TAN, P.L.J., FARMILOE, S., YEOMAN, S., AND WATSON, J.D. Expression of the interleukin 6 gene in rheumatoid synovial fibroblasts. **J. Rheumatol**. 17:1608-1612. 1990.

TARNER IH, HÄRLE P, MÜLLER-LADNER U *et al.* The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. **Best Prac Res Clin Rheumat.** 19:19–35. 2005.

TONN T, ESSER C, SCHNEIDER EM, STEINMANN STEINER HALDENSTATT W, GLEICHMANN E. Persistence of decreased T- helper cell function in industrial workers 20 years after expo- sure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Environ Health Perspect**. 104:422-426. 1996.

TUOMISTO, J. T., VILUKSELA, M., POHJANVIRTA, R., AND TUOMISTO, J. The AH receptor and a novel gene determine acute toxic responses to TCDD: Segregation of the resistant alleles to different rat lines. **Toxicol. Appl. Pharmacol**. 15, 71–81. 1999

TURESSON C, JACOBSSON L, BERGSTROM U. Ocurrence of extra-articular disease manifestations is associated with excess mortality in a population-based cohort of patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**. 29:62-67. 2002.

TURESSON C, O'FALLON WM, CROWSON CS *et al.* Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. **Ann Rheum Dis.** 62:722-727. 2003.

TZARTOS, J.S., FRIESE, M.A., CRANER, M.J., PALACE, J., NEWCOMBE, J., ESIRI,M.M., AND FUGGER, L. Interleukin-17 production in central nervous system-in?ltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am. J. Pathol**. 172, 146–155. 2008.

van den BERG WB. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. **Arthritis Res**. 3:18-26. 2001.

van den BERGHE, W., K. de BOSSCHER, E. BOONE, S. PLAISNACE, AND G. HAEGEMAN. The nuclear factor-kappa B engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the IL-6 gene promoter. **J. Biol. Chem.** 274:32091-32098. 1999.

van der WOUDE D, HOUWING-DUISTERMAAT JJ, TOES RE, *et al.* Quantitative heritability of anticitrullinated protein antibody-positive and anticitrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 60:916–923. 2009.

van LENT PL, van de LOO FA, HOLTHUYSEN AE, et al. Major role for interleukin-1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice. **J Rheumatol**. 22:2250-2258. 1995.

VANG, T., CONGIA, M., MACIS, M.D., MUSUMECI, L., ORRÚ, V., ZAVATTARI, P., NIKA, K., TAUTZ, L., TASKÉN, K., CUCCA, F., MUSTELIN, T., BOTTINI, N. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant.

Nat. Genet. 37:1317-9, 2005.

VECCHI A, MANTOVANI A, SIRONI M, LUINI W, SPREAFICO F, GARATTINI S.

The effect of acute administration of 2,3,7,8-tetra- chlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on

humoral antibody production and cell-mediated activities in mice. **Arch Toxicol Suppl** 4:163-165. 1980.

VELDHOEN M, HIROTA K, WESTENDORF AM, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature**. 453:106-109. 2008.

VESSEY MP, VILLARD-MACKINTOSH L, YEATES D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. **Contraception**. 35:457–64. 1987.

VIGNALI DA, COLLISON LW, WORKMAN CJ. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol**. 8:523-32. 2008.

VOSSENAAR ER, DESPRES N, LAPOINTE E *et al.* Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. **Arthrhitis Res Ther.** 6:142-150. 2004.

WALLBERG-JONSSON S, OHMAN ML, DAHLQVIST SR. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. **J Rheumatol**. 24:445-451. 1997.

WESTING A. IN: HERBICIDES IN WAR, A. WESTING, (ed.), **Stockholm**International Peace research Institute: London. 3ed. 1984

WILLIAMS RC, JACOBSSON LT, KNOWLER WC, DEL PUENTE A, KOSTYU D, MCAULEY JE, BENNETT PH, PETTITT DJ. Meta-analysis reveals association between most common class II haplotype in full-heritage Native Americans and rheumatoid arthritis. **Hum Immunol**. 42:90-4. 1995.

WITOWSKI J, KSIAZEK K, & JORRES AS: Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. **Cell Mol Life Sci**. 61:567-79. 2004.

WONG JM, OKEY AB, HARPER PA. Human aryl hydrocarbon receptor polymorphisms that result in loss of CYP1A1 induction. **Biochem Biophys Res Commun**. 288:990-6. 2001.

XU S, LU H, LIN J, CHEN Z, JIANG D. Regulation of TNFa and IL1b in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. **Rheumatol Int**. 30:1183–1189. 2010.

ZWERINA J, REDLICH K, POLZER K, JOOSTEN L, KRÖNKE G, DISTLER J, HESS A, PUNDT N, PAP T, HOFFMANN O, GASSER J, SCHEINECKER C, SMOLEN JS, VAN DEN BERG W, SCHETT G. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 104:11742-7. 2007.

# 8. ANEXOS

### Anexo 1

#### Ficha para coleta de dados – Estudo anti-CCP e artrite reumatóide

Nome:			
Idade: Sexo: □ M □ F Raça: □C	aucasiana Degra DMulata DAmarela		
Est. Civil: Profissão:	NaturalU Old U Kui		
1º Atendimento:/_/ Tempo de Doença			
Data da Avaliação:// Data da coleta:_	_//		
CRITÉRIOS PARA ARTRITE REUMATÓID  □ Rigidez matinal maior que 1 hora  □ Artrite observada pelo médico em 3 ou mais art	iculações das 14 seguintes: IFP, MCF, punhos,		
cotovelos, MTF, tornozelos e joelhos. Cada lado (direito ou esquerdo) é considerado uma área  Artrite observada pelo médico em pelo menos 1 das articulações das mãos, ou seja IFP, MCF e punhos  Artrite simétrica. Acometimento simultâneo da mesma articulação em ambos os lados do corpo. O acometimento das IFP, MCF e MTF é aceitável sem absoluta simetria			
		□ Nódulos subcutâneos observados pelo médico	
		□ Presença de títulos anormais de Fator Reumatóide	
		☐ Alterações radiológicas características da AR	
	Reumatóide caso sejam satisfeitos 4 ou mais dos 7		
critérios acima, sendo que os quatro primeiros dev	em estar presentes por pelo menos 6 semanas		
ENVOLVIMENTO EXTRA-ARTICULAR			
□ Perda de pesoKg			
□ Cutâneo: □ Púrpura □ Úlcera	□ Outros		
□ Ocular: □ Uveite □ Esclerite	□ Retinite □ Outros □ Derrame Pleural □ Outros □ Outros □ Outros □		
□ Pulmonar: □ Doença Intersticial Crônica	□ Derrame Pleural □ Outros		
□ Cardíaco: □ Miocardite □ Pericardite	Uutros		
☐ Hematologico: ☐ Sd de Felty ☐ Anemia	dça cr 🗆 Outros		
	Compressão nervosa periférica 🗆 Outros		
□ Outras manifestações:			
CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL  □ Classe II □ Class	se III     Classe IV		
CLASSIFICAÇÃO RADIOLÓGICA			
Índice de Larsen-Dale			
□ Grau 0 □ Grau 1 □ Grau 2 □ Grau 3 □ G	Grau 4 □ Grau 5 Score de Larsen:		
U Glau V U Glau I U Glau Z U Glau 3 U C	Jiau 4 🗆 Giau 5 Scole de Laiseii		
TRATAMENTO PRÉVIO			
□ Prednisona – AI □ Prednisona – IS	□ Pulso de Metilprednisolona		
□ Cloroquina □ Metotrexato	□ Sulfasalazina		
□ Ciclosporina □ Azatioprina	□ Ciclofosfamida (□ VO □ EV)		
□ Clorambucil □ Anti-TNF	Outros		
- Cloramouch - Anti-Tivi	U Outos		
TRATAMENTO ATUAL			
□ Prednisona – AI □ Prednisona – IS	□ Pulso de Metilprednisolona		
□ Cloroquina □ Metotrexato	□ Sulfasalazina		
□ Ciclosporina □ Clorambucil	□ Ciclofosfamida (□ VO □ EV)		
□ Leflunomide □ Anti-TNF	□ Outros		
ANTECEDENTES			
	ing iatrogênico □ Osteoporose		
☐ Hepatopatia ☐ Hepatotoxicidade ☐ Nefro	otoxicidade   Intolerância GI		
□ Infecciosos (□ Tb □ Herpes zoster □ Cut	tâneo   Sinusite   Pneumonia   ITU)		

☐ Citopenias por drogas (☐ Série vermelha ☐ Série branca ☐ Série megacariocítica)
EXAMES LABORATORIAIS
□ Fator Reumatóide □ Anti-CCP □ FAN
Γipagem dos genes HLA de Classe II
DRB1
DQB1
DAS28
Nº artic. dolorosas:
N° artic. inflamadas:
VHS:
Escala Visual Analógica de Dor:
DAS 28:

#### Anexo 2

## Fórmula para cálculo do DAS28

DAS28= $0.56x\sqrt{(TJC28)}+0.28x\sqrt{(SJC28)}+0.70x\log_{nat}(VHS)+0.014xSG$ 

Onde: TJC – Contagem de articulações dolorosas

SJC – Contagem de articulações edemaciadas

VHS - Velocidade de hemossedimentação

SG – Escala visual analógica global de saúde pelo paciente