

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE CODIFICADOR DA  
ENZIMA MTHFR COM A ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL**

**Ayla Dayane de Faria Aguiar**

**Uberlândia – MG**  
**2013**

Ayla Dayane de Faria Aguiar

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE CODIFICADOR DA  
ENZIMA MTHFR COM A ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia**

**Uberlândia – MG**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

A282a Aguiar, Ayla Dayane de Faria, 1982-  
2013      Associação do polimorfismo no gene codificador da enzima  
MTHFR com a artrite idiopática juvenil / Ayla Dayane de Faria  
Aguiar. -- 2013.  
87 f.

Orientador: Carlos Ueira-Vieira.  
Coorientador: Yara Cristina de Paiva Maia.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Artrite idiopática juvenil -  
Teses. 3. Polimorfismo (Genética) - Teses. I. Ueira-Vieira, Car-  
los. II. Maia, Yara Cristina de Paiva. III. Universidade Federal  
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde. IV. Título.

---

CDU: 61

**AYLA DAYANE DE FARIA AGUIAR**

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE CODIFICADOR DA  
ENZIMA MTHFR COM A ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Uberlândia, 18 de fevereiro de 2013**

**Comissão Organizadora:**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Co-orientadora: Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

**Examinadores Titulares:**

Dra. Rosana de Cássia Oliveira

Dra. Cibele Aparecida Crispim

**Uberlândia – MG**

**2013**

**Dedico este trabalho:**

**Ao grande amor da minha vida, Ernesto  
Aguiar, meu esposo, presente em todos os  
momentos e que, com grande ternura,  
compreendeu todas as minhas ausências;**

**À minha mãe, Ilda Faria, mulher guerreira,  
meu exemplo de vida, que almejou como  
herança uma educação de qualidade aos  
filhos, obrigada por tudo!**

***“Bendito o homem que confia no Senhor, e  
cuja confiança é o Senhor”***

***Jr 17:7***

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a **Deus**, autor e consumador da minha fé, que abundantemente me abençoou fazendo-me vitoriosa. Esteve presente em minha vida em todos os momentos, de modo especial naqueles em que as dificuldades surgiram no meu caminho, permitindo-me superá-las. Esta conquista foi permissão de Deus e a Ele toda honra, toda glória e todo louvor!*

*A minha mãe, **Ilda Alvercina de Faria**, por ter colocado a construção de minha carreira profissional como uma de suas primícias. Você foi fundamental nesta conquista.*

*Ao meu esposo, **Ernesto Aguiar**, se não fosse o nosso amor incondicionalmente forte, sua postura apoiadora e divertida, eu não seria capaz de concluir mais esta etapa. Seu incentivo em desbravar novos horizontes, sua paciência, companheirismo e cuidado em sempre me ensinar foram decisivos para a conclusão do estudo. Te amo!*

*Agradeço todas as contribuições e orientações que recebi ao longo de todos estes anos com intuito de moldar meu profissionalismo, mas em especial àqueles que incisivamente contribuíram na condução, orientação efetiva e finalização do estudo.*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira**, que me aceitou no Laboratório de Nanobiotecnologia e cordialmente me auxiliou no desenvolvimento dos experimentos me incentivando mesmo quando eu mesma não acreditava que poderia vencer; obrigada pela confiança!*

*À **Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia**, que me orientou grande parte do tempo mesmo quando a co-orientação não havia sido formalizada; sua competência e conhecimento do tema proposto para o estudo foi um grande divisor de águas, realmente uma valiosa contribuição para este estudo. Minha eterna gratidão!*

*Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pela acessibilidade e confiança, otimismo e contribuição a mim dispensados.*

*Há muitas pessoas que tiveram destaque, porém há uma, em especial, que merece menção, **Léa Duarte da Silva Moraes**, sempre prestativa, me auxiliou na busca pelo orientador. Nos meus primeiros passos no Laboratório esteve sempre a me ensinar e em todas as etapas tinha uma palavra amiga e incentivadora: uma lição para a vida “Há amigos mais chegados que irmãos”.*

*Aos médicos **Prof. Dr. Carlos Henrique Martins e Karla Pereira Fernandes** que com seriedade, competência e ética contribuíram para o entendimento do quadro clínico dos pacientes.*

*Ao mestrando **João Paulo Borges** do Laboratório de Nanobiotecnologia (INGEB/UFU), por tamanha dedicação ao estudo, que Deus o abençoe!*

*Agradeço ao meu irmão, **Alex Douglas de Faria**, e minha cunhada, **Joselaine Faria**, que mesmo distantes encheram meu coração de alegria. Obrigada por fazerem parte da minha vida e pelo meu grande presente: meu sobrinho **Gabriel!***

*Às alunas: **Msc. Patrícia Tieme, Dra. Fabiana, Patrícia Terra, Eliza Davi** pelo grande auxílio nas coletas e técnicas laboratoriais.*

*Aos demais componentes do Laboratório de Nanobiotecnologia (INGEB/UFU) que participaram desta caminhada, obrigada pelo carinho, afetividade e receptividade!*

*Agradeço a **Profa. Dra Janaína Lobato** que me orientou na extração de DNA das amostras e a todos do Laboratório CREDESH e Laboratório de Genética da UFU pelo apoio.*

*Às amigas da Diretoria de Enfermagem do **Hospital e Maternidade Municipal Dr. Odelmo Leão Carneiro** pelo convívio e compreensão ao longo do estudo, à vocês minha gratidão, que Deus as abençoe!*

*Aos irmãos em Cristo da **Igreja Evangélica Assembleia de Deus Missão aos Povos** que sempre intercederam por mim em especial à Congregação Marta Helena por ter compreendido minhas ausências. Que Deus os recompense com grandes bênçãos!*

*À todas as crianças e suas famílias que voluntariamente doaram tanto material biológico como seu tempo: vocês foram fundamentais para o estudo!*

*À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pelos ensinamentos de qualidade oferecidos.*

*Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pela dedicação e carinho.*

***“Exaltado seja o Deus da minha salvação”***  
***SI 18:46***

## RESUMO

**Objetivo:** O gene *mthfr* (metilenotetrahidrofolato redutase) tem um forte impacto sobre a metilação do DNA, a biossíntese e reparação de células em proliferação, e a sua mutação mais frequente (C677T) tem sido associada a uma redução da atividade enzimática, e, consequentemente, envolvida em diversas doenças inflamatórias, provavelmente devido ao acúmulo de homocisteína (Hcy). O metotrexato (MTX) é um agente antifolato amplamente utilizado como uma droga antirreumática modificadora de doença (DMARD) para o tratamento da Artrite Idiopática Juvenil (AIJ). O objetivo é analisar a associação entre a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo C677T do gene codificador da enzima MTHFR e a susceptibilidade à AIJ. **Método:** Estudo transversal com 38 pacientes com AIJ e 22 controles saudáveis, com faixa etária entre 3 a 22 anos. Pacientes com AIJ foram tratados com MTX, e foram monitorados para a ocorrência de eventos adversos. Análises laboratoriais e exames clínicos, incluindo dados de toxicidade, foram realizados durante 16 meses. Pacientes foram submetidos à coleta de sangue periférico para extração de DNA e posterior análise por Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento para determinar se havia modificação na região amplificada. **Resultados:** A ocorrência de AIJ foi significativamente associada com o alelo 677T e seus genótipos ( $p<0.01$ ). O *odds ratio* para o alelo T e genótipos (CT e TT) foi oito vezes maior para a manifestação da doença, o que sugere um efeito de dominância do alelo T. Não houve correlação significativa entre o polimorfismo C677T e análises laboratoriais e história clínica ( $p>0.05$ ), o que também não foi associado com reações adversas ao tratamento com MTX ( $p>0.05$ ). Foi encontrado um novo polimorfismo na região 678 ainda não descrito na literatura. **Conclusão:** A AIJ foi significativamente afetada pelo polimorfismo no gene MTHFR na região genômica C677T. O aumento da prevalência de genótipos CT e TT em pacientes com AIJ indicou um efeito de dominância do alelo T. No entanto, este polimorfismo não estava associado com intolerância MTX, o que sugere que o acúmulo de substrato não está relacionado com a incapacidade do paciente para sequestrar MTX e prevenir a desintoxicação celular.

**Palavras- Chave:** Artrite Idiopática Juvenil, Metotrexato, Polimorfismo Genético, Toxicidade, Susceptibilidade, Metilenotetrahidrofolato Redutase.

## ABSTRACT

**Objective:** The *mthfr* (methylenetetrahydrofolate reductase) gene has a strong impact on DNA methylation, biosynthesis and repair of proliferating cells, and its most common mutation (C677T) has been linked to a reduced enzymatic activity, and consequently involved in various inflammatory diseases probably due to the homocysteine accumulation (Hcy). Methotrexate (MTX) is an antifolate agent widely used as a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD) for treatment of juvenile idiopathic arthritis (JIA). The objective is to analyze the association between allelic and genotypic distribution of the C677T polymorphism of the gene encoding MTHFR and susceptibility to JIA. **Method:** A cross-sectional study included 38 patients with JIA and 22 healthy controls, with age range from 3 to 22 years. JIA patients were under MTX treatment, and were monitored for adverse events. Laboratorial analyses and clinical examinations, including toxicity data, were performed during 16 months. Patients underwent peripheral blood sampling for DNA extraction and subsequent analysis by Polymerase Chain Reaction and Sequencing to determine if there were changes in the amplified region. **Results:** JIA occurrence was significantly associated with the 677T allele and its genotypes ( $P<0.01$ ). The odds ratios for T allele and genotypes (CT and TT) were eight-times higher towards the disease manifestation, suggesting a dominance effect of the T allele. There was no significant correlation between the C677T polymorphism and laboratorialy analyses and medical history ( $p>0.05$ ), which was not associated with adverse reactions to MTX therapy ( $p>0.05$ ) either. We found a new polymorphism was 678 not yet described in the literature. **Conclusion:** JIA was significantly affected by the polymorphism in the MTHFR gene at the C677T genomic region. The increased prevalence of CT and TT genotypes in JIA patients indicated a dominance effect of the T allele. However, this polymorphism was not associated with MTX intolerance, suggesting that accumulation of substrate is not related to the incapacity of patients to sequester MTX and prevent cellular detoxification.

**Keywords:** Juvenile Idiopathic Arthritis, Methotrexate, Genetic Polymorphism, Toxicity, Susceptibility, Methylenetetrahydrofolate Reductase.

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

5 mTHF	5 metil tetrahidrofolato redutase
ACJ	Artrite Crônica Juvenil
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AICAR	5 aminoimidazol 4 carboxamida
AIJ	Artrite Idiopática Juvenil
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
AR	Artrite Reumatóide
ARJ	Artrite Reumatóide Juvenil
ATIC	5 aminoimidazol 4 carboxamida ribonucleotídeo
Blastp	(Basic Local Alignment Search Tool) programa de busca por alinhamento
bp	Pares de bases
CEP/UFU	Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia
CH <sup>3</sup>	Grupo metil
DHFR	Dihidrofolato Redutase
DMARD	Droga anti-reumática modificadora de doença
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	2' deoxinucleosídeo 5' trifosfato
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
EULAR	Liga Européia contra o Reumatismo
FAN	Anticorpos Antinucleares
FR	Fator Reumatóide
FYGS	Foliglutamato Sintase
Hcy	Homocisteína
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
ILAR	Liga Internacional de Reumatologia
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
MTR	Metionina Sintase

MTRR	Metionina Sintase Redutase
MTX	Metotrexato
MTXPG	Metotrexato Poliglutamato
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
SAM	S-adenosilmetionina
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato-EDTA (solução tampão)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THF	Tetrahidrofolato
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
Tris-HCL	Tris Hidrocloreto
TYMS	Timidilato Sintase
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

## **LISTA DE NOTAÇÕES**

°C Graus Celsius

dL Decilitro

g Gramas

M Molar

Min Minuto

mL Mililitro

mM Milimolar

ng Nanogramas

pmol Picomol

rpm Rotações por minuto

µL Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Localização cromossômica do gene <i>mthfr</i> na região 1p36.3 .....	35
<b>FIGURA 2:</b> Via bioquímica simplificada do metabolismo do folato e do papel da MTHFR na síntese, reparo e metilação do DNA.....	36
<b>FIGURA 3:</b> Esquema do metabolismo de um-carbono ou metabolismo do folato ....	37
<b>FIGURA 4:</b> Os produtos obtidos após digestão pela enzima <i>HinfI</i> de um fragmento de 198pb do gene codificador da enzima MTHFR apresentando: CC, CT e TT na posição 677 por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por prata .....	40
<b>FIGURA 5:</b> Histograma da Distribuição da idade, em anos, de 60 pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 .....	51
<b>FIGURA 6:</b> Caracterização demográfica dos 60 indivíduos estudados pertencentes ao Grupo com AIJ e ao Grupo Controle Saudável .....	52
<b>FIGURA 7:</b> Classificação dos tipos de AIJ em 38 indivíduos atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU; no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 .....	52
<b>FIGURA 8:</b> Distribuição dos intervalos de idade de início da AIJ em 38 indivíduos atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU; no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 .....	53
<b>FIGURA 9:</b> Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos amplificados de fragmento do gene da enzima codificadora MTHFR de 13 pacientes (Grupo AIJ e Grupo controle saudável) atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 .....	56
<b>FIGURA 10:</b> Relação do polimorfismo no gene <i>mthfr</i> em 34 indivíduos aleatórios atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; descritos pelo método Clustal W .....	57
<b>FIGURA 11:</b> Cromatograma ilustrativo do gene <i>mthfr</i> na posição 677. ....	59
<b>FIGURA 12:</b> Classificação dos genótipos e alelos da posição 677 do gene da enzima codificadora MTHFR de pacientes atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU; Uberlândia, 2012. ....	61

**FIGURA 13:** Classificação dos pacientes artríticos (N=38) atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU conforme alelos do gene *mthfr* e tipos de AIJ .....61

**FIGURA 14:** Cromatograma ilustrativo do gene *mthfr* na posição 678 .....63

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Características das Classificações das Artrites Crônicas na Infância segundo ACR, EULAR e ILAR .....	25
<b>TABELA 2:</b> Descrição da sequência dos oligonucleotídeos utilizados para as reações de amplificação e de sequenciamento do gene da enzima codificadora MTHFR .....	47
<b>TABELA 3:</b> Análise descritiva com os valores de frequência de resposta ou não ao MTX dos 38 indivíduos atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia; no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 .....	53
<b>TABELA 4:</b> Caracterização das variáveis clínicas e laboratoriais de 38 indivíduos com AIJ atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 .....	54
<b>TABELA 5:</b> Associação entre os dados laboratoriais e diagnósticos dos 60 pacientes do Grupo AIJ e do Grupo controle saudável atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 .....	54
<b>TABELA 6:</b> Análise univariada com os valores de frequência da variável idade de 38 indivíduos com AIJ e 22 indivíduos controles saudáveis atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 .....	55
<b>TABELA 7:</b> Caracterização do SNP 677 de 17 pacientes AIJ e respectivo genótipo, atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; descritos pelo método Clustal W .....	58
<b>TABELA 8:</b> Associações univariadas das frequências dos alelos e genótipos para o polimorfismo no gene <i>mthfr</i> C677T em 38 indivíduos com AIJ e 22 controles saudáveis atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU .....	60
<b>TABELA 9:</b> Análise da tabela de contingência dos alelos T e C (posição 677 do gene <i>mthfr</i> ) em pacientes com AIJ, atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU, quanto à resposta ao metotrexato .....	62

**TABELA 10:** Caracterização da amostra de 03 pacientes atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU conforme SNP encontrado no gene *mthfr* na posição 678 .....62

## SUMÁRIO

Resumo .....	9
Abstract .....	11
Lista de Abreviações .....	12
Lista de Notações.....	14
Lista de Figuras.....	15
Lista de Tabelas .....	17
1. Introdução .....	22
1.1 Histórico da Artrite Idiopática Juvenil .....	23
1.2 Classificação da Artrite Idiopática Juvenil .....	23
1.3 Epidemiologia.....	26
1.4 Etiopatogenia da Artrite Idiopática Juvenil .....	26
1.5 Sintomatologia na Artrite Idiopática Juvenil.....	28
1.5.1 Sistêmica.....	28
1.5.2 Oligoartrite.....	29
1.5.3 Poliartrite com fator reumatóide positivo .....	30
1.5.4 Poliartrite com fator reumatóide negativo.....	30
1.5.5 Artrite Psoriásica .....	30
1.5.6 Artrite relacionada à entesite.....	31
1.5.7 Artrite indiferenciada .....	31
1.6 Terapia Medicamentosa .....	31
1.6.1 Metotrexato .....	32
1.7 Polimorfismos em enzimas relacionadas ao metabolismo do folato e ao metabolismo do MTX .....	33
1.8 Polimorfismos em enzimas relacionadas ao metabolismo do folato e a predisposição à AIJ .....	39
2. Objetivos .....	43
3. Método e Casuística .....	44
3.1 Delineamento epidemiológico .....	44
3.1.1 Tipo de estudo .....	44
3.1.2 Área e População.....	44

3.1.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	44
3.2 Coleta de dados .....	45
3.2.1 Obtenção das amostras biológicas .....	45
3.2.2 Aspectos éticos .....	46
3.2.3 Extração do DNA das amostras .....	46
3.2.4 Oligonucleotídeos utilizados para a síntese do DNA: Reação em cadeia da polimerase e Sequenciamento.....	47
3.2.5 PCR do gene da enzima MTHFR (C677T) .....	47
3.2.6 Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose .....	47
3.2.7 Precipitação e purificação dos produtos de PCR do gene da enzima MTHFR .....	48
3.2.8 Sequenciamento dos produtos amplificados.....	48
3.2.9 Edição e alinhamento das sequências .....	49
4. Processamento e análise dos dados.....	50
5. Resultados.....	51
5.1 Avaliação descritiva das amostras .....	51
5.2 Análise univariada .....	55
5.3 Amplificação do DNA por PCR.....	55
5.4 Sequenciamento dos produtos amplificados .....	56
5.4.1 Análise do SNP no fragmento do gene <i>mthfr</i> sequenciado .....	56
5.4.1.1 SNP em 677 .....	56
5.4.1.2 SNP em 678 .....	62
6. Discussão .....	64
6.1 Avaliação descritiva das amostras .....	64
6.2 Avaliação dos dados laboratoriais .....	65
6.3 Genotipagem do polimorfismo C677T do gene <i>mthfr</i> .....	66
6.4 Genotipagem do polimorfismo C678T do gene <i>mthfr</i> .....	69
Conclusão.....	70
Referências .....	71
Anexo A .....	82
Anexo B .....	84
Anexo C .....	85

Apêndice A .....	86
------------------	----

## 1. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatóide Juvenil (ARJ) é uma doença sistêmica inflamatória crônica, de etiologia desconhecida, porém acredita-se que haja a combinação de fatores genéticos, ambientais, resposta imunológica anormal além de infecção viral e bacteriana. Recentemente, em 1990, na *International League of Associations for Rheumatology* (ILAR), houve um consenso entre especialistas e a nova classificação reconhecida internacionalmente em substituição à artrite reumatóide juvenil proposta é Artrite Idiopática Juvenil (AIJ). O aparecimento da AIJ ocorre em crianças, de ambos os gêneros, antes de completarem dezesseis anos persistindo por, no mínimo, seis semanas e acometendo três vezes mais meninas em comparação com meninos (PETTY et al., 2004; RAVELLI & MARTINI, 2007; IWAMOTO et al., 2008; PRAHALAD & GLASS, 2008).

Nas últimas décadas houve grande progresso no tratamento das artrites juvenis. O reconhecimento precoce de suas complicações como a síndrome de ativação macrofágica, principalmente na forma sistêmica, resultou em declínio da mortalidade dos pacientes acometidos pela AIJ. A intervenção mais precoce, nas formas poliarticulares, resulta em menor incapacidade física e psicossocial assim como melhora no prognóstico visual. Todo este avanço é resultante do aprimoramento de técnicas diagnósticas, laboratoriais e por imagem além da introdução de novos agentes terapêuticos como as drogas antirreumáticas, os agentes biológicos e a combinação de várias drogas no tratamento mais agressivo da AIJ, visando à redução precoce de comprometimentos articulares (MACHADO & RUPERTO, 2005; PRAHALAD & GLASS, 2008; DERVIEUX et al., 2012; LUBRAND & SCARPA, 2012; RANTALAIHO et al., 2012 ).

O metotrexato (MTX) é um antagonista do ácido fólico, considerado hoje como um dos mais importantes fármacos modificadores da doença (DMARD's) no tratamento da Artrite Reumatóide (AR). Estima-se que, atualmente, cerca de 500.000 indivíduos com AR estão sob terapêutica com MTX, sendo a DMARD mais prescrita, mesmo quando comparado com o conjunto de todas as outras DMARD's restantes atualmente em uso (NEVES & JORGE et al., 2009).

Por outro lado, é válido ressaltar que o fator limitante a boa resposta terapêutica na AIJ ainda é o atraso no diagnóstico e no planejamento do tratamento adequado bem como a dificuldade no manejo da medicação (MOTA, 2008).

Os polimorfismos genéticos podem influenciar diretamente os fatores de risco associados a diversas doenças. A ocorrência, portanto, de variações genéticas, indubitavelmente elevam o risco de desenvolvimento de eventos adversos pela utilização das drogas antirreumáticas acarretando falhas no tratamento. Os benefícios pela utilização do metotrexato são inegáveis, acompanhados por uma miríade de fatores tóxicos que acometem os indivíduos em tratamento (VAN DER PUT et al., 1997; NEVES et al., 2009).

Considerando que fatores comportamentais podem modular o efeito de alguns polimorfismos genéticos, faz-se necessário o conhecimento das interações entre os genes humanos, as suas funções e o conhecimento dos componentes clínicos e comportamentais. A compreensão das correlações entre susceptibilidade, fatores comportamentais, clínicos e terapêutica medicamentosa em pacientes com AIJ possibilitará uma otimização da saúde humana e a prevenção das doenças.

## **1.1 Histórico da Artrite Idiopática Juvenil**

A AIJ é uma doença reumática crônica que tem seu início na infância e apresenta características distintas das outras classificações de artrites inflamatórias crônicas. A primeira descrição da sintomatologia da artrite em crianças foi descrita em 1545 com relatos sobre a hidroterapia no tratamento da doença. Em 1891, *Meyer Diamant-Berger*, publicou um relato geral de 39 casos e concluiu que a artrite em adultos diferia-se com a doença manifestada em crianças, com acentuada variação na sua forma de apresentação. *George Frederic Still* em 1897 reconheceu a heterogeneidade da expressão da doença por meio da publicação de 19 casos com a descrição do atraso no crescimento das crianças acometidas por artrite (WOO, 1997; SCHNEIDER & PASSO, 2002; MARTIN et al., 2006).

## **1.2 Classificações da Artrite Idiopática Juvenil**

Os critérios definidos do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) incluem a definição da artrite, idade e o tempo de sintomatologia, necessário para o

diagnóstico. Tal classificação incluía os três tipos sendo eles sistêmico, poliarticular e oligoarticular. O limite de idade para o desenvolvimento de AIJ estabelecido era até dezesseis anos, com duração dos sinais e sintomas de, no mínimo, seis meses a um ano, baseado não nas variações biológicas apresentadas pela doença, mas na avaliação clínica por especialistas (BREWER et al., 1997).

A forma de início foi definida pelo aparecimento dos sinais clínicos presentes nos primeiros seis meses da doença. A quantidade de articulações acometidas define o tipo de artrite manifestada em crianças. Assim a AIJ oligoarticular acomete até quatro articulações. A AIJ poliarticular é definida como artrite de cinco ou mais articulações durante os seis primeiros meses de doença. A AIJ sistêmica é caracterizada por febre com picos diários maiores que 39°C por pelo menos duas semanas, em associação com artrite em pelo menos uma articulação. A maioria das crianças com AIJ de início sistêmico apresenta o rash característico, além de evidências das manifestações extra-articulares como linfoadenomegalias, hepatomegalias e serosites (SANTOS, 2006).

Em 1977, houve a criação de novos critérios para melhor diferenciação das doenças reumáticas pela Liga Europeia contra Reumatismo (EULAR). Porém, o termo Artrite Crônica Juvenil (ACJ) foi proposto para um grupo heterogêneo de doenças que se apresentam com artrites juvenis. Para que o diagnóstico ACJ seja confirmado é necessário que a artrite se inicie antes dos dezesseis anos, com a positividade do fator reumatóide persistindo por, pelo menos três meses, com exclusão de outras doenças como: artrites infecciosas, anormalidades não reumáticas específicas como a febre familiar do Mediterrâneo, sarcoidose, doenças hematológicas e neoplásicas, outras doenças do tecido conjuntivo, vasculites, febre reumática e artropatias pós-infecciosas. Incluídos no termo ACJ estão a espondilite anquilosante juvenil, a artropatia psoriásica e as artropatias associadas às doenças inflamatórias intestinais. É necessário identificar as diferenças significativas entre os critérios da ACR e EULAR sendo elas a inclusão das espondilite anquilosante juvenil, artrite psoriásica e artrites associadas às doenças inflamatórias intestinais, e a restrição do termo Artrite Reumatóide Juvenil (SCHNEIDER & PASSO, 2002; SANTOS, 2006).

Em 1993, o *International League of Associations for Rheumatology* (ILAR) instituiu um grupo internacional de reumatologistas pediátricos no intuito de se criar uma nova classificação para a doença. O objetivo do trabalho era alcançar homogeneidade entre as categorias, a fim de melhorar a comunicação entre os profissionais, e consequentemente representava um avanço nos cuidados aos pacientes (PETTY et al., 1998).

A classificação proposta pela ILAR é a mais recente e descreve os sete subtipos de AIJ sendo eles: sistêmico, oligoarticular, poliarticular com fator reumatóide positivo (FR), poliarticular FR negativo, artrites relacionadas com as entesites, artrite psoriásica e artrites indiferenciadas. O objetivo dessa nova classificação é identificar subtipos homogêneos de pacientes com artrite crônica e permitir o avanço das pesquisas relacionadas com etiologia, patogênese, epidemiologia, história natural e terapêutica (PETTY et al., 2004).

A **Tabela 1** apresenta as características das classificações das artrites na infância segundo ACR, EULAR e ILAR conforme descrita abaixo.

**Tabela 1 - Características das Classificações das Artrites Crônicas na Infância segundo ACR<sup>1</sup>, EULAR<sup>2</sup> e ILAR<sup>3</sup>.**

Características	ACR	EULAR	ILAR
Nomenclatura	ARJ <sup>4</sup>	ACJ <sup>5</sup>	AIJ <sup>6</sup>
Tipos de início	Três	Seis	Sete
Cursos dos subtipos	≥ 6 semanas	≥ 3 meses	≥ 6 semanas
Idade de início da artrite	≤ 16 anos	≤ 16 anos	≤ 16 anos
Duração da artrite	≥ 6 semanas	≥ 3 semanas	≥ 6 semanas
Inclusão de EAJ <sup>7</sup>	Não	Sim	Sim
Inclusão de APJ <sup>8</sup>	Não	Sim	Sim
Inclusão de DII <sup>9</sup>	Não	Sim	Sim
Exclusão de outras doenças	Sim	Sim	Sim

1- American College of Rheumatology, 2- European League Against Rheumatism, 3- International League Association for Rheumatology, 4- Artrite Reumatóide Juvenil, 5- Artrite Crônica Juvenil, 6- Artrite Idiopática Juvenil, 7- Espondilite Anquilosante Juvenil, 8- Artrite Psoriásica Juvenil, 9- Doença inflamatória intestinal. Fonte: Adaptado de Ferriani, 2008.

### **1.3 Epidemiologia**

A AIJ é uma das doenças crônicas mais comuns na infância e importante causa de deficiência no crescimento a curto e longo prazo. O início dos sintomas ocorre na faixa etária entre um a três anos com incidência maior em crianças do gênero feminino (SAYAH & ENGLISH, 2005; SIZOVA, 2008; HAYWARD & WALLACE, 2009).

As taxas de incidência publicadas atualmente variam de 0,80 a 86,0 / 100.000 crianças e a prevalência é de 0,07 a 4,01 / 1.000 crianças. De modo geral, há uma predominância maior no gênero feminino, com relação de três meninas para cada menino. Quanto à presença de uveíte, as meninas são mais afetadas que os meninos, pois a proporção varia de 5,0 – 6,6: 1 (MANNERS & BOWER, 2002; RUPERTO, 2004; RAVELLI & MARTINI, 2007; BECKER et al., 2011; TASBAS et al., 2011). A grande variabilidade nestas taxas deve-se a fatores principais como dificuldades quanto ao diagnóstico, diferentes definições clínicas dos casos, diversidade nos grupos estudados e desenvolvimento de novos critérios para classificação (SANTOS, 2006).

### **1.4 Etiopatogenia da Artrite Idiopática Juvenil**

Embora a AIJ tenha seu curso clínico e patológico bem conhecido, a etiologia permanece ainda desconhecida. A AIJ é uma doença crônica multifatorial com uma combinação de diversos fatores imunogenéticos e ambientais acometendo uma ou mais articulações englobando vários subtipos cuja gravidade e evolução se diferem (FERNANDES, 2006; BULATOVIC et al., 2011).

A multiplicidade das características clínicas, evolutivas, imunológicas e imunogenéticas dessa doença heterogênea sugerem que as diferentes formas clínicas representem, na realidade, entidades clínicas distintas com mecanismos etiopatogênicos próprios (FERRIANI, 2008).

O evento inicial é caracterizado por um processo inflamatório na membrana sinovial com acúmulo de linfócitos e macrófagos. A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese promovem a formação de um tecido proveniente da sinóvia conhecido como *pannus*, o qual atinge a cartilagem articular com destruição progressiva. A morbidade da doença é caracterizada por perdas

ósseas sendo o osteoclasto a principal célula envolvida neste processo. As citocinas e mediadores inflamatórios como TNF $\alpha$  são responsáveis pela ativação dos osteoclastos ocupando lugar de destaque na doença erosiva da articulação (GOLDRING, 2002; MIOSSEC, 2004).

A resposta autoimune dirigida contra autoantígenos parece ser a patogênese central no desenvolvimento da doença. O antígeno leucocitário humano (HLA-*human leukocyte antigen*) é o fator genético que contribui mais intensamente para o risco de desenvolver AR (BRENOL, 2010). Foram descritas associações entre alelos do complexo principal de histocompatibilidade (HLA-A2; HLADRB1\*11 e HLA-DRB1\*08) e os subtipos da AIJ. O HLA-DR4 (DRB1\*0401) tem uma associação forte com o tipo poliarticular FR positivo. Indubitavelmente o desencadeamento da AIJ, em indivíduos predispostos geneticamente, pode ocorrer devido a estresse psicológico, anormalidades nos níveis de hormônios e citocinas inflamatórias, traumas articulares ou infecções virais e bacterianas. Portanto, há o desenvolvimento de fenômenos autoimunes com um aumento nos níveis séricos de imunocomplexos circulantes e citocinas pró-inflamatórias (SULLIVAN, 2005; WEISS & ILOWITE, 2005; SANTOS, 2006; FERRIANI, 2008).

O possível papel das infecções como causa da AIJ é sustentado pelo acometimento de crianças sendo que, frequentemente há desequilíbrio no sistema imunológico: imunodeficiências como a deficiência seletiva de IgA, hipogamaglobulinemia ou deficiência de frações do complemento. Entre os vírus implicados na etiologia da AIJ, estão o *Epstein-Barr*, o *parvovírus B19*, os vírus *influenza*, o da rubéola e o herpes simples e o *adenovírus*. Estímulos ambientais, por meio de mecanismos mediados pelo sistema imune, podem desencadear uma resposta inflamatória em um indivíduo geneticamente suscetível, levando à destruição articular na AIJ (SULLIVAN, 2005; WEISS & ILOWITE, 2005; SANTOS, 2006; FERRIANI, 2008).

A imunidade celular na AIJ pode ser comprovada pela presença de células T CD4+ no líquido sinovial em indivíduos portadores de artrite. Estas células têm papel fundamental na iniciação da inflamação crônica na membrana sinovial. Por outro lado, vários trabalhos demonstraram a presença de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF  $\alpha$ ) no líquido sinovial de crianças com AIJ. Além disso,

foi também observado que níveis de IL-6 estão significativamente mais elevados em pacientes com AIJ de início sistêmico, quando comparados aos pacientes com AIJ oligoarticular e adultos com Artrite Reumatóide. Essas citocinas constituem alvo de novas formas de tratamento (BRENOL, 2010).

Vários aspectos dos mecanismos patogênicos responsáveis pelas manifestações clínicas da AIJ necessitam de melhores esclarecimentos. A etiologia dessa doença permanece desconhecida (FERRIANI, 2008).

Reconhecendo que a AIJ é um conjunto de desordem com manifestações articulares e extra-articulares que conduzem a prejuízos estruturais e funcionais, o diagnóstico é primordial para redução de sequelas (SAYAH & ENGLISH, 2005).

### **1.5 Sintomatologia na Artrite Idiopática Juvenil**

Os indivíduos acometidos por AIJ podem, além de apresentar uma artrite crônica, ter manifestações extra-articulares variáveis dependendo do tipo de início da doença. Rrigidez matinal e dor noturna são os sintomas mais relatados por crianças com AIJ ou responsáveis. Não obstante, irritabilidade, atraso de crescimento, fadiga, anorexia, presença de posições antalgicas e recusa ao andar podem ser encontrados nestes indivíduos (SANTOS, 2006; FERRIANI, 2008).

A artrite persistente em uma ou mais articulações, por no mínimo seis semanas, é suficiente para o diagnóstico de AIJ. As manifestações presentes nos primeiros seis meses determinam o tipo de artrite instalado (FERNANDES, 2006).

#### **1.5.1 Sistêmica**

O subtipo sistêmico é muito distinto dos outros subtipos. Acomete mais frequentemente meninos em relação a meninas e não há idade preferencial. Uma das características principais que definem este subtipo é a presença de febre por mais ou menos duas semanas e inclui: erupção eritematosa, hepatomegalia ou esplenomegalia, linfoadenopatia generalizada ou serosite e presença de mialgias e dores abdominais intensas durante os picos (WEISS & ILOWITE, 2005; SANTOS, 2006; RAVELLI & MARTINI, 2007).

A AIJ do tipo sistêmica é geralmente simétrica e poliarticular. Na investigação dos exames laboratoriais há a presença de leucocitose com neutrofilia, trombocitose

e elevação da taxa de segmentação de eritrócitos e proteína C-reativa. Os indivíduos ainda podem apresentar anemia microcítica (PETTY et al., 2004; WEISS & ILOWITE, 2005).

A síndrome de ativação macrofágica pode ser encontrada em 5 a 8% dos indivíduos. Esta síndrome é caracterizada por aparecimento súbito de febre contínua, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, insuficiência hepática, coagulopatia com manifestações hemorrágicas e sintomas neurológicos. Nos exames laboratoriais encontram-se elevados níveis de triglicerídeos, redução de sódio e aumento na concentração de ferritina (WEISS & ILOWITE, 2005; RAVELLI & MARTINI, 2007).

### **1.5.2 Oligoartrite**

Este subtipo acomete até quatro articulações sendo a forma mais frequente de AIJ representando 26% a 56% de todos os casos. A incidência é maior no gênero feminino sendo as articulações do joelho e tornozelos as mais frequentemente acometidas, geralmente de maneira assimétrica (SULLIVAN, 2005; FERNANDES, 2006; TASBAS et al., 2011).

Existe uma forte associação com alelos HLA. Os anticorpos antinucleares (FAN) são encontrados em 70% a 80% dos casos e constituem fator de risco para o desenvolvimento de uveíte. Em torno de 20% das crianças são acometidas por uveíte e cerca de 10% dos casos pode preceder o início do quadro articular. Quando o tratamento não é iniciado podem evoluir para sequelas que variam desde sinéquias posteriores até catarata, glaucoma e cegueira (WEISS & ILOWITE, 2005; RAVELLI & MARTINI, 2007).

Segundo ILAR há a distinção de duas categorias de oligoartrite, sendo elas do tipo persistente acometendo até quatro articulações durante sua evolução, e extendida (presente em até 30% dos casos) quando mais de quatro articulações são atingidas após os seis primeiros meses de evolução da doença. Os fatores de risco para essa evolução são: artrite em punhos e tornozelos, articulações em mãos, artrite simétrica, aumento do VHS (velocidade de hemossedimentação) e presença de FAN (SAYAH & ENGLISH, 2005; FERNANDES, 2006).

### **1.5.3 Poliartrite com fator reumatóide positivo**

Este subtipo acomete cinco ou mais articulações durante os primeiros seis meses da doença com pesquisa do FR (fator reumatóide) positivo em pelo menos 2 testes com, no mínimo, três meses de intervalo. É mais frequente no sexo feminino com início entre 12 a 16 anos, acometendo 10% das crianças com AIJ (PETTY et al., 2004).

Os principais sintomas são: anorexia, febre baixa, adenomegalias, hepatoesplenomegalias e serosite. Há manifestações extra-articulares como presença de nódulos subcutâneos e vasculite sistêmica. É considerada uma poliartrite simétrica que afeta articulações como punhos, metacarpofalangianas, interfalangianas proximais, metatarsofalangianas e a seguir, joelhos, tornozelos e quadris. Seu prognóstico é desfavorável, e há uma associação entre HLA e anticorpos antinucleares (SCHNEIDER & PASSO, 2002; SAYAH & ENGLISH, 2005; WEISS & ILOWITE, 2005).

### **1.5.4 Poliartrite com fator reumatóide negativo**

A poliartrite com fator reumatóide negativo acomete de 20% a 30% dos pacientes com AIJ em qualquer idade sendo dois os maiores picos de incidência: entre dois e três anos e por volta dos dez anos. É assimétrica, com predominância no sexo feminino, afeta cinco ou mais articulações durante seis meses da doença e fator reumatóide é persistentemente negativo (RAVELLI & MARTINI, 2007).

### **1.5.5 Artrite Psoriásica**

Definida como artrite associada à psoríase ou como artrite associada a pelo menos duas das seguintes características: dactilite, alterações ungueais e histórico familiar de psoríase (SANTOS, 2006).

O quadro articular consiste no comprometimento assimétrico de grandes articulações (joelhos e tornozelos) e também de pequenas articulações dos dedos das mãos e pés. A artrite psoriásica tem um diagnóstico muito difícil, pois as alterações cutâneas podem preceder o aparecimento da artrite (RAVELLI & MARTINI, 2007).

### **1.5.6 Artrite relacionada à entesite**

Acomete mais frequentemente meninos na proporção de 9:1 na faixa etária de seis anos de idade. Há forte associação com a presença de HLA-B27 em 75% dos casos e por vezes, há referência de espondiloartropatia na história familiar (TSE & LAZER, 2003; BRENOL, 2010).

Em geral é assimétrica e aditiva comprometendo usualmente articulações periféricas dos membros inferiores principalmente joelhos, tornozelos e quadris. A evolução é benigna, porém 50% das crianças podem ter progressão e posterior comprometimento das articulações sacroilíacas e da coluna cervical produzindo quadro clínico de espondilite anquilosante (FERNANDES, 2006).

### **1.5.7 Artrite Indiferenciada**

Os pacientes que não satisfazem critérios de inclusão para quaisquer outras categorias citadas anteriormente ou preenchem critérios de inclusão para mais de um tipo de AIJ (PETTY et al., 2004).

## **1.6 Terapia Medicamentosa**

Historicamente o tratamento das artrites idiopáticas juvenis é composto por DMARD's como Metotrexato (MTX) e Sulfassalazina associado a corticóides sistêmicos (SIZOVA, 2008; HAYWARD & WALLACE, 2009).

Em décadas anteriores a terapia medicamentosa era composta por drogas anti-inflamatórias não esteroidais associadas a baixas doses de corticóides. Recentemente inúmeras pesquisas demonstraram a eficácia na utilização das DMARD's em artrites reumatóides juvenis. As DMARD's incluem metotrexato, sulfassalazina, azatioprina, ciclosporina, hidroxicloroquina, leflunomida e outros (MARTIN et al., 2006; SIZOVA, 2008; HAYWARD & WALLACE, 2009; SOLIMAN et al., 2011; LUBRAND & SCARPA, 2012).

Novos tratamentos têm sido discutidos em diversas pesquisas de terapia medicamentosa para crianças com AIJ. O paradigma do tratamento das artrites juvenis está evoluindo para uma terapêutica mais precoce também considerada mais “agressiva”, porém objetiva a regressão da atividade inflamatória antes que tenha ocorrido danos articulares permanentes alcançando melhor desempenho

funcional em longo prazo. A escolha da terapia a ser empregada requer uma avaliação cuidadosa dos riscos e benefícios de cada fármaco (PINCUS et al., 2003; KREMER, 2004; HAYWARD & WALLACE, 2009).

### **1.6.1 Metotrexato**

O metotrexato (MTX) foi desenvolvido em 1940 como antagonista específico do ácido fólico, inibindo primariamente a proliferação de células malignas e a síntese de purinas e pirimidinas. Efeitos do MTX são essenciais para compreensão do metabolismo da purina, síntese de DNA e inibição da produção de timidilato (CHAN & CRONSTEIN, 2002).

Esta droga mostrou sua eficiência por meio de um início relativamente rápido da ação sendo bem tolerada na maioria dos casos. Esses recursos proporcionaram ao MTX tornar-se a DMARD mais amplamente usada com alto destaque na terapia medicamentosa e a primeira droga de escolha no tratamento de artrites (WHITILE & HUGHES, 2004; RAU & HERBON, 2004; FOELL et al., 2004; FRANSEN et al., 2004; LEE et al., 2009; STAMP et al., 2009, STAMP et al., 2010; BULATOVIC, 2011; HOLB et al., 2012, RANTALAIHO et al., 2012).

O metotrexato é um fármaco composto por aminopterina, um análogo do ácido fólico e inibidor da Dihidrofolato redutase (DHFR) (CHAN & CRONSTEIN, 2002; KREMER, 2004; SCHMELING et al., 2005). Isto se deve a remissão da doença ser maior que 70% dos pacientes. Esta superioridade do MTX em relação aos outros fármacos pode ser confirmada por vastas pesquisas que refletem sua potencialidade na eficácia, baixo custo e segurança aceitável (PINCUS et al., 2003; KREMER, 2004; LUBRAND & SCARPA, 2012; RANTALAIHO et al., 2012).

Apesar da sua grande utilização e dos seus inegáveis benefícios, o MTX apresenta efeitos adversos sendo sua toxicidade a principal razão do abandono do tratamento. Cerca de 10 a 30% dos pacientes em uso de MTX abandonaram o tratamento devido a toxicidade (RAU & HERBON, 2004; STAMP et al., 2010). Os principais eventos adversos relatados na literatura são: sintomas gastrintestinais (como náuseas, vômitos, diarreia e úlceras pépticas), mucosites, elevação de enzimas hepáticas, trombocitopenia, leucopenia, alopecia, formação de nódulos reumatóides e neurotoxicidade (WHITTLE & HUGHES, 2004; WESSELS et al.,

2006; FISHER & CRONSTEIN, 2009; STAMP et al., 2010; MENA et al., 2011; YANAGIMACHI et al., 2011).

### **1.7 Polimorfismos em enzimas relacionadas ao metabolismo do folato e ao metabolismo do MTX**

A susceptibilidade dos indivíduos a agravos a saúde pode ser determinada por variações genéticas que acometem mais de 1% da população em geral. Tais variações são classificadas como polimorfismos genéticos. Há polimorfismos de um único nucleotídeo que ocorre entre as sequências de DNA comuns no genoma humano e ajudam a determinar a susceptibilidade de um indivíduo ao desenvolvimento de agravos. Estes polimorfismos são chamados de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (MAIA, 2007; ROCHA et al., 2007; SILVA, 2007).

Algumas alterações nas sequências de DNA como SNP's afetam os sítios de reconhecimento para enzimas de restrição, resultando em uma variação de indivíduo para indivíduo no tamanho de certos fragmentos de DNA produzidos pela digestão com uma enzima de restrição específica. Estas diferenças de tamanho são referidas como polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição, ou RFLP's (*Restriction Fragments Length Polymorphisms*) (KREMER, 2006; MAIA, 2007).

A ação do MTX é ainda desconhecida, porém sabe-se que ele inibe a enzima DHFR devido a sua alta afinidade, de aproximadamente 1000 vezes mais que a dihidrofolato (VAN EDE et al., 2001; BERKUN et al., 2004; AGGARWAL et al., 2006; BECKER et al., 2011). Devido ao seu efeito inibitório em diversas enzimas alvo, o MTX interrompe o ciclo do folato ocasionando diminuição na produção de precursores de DNA, interrupção de reações metil-dependentes e posterior acúmulo de adenosina (HORNUNG et al., 2008; BECKER et al., 2011; IZMIRLI, 2013).

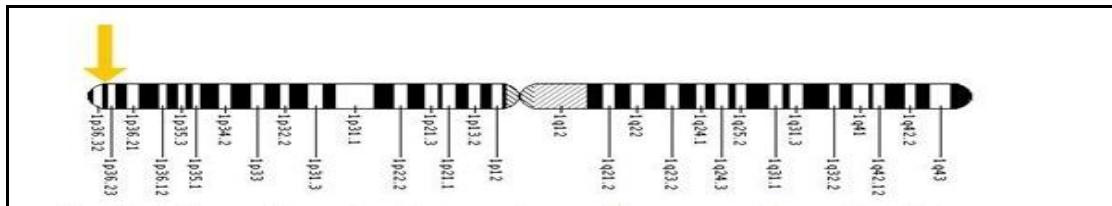
Após a entrada do MTX na célula por carregadores de folato, ele se liga rapidamente a enzima até que os sítios de ligação enzimáticos fiquem saturados (VAN EDE et al., 2001; DERVIEUX et al., 2006; RANGANATHAN et al., 2008). Por meio de transporte ativo, e uma vez internalizado, o MTX é convertido na forma de poliglutamato (MTXPG) pela enzima foliglutamato sintase (FYGS) adicionando resíduos de glutamato ao MTX (DERVIEUX et al., 2004; HORNUNG et al., 2008; WESTLAKE et al., 2009). Sob esta forma o MTX é retido na célula inibindo outras

enzimas dependentes de folato como timidilato sintase (TYMS), 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) transformilase (ATIC) e DHFR. Consequentemente há um acúmulo de droga livre no espaço intracelular, e a presença em excesso do MTX provoca redução drástica dos níveis de tetrahidrofolato (THF) promovendo redução na síntese de DNA, inibição da divisão celular e consequentemente a inibição do metabolismo das purinas e pirimidinas, e a inibição da síntese de ácidos nucleicos. A depleção da THF e a redução da 5 metil THF (5mTHF) irá reduzir a remetilação de homocisteína (Hcy) em metionina promovendo uma acúmulo de homocisteína (DERVIEUX et al., 2006; WESSELS et al., 2006; WESSELS et al., 2008; RANGANATHAN et al., 2008; FISHER & CRONSTEIN, 2009).

O MTX interfere no metabolismo da metionina-homocisteína, especificamente na transmetilação da homocisteína em metionina, por inibição da 5,10 MTHFR, uma enzima dependente do folato, que cataliza a conversão da Hcy em metionina (BERKUN et al., 2004; ROCHA et al., 2007; FISHER & CRONSTEIN, 2009; MATTIA & TOFFOLI, 2009).

O gene autossômico humano *mthfr* está localizado no cromossomo 1p36.3 e codifica uma flavoproteína de 656 aminoácidos (GOYETTE, 1994). A MTHFR atua no metabolismo do carbono e/ou do ácido fólico e o polimorfismo mais importante encontra-se na posição 677 (exon 4, códon 222) alterando um aminoácido altamente conservado no domínio catalítico N-terminal (C677T/Ala222Val). Esta enzima catalisa a redução da 5,10 MTHFR a 5 Metil THF. A enzima MTHFR tem um papel crucial no metabolismo do folato, importante para a manutenção da biossíntese de DNA e/ou RNA e metilação do DNA genômico (MAIA, 2007; ROCHA et al., 2007; SILVA, 2007).

Polimorfismos associados à variabilidade da enzima MTHFR podem alterar a susceptibilidade individual dos indivíduos ao MTX (HUGHES et al., 2006). Na **Figura 1** é apresentada a localização do gene *mthfr*.

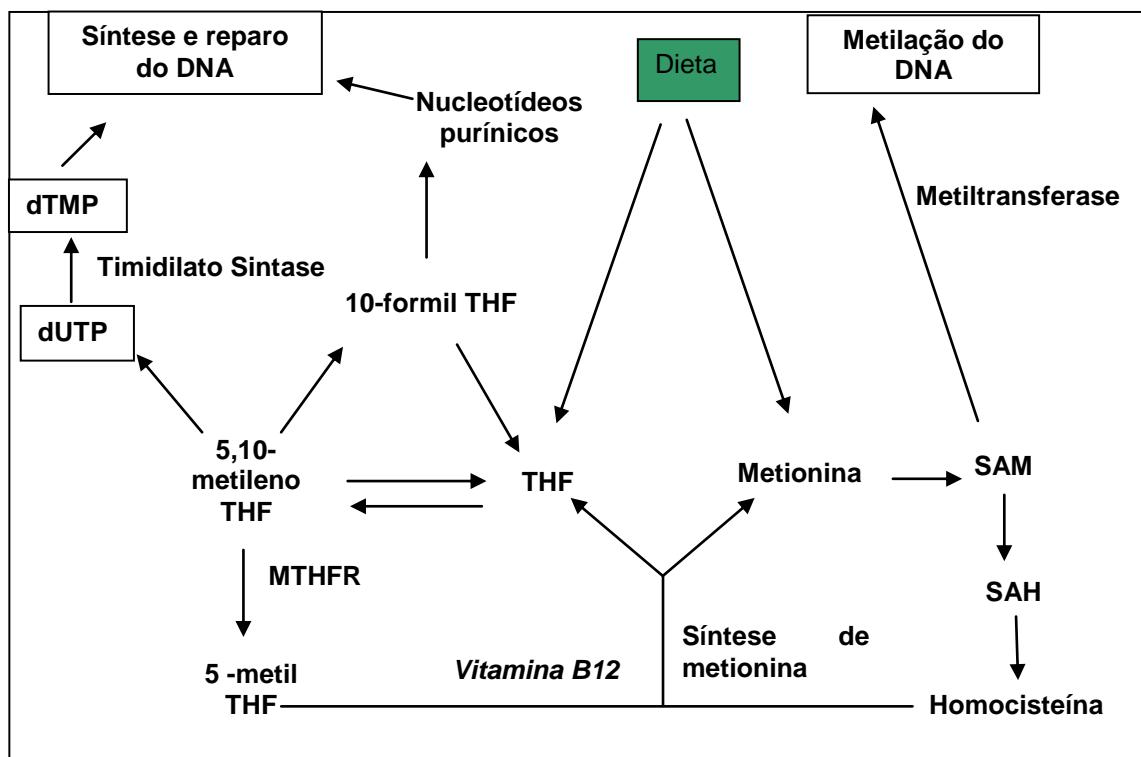


**Figura 1** – Localização cromossômica do gene *mthfr* na região 1p36.3. Fonte: Genetics Home Reference, 2012.

A Hcy é um aminoácido sulfurado, produto intermediário do metabolismo da metionina. Seu metabolismo intracelular ocorre por meio da remetilação à metionina e transsulfuração à cisteína. A Hcy não é utilizada na síntese de proteínas e também não é parte significativa da dieta humana, sendo sua única fonte para o organismo, a degradação da metionina (LOPES, 2006).

A enzima MTHFR cataliza irreversivelmente a conversão de 5,10 MTHFR em 5 MTHFR, considerado o doador de metil necessário para a conversão de Hcy em metionina pela metionina sintase (MTR). A Hcy está envolvida, por exemplo, na formação da S-adenosilmetionina (SAM), o doador universal de grupos metil (CH<sub>3</sub>), em diversas reações de metilação cruciais para a síntese de DNA, proteínas e vários neurotransmissores. A MTR cataliza a regeneração da metilcobalamina, um cofator para a metionina sintase, e esta reação tem um papel essencial na manutenção do estado da atividade enzimática da MTR (VAN EDE et al., 2001; WEISMAN et al., 2006; MA et al., 2009).

Na **Figura 2** é apresentada a via bioquímica simplificada do metabolismo do folato e do papel da MTHFR na síntese, reparo e metilação do DNA e na **Figura 3** é apresentado o metabolismo do ácido fólico ou o metabolismo de um carbono.



**Figura 2 -** Via bioquímica simplificada do metabolismo do folato e do papel da MTHFR na síntese, reparo e metilação do DNA. Maia YCP, 2007.

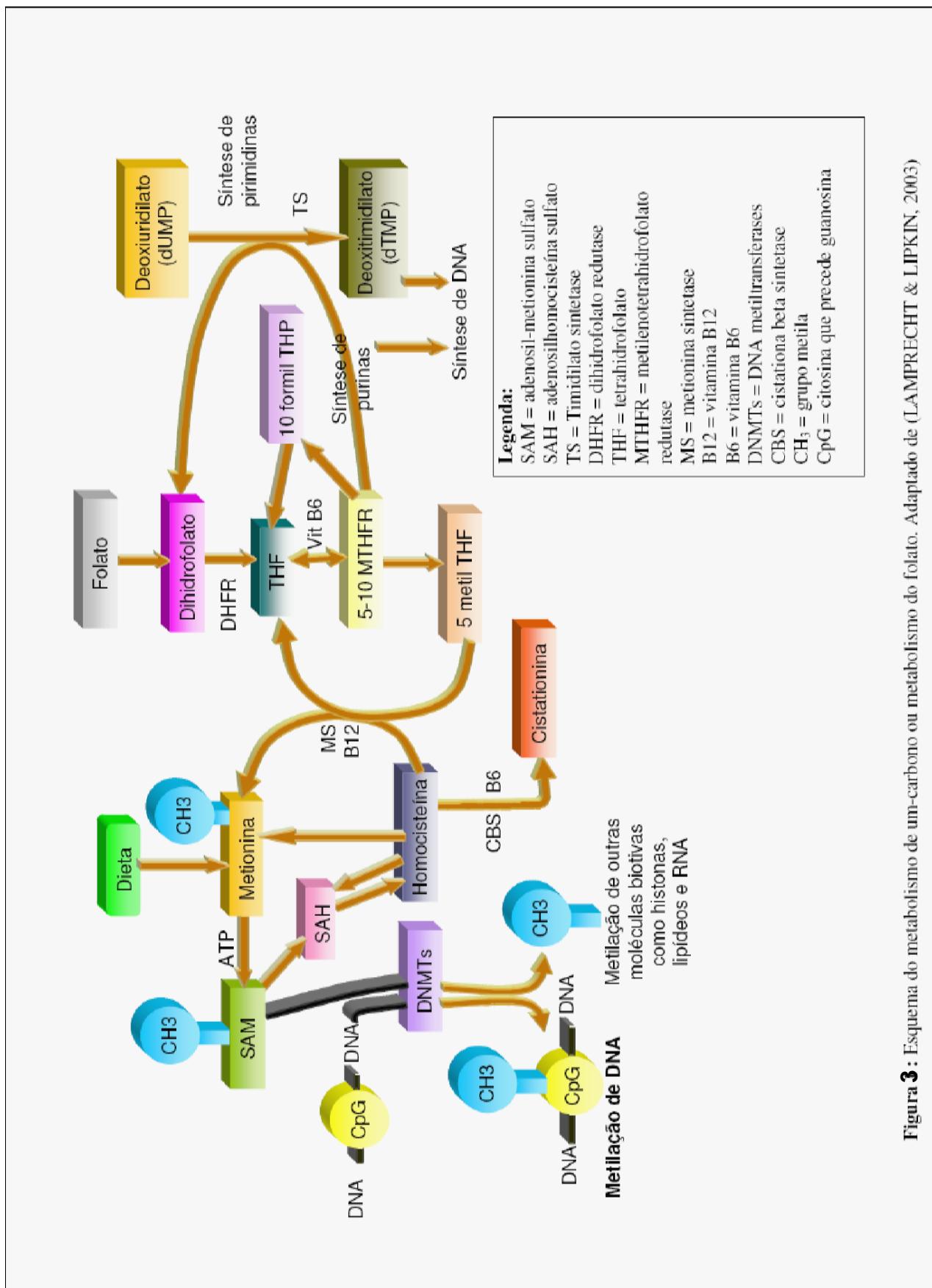


Figura 3 : Esquema do metabolismo de um-carbono ou metabolismo do folato. Adaptado de (LAMPRECHT & LIPKIN, 2003)

Vários genes que controlam o metabolismo do folato são polimórficos. A literatura relata outro polimorfismo funcional, *mthfr* A1298C (glutamina para alanina, exon7, códon 1298). Este polimorfismo ocorre em uma menor frequência, porém atua na redução da atividade enzimática da MTHFR (MA et al., 2009).

A MTHFR apresenta um papel central no metabolismo de um carbono ou no metabolismo do ácido fólico, e determina o equilíbrio entre as várias formas de folato, essenciais para a metilação e síntese de DNA (PINCUS et al., 2003; SCHMELING et al., 2005; MAIA, 2007).

Há relatos que indicam que o MTX direta ou indiretamente está envolvido na liberação de adenosina endógena, outro mecanismo importante de ação do MTX. Os poliglutamatos do MTX inibem também a AICAR, uma enzima envolvida na síntese das purinas, e que, em última análise, leva à acumulação de adenosina, mediadora de muitos dos efeitos anti-inflamatórios do MTX (RAU & HERGON, 2004; RANGANATHAN et al., 2008; WESTLAKE et al., 2009). A adenosina é libertada para o espaço extracelular e entre múltiplos efeitos anti-inflamatórios, inibe a acumulação de leucócitos e a lesão endotelial mediada por neutrófilos nos locais de inflamação, a redução da síntese do fator de necrose tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), e inibição de uma variedade de atividades de monócitos/macrófagos e células T (SCHMELING et al., 2005; RANGANATHAN et al., 2008; BRENOL, 2010).

É válido mencionar que outros polimorfismos nos genes associados ao metabolismo do folato, também podem contribuir no aumento ou redução do risco para alguns tipos de câncer. Merecem atenção os genes da enzima metionina sintase (*MTR*), da metionina sintase redutase (*MTRR*) e da *TYMS*. A metionina sintase é essencial para a manutenção adequada dos níveis de folato intracelular, catalisando a remetilação da Hcy para formar metionina, que é requerida para a produção de SAM. O gene *mtr* tem um polimorfismo na posição A2757G, o que leva a uma baixa atividade enzimática. A enzima MTRR cataliza a regeneração da metilcobalamina, um cofator para a metionina sintase, e esta reação tem um papel importante na manutenção do estado da atividade enzimática da MTR (WILSON et al., 1999). Esta reação é essencial para a biossíntese de pirimidinas, portanto também é essencial para o reparo e a replicação do DNA (TOFFOLI et al., 2000; CHAN & CRONSTEIN, 2003; LOPES, 2006; MA et al., 2009).

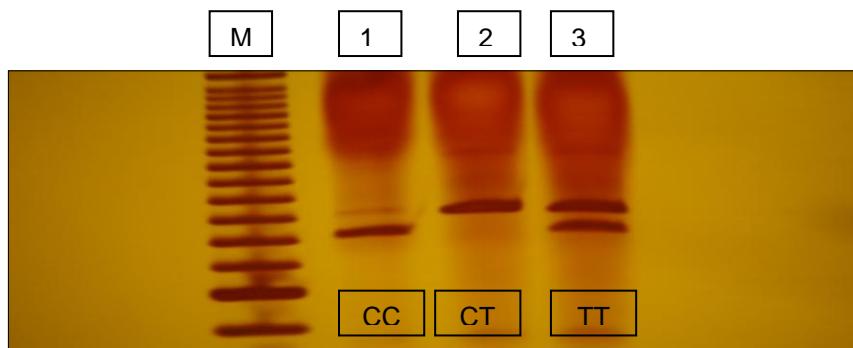
A MTR tem um polimorfismo genético comum o MTR A2756G, ocasionando uma baixa ação enzimática, e em alguns estudos já mostraram que com o polimorfismo MTR A2756G há um maior risco para o desenvolvimento de doenças como câncer de mama (LOPES, 2006; MA et al., 2009).

A prevalência de SNP's em genes que codificam enzimas associadas ao metabolismo do folato e do MTX faz com que alguns destes polimorfismos possam ser associados a diferentes tipos de resposta clínica quer a nível de toxicidade quer a nível de benefício pois, o importante mecanismo de ação do MTX pode alterar todo o processo que envolve a síntese de folato e produzir efeitos adversos ou acentuando os eventos indesejáveis esperados na utilização da droga. Existem atualmente várias linhas de investigação na área da toxicidade do MTX, com diversos genes e suas variantes, associados a genótipos específicos. A maioria dos estudos centra-se nas enzimas responsáveis pelo transporte do MTX para o meio intracelular ou extracelular, ou no metabolismo do folato. No entanto, apesar de promissor, os mecanismos de ação do MTX são múltiplos e variados. Não existe nenhum biomarcador confiável para prever a resposta de um indivíduo ao fármaco. Assim encontrar uma variante única que permita definir o padrão de eficácia e toxicidade para um determinado indivíduo é difícil (TOFFOLI et al., 2000; ULRICH et al., 2001; CHAN & CRONSTEIN, 2002; LOPES, 2006; DULUCQ, 2008).

### **1.8 Polimorfismos em enzimas relacionadas ao metabolismo do folato e a predisposição à AIJ**

O polimorfismo C677T no gene da MTHFR, com uma prevalência de 8% na população geral, causa uma diminuição da atividade da enzima, podendo estar relacionada ao acúmulo de Hcy e hipometilação genômica (STERN et al., 2000; VAN EDE et al., 2002; RANGANATHAN et al., 2008). A concentração de Hcy é influenciada por fatores genéticos e ambientais. Entre os fatores não genéticos estão a concentração dos folatos e de outras vitaminas do complexo B. Quanto aos fatores genéticos há a presença de polimorfismos com origem em mutações de genes que codificam enzimas do metabolismo da Hcy, como é o caso da MTHFR (RASSOUL et al., 2008).

Na **Figura 4** é apresentado os produtos de digestão do polimorfismo C677T por eletroforese em gel de poliacrilamida.



**Figura 4-** Os produtos obtidos após digestão pela enzima *Hinfl* de um fragmento de 198pb do gene codificador da enzima MTHFR apresentando: CC, CT e TT na posição 677 por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado por prata. MAIA, 2007.

A redução da atividade enzimática da MTHFR pode ocasionar um aumento da concentração plasmática de Hcy em aproximadamente 25% (BRADLEY & LOSCALZO, 2008). A enzima MTHFR é, portanto, um elemento-chave no metabolismo da Hcy. Estudos importantes têm sido desenvolvidos sobre a relação folato/hiperhomocisteinemia no ciclo da metilação da homocisteína para produzir metionina e também na via de síntese de DNA (STAMPFER et al., 1999).

O polimorfismo MTHFR 677 diz respeito a uma transição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677 levando a uma substituição de alanina por valina. O alelo T deste polimorfismo dá origem a uma enzima termolábil, com redução de atividade na ordem dos 50 a 60% quando a 37°C, enquanto que, quando a 46°C, a redução da atividade enzimática pode atingir os 65% (SAZCY et al., 2005). Assim, a diminuição da atividade está associada à homozigose TT e, embora em menor extensão, também à heterozigose CT (MARKAN et al., 2007). Estando bem definida a relação entre a hiperhomocisteinemia e o efeito dominante do alelo T entende-se que o polimorfismo no gene codificador da enzima MTHFR tem implicações na predisposição a doenças, principalmente doenças inflamatórias crônicas.

Há poucos estudos que relatam a associação entre o polimorfismo na enzima MTHFR e doenças inflamatórias crônicas. A literatura relata estudos realizados com pacientes portadores psoríase, porém os resultados não são necessariamente

convergentes (BAIGIU et al., 2000; WEGER et al., 2008; LIEW et al., 2012). Estudos epidemiológicos sugerem que o polimorfismo do gene da *MTHFR*, C677T, pode modificar o risco para a ocorrência de alguns tipos de doenças, mas ainda não foi relatada na literatura a associação com a AIJ. Porém, como a enzima mutante possui características termolábeis diferentes da enzima normal, esta poderá levar, por meio da dominância do alelo T, a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças inflamatórias (LIEW et al., 2012). Na literatura o gene da enzima codificadora *MTHFR* não é descrito como gene detoxificante.

Na literatura o gene da enzima codificadora *MTHFR* não é descrito como gene detoxificante. Esta é uma das razões encontradas pelo grande número de resultados controversos na literatura quando mencionam-se a utilização de MTX na presença de polimorfismo genético pertencentes a cadeia do folato (TESSIER, HARAQUI, 2010; YANAGIMACHI, 2011). Alguns genes relatados na literatura estão envolvidos na detoxificação e metabolização de agentes tóxicos como os genes da superfamília do citocromo P450 e os genes da Glutationa S-transferase. As enzimas da fase I, ou enzimas de ativação, representadas pela família do citocromo 450, ativam o xenobiótico tornando-o mais eletrofílico e desta forma mais reativo com a introdução de um grupamento funcional. Já as enzimas de fase II ou de detoxificação como a glutationa S-transferase normalmente atuam com a conjugação dos metabólitos com um substrato endógeno por enzimas transferases. O resultado deste processo é a transformação dos metabólitos em substâncias hidrofílicas, e assim, passíveis de excreção (WILKINSON & CLAPPER, 1997; GUECHEVA & HENRIQUES, 2003). Alguns estudos retratam que estes genes podem predispor o organismo a ocorrência de doenças inflamatórias autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico e a variabilidade de resposta terapêutica (HORIUCHI et al., 2009; MONTICIELO et al., 2010).

É notória a ocorrência de um grande número de polimorfismos na cadeia do folato e muitos deles podem predispor à doenças inflamatórias crônicas como a AIJ e outras. Devido ao forte impacto da enzima *MTHFR* na metilação do DNA, biossíntese e reparo do DNA na divisão de células ativas, este estudo objetivou analisar a associação entre a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo

C677T do gene codificador da enzima MTHFR com os fatores clínicos e a susceptibilidade para a ocorrência de AIJ.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Analisar a associação entre a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo C677T do gene codificador da enzima MTHFR e a susceptibilidade para a ocorrência de AIJ.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência alélica e genotípica do polimorfismo C677T do gene da enzima da MTHFR na população estudada.
- Determinar a presença de mutações na região amplificada.
- Verificar se há correlação dos dados clínicos e laboratoriais obtidos com a presença do polimorfismo genético.
- Verificar se há aumento da susceptibilidade para a ocorrência de AIJ na presença do polimorfismo.
- Correlacionar o polimorfismo genético no gene *mthfr* com a exacerbação dos eventos adversos/ intolerabilidade na utilização do Metotrexato.

### **3. MÉTODO E CASUÍSTICA**

#### **3.1 Delineamento epidemiológico**

##### **3.1.1 Tipo do estudo**

O estudo realizado foi caracterizado como experimental do tipo transversal a fim de investigar a associação do polimorfismo C677T do gene codificador da enzima MTHFR na população do estudo.

##### **3.1.2 Área e população**

A população estudada foi composta por 60 crianças e adolescentes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas de Uberlândia, em Minas Gerais. O grupo composto por crianças e adolescentes com AIJ estavam em uso de MTX ou interromperam o tratamento por, no máximo, três meses; entre Agosto de 2010 a Dezembro de 2011. Os indivíduos pertencentes ao grupo controle saudável foram selecionados após consulta em puericultura ou clínica geral de rotina, não apresentavam comorbidades e mantinham seus exames laboratoriais dentro dos limites da normalidade estabelecidos pelo Laboratório de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – MG. Compuseram esta amostra crianças e adolescentes de ambos os gêneros sendo 38 pacientes artríticos e 22 pacientes controles saudáveis.

##### **3.1.3 Critérios de inclusão e exclusão**

A pesquisa foi composta por dois grupos intitulados como: Grupo AIJ e Grupo Controle Saudável. Os critérios de inclusão utilizados na pesquisa para composição do Grupo AIJ foram: faixa etária até 22 anos com o diagnóstico de AIJ em uso do MTX e pacientes que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo A). Houve a inclusão de pacientes na faixa etária até 22 anos com o diagnóstico de AIJ sem utilização do MTX devido à suspensão por eventos adversos. Os critérios de exclusão utilizados para este grupo foram: não pertencer à faixa etária estabelecida, não possuir autorização do TCLE e pacientes em utilização de outros fármacos.

Para compor o Grupo Controle Saudável foram utilizados como critérios de inclusão pacientes na faixa etária até 22 anos sem o diagnóstico de AIJ, sem utilização do MTX devido à suspensão por eventos adversos e pacientes que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o TCLE. Os critérios de exclusão utilizados para este grupo foram: não pertencer à faixa etária estabelecida, pacientes que não possuem TCLE, pacientes em utilização de MTX e pacientes com comorbidades.

### **3.2 Coleta de dados**

A coleta de dados ocorreu em três etapas principais: entrevista com coleta de dados, punção periférica para obtenção de sangue venoso e pesquisa de dados em prontuário. Na entrevista houve a aplicação de um questionário estruturado para a caracterização sociodemográfica e clínica dos sujeitos participantes da pesquisa (Apêndice A). Este questionário foi composto por dados como: identificação do sujeito, idade, gênero, etnia, dados antropométricos, idade no diagnóstico de AIJ, forma de início, subtipo de AIJ presente, prática de atividade física, terapêutica medicamentosa em uso, histórico familiar, dentre outros. Todos os pacientes foram informados sobre a necessidade de realização da pesquisa, a importância da participação e os procedimentos a serem executados.

A segunda etapa da coleta dos dados ocorreu por meio da obtenção de sangue venoso periférico para realização das análises laboratoriais. A última etapa ocorreu por meio de avaliação dos prontuários a fim de realizar a busca por informações ainda mais concretas e relevantes sobre a saúde do indivíduo. Os resultados dos exames laboratoriais foram pesquisados a fim de agregar maiores informações clínicas para o delineamento epidemiológico de cada participante da pesquisa.

#### **3.2.1 Obtenção das amostras biológicas**

Os sujeitos participantes da pesquisa submeteram-se à coleta de amostra de sangue venoso periférico (5 ml de cada indivíduo participante) em frasco codificado contendo EDTA e uma frasco sem EDTA. O sangue foi centrifugado para a obtenção de plasma e o sangue total armazenado a -20 C até a sua posterior utilização.

### **3.2.2 Aspectos éticos**

Os responsáveis pelas crianças e adolescentes, depois de informadas sobre os objetivos da pesquisa, o protocolo e os procedimentos a serem realizados, bem como os riscos e benefícios da participação no estudo foram solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A e ANEXO B). Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU) sob o processo N°146/10 (ANEXO C).

### **3.2.3 Extração do DNA das amostras**

O DNA das amostras provenientes de sangue periférico foi extraído seguindo-se o protocolo de Goulart (GOULART et al., 2007) e Martinez (MARTINEZ et al., 2011) realizado no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU, Uberlândia. Os tubos foram devidamente etiquetados contendo 500 µL de sangue total. Foram acrescidos 250 µL Tris-HCL 1M (pH=8.0) e 500 µL de Fenol (pH=8.0) saturado com Tris-HCL( 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL). A amostra foi submetida à homogeneização com vórtex e consequentemente foi deixada em repouso por cinco minutos. Em seguida a amostra foi submetida à centrifugação a 10000 rpm 4°C por 15 minutos. Após esta etapa desprezou-se 600µL do sobrenadante prosseguindo com alíquota da solução para a transferência em um tubo limpo. À amostra adicionou-se 1 ml de EDTA absoluto gelado, sofrendo homogeneização e centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente desprezou o sobrenadante e lavou o pellet com 1 ml de EDTA 75% e submeteu-se a amostra à centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e manteve-se o pellet em repouso por 24 horas a temperatura ambiente. Na etapa seguinte dilui-se o pellet em 50 µL de água destilada. Após a finalização desta etapa o DNA foi estocado a 4°C.

A quantificação do DNA das amostras foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (Spectrophotometer ND 1000) lida em 260nm a 280nm para avaliação da pureza do DNA. Posteriormente, a solução de trabalho de DNA foi padronizada a uma concentração equivalente a 20ng/ µL.

### 3.2.4 Oligonucleotídeos utilizados para síntese do DNA: Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento

Para as reações de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizados oligonucleotídeos descritos anteriormente (FROSST et al., 1995) conforme **Tabela 2** abaixo.

**Tabela 2** - Descrição da sequência dos oligonucleotídeos utilizados para as reações de amplificação e de sequenciamento do gene da enzima codificadora MTHFR, Uberlândia, 2012.

Primer	Orientação	Gene	Descrição	Tamanho
MTHFR	Foward	MTHFR	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCG	
C677T			GGA	198 pb
MTHFR	Reverse	MTHFR	CACTCTCACCGCACCGTCCT	
C677T				

### 3.2.5 PCR do gene da enzima MTHFR (C677T)

O DNA obtido das amostras de sangue foi amplificado pela PCR com iniciadores específicos. A reação do gene *mthfr* C677T ocorreu em volume final de 50  $\mu$ L contendo aproximadamente 100ng de DNA, 5  $\mu$ L de Tampão 10X, 2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1.25  $\mu$ L de dNTPs 10mM, 0,5  $\mu$ L de cada primer 5pmol/ $\mu$ L (Foward e Reverse); 0,2  $\mu$ L de *Taq* DNA Polimerase Platinun<sup>®</sup> (Invitrogen) 5U/ $\mu$ L e água destilada para completar o volume final. Para a reação foi utilizado termociclador MJ96/MJ966 (Biosystems, Peltier Thermal Cycler), sob as seguintes condições: desnaturação a 92°C, por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos, sendo: 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C. Ao final, seguiu uma extensão a 72°C, por 7 minutos.

### 3.2.6 Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose

Dos produtos amplificados, 5  $\mu$ L foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5% contendo brometo de

etídeo 0,3 µg/ml. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado por um sistema digital com câmera convencional (MBS-D2).

### **3.2.7 Precipitação e Purificação dos produtos de PCR do gene da enzima MTHFR**

A reação de precipitação e purificação do produto de PCR do gene da enzima MTHFR na posição 677 obedeceu aos seguintes critérios: foi acrescido a cada amostra 4,5 µL de acetato de amônio e 90 µL de etanol absoluto gelado permanecendo em repouso por vinte e quatro horas em temperatura a – 20°C. Na etapa seguinte prosseguiu-se com a centrifugação a 14000 rpm por trinta minutos desprezando o sobrenadante. Foi acrescido 50 µL de etanol 75% gelado a fim de lavar o pellet em cada amostra. Centrifugou-se a 14000 rpm por cinco minutos sendo desprezado o sobrenadante. A próxima etapa foi secar o pellet e ressuspê-lo em 12 µL de água miliQ. A quantificação do DNA das amostras foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (Spectrophotometer ND 1000) lida em 260nm a 280nm. Posteriormente, a solução de trabalho de DNA foi padronizada a uma concentração equivalente a 20ng/µL. Dois µL da amostra foi aplicado em gel de agarose a 1,5% e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado por um sistema digital com câmera convencional (MBS-D2).

### **3.2.8 Sequenciamento dos produtos amplificados**

A reação de sequenciamento constituiu-se de: 20ng do produto de PCR purificados, 5pmol/µL do *primer* (R ou F em reações separadas), 4 µL Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences) e água para volume final de reação de 10 µL.

A reação de 35 ciclos foi realizada em um termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (a 95°C por 20 segundos), anelamento do *primer* (a 60°C por 15 segundos) e extensão (a 50°C por um minuto). Após esta etapa o DNA a ser sequenciado foi precipitado com 1 µL de acetato de amônio e 27,5 µL etanol absoluto. Então a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3700 rpm. O sobrenadante foi descartado.

Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700 rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por um papel alumínio durante dez minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10 µL de Loading Buffer (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences). A leitura do sequenciamento foi realizada em um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

### **3.2.9 Edição e alinhamento das sequências**

As sequências foram analisadas utilizando a ferramenta para edição de sequências biológicas BioEdit (HALL, 1999). A similaridade entre as sequências encontradas e a sequência referência foi realizada utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. BLAST é um conjunto de programas que comparam (alinham) as sequências a serem investigadas com todas as depositadas nos bancos de dados de ácidos nucleicos. Dentro do Blast a busca foi realizada no “Nucleotide blast” utilizando como database o “Human Genomic Plus Transcript (Human G+T)”. A sequência utilizada como referência foi obtida do GenBank com Código de Acesso U09806.

Os produtos amplificados de cada paciente foram sequenciados três vezes para cada *primer*. Para analisar as sequências contigs de cada repetição, estas foram geradas utilizando BioEdit (HALL, 1999). A ferramenta utilizada para a montagem do reverso complementar do sequenciamento por meio do *primer* reverso foi a *The Bio Web* (<http://www.cellbiol.com/scripts/complement>). A predição da sequência de aminoácidos foi feita utilizando a ferramenta Expasy disponível em <http://www.web.expasy.org/translate>.

As sequências obtidas e a de referência foram alinhadas por BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e pelo método ClustalW disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>, a partir da sequência de aminoácidos.

Após verificar a presença do polimorfismo genético no gene *mthfr* produzido pelas análises de alinhamento dos eletroferogramas das sequências amplificadas pelos oligonucleotídeos Foward e Reverse, gerados automaticamente, as

sequências foram inspecionados visualmente utilizando a ferramenta Chromas Lite versão 2.1 (Technelysium Pty LTD).

#### **4. PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS**

Todas as informações obtidas por meio dos questionários de identificação pessoal foram compiladas em banco de dados e analisados no software SPSS (*Software Package Statistical System*) 17.0 for Windows.

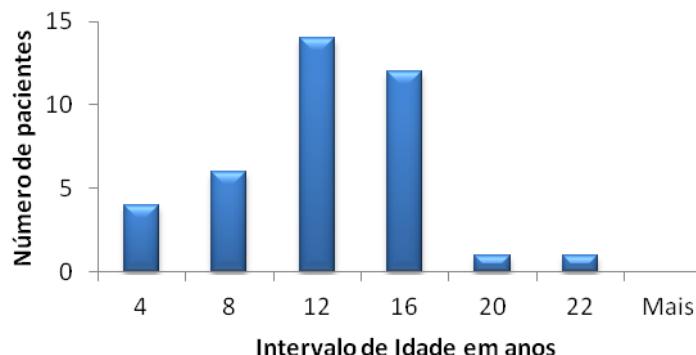
Inicialmente foi realizada a descrição da população estudada segundo as variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais por meio da análise descritiva dos dados utilizando médias, desvios-padrão, medianas, valores mínimos e máximos.

Em seguida foi realizada a análise univariada binária, assumindo como variável resposta ser pacientes do Grupo com AIJ ou do Grupo Controle Saudável, sendo as demais variáveis descritas como explicativas. Quando as variáveis não apresentavam distribuição normal ou homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis para as variáveis com mais de dois atributos determinando se havia diferença de interação entre dados clínicos de pacientes com AIJ e controles saudáveis. Quando as variáveis eram categorizadas, a análise estatística utilizada foi o Teste de Qui-quadrado para a comparação de proporções e Teste Exato de Fisher. Nestes casos a medida de associação utilizada foi a razão de odds (OR). A associação entre os genótipos do polimorfismo MTHFR e frequências alélicas com grupos (AIJ ou controle saudável) variáveis foram analisadas com o teste de Correlação de Spearman. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado pelo teste Qui-quadrado para comparar as frequências genotípicas observadas com as frequências esperadas entre os sujeitos. Todas as análises foram realizadas com intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e p<0,05.

## 5. RESULTADOS

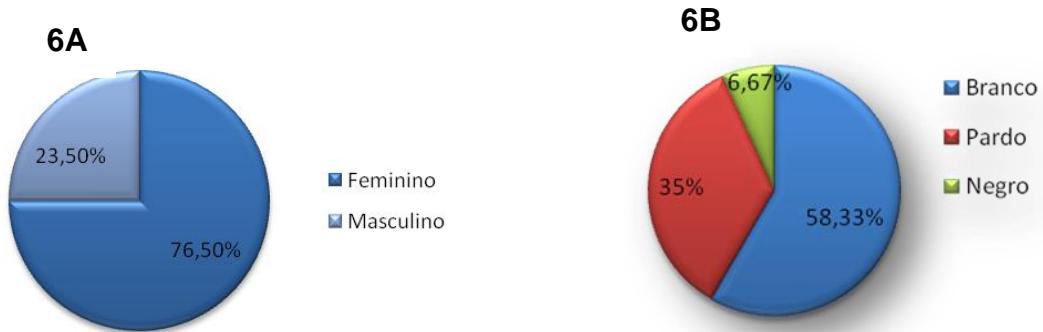
### 5.1 Avaliação descritiva das amostras

Após 16 meses de coleta de dados, compuseram o estudo 60 amostras (38 pacientes com AIJ e 22 pacientes controles saudáveis), as quais foram agrupadas respeitando os critérios de inclusão e exclusão das amostras: AIJ (pacientes portadores de AIJ) e Controle (pacientes saudáveis). Foram excluídos da análise os pacientes que não apresentavam o diagnóstico concluído até a data da coleta e aqueles pacientes que tiveram insucessos na coleta de sangue periférico como: escassez de sangue total e coagulação da amostra. Dentre os pacientes com AIJ, compuseram a amostra indivíduos de 3 a 21 anos. A **Figura 5** apresenta o histograma da distribuição da idade dos pacientes que compuseram a amostra, sendo a média  $10,61 \pm 4,30$  anos de idade e mediana de 10 anos.



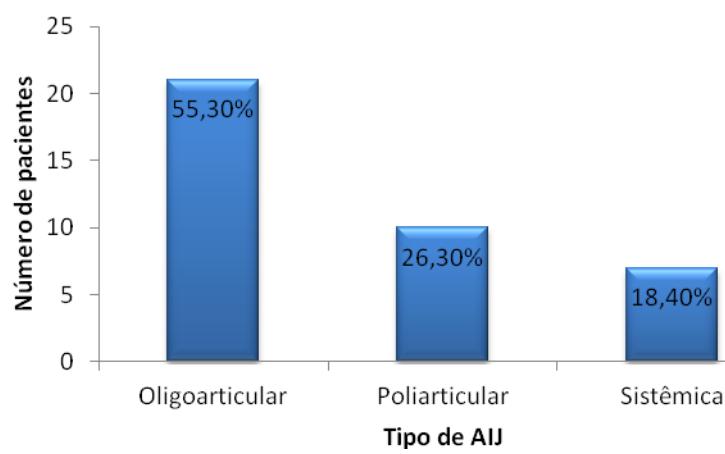
**Figura 5** - Histograma da Distribuição da idade, em anos, de 60 pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; Uberlândia, 2012.

A **Figura 6** apresenta os gráficos com a caracterização demográfica, mostrando a distribuição de frequência conforme gênero (6A) e etnia (6B). Quanto ao gênero, os dados revelam que 76,5% dos indivíduos eram do gênero feminino. De acordo com a etnia, a amostra foi composta, em grande parte, por brancos (58,33%) e pardos (35%) sendo 6,67% da amostra representada por negros.



**Figura 6** - Caracterização demográfica dos 60 indivíduos estudados pertencentes ao Grupo com AIJ e ao Grupo Controle Saudável: A: Gênero, B: Etnia, Uberlândia, 2012.

A classificação da AIJ utilizada nessa pesquisa foi a de ACR obedecendo aos mesmos critérios de classificação do Ambulatório de Reumatologia Pediátrica da Universidade Federal de Uberlândia. De acordo com os critérios de classificação da AIJ, a amostra foi caracterizada segundo os tipos de AIJ obedecendo à classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) conforme evidenciado na **Figura 7**. Segundo a classificação, 55,3% tiveram a artrite classificada como oligoarticular, 26,3% poliarticular e 18,4% da amostra como sistêmica. Na **Figura 8** está a distribuição da idade de início da doença entre os pacientes com AIJ.



**Figura 7** - Classificação dos tipos de AIJ em 38 indivíduos atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; Uberlândia, 2012.



**Figura 8** – Distribuição dos intervalos de idade de início da AIJ em 38 indivíduos atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; Uberlândia, 2012.

De acordo com os dados observados, 76,31% dos pacientes são considerados respondedores à terapêutica medicamentosa por MTX. O grupo que não respondeu apropriadamente ao MTX (23,69%) apresentou intolerabilidade à droga e consequente progressão da doença. Isto exigiu a utilização de complemento ao MTX ou mudança de terapêutica. Em relação ao tratamento, todos os indivíduos que compuseram a amostra já receberam doses de MTX ou continuam recebendo conforme evidenciado na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Análise descritiva com os valores de frequência de resposta ou não ao MTX dos 38 indivíduos atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; Uberlândia, 2012.

Variável	Frequência
<b>Eventos</b>	
Respondedores ao MTX	29 (76,31)
Não respondedores ao MTX	9 (23,69)
<b>Medicação</b>	
Em uso de MTX	21 (55,26)
Em uso de MTX + Complemento	12 (31,58)
Outras DMARD's	5 (13,16)

A **Tabela 4** apresenta a caracterização das variáveis clínicas e exames laboratoriais dos indivíduos avaliados, mostrando as frequências e porcentagens da ocorrência de exercício físico, doença inflamatória, doença infecciosa, exames complementares, anticorpos antinucleares (FAN) e fator reumatoide (FR). Na **Tabela 5** há uma associação entre os dados laboratoriais e diagnóstico dos pacientes com AIJ e controles saudáveis que compõe a amostra.

**Tabela 4 –** Caracterização das variáveis clínicas e laboratoriais de 38 indivíduos com AIJ atendidos pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; Uberlândia, 2012.

Variável	Sim	Não
Exercício Físico	15 (39,50)	23 (60,50)
Doença Inflamatória	4 (10,50)	34 (89,50)
Doença Infecciosa	0 (0)	38 (100,0)
Exames Complementares	19 (50,0)	19 (50,0)
FAN	19 (50,0)	19 (50,0)
FR	17 (44,70)	21 (55,30)

**Tabela 5 -** Associação entre os dados laboratoriais e diagnósticos dos 60 pacientes do Grupo AIJ e do Grupo controle saudável atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; Uberlândia, 2012.

Dados Laboratoriais	AIJ	Controle	P
VHS	21,00	11,00	0,00
PCR	0,80	0,70	0,78
Leucócitos	7,55	8,70	0,42
Plaquetas	304,50	291,50	0,82
Uréia	24,00	25,00	0,00
Creatinina	0,50	0,70	0,00
Hemoglobina	12,60	13,00	0,00
Hematórito	37,35	40,20	0,01
AST	16,50	17,50	0,68
ALT	19,00	25,00	0,10

Teste Kruskal Wallis (Intervalo de Confiança 95%, p<0,05)

Legenda: VHS: Velocidade de Hemossedimentação, PCR: Proteína C-Reativa, AST: Aspartato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase.

Houve correlação significativa nos seguintes dados laboratoriais: VHS ( $p<0,00$ ), Uréia ( $p<0,001$ ), Creatinina ( $p<0,00$ ), Hemoglobina ( $p<0,009$ ) e Hematócrito ( $p<0,012$ ) não apresentando correlação significativa nos demais dados analisados (Valor de significância de 95%).

## 5.2 Análise univariada

A **Tabela 6** apresenta os dados referentes à variável idade de 38 indivíduos com AIJ e 22 indivíduos controles saudáveis categorizados pela mediana.

**Tabela 6** – Análise univariada com os valores de frequência da variável idade de 38 indivíduos com AIJ e 22 indivíduos controles saudáveis atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; Uberlândia, 2012.

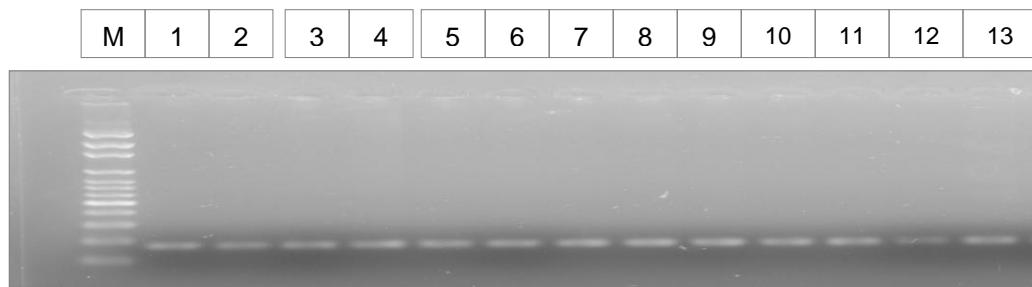
Variável	Total	AIJ N (%)	Controle N (%)
Idade (anos)			
< 10	24	15 (60,5)	9 (40,9)
> 10	36	23 (39,5)	13 (59,1)

Teste de Correlação de Spearman ( $p>0,915$ )

Não houve correlação entre os valores de frequência da variável idade dos pacientes do estudo segundo o Teste de Spearman ( $p>0,05$ ).

## 5.3 Amplificação do DNA por PCR

Após a extração de DNA, as amostras foram amplificadas pelo método de PCR e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a fim de verificar sua qualidade e estimar sua quantidade (**Figura 09**). Posteriormente à análise do DNA, o mesmo foi sequenciado e analisado conforme protocolos já descritos.



**Figura 09-** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos amplificados de fragmento do gene da enzima codificadora MTHFR de 13 pacientes (Grupo AIJ e Grupo controle saudável) atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; Uberlândia, 2012. M: marcador de 100 pb, e as canaletas de 1 a 13 representam as amostras de DNA dos pacientes.

#### 5.4 Sequenciamento dos produtos amplificados

A análise dos polimorfismos na região amplificada foi realizada por meio do método de Sequenciamento, a fim de investigar a ocorrência de outros polimorfismos genéticos na região estudada. Todos os pacientes com AIJ e pacientes saudáveis foram submetidos ao sequenciamento. A fim de garantir a confiabilidade dos resultados, todos os produtos amplificados foram sequenciados em triplicata para cada *primer*.

##### 5.4.1 Análise do SNP no fragmento do gene da enzima codificadora MTHFR sequenciado

O alinhamento das sequências foi realizado para possibilitar a identificação visual dos SNP's na região de éxon do gene. Após a dedução e o alinhamento linear das sequências pelos programas Expasy, The Bio Web, Blast e ClustalW detectamos a presença de dois polimorfismos diferentes presentes nos pacientes com AIJ, sendo eles, C677T e C678T.

###### 5.4.1.1 SNP em 677

De 38 pacientes com AIJ avaliados, dezessete evidenciam uma mutação na posição 677 do gene *mthfr*. Entre os 22 pacientes controles saudáveis, dois pacientes são polimórficos para o gene *mthfr* C677T. Na **Figura 10** encontramos o alinhamento, pelo método ClustalW, dos pacientes para o gene *mthfr* na posição 677.

MTHFR	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
1	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
2	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
3	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
4	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
5	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
6	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
7	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
8	GCTGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
9	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
10	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
11	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
12	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
13	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
14	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
15	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
16	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
17	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
18	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
19	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
20	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
21	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
22	GCTGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
23	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
24	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
25	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
26	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
27	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
28	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
29	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
30	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
31	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
32	GCTGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
33	GTCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG
34	GCCGATTTCATCATCACGCAGCTTCTTGAGGCTGACACATTCTCCGTTGTGAAG

**Figura 10** - Relação do polimorfismo no gene mthfr em 34 indivíduos aleatórios atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; descritos pelo método Clustal W, Uberlândia, 2012. A sequência referência está indicada por MTHFR e a região destacada representa a localização do SNP em indivíduos do estudo identificados conforme nomeação recebida.

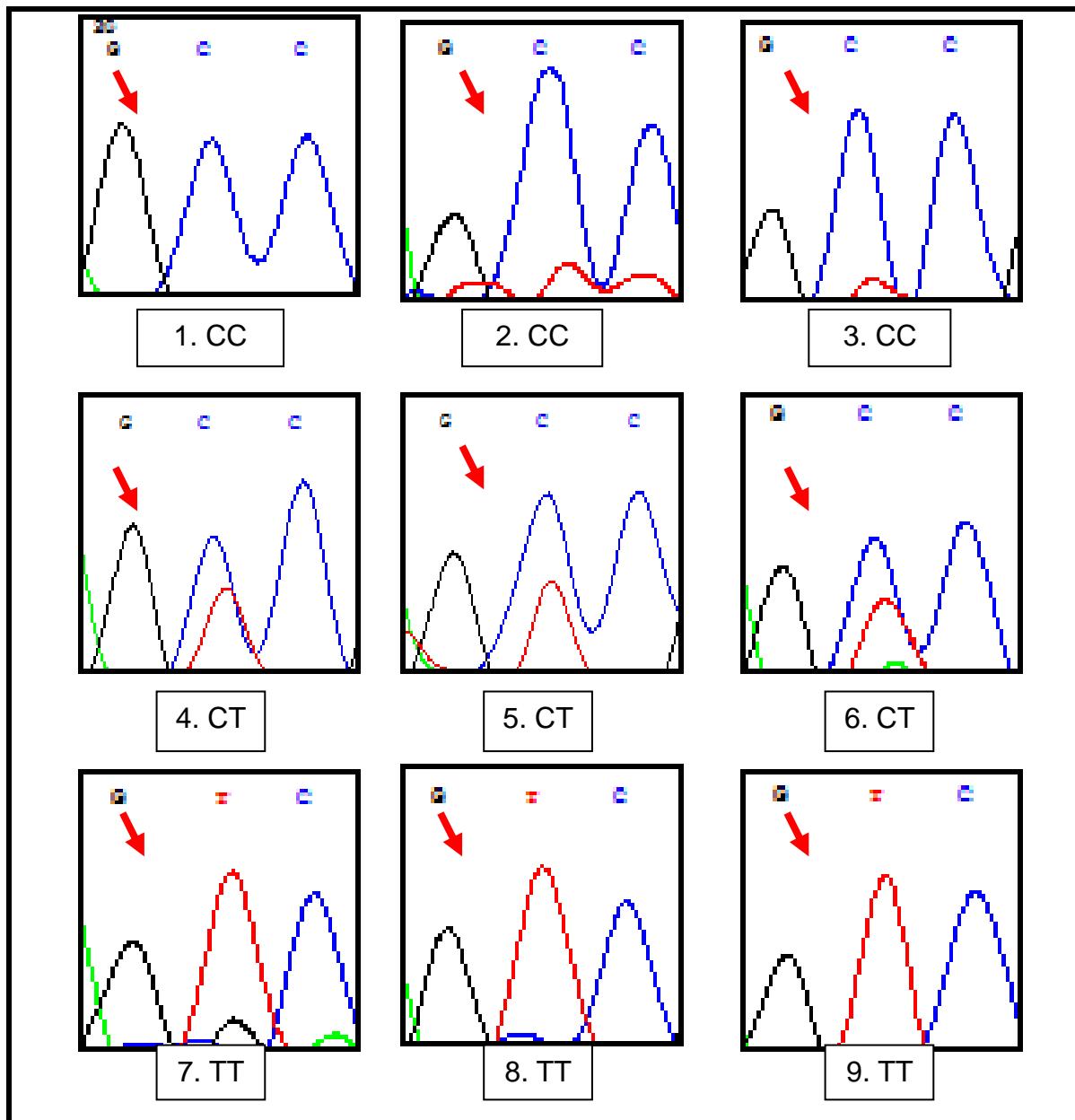
Na **Tabela 7** relacionamos todos os indivíduos com SNP na posição 677. Conforme descrito houve mudança no aminoácido codificado: com o SNP houve substituição do aminoácido alanina (A) para valina (V).

**Tabela 7** – Caracterização do SNP 677 de 17 pacientes AIJ e respectivo genótipo, atendidos no Hospital de Clínicas da UFU, no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011; descritos pelo método Clustal W, Uberlândia, 2012.

PACIENTE	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO	GENÓTIPO
01 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
02 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	TT
05 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	TT
07 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
11 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
12 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
14 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
15 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
16 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
21 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
24 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	TT
27 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
28 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	TT
29 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	TT
33 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
34 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT
37 ART	GTCGATTT (SNP C/T)	677 (665)*	CT

\* Localização real do SNP no gene *mthfr*.

A **Figura 11** mostra o cromatograma de amostras aleatórias a fim de apresentar os genótipos encontrados: CC, CT e TT.



**Figura 11** - Cromatograma ilustrativo do gene *mthfr* na posição 677. Os pacientes 1 a 3 são homozigotos (CC) para o SNP do gene *mthfr* na posição 677, os indivíduos de 4 a 6 são heterozigotos (CT) e os pacientes de 7 a 9 são homozigotos recessivos (TT) para o gene *mthfr*.

Para fins desta análise, os genótipos foram separados em dois grupos: homozigotos CC + heterozigotos CT e homozigotos TT; e também foram agrupados como homozigotos CC e heterozigotos CT + homozigotos TT uma vez que os genótipos CT + TT estão associados a uma redução da atividade enzimática, contrastando com a atividade dos portadores do genótipo CC.

A **Tabela 8** apresenta a frequência alélica e genotípica encontrada nos pacientes com AIJ e nos controles saudáveis. A frequência observada dos genótipos nos pacientes artríticos não foi diferente da frequência esperada demonstrando estar sob equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, nesta população.

**Tabela 8** - Associações univariadas das frequências dos alelos e genótipos para o polimorfismo no gene *mthfr* C677T em 38 indivíduos com AIJ e 22 controles saudáveis atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU; Uberlândia, 2012.

	Total (N%)	AIJ (N%)	Controle Saudável (N%)
<b>Alelo</b>			
C	47,5(79,16)	27(71,06)	20,5(93,18)
T*	12,5(20,84)	11(28,94)	1,5(6,82)
<b>Genótipo</b>			
CC	41(68,34)	21(55,26)	20(90,90)
CT	13(21,66)	12(31,58)	1(4,55)
TT	6(10,00)	5(13,16)	1(4,55)
<b>Genótipos Agrupados</b>			
CC + CT	54(90,00)	33(86,84)	21(95,45)
TT	6(10,00)	5(13,16)	1(4,55)
CC	41(68,34)	21(55,26)	20(90,90)
CT + TT**	19(31,66)	17(44,74)	2(9,10)

Teste Exato de Fisher

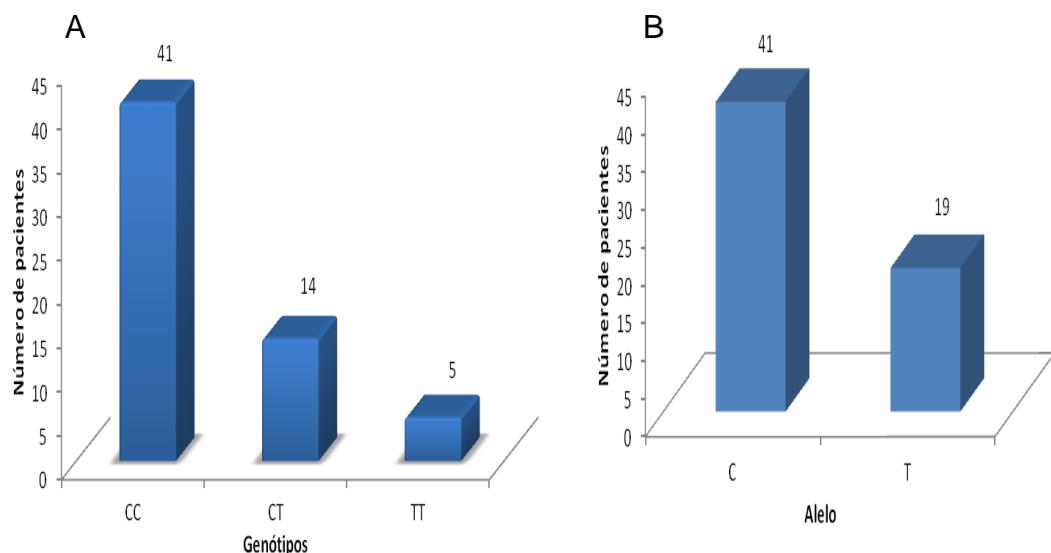
\* Odds Ratio = 8,55 ( $CI_{95\%} = 1,02-71,64$ ;  $p<0,0477$ );

\*\*Odds Ratio = 8,09 ( $CI_{95\%} = 1,65-39,61$ ;  $p<0,0098$ ).

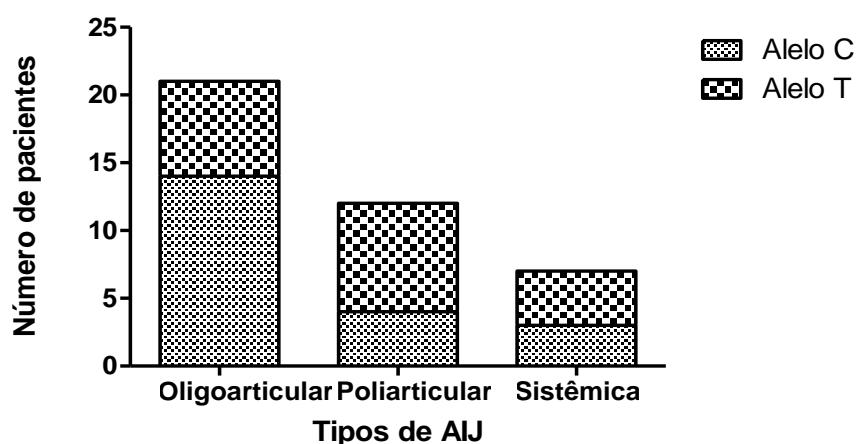
Na análise univariada das frequências de alelos e genótipos foi encontrada correlação significativa ao analisar a frequência do alelo T em pacientes artríticos ( $p<0,0477$ ,  $CI_{95\%} = 1,02-71,64$ ). A incidência do alelo T na população artrítica foi 8 vezes maior quando comparados com a população saudável. Na análise da frequência genotípica, indivíduos que carregam o alelo T são oito vezes mais predisponentes a AIJ quando comparados com os controles saudáveis ( $CI_{95\%} = 1,65-39,61$ ;  $p<0,0098$ ; O.R= 8,09).

A classificação dos indivíduos que compõem a amostra segundo os genótipos e alelos está representada na **Figura 12**. Dos 19 alelos 677TT, 17 são AIJ e 2 são controles saudáveis.

Na **Figura 13** está representada a classificação dos indivíduos artríticos segundo os alelos e os tipos de AIJ.



**Figura 12** - Classificação dos genótipos e alelos da posição 677 do gene da enzima codificadora MTHFR de pacientes atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU; Uberlândia, 2012.



**Figura 13** - Classificação dos pacientes artríticos (N=38) atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU conforme alelos do gene *mthfr* e tipos de AIJ, Uberlândia, 2012.

Na **Tabela 9** está descrito uma análise de contingência por meio do Teste de Qui-Quadrado onde se correlacionou pacientes artríticos alelo T e C quanto a resposta ao MTX.

**Tabela 9** - Análise da tabela de contingência dos alelos T e C (posição 677 do gene *mthfr*) em pacientes com AIJ, atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU, quanto à resposta ao metotrexato; Uberlândia, 2012.

	Não Respondedores	Respondedores	Total
Artríticos Genótipo CC	4 (10,52)	17 (44,74)	21 (55,26)
Artríticos Genótipo CT	4 (10,52)	8 (21,06)	12 (31,58)
Artríticos Genótipo TT	1 (2,64)	4 (10,52)	5 (13,16)
Total	9 (23,68)	29 (76,32)	38 (100)
CT + TT	5 (13,16)	12 (31,58)	
CC	4(10,52)	17 (44,74)	OR: 1,77*
TT	1 (2,64)	4 (10,52)	
CC + CT	8 (21,04)	25 (65,80)	OR: 0,78**

\* CI<sub>95%</sub> = 0,39-8,00; p<0,4577 (Teste Exato de Fisher);

\*\* CI<sub>95%</sub> = 0,07-8,04; p<0,8356 (Teste Exato de Fisher).

Não foi detectada correlação entre a frequência alélica e a resposta ao MTX (P>0,05).

#### 5.4.1.2 SNP em 678

Devido à realização do sequenciamento, foi possível detectar em três pacientes (dois AIJ e um controle saudável) um polimorfismo no gene *mthfr* na posição 678 ainda não relatado na literatura. O mesmo já foi ilustrado na **Figura 10**.

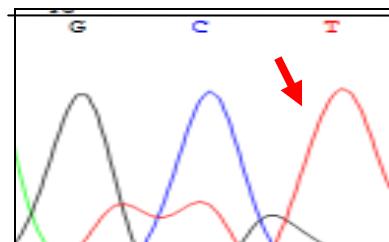
Na **Tabela 10** relacionamos todos os indivíduos com SNP na posição 678. Não houve alteração no aminoácido codificado.

**Tabela 10** – Caracterização da amostra de 03 pacientes atendidos pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFU conforme SNP encontrado no gene *mthfr* na posição 678, Uberlândia, 2012.

PACIENTE	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO	AMINOAC.	GENÓTIPO
08 ART	GCTGATT (SNP C/T)	678 (666)	A/A	TT
30 ART	GCTGATT (SNP C/T)	678 (666)	A/A	TT
08 CRT	GCTGATT (SNP C/T)	678 (666)	A/A	TT

Não houve correlação entre o SNP na posição 678 e todas as variáveis devido a frequência ser baixa, foi encontrado apenas em 2 pacientes com AIJ e 1 paciente controle saudável.

Na **Figura 14** mostra o cromatograma ilustrativo do gene *mthfr* na posição 678, sendo os três pacientes homozigóticos 678TT para o gene *mthfr*.



**Figura 14** - Cromatograma ilustrativo do gene *mthfr* na posição 678. A imagem mostra que o paciente é homozigótico (TT) para este SNP.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Avaliação descritiva das amostras

O serviço de Reumatologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Uberlândia realiza atendimento ambulatorial recebendo crianças e adolescentes encaminhados pela rede pública do município e regiões do entorno. É referência no atendimento de Reumatologia para a região. O presente estudo foi composto por 38 indivíduos que recorreram ao serviço de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011 e outros 22 indivíduos que compareceram ao ambulatório de Pediatria para consultas de rotina no ano de 2011. Constitui-se como um serviço de saúde pública que presta assistência ambulatorial pediátrica por meio de consultas agendadas e ações de prescrição.

O estudo mostrou que compuseram a amostra indivíduos entre três e vinte e dois anos, sendo 76,5% com AIJ do gênero feminino de modo semelhante aos estudos já publicados (PRAHALAD & GLASS, 2008; BECKER et al., 2011; TASBAS et al., 2011). Não há relatos justificando a ocorrência três vezes maior de AIJ em crianças do sexo feminino, estudos posteriores deverão ser feitos a fim de correlacionar esta incidência com fatores ainda obscuros.

Quanto à distribuição racial, no presente estudo observou-se igualdade para o acometimento nos grupos raciais analisados. Na literatura não há relatos de haver predomínio racial, apenas variações devido à regionalização dos estudos (KULAS, 2001; SCHNEIDER & PASSO, 2002). Devido o Brasil ser um país com mistura de raças, torna-se inviável a construção de estudos que almejem a correlação entre raça e etnias (ALVES et al., 2005).

De acordo com a classificação da AIJ segundo ACR observamos que o subtipo mais encontrado entre os pacientes com AIJ foi o oligoarticular sendo o responsável por 55,3% dos casos conforme observado em estudos conduzidos na Itália, Turquia e outros países (SULLIVAN, 2005; FERNANDES, 2006; WALLACE et al., 2005; TASBAS et al., 2011).

Estudos sobre a idade de início da AIJ mostram pico de incidência no segundo ano de vida, não sendo semelhante neste estudo, onde o maior pico aconteceu no quarto ano de vida (FERRIANI, 2008; SANTOS, 2006). Uma

explicação para este achado é que, apesar da doença ser relatada há anos, a ausência de exames diagnósticos específicos dificultam a classificação precoce dos sintomas da AIJ permanecendo tardio seu diagnóstico.

Em relação à terapêutica medicamentosa, a droga de escolha no tratamento da AIJ foi o MTX (86,84) e apenas 13,16% dos pacientes tratados com MTX apresentaram exacerbação de eventos adversos, sendo necessário optar-se pela mudança da droga. Estudos confirmam que o MTX é a primeira droga de escolha no tratamento da AIJ por apresentar como benefícios baixo custo, redução progressiva da doença ativa e preservação das articulações, apesar da grande variabilidade na resposta clínica (FOELL et al., 2004; FRANSEN et al., 2004; LEE et al., 2009; STAMP et al., 2009, STAMP et al., 2010; BULATOVIC, 2011; HOLB et al., 2012, RANTALAIHO et al., 2012).

Os pacientes com AIJ podem apresentar sequelas graves principalmente físicas e emocionais. O presente estudo revelou que 60,5% dos pacientes com o diagnóstico de AIJ não praticavam atividade física e destes 65,22% foram classificados como oligoarticulares. Este dado é preocupante devido à maioria dos pacientes apresentarem a forma inicial da doença com pouca restrição de movimentos articulares, porém representam a grande maioria dos indivíduos não praticantes de atividade física podendo comprometer suas articulações no futuro (SANTOS, 2006; RAVELLI & MARTINI, 2007).

## 6.2 Avaliação dos dados laboratoriais

Os achados laboratoriais são parâmetros usados a fim de analisar a atividade da doença e os efeitos colaterais da terapêutica medicamentosa. Os autoanticorpos são descritos na AIJ, mas apenas o FAN e FR têm particular importância. No presente estudo a análise dos dados laboratoriais revelou que metade dos pacientes apresentavam positividade para FAN sendo que somente 55,30% apresentavam positividade para FR, porém não houve associação significante entre a presença de FAN/FR e os alelos polimórficos ( $p>0,05$ ). Segundo Flato (FLATO et al., 2002), há relação entre a positividade do FR com um pior prognóstico para os pacientes.

As provas de fase aguda avaliam de forma inespecífica a intensidade da inflamação. A VHS é uma prova inespecífica para avaliar a atividade da AIJ. De

acordo com a literatura o valor de referência para VHS é >20mm na 1<sup>a</sup> hora (RAMOS et al., 2006). No presente estudo houve associação altamente significativa entre o valor de VHS nos pacientes artríticos e o diagnóstico ( $p<0,05$ ). Este dado está presente na literatura e revela que no momento da realização do exame havia atividade inflamatória, dado este que não encontramos no grupo dos pacientes controles saudáveis (WALLACE et al., 2005).

Não houve associação significativa em relação ao diagnóstico nos seguintes dados laboratoriais: contagem de plaquetas ( $p>0,824$ ), contagem de leucócitos ( $p>0,420$ ) e exames para função hepática como TGO ( $p>0,683$ ) e TGP ( $p>0,102$ ). Diversos estudos tendem a relatar alterações bioquímicas nos exames principalmente de função hepática devido à terapêutica medicamentosa com o MTX ocasionar disfunções em órgãos como fígado e possibilidade de apresentar plaquetose (YANAGIMACHI et al., 2011). Portanto os pacientes que compuseram a amostra mantiveram preservadas suas funções.

Na análise do hemograma, os níveis de hemoglobina (HB) e hematócrito (HT) mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis 12 a 16g/dl e 35% a 45% respectivamente, havendo correlação significativa entre estes dados e o diagnóstico. Esses dados são semelhantes aos observados por BISOTTO (2005). Os pacientes atendidos no ambulatório de Reumatologia são frequentemente avaliados e todos seus exames são realizados periodicamente a fim de evitar que alterações bruscas possam comprometer sua saúde física.

Os exames para análise de disfunção renal, entre eles, a ureia e a creatina, não apresentaram valores acima dos limites aceitáveis e, portanto os pacientes, apesar da terapêutica com o MTX, não tiveram sua função prejudicada mesmo com a correlação estatística significativa presente.

### **6.3 Genotipagem do polimorfismo C677T do gene *mthfr***

A posição 677 do polimorfismo relatado no estudo foi assim denominada por Frosst et al (1995), que utilizou um “linker sintético” e nomeou o SNP encontrado a partir deste linker gerando discussões em relação a posição 677 relatada nos estudos, na ausência deste fragmento sintético a posição do polimorfismo seria 665. De acordo com as recomendações do *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI) todas as demais descobertas de novos SNP's deverão ser nomeadas a partir deste posicionamento (677), evitando assim mudanças na literatura. Código de acesso no GenBank: U09806.

Polimorfismo C677T no gene *mthfr* está associado a eventos adversos na presença de MTX (VAN EDE, et al., 2001), porém em alguns estudos não houve correlação do genótipo com os eventos adversos (WESSELS, et al, 2006; MATTIA & TOFFOLI, 2009; TASBAS, et al, 2011; YANAGIMACHI et al, 2011). Esta discrepância pode ser explicada pelo número de pacientes que compõe a amostra ser reduzido devido a uma baixa incidência de AIJ na população, de modo geral em torno de 0.8% (KULAS, 2001; MANNERS & BOWER, 2002). No Brasil não há estudos representativos, apenas estudos de caso. No período de 2010 a 2011 foram atendidos no ambulatório do Hospital de Clínicas de Uberlândia, 220.035 pacientes, sendo que apenas 0,002% com AIJ ( dado estimado da Universidade Federal de Uberlândia). No presente estudo foram analisados as frequências do polimorfismo C677T em pacientes com AIJ e controles saudáveis em relação ao diagnóstico de artrite. Uma diferença significativa foi observada na distribuição do alelo T entre os pacientes com AIJ e os pacientes controles saudáveis ( $p < 0,0477$ ,  $CI_{95\%} = 1,02-71,64$ ; O.R= 8,55). A incidência do alelo T na população artrítica foi 8 vezes maior quando comparados com a população saudável. Na análise da frequência genotípica, indivíduos que carregam o alelo T são oito vezes mais predisponentes a AIJ quando comparados com os controles saudáveis ( $CI_{95\%} = 1,65-39,61$ ;  $p < 0,0098$ , O.R= 8,09). Estudos epidemiológicos sugerem que o polimorfismo do gene da enzima MTHFR, C677T, pode modificar o risco para a ocorrência de alguns tipos de doenças, mas ainda não foi relatada na literatura a associação com a AIJ (HORIUCHI et al., 2009; LIEW et al.,2012).

Não houve associação estatisticamente significativa entre a resposta terapêutica e a frequência alélica ( $p > 0,05$ ). Diversos estudos retratam a toxicidade do MTX em pacientes polimórficos 677T, porém muitos com resultados contraditórios (WESSELS, et al, 2006; MATTIA & TOFFOLI, 2009; TASBAS, et al, 2011; YANAGIMACHI, 2011). É válido lembrar que o gene MTHFR não está relacionado diretamente a produção de eventos adversos por não ser um gene detoxificante, porém pode estar envolvido no aumento ou redução de algum

substrato que contribui para a ocorrência da toxicidade. Esta é uma das razões encontradas pelo grande número de resultados controversos na literatura quando mencionam-se a utilização de MTX na presença de polimorfismo genético pertencentes a cadeia do folato (TESSIER & HARAOUI, 2010; YANAGIMACHI et al, 2011).

Na análise da amostra estudada foi encontrado que existem mais casos com alelo polimórfico (T) na população com AIJ. A frequência genotípica encontrada foi: 55,26% dos pacientes CC, 31,58% dos pacientes CT e 13,16% TT. Este resultado difere da maioria dos estudos que mostram uma maior ocorrência de genótipos heterozigóticos e uma incidência em torno de 8% do alelo T nas populações estudadas (KREMER, 2004; BECKER, 2011).

Em diversos estudos há a afirmativa que o alelo polimórfico (T) pode causar redução na atividade enzimática da enzima MTHFR levando a hiperhomocisteinemia que representa um fator de risco cardiovascular. Isto ocorre devido o alelo T possuir características termolábeis (LIEW et al., 2012). Nestes pacientes a terapêutica com o MTX pode ocasionar alterações de remetilação da Hcy e seu acúmulo é seguido de efeitos gastrintestinais indesejáveis. A presença de SNP's pode provocar variabilidade na resposta clínica exacerbando os eventos adversos (HUGHES et al., 2006; STAMP et al., 2009). No presente estudo não houve associação alélica e genotípica quanto à resposta terapêutica ao MTX contradizendo os resultados de Holb (HOLB et al., 2012), que mostram que a medição das concentrações de MTX é um instrumento adequado podendo ser um indicador potencial para a resposta clínica servindo como marcador para monitorização da droga e redução de intolerabilidade ao fármaco.

Portanto, no presente estudo foi observada associação entre o polimorfismo C677T de MTHFR e a AIJ. Não há indícios na literatura da associação entre a predisposição à ocorrência de AIJ e polimorfismos C677T de *MTHFR*, porém verifica-se que a AIJ é significativamente afetada pelo polimorfismo no gene da enzima MTHFR nesta região genômica.

#### **6.4 Genotipagem do polimorfismo C678T do gene *mthfr***

No presente estudo, além do polimorfismo C677T já relatado na literatura, foi observado outro polimorfismo (C678T), ainda sem registros na literatura e nem depósitos no *NCBI*. Apenas três pacientes apresentaram este SNP, por este motivo não houve correlação com os dados do estudo. Na posição 678 houve, portanto, uma substituição de um nucleotídeo C por T, porém não há impacto clínico visto não ter modificado o aminoácido codificado.

A nova proposta do estudo é coletar células dos pacientes polimórficos (TT e CT) e dos pacientes não polimórficos (CC) para o gene *mthfr* e tratá-las com folato. Após esta etapa prosseguiremos com a quantificação dos níveis de Hcy e realizaremos a associação com as principais variáveis.

## CONCLUSÃO

A partir da análise e discussão dos dados apresentados neste estudo podemos concluir que:

- Houve associação significativa entre a frequência alélica e genotípica do gene *mthfr* na posição 677 e o diagnóstico de AIJ, mostrando que o gene é predisponente para a artrite.
- Houve diferença estatisticamente significativa ao correlacionar alguns dados clínicos e laboratoriais de pacientes controles saudáveis e com AIJ.
- Não houve correlação dos dados clínicos e laboratoriais e a presença do polimorfismo genético.
- Não foi encontrada associação entre a resposta terapêutica ao uso do MTX e a ocorrência de exacerbação dos eventos adversos/intolerância a droga.
- A AIJ foi significativamente afetada pela mutação no gene MTHFR na região genômica C677T. O aumento da prevalência de genótipos CT e TT em pacientes com AIJ indicou um efeito de dominância do alelo T. No entanto, este polimorfismo não estava associado com intolerância MTX, o que sugere que a acumulação de substrato não está relacionada com a incapacidade do paciente para sequestrar MTX e prevenir a desintoxicação celular.

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, P; NAIK, S; MISHRA, K. P; AGGARWAL, A; MISRA, R. Correlation between methotrexate efficacy and toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian Journal of Medical Research*, v.124, p. 521-526, 2006.

ALVES, C; FORTUNA, C.M.M; TORALLES, M.B.P. A aplicação e o conceito de raça em Saúde Pública: definições, controvérsias e sugestões para uniformizar sua utilização nas pesquisas biomédicas e na Prática Clínica. *Gazeta Médica Bahia*, v.75, n.1, p.92-115, 2005.

BAIGU, W; SONGBIN, F; GUIYINZ, P. Study of the relationship between psoriasis and the polymorphic site C677T of the methylenetetrahydrofolate reductase. *Chinese Medical Sciences Journal*, v.15, n. 2, p. 119-120, 2000.

BECKER, M. L; et al. The effect of genotype on Methotrexate polyglutamate variability in juvenile idiopathic arthritis and association with drug response. *Arthritis & Rheumatism*, v.63, n. 1, p. 276-285, 2011.

BERKUN, Y; et al. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 63, n, 10, p. 1227-1231, 2004.

BISOTTO, L. S. Parâmetros nutricionais na Artrite Idiopática Juvenil. 2005. 97f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Acesso em: Setembro 2012.

BRADLEY, A; LOSCALZO, M; LOSCALZO, J. The treatment of hyperhomocysteinemia. *Annual Review of Medicine*, v. 60, p. 39-54, 2008.

BRENOL, C. V. Avaliação de polimorfismo inserção/deleção de 14 pb do gene HLA-G na expressão clínica e resposta terapêutica ao metotrexato na artrite reumatóide. 2010. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BREWER, E. J. JR; et al. Current proposed revision of JRA criteria. *Arthritis & Rheumatism*, v. 20, n. 2, p. 195-199, 1997.

BULATOVIC, M; et al. High prevalence of methotrexate intolerance in juvenile idiopathic arthritis: development and validation of methotrexate intolerance severity score. *Arthritis & Rheumatism*, v. 63, n. 7, p. 2007-2013, 2011.

CHAN, E.S.L; CRONSTEIN, B.N. Molecular action of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *Archives of Disease in Childhood*, v. 88, n. 3, p. 197-200, 2003.

CHAN, E.S.L; CRONSTEIN, B.N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*, v. 4, n. 4, p. 266-273, 2002.

CHROMAS. Software for DNA sequencing. Version Lite 2.1. Copyright, 1998/2012. 1 CD-ROM.

CLUSTAL W. Align sequences using ClustalW2. Disponível em:  
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>. Acesso em: Setembro 2012.

DERVIEUX, T; WEINBLATT, M; KIVITZ, A; KREMER, J.M. Methotrexate polyglutamation in relation to infliximab pharmacokinetics in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012. Disponivel em:  
<HTTP://ard.bmjjournals.org/content/early/2012/11/16/annrheumdis-2012-202595.abstract>  
Acesso em: Janeiro 2013.

DERVIEUX, T; GREENSTEIN, N; KREMER, J.M Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 54, n. 10, p. 3095-3103, 2006.

DERVIEUX, T; et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 50, n. 9, p. 2766-2774, 2004.

DULUCQ, S; et al. DNA variants in the dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood*, v. 111, n. 7, p. 3692-3700, 2008.

EXPASY Bioinformatics Resource. Disponível em:  
<http://www.web.expasy.org/translate>. Acesso em: Dezembro 2012.

FERNANDES, T. A. P. Um estudo de coorte para o prognóstico da artrite idiopática juvenil. 2006. 86f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

FERRIANI, V. P. L. Artrite Idiopática Juvenil. In: Júlio César Voltarelli. (Org.). Imunologia Clínica na Prática Médica. 1 ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 637-649, 2008.

FISHER, M. C; CRONSTEIN, B. N. Metaanalysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate. *The Journal of Rheumatology*, v. 36, p. 539-545, 2009.

FLATO, B.L; et al. Prognostic factors in juvenile rheumatoid arthritis: a case-control study revealing early predictors and outcome after 14,9 years. *The Journal of Rheumatology*, v.30, p. 386-393, 2002.

FOELL, D; FROSCH, M; WIESCH, A.S.Z; VOGL, T; SORG, C; ROTH, J. Metotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis: when is the right time to stop? *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 63, n. 1, p. 206-208, 2004.

FRANSEN, J; LAAN, R.F.J.M; VAN DER LAAR, M.A.F.J; HUIZINGA, T.W.J; VAN RIEL, P.L.C.M. Influence of guideline adherente on outcome in a randomised controlled trial on the efficacy of methotrexate with folate supplementation in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 63, p. 1222-1226, 2004.

FROSST, H. J; et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, v.10,111-113, 1995.

GENETICS HOME REFERENCE. Your guide to understanding genetic conditions. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>. Acesso em: Outubro 2012.

GOLDRING, S.R. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 14, n. 4, p. 406-410, 2002.

GOYETTE, P; et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genetics*, v. 7, p. 195-200, 1994.

GOULART, I.M; CARDOSO, A.M; SANTOS, M.S; GONCALVES,M.A; PEREIRA, J.E; GOULART,L.R. Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicons size. *Archives Dermatology Research*, v. 299, n. 5-6, p. 267-271, 2007.

GUECHEVA, T.N; HENRIQUES, J.A.P. Metabolismo de xenobióticos: citocromo p450. *Genética Toxicológica*, p. 225-247, 2003.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/WT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98.

HAYWARD, K; WALLACE, C.A. Recent developments in anti-rheumatic drugs in pediatrics: treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 11, n. 1, p. 216-222, 2009.

HOLB, E.L et al. A short-chain metotrexate polyglutamate as outcome parameter in rheumatoid arthritis patients receiving methotrexate. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 30, p. 156-163, 2012.

HORIUCHI, T; et al. Combination of TNF-TII, CYP 1<sup>a</sup>1 and GSTM1 polymorphism and the risk of Japanese SLE: findings from the KYSS study. *Rheumatology (Oxford)*, v. 48, p. 1045-1049, 2009.

HORNUNG, N; ELLINGSEN, T; ATTERMANN, J; PEDERSEN, K.S; POULSEN, J.H. Patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate (MTX): concentrations of steady-state erythrocyte MTX correlate to plasma concentrations and clinical efficacy. *The Journal of Rheumatology*, v. 35, 1709-1715, 2008.

HUGHES, L.B; et al. Racial or ethnic differences in allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 65, p. 1213-1218, 2006.

IZMIRLI, M. A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. *Molecular Biology Reports*, v. 40, n. 1, p. 625-637, 2013.

IWAMOTO, V; SANTOS, S.H.P; SHARE, T.L; SPELLING, P.F Avaliação do estresse psicológico do cuidador primário do paciente com artrite idiopática juvenil. *Journal of Pediatrics*, v. 84, n. 1, p. 91-94, 2008.

KREMER, J.M. Methotrexate pharmacogenomics. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 65, n. 9, p. 1121-1123, 2006.

KREMER, J.M. Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis & Rheumatism*, v. 50, n. 5, p. 1370-1382, 2004.

KULAS, D.S.L. Juvenile idiopathic arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 13, n. 5, p. 392-398, 2001.

LAMPRECHT, S.A, LIPKIN,M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate molecular mechanisms. *Nature Revision Cancer*, v.3, p. 601-614, 2003.

LEE, Y.C; CUI, J; COSTENBADER, K.H; SHADICK, N.A; WEINBLATT, M.E; KARLSON, E.W. Investigation of candidate polymorphisms and disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Rheumatology*, v.48, p. 613-617, 2009.

LIEW, S.C; Gupta, E.D; WONG, S.F; LEE, N; SADFAR,N; JAMIL, A. Association of Methylentetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 677 C > T gene polymorphism and homocysteine levels in psoriasis vulgaris patients from Malaysia: a case-control study. *Nutrition Journal*, v. 11, n.1, p. 1-7, 2012.

LOPES, A. Análise do Polimorfismo C677T da Metilenotetraidrofolato Redutase em Pacientes com Episódio de Trombose Venosa. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LUBRAND, E; SCARPA, R. Psoriatic arthritis: treatment strategies using anti-inflammatory drugs and classical DMARD's. *Reumatismo*, v. 64, n. 2, p. 107-112, 2012.

MA, E; et al. Dietary intake of folate, vitamin B<sub>6</sub>, and vitamin B12, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC Cancer*, v. 9, n. 2, p. 122-131, 2009.

MACHADO, C; RUPERTO, N. Consenso em Reumatologia Pediátrica Parte I  
Definição dos critérios de doença inativa e remissão em artrite idiopática juvenil.  
*Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 45, n. 1, p. 9-15, 2005.

MAIA, Y.C.P. Fatores clínicos, comportamentais, nutricionais, polimorfismo C677T do gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e risco de câncer de mama. 2007. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

MANNERS, P.J; BOWER, C. Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? *The Journal of Rheumatology*, v. 29, n. 7, p. 1520-1530, 2002.

MARKAN, S; SACHDEVA, M; SEHRAWAT, B.S, KUMARI, S; JAIN, S; KHULLAR, M. MTHFR 677 CT/MTHFR 1298 CC genotypes are associated with increased risk of hypertension in Indians. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 302, p. 125-131, 2007.

MARTIN, P; MEDEIROS, A.C; SCHAINBERG, C.G. The role of tumor necrosis factor inhibitors in the treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 46, n. 2, p. 126-133, 2006.

MARTINEZ, T.S; FIGUEIRA, M.M; COSTA, A.V; GONCALVES,M.A; GOULART,L.R; GOULART,I.M. Oral mucosa as a source of Mycobacterium leprae infection and transmission and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clinical Microbiology and Infection*, n. 17, v. 11, p. 1653-1658, 2011.

MATTIA, E; TOFFOLI, G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalization. *European Journal of Cancer*, v. 45, p. 1333-1351, 2009.

MENA, et al. Polymorphisms C677T and 1298C in the MTHFR gene in Mexican patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: implication in with elevation of transaminases. *Pharmacogenomics Journal*, v.11, p. 287-291, 2011.

MIOSSEC, P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 16, n. 3, p. 218-222, 2004.

MOTA, L.M.H. Atualização em Reumatologia: Artrite Reumatóide Inicial. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 48, n. 6, p. 360-365, 2008.

MONTICIELO, O.A; et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systematic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 19, p. 280-287, 2010.

NEVES, C; JORGE, R; BARCELOS, A. A teia de toxicidade do metotrexato. *Acta Reumatológica Portuguesa*, v. 34, n. 1, p. 11-34, 2009.

PETTY, R.E, et al. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v. 25, p. 1991-1997, 1998.

PETTY, R.E; SOUTHWOOD, T.R; MANNERS, P; BAUM J; GLASS, D.N; GOLDENBERG, J. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis second revision. *The Journal of Rheumatology*, v. 31, n. 5, p. 390-392, 2004.

PINCUS, T; YAZICI, Y; SOKKA, T; ALETAHA, D; SMOLEN, J.S. Methotrexate as the “anchor drug” for the treatment of early rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 21 n. 31, p. 179-185, 2003.

PRAHALAD, S; GLASS, D.N. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric Rheumatology Online Journal*, v. 11, n. 6, p. 1-16, 2008.

RAMOS, V.C.S; RONCHEZEL, M.V; OKUDA, E.M; SACCHETTI, S.B. Caracterização epidemiológica, clínica e laboratorial de 100 crianças com artrite reumatóide juvenil. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 24, n. 4, p. 335-342, 2006.

RANGANATHAN, P, et al. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v. 35, p. 572-579, 2008.

RANTALAIHO, V; PWOLAKKA, K; KORPILA, M; HANNONEN, P; MOTTONEN, T. Long term results of the FIN-RACo trial, treatment with a combination of traditional disease-modifying anti-rheumatic drugs is an excellent option in early rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 30 (suppl. 73), p. S27-S31, 2012.

RASSOUL, F; RICHTER, V; HENTSCHEL, B; GEISEL, J; HERRMANN, W; KUNTZE, T. Plasma homocysteine levels & 677C→T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with coronary artery disease of different severity. *Indian Journal of medical Research*, v.127, n. 2, p. 154-158, 2008.

RAU, R; HERBON, G. Benefit and risk of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 22, n. 35, p. 83-94, 2004.

RAVELLI, A; MARTINI, A. Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet*, v. 369, p. 767-778, 2007.

ROCHA, A.P; MAGALHÃES, P.K.R; MAIA, A.L, MACIEL, L.M.Z. Polimorfismos Genéticos: Implicações na Patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 51, n. 5, p. 723-730, 2007.

RUPERTO, N; et al. A randomized trial of parenteral methotrexate comparing an intermediate dose with a higher dose in children with juvenile idiopathic arthritis who failed to respond to standard doses of methotrexate. *Arthritis & Rheumatism*, v. 50, n. 7, p. 2191-2201, 2004.

SANTOS, F.P.S.T. Caracterização dos pacientes com diagnóstico de artrite idiopática juvenil do serviço de reumatologia do Hospital de Clínicas da UFMG com avaliação dos fatores determinantes do prognóstico. 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SAYAH, A; ENGLISH, J.C. Rheumatoid arthritis: A review of the cutaneous manifestations. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 53, n. 3, p. 191-209, 2005.

SAZCY, A; ERGUL, E; KAYA, G; KARA, I. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochemistry and Function*, v. 23, n. 1, p. 51-54, 2005.

SCHMELING, H; BIBER, D; HEINS, S; HORNEFF, G. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on efficacy and toxicity of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 2005, v. 32, n. 9, p. 1832-1836, 2005.

SCHNEIDER, R; PASSO, M.H. Juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v. 28, n. 1, p. 503-530, 2002.

SIZOVA, L. Approches to the treatment of early rheumatoid arthritis with disease-modifying antirheumatic drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 66, n. 2, p. 173-178, 2008.

SILVA, M.R. Polimorfismo do gene da tiopurina metiltransferase (TPMT) em uma população de crianças e adolescentes com Leucemia Linfocítica Aguda. 2007. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOLIMAN, M. M; et al. Impact of concomitant use of DMARD's on the persistence with anti-TNF therapies in patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 70, n. 4, p. 583-589, 2011.

STAMP, L; et al. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis & Rheumatism*, v. 60, n. 8, p. 2248-2256, 2009.

STAMP, L; et al. Methotrexate polyglutamate concentrations are not associated with disease control in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate therapy. *Arthritis & Rheumatism*, v. 62, n. 2, p. 359-368, 2010.

STAMPFER, M.J, et al. Polymorphisms of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, v. 8, n. 9, p. 825-829, 1999.

STERN, L.L; SELHUB, J; CHOI, S.W. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, v. 9, n. 8, p. 849-853, 2000.

SULLIVAN, K.E. Inflammation in juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric Clinics of North America*, v. 52, p. 335-357, 2005.

TASBAS, O; BORMAN, P; KARABULUT, H.G; TURKUN, A; YORGANCI OGLU, R. The frequency of A1298C and C677T polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate gene in Turkish patients with rheumatoid arthritis: relationship with metotrexate toxicity. *The Open Rheumatology Journal*, v. 5, p. 30-35, 2011.

TESSIER, J.B; HARAOUI, B. Methotrexate drug interactions in the treatment of Rheumatoid Arthritis: a systematic review. *Journal of Rheumatology*, v. 37, p. 1416-21, 2010.

THE BIO WEB. Resources for cell and molecular biologists. Disponível em: <http://www.cellbiol.com/scripts/complement>. Acesso em: Setembro 2012.

TOFFOLI, G; VERONESI, A; BOIOCCHI, M; CRIVELLARI, D. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). *Annals of Oncology*, v. 11, n. 2, p. 373-375, 2000.

TSE, S.M.L; LAZER, R.M. Juvenile spondyloarthropathy. *Current Opinion in Rheumatology*, v.31, n. 2, p. 390-392, 2003.

ULRICH, C.M; et al. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood*, v. 98, n. 1, p. 231-234, 2001.

VAN EDE, A.E; et al. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 41, p. 658-665, 2002.

VAN EDE, A.E; et al. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Arthritis & Rheumatism*, v. 44, n. 11, p. 2525-2530, 2001.

VAN DER PUT, N.M.J; ESKES, T.K.A.B; BLOM, H.J. Is the common 677CT mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Q Journal Medical*, v. 90, p. 111-115, 1997.

WALLACE, C.A; HUANG, B; BANDEIRA, M; RAVELLI, A; GIANNINI, E.H. Patterns of clinical remission in select categories of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 52, p. 554-562, 2005.

WEGER, W; et al. 677 C>T gene polymorphism is not associated with chronic plaque psoriasis. *Experimental Dermatology*, v. 17, n. 9, p. 798-751, 2008.

WEISMAN, M.H; et al. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 54, n. 2, p. 607-612, 2006.

WEISS, J.E; ILOWITE, N.T. Juvenile Idiopathic Arthritis. *Pediatric Clinics of North America*, v. 52, p. 413-442, 2005.

WESSELS, J.A.M; et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis & Rheumatism*, v. 54, n.4, p. 1087-1095, 2006.

WESSELS, J.A, HUIZINGA, T.W.; GUCHELAAR, H.J. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 47, n. 3, p. 249-255, 2008.

WESTLAKE, S.L; et al. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 49, n. 2, p. 295-307, 2009.

WILSON, A; et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (Vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 67, p. 317-323, 1999.

WILKINSON, J.T, CLAPPER, M.L. Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 216, p. 192-200, 1997.

WOO, P. The growth of pediatric rheumatology. *British Journal of Rheumatology*, v. 36, n. 7, p. 721-728, 1997.

WHITTLE, S.L; HUGHES, R.A. Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumatology*, v. 43, p. 267-271, 2004.

YANAGIMACHI, M; et al. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 71, n. 2, p. 237-243, 2011.

## ANEXO A



### Universidade Federal de Uberlândia Instituto de Genética e Bioquímica Laboratório de Nanobiotecnologia

Campus Umuarama – Bloco 2E, Sala 24  
38400-902 - Uberlândia-MG - FONES: (034) 3218-2478 – ueira@ingeb.ufu.br

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Correlação entre polimorfismos genéticos em genes relacionados ao metabolismo do folato em pacientes com Artrite Idiopática Juvenil e o uso de Metotrexato” sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. Carlos Ueira Vieira, Dr. Carlos Henrique Martins da Silva, Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Dra. Yara Cristina de Paiva Maia e Ayla Dayane de Faria Aguiar. Espera-se que, com este estudo seja possível detectar a correlação entre variação genética e fatores comportamentais, nutricionais e clínicos presentes em pacientes com Artrite Idiopática Juvenil em utilização de Metotrexato. Almeja-se com o estudo, auxiliar na minimização dos eventos adversos presentes no tratamento contra a doença.

Nesta pesquisa você poderá se encaixar em um dos dois grupos seguintes: Grupo 1 (com AIJ) e Grupo 2. Nesta pesquisa você deverá responder a um questionário, que será aplicado pela equipe no dia da consulta no hospital e será coletada uma amostra de sangue (5mL) sem nenhum desconforto adicional para você. Estes materiais serão enviados para o Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia para extração de DNA.

A partir da análise dos resultados destes dados é que pesquisaremos quais alterações genéticas podem resultar do uso de Metotrexato e os fatores nutricionais, comportamentais e clínicos individuais que podem influenciar no desenvolvimento de eventos adversos como os polimorfismos. O material coletado para este estudo receberá um código e apenas o professor Dr. Carlos Ueira Vieira saberá a origem do mesmo.

Este material será utilizado apenas para os estudos descritos acima e ao final, será descartado. Em nenhum momento desse estudo, as pessoas que estarão trabalhando com este material saberão que é seu, garantindo o sigilo de seus dados. Nenhuma outra pessoa, que não aquelas envolvidas no presente projeto, terão acesso aos dados individuais gerados por esta pesquisa. Os resultados deste trabalho serão publicados em veículos de divulgação científica (revistas especializadas e congressos) garantindo-se o anonimato dos participantes. Sua participação ou não neste estudo não influenciará de nenhuma forma no tipo e na qualidade do atendimento médico que a você está recebendo ou poderá receber no futuro. Você poderá solicitar aos pesquisadores, a qualquer momento, o seu desligamento do estudo e a retirada dos seus dados. Você poderá ter conhecimento, se quiser e no momento que desejar, dos resultados da avaliação genética.

É através deste tipo de pesquisa e da divulgação dos resultados, que esperamos descobrir a existência de fatores que contribuem para o agravamento dos efeitos adversos no tratamento contra a artrite reumatóide. Sua participação poderá ajudar a melhorar os conhecimentos necessários para um melhor orientar programa de tratamento com eficácia elevada e com minimização dos efeitos indesejáveis. Vale dizer que você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com a senhora.

Caso você queira se informar de mais detalhes sobre a pesquisa agora, ou no futuro, poderá entrar em contato com a equipe de pesquisadores: Dr. Carlos Ueira Vieira, Dr. Carlos Henrique Martins da Silva, Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Dra. Yara Cristina de Paiva Maia e Ayla Dayane de Faria Aguiar. Endereço: Universidade Federal de Uberlândia-Instituto de Genética e Bioquímica-Lab. de Nanobiotecnologia - Campus Umuarama - Bloco 2E, Sala 24 – CEP: 38400-902, Uberlândia, MG. Telefone de contato: (34) 3218-2478.

Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética na Universidade Federal de Uberlândia CEP/UFU, localizado na Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J,Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-3239-4131.

Uberlândia, ..... de ..... de 20....

---

Assinatura do pesquisador que coletará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da pesquisa ou representante legal

## ANEXO B



**Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Laboratório de Nanobiotecnologia**

---

Campus Umuarama – Bloco 2E, Sala 24  
38400-902 - Uberlândia-MG - FONES: (034) 3218-2478 – ueira@ingeb.ufu.br

---

### **TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA O MENOR**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo estudar a correlação entre variação genética e fatores comportamentais, nutricionais e clínicos presentes em pacientes com Artrite Idiopática Juvenil em utilização de Metotrexato. Almeja-se com o estudo, auxiliar na minimização dos eventos adversos presentes no tratamento contra a doença.

Você está sendo esclarecido dos desconfortos e riscos possíveis, assim como a metodologia empregada, os benefícios esperados e sobre a quantidade de sangue necessária para realização do trabalho (5,0 mL). Você também está sendo comunicado que será esclarecido a qualquer momento do andamento da pesquisa, sobre os resultados obtidos, bem como qualquer dúvida, desde que seja solicitado por você a qualquer pesquisador envolvido na pesquisa. Você está sendo informado que não haverá necessidade de uma segunda punção visto que o sangue que será utilizado nos experimentos será o mesmo que foi submetido aos eventuais exames que justificam a coleta, que será feita por um profissional qualificado com o auxílio de seringa/agulha descartáveis. Portanto, não haverá nenhum desconforto adicional.

Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa, e é livre para cessar sua participação a qualquer momento sem nenhum prejuízo.

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

---

Assinatura do participante menor

## ANEXO C



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: [cep@propp.ufu.br](mailto:cep@propp.ufu.br); [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº. 495/10 DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU 146/10

Projeto Pesquisa: Correlação entre polimorfismos genéticos em genes relacionados ao metabolismo do folato em pacientes com artrite idiopática juvenil e o uso de metotrexato.

Pesquisador Responsável: Carlos Ueira Vieira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.  
O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do 1º relatório parcial: agosto de 2011.

Data de entrega do relatório final: dezembro de 2011.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 30 de julho de 2010

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requereram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto.

## APÊNDICE A

### ***Questionário de Avaliação Clínica para o grupo com artrite***

Data da avaliação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Número do prontuário do paciente: \_\_\_\_\_

Iniciais do nome do paciente: \_\_\_\_\_

#### **A. IDENTIFICAÇÃO**

Iniciais: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Gênero: M  F

Etnia: Branco  Pardo  Negro  Telefone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Cidade do nascimento: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

#### **B. HISTÓRIA CLÍNICA**

1. Portador de qual forma de AIJ? Oligoarticular  Poliarticular  Sistêmica   
Em que idade foi diagnosticado? \_\_\_\_\_

2. Forma de início: Oligoarticular  Poliarticular  Sistêmica

Idade do início dos sintomas: \_\_\_\_\_

Idade na primeira consulta: \_\_\_\_\_

3. Pratica alguma atividade física? Sim  Não

Qual e em que frequência? \_\_\_\_\_

Atividade leve  moderada  intensa

Quanto tempo de exercício: \_\_\_\_\_ minutos

4. Tem algum tipo de alergia? Sim  Não

Qual? \_\_\_\_\_

5. Fez alguma radiografia, tomografia ou ressonância magnética nos últimos 6 meses? Sim  Não

Quanto tempo faz? \_\_\_\_\_

6. Fez uso de algum medicamento nos últimos 3 meses? Sim  Não

Qual medicamento? \_\_\_\_\_

Qual dose? \_\_\_\_\_

7. Portador de alguma outra doença inflamatória? Sim  Não

Qual? \_\_\_\_\_

**8.** Portador de alguma doença infecciosa?      Sim     Não   
Qual? \_\_\_\_\_

**9. Qual o seu peso atual? \_\_\_\_\_**

**10.** Qual o seu peso usual? \_\_\_\_\_

**11. Altura:** \_\_\_\_\_

**12. IMC:** \_\_\_\_\_

## C. HISTÓRICO FAMILIAR

Algum portador de AIJ na família? Sim  Não

Qual grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Qual grau de parentesco: \_\_\_\_\_

## D. EVENTOS ADVERSOS

**Examinador:** \_\_\_\_\_