

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
Área de Concentração: Reumatologia**

**POLIMORFISMO T-786C DA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL
NA ARTRITE REUMATÓIDE**

Claiton Viegas Brenol

Orientador: Ricardo Machado Xavier
Co-orientador: José Artur Bogo Chies

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2006

1 B838p Brenol, Claiton Viegas

Polimorfismo T-786C da óxido nítrico sintase endotelial na artrite reumatóide / Claiton Viegas Brenol ; orient. Ricardo Machado Xavier ; co-orient. José Artur Bogo Chies. – 2006. 90 f. ; il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Artrite reumatóide 2. Polimorfismo genético 3. Óxido nítrico sintase I. Xavier, Ricardo Machado II. Chies, José Artur Bogo III. Título.

NLM: WE 345

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedico este trabalho aos meus pais e avó Adiles.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ricardo Machado Xavier, pela confiança e acolhida como orientador. Por seu profundo conhecimento científico e postura acadêmica, foi e será um modelo para minha formação profissional.

Ao Professor José Artur Bogo Chies, cujas valiosas co-orientação e colaboração científica foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Professor João Carlos T. Brenol, pela assessoria científica, revisão final do trabalho e por cultivar e transmitir fundamentais valores ao longo da minha vida, que são os alicerces na busca da minha realização pessoal e profissional.

Ao Professor Roberto Eichenberg, pelo apoio e incentivo ao longo da minha formação profissional.

Aos acadêmicos Andrei Neves, Felipe Birriel, Marcele Rizzatti, Paulo Franciscatto e Rafael Pereira, pelo valioso trabalho e dedicação.

Aos colegas Charles Kohem, Odirlei Monticielo, Rafael Chakr, Tamara Mucenic e Vera Lopes Silva, pela colaboração na implantação e desenvolvimento do ambulatório de artrite reumatóide do serviço de reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

À coordenadora *senior* Leila Krammer e à secretária do Serviço de Reumatologia do HCPA, Juliana Rios, pela ajuda e suporte nos trâmites relacionados à defesa da tese.

Às coordenadoras de pesquisa clínica do serviço de Reumatologia do HCPA, Karina Franz e Vanessa Borba, pela compreensão durante a realização da tese.

Aos secretários, Andréia Ramiro e Denílson Marques, e à auxiliar de enfermagem, Lorena Koglin, pela cooperação com os pacientes e harmoniosa convivência no ambulatório da zona 16.

À Nicolle, cujo carinho, estímulo, compreensão e auxílio foram indispensáveis para a conclusão da tese.

Aos meus pais, João e Marli, irmã Marlise, avó Adiles, dindos Sérgio, Maria e Rosa, e à toda minha família, pelo apoio e afeto.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
FIGURA E TABELA	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Artrite reumatóide	12
2.1.1 Conceito e prevalência da AR.....	12
2.1.2 Fisiopatogênese da AR.....	12
2.1.3 Suscetibilidade genética para AR	14
2.1.4 Sobrevida na AR.....	15
2.1.5 Importância da aterosclerose na AR.....	15
2.1.6 Fatores de risco cardiovasculares convencionais na AR.....	16
2.1.7 Fatores de risco cardiovasculares próprios da AR.....	18
2.1.8 Disfunção endotelial na AR.....	20
2.2 Óxido nítrico	21
2.2.1 Síntese do óxido nítrico.....	21
2.2.2 Efeitos biológicos do óxido nítrico	22
2.3 Gene da óxido nítrico sintase endotelial.....	24
2.3.1 Polimorfismos da óxido nítrico sintase e doença aterosclerótica	25
2.3.2 Funcionalidade dos polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial	26

2.4	Prevalência dos polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial nas doenças reumatológicas.....	27
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS DO ESTUDO	32
4.1	Objetivo geral	32
4.2	Objetivos específicos	32
5	REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	33
6	ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	48
7	VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS	67
8	ANEXOS	86
8.1	ANEXO I – Protocolo de pesquisa	87
8.2	ANEXO II – Termo de Consentimento	90
8.3	ANEXO III – Critérios diagnósticos da artrite reumatóide do Colégio Americano de Reumatologia.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – artrite reumatóide

DCV – doença cardiovascular

DE – disfunção edotelial

DM – diabete mérito

DNA - *deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucléico

ECV – evento cardiovascular

eNOS – *endothelial nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase endotelial

GMPc – guanosina monofosfato cíclico

HLA – human leukocyte antigen – antígeno leucocitário humano

IC – intervalo de confiança

IFN- α – interferon-alfa

IFN- γ – interferon-gama

IL-10 – interleucina-10

IL-1 β – interleucina-1-beta

IL-6 – interleucina-6

iNOS – *inducible nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase indutível

LES – lúpus eritematoso sistêmico

L-NMMA - NG-monometil-L-arginina

MTX – metotrexato

NK – *natural killer cells* – células assassinas naturais

nNOS – *neuronal nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase neuronal

ON – óxido nítrico

PCR – *polymerase chain reaction* – reação em cadeia de polimerase

PcR – proteína C reativa

r – coeficiente de correlação amostral

RC – razão de chances

RCV – risco cardiovascular

Th1 – *T helper 1 lymphocyte* – linfócito T auxiliar do tipo 1

TNF- α – tumor necrosis factor-alfa – fator de necrose tumoral-alfa

VNTR – *variable number of tandem repeats* – número variável de repetições em tandem

VSG – velocidade de sedimentação globular

FIGURA E TABELA

Figura 1. Organização do gene da eNOS e localização dos polimorfismo mais estudados (indicado nos retângulos). A linha superior indica a escala em kilobases.

O gene da eNOS é composto por 26 exons. Adaptado de Tanus et al, 2001(111).

..... 25

Tabela 1. Associações entre polimorfismos do gene da eNOS e doenças reumatológicas..... 30

2 INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia auto-imune (1). Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas e a maioria dos pacientes apresenta fator reumatóide positivo. Apesar de prováveis fatores ambientais deflagrarem o início da doença, a existência do componente genético na etiopatogênese da AR é clara (2). Os genes relacionados ao HLA (*human leukocyte antigen*) explicam menos de 50% da contribuição genética para suscetibilidade à AR (3). Além do maior risco de desenvolver AR, os polimorfismos do HLA-DR de classe II são relacionados a um pior prognóstico (4). Assim, a identificação de novos genes associados à suscetibilidade e gravidade da AR é um desafio importante.

Pacientes portadores de AR têm uma sobrevida menor do que a da população em geral. A expectativa de vida pode diminuir de 3 a 10 anos dependendo da gravidade e da idade de início da doença (5). A principal causa de morte em pacientes com AR é a doença cardiovascular (DCV). Além disso, a mortalidade por DCV é maior na AR em comparação com a população em geral (6-8).

A disfunção do endotélio é caracterizada pela perda das suas propriedades de vasodilatação, anticoagulação ou antiinflamatórias (9). A disfunção endotelial (DE) tem sido reportada em diversos estudos na AR (10-16). A DE é, em grande parte, gerada pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (ON) no endotélio. A presença de disfunção endotelial é diretamente relacionada a um risco aumentado para aterosclerose coronariana (17-19), à gravidade de doença coronariana (17) e à doença coronariana em pacientes jovens (19).

Como a regulação da produção de óxido nítrico no endotélio se dá através da expressão da óxido nítrico sintase endotelial, o gene codificador de tal enzima, eNOS

(*endothelial nitric oxide synthase*), é um potencial candidato para suscetibilidade de doença aterosclerótica (20). Recente meta-análise que incluiu 26 estudos de casos e controles verificou a associação entre doença coronariana aterosclerótica e polimorfismos de eNOS. As homozigoses para os alelos Asp298 e alelo “a” dos VNTRs (*variable number of tandem repeats*) do íntron 4, bem como o polimorfismo T-786C, estiveram associados à presença de doença cardíaca isquêmica (21, 22).

Além da AR, outras doenças reumatológicas, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), têm mortalidade cardiovascular aumentada com relação à população da mesma faixa etária (23). Outras doenças reumatológicas também apresentam DE, e os polimorfismos da eNOS foram associados com Behçet, arterite de células gigantes, esclerose sistêmica e LES (24-27).

Com base nos dados disponíveis, não é possível explicar o excesso de risco cardiovascular em portadores de AR através dos fatores de risco convencionais (28, 29). Além disso, manifestações extra-articulares e marcadores de inflamação sistêmica conferem risco adicional para aterosclerose e morte cardiovascular entre pacientes com AR, mesmo após o controle de fatores de risco cardiovascular tradicionais e comorbidades (29, 30). Assim, por suas associações com aterosclerose e outras doenças inflamatórias crônicas, os polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial constituem plausíveis genes candidatos para suscetibilidade e marcadores fenotípicos da AR.

O objetivo do presente estudo é investigar a associação dos polimorfismos T-786C da região promotora com AR e suas manifestações clínicas em uma amostra de pacientes e controles saudáveis da região sul do Brasil.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Artrite reumatóide

3.1.1 Conceito e prevalência da AR

A AR é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia auto-imune. Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas e a maioria dos pacientes apresenta fator reumatóide positivo (30). Tem uma prevalência de aproximadamente 1% na população brasileira (31), que é similar a da população mundial (32). A taxa de incidência da doença pode estar diminuindo, como demonstrado em uma coorte de base populacional americana acompanhada ao longo dos últimos 40 anos (33). Tem preferência pelo sexo feminino (34). Tende a surgir a partir da quarta década de vida, com pico de incidência na quinta década (5). A AR é uma doença bastante heterogênea em termos de gravidade e ritmo de progressão da inflamação articular, presença de manifestações extra-articulares e de resposta ao tratamento farmacológico (1). Para fins de investigação científica, convencionou-se realizar seu diagnóstico através da associação de manifestações clínicas, radiológicas e laboratoriais, conforme os critérios diagnósticos propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia revisados em 1987 (anexo III) (35).

3.1.2 Fisiopatogênese da AR

O evento inicial da doença é o processo inflamatório iniciado na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos. Este pode adquirir uma estrutura similar ao de tecidos linfóides terciários com predomínio de linfócitos T CD4+. A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese levam à

formação do *pannus*, que atinge o osso subcondral e, em seguida, a cartilagem articular com destruição progressiva (36). As perdas focais de osso marginal e subcondral contribuem decisivamente para a morbidade da doença. Estudos em tecidos humanos e provenientes de modelos animais apontam o osteoclasto como a principal célula envolvida neste processo. A ativação e recrutamento de tais células são influenciadas por citocinas e mediadores inflamatórios (37). Apesar da identificação de mais de 100 diferentes tipos de citocinas, quimiocinas e outros fatores envolvidos na patogênese da AR, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α – *tumoral necrosis factor*) continua ocupando lugar de destaque no processo erosivo articular através da ativação dos osteoclastos (38).

A produção de citocinas com balanço predominante para as citocinas pró-inflamatórias tem papel fundamental na iniciação e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial. A resposta do linfócito T auxiliar do tipo 1 (Th1) gera a produção de interferon-gama (IFN- γ) que estimula a liberação de TNF- α , interleucina-1 beta (IL-1 β) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais (39).

Recentemente, as funções desempenhadas pelos linfócitos B têm sido reconhecidas como significativas na patogênese da AR. A migração de células T e B com formação de agregados com estrutura de folículos terciários, a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD 154), e a produção aumentada de interleucina-6 (IL-6) e 10 (IL-10), que estimulam linfócitos B, são indicadores da hiperatividade destas células na doença (40).

Radicais reativos de oxigênio e nitrogênio também têm papel na patogênese da AR, pois os radicais reativos de oxigênio, como o superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ácido hipocloroso, bem como radicais reativos de nitrogênio, como óxido nítrico e peroxinitrito, contribuem significativamente para o dano tecidual (41).

3.1.3 Suscetibilidade genética para AR

Apesar de prováveis fatores ambientais deflagrarem o início da doença, a existência do componente genético na etiopatogênese da AR é clara a partir de observações de um maior risco da doença nos familiares de pacientes e de uma concordância maior em gêmeos monozigóticos em comparação com dizigóticos (2). A comparação entre as taxas de concordância em gêmeos monozigóticos e a prevalência na população revela que aproximadamente 50% na variação de ocorrência da doença é atribuída a fatores genéticos (42).

O antígeno leucocitário humano (HLA – *human leukocyte antigen*) é o fator genético que contribui mais fortemente para o risco de desenvolver AR. Diversos alelos de HLA-DRB1 vêm sendo associados à AR em diferentes populações: DRB1*0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1001, *1402 (2).

A teoria do epítipo compartilhado foi desenvolvida para explicar a suscetibilidade para AR em portadores dos alelos de HLA-DRB1. Os alelos citados anteriormente compartilham uma seqüência de aminoácidos nas posições 70-74 da terceira região hipervariável da cadeia DR β 1. Estes epítopos compartilhados estariam envolvidos diretamente na patogênese da doença por permitir a apresentação de peptídeos artritogênicos às células efectoras (42, 43).

Os genes relacionados ao HLA explicam menos de 50% do componente genético da suscetibilidade para a AR (3). Assim, uma série de genes não relacionados ao HLA tem sido avaliada quanto à sua associação com a doença. Genes com papel na regulação imunológica e na suscetibilidade para outras doenças auto-imunes foram testados na AR. Dentre os recentes candidatos convincentes, situam-se os genes da proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN22), do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) e peptidilarginina

deaminase tipo 4 (PADI4) (1, 44). O polimorfismo da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) foi testado em 2 estudos espanhóis de suscetibilidade para AR, um com associação estatisticamente significativa e outro com apenas uma tendência para associação com AR (45, 46).

3.1.4 Sobrevida na AR

Pacientes com AR apresentam taxas aumentadas de mortalidade em comparação com a população em geral. Estudo americano demonstrou uma razão de mortalidade padronizada de 1,27 (IC 95% 1,13-1,41) (33). Pacientes portadores de AR têm uma sobrevida menor que a da população em geral. A expectativa de vida pode cair de 3 a 10 anos dependendo da gravidade da doença e da idade de início da mesma (5). As principais causas de morte descritas são infecções, doenças linfoproliferativas, doença cardiovascular (DCV) e cerebrovascular, complicações gastrintestinais e relacionadas à atividade da doença propriamente dita. Dentre os fatores preditivos de mortalidade, estão incluídos idade avançada, incapacidade funcional, número de articulações acometidas, fator reumatóide positivo, nódulos reumatóides e velocidade de sedimentação globular (VSG) elevada (6, 47-51).

3.1.5 Importância da aterosclerose na AR

A principal causa de morte em pacientes com AR é a DCV. A mortalidade por DCV é maior na AR em comparação com a população em geral (6-8). O risco de morte por DCV é duas vezes maior nos portadores de AR em comparação com controles da mesma faixa etária (6).

Em 2001, del Rincon et al publicaram o primeiro estudo que avaliou risco cardiovascular em pacientes com AR, tanto para eventos fatais, quanto para não-fatais. A incidência aumentada de eventos cardiovasculares na AR ocorreu independentemente dos fatores de risco tradicionais, sugerindo que mecanismos adicionais podem ser responsáveis pela DCV na AR (29).

Em 2002, Goodson et al publicaram o primeiro estudo demonstrando aumento das taxas de mortalidade por DCV nos primeiros anos de apresentação de poliartrite inflamatória com fator reumatóide positivo (52).

A AR foi fator de risco independente para aumento de espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas comuns e femorais, que se correlacionou com gravidade e cronicidade da doença reumatológica (53-56). A espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas comuns tem correlação direta com a presença de doença coronariana (57).

Pacientes portadores de angina instável apresentam níveis aumentados de células T CD4+CD28-, o que não foi verificado em portadores de angina estável (58). Esta subpopulação de linfócitos T foi originalmente descrita em pacientes com AR e associada à presença de doença extra-articular, especialmente vasculite (59). Este achado foi confirmado em trabalho conduzido com pacientes com AR e doença coronariana recente, no qual foi verificado também um risco aumentado para doença coronariana em múltiplos vasos nestes pacientes (60).

3.1.6 Fatores de risco cardiovasculares convencionais na AR

Como a importância da DCV na AR foi apenas recentemente reconhecida, poucos estudos para avaliação de frequência de fatores de risco foram realizados, e os resultados são controversos.

O tabagismo foi mais prevalente em pacientes com AR do que nos controles em 3 estudos (61-63). Numa coorte do norte da Suécia, os autores não observaram correlação entre eventos cardiovasculares (ECV) e tabagismo na AR (48). Já Wolfe et al constataram um risco maior de DCV que se correlacionou com o número de cartelas fumadas (47). Corroborando os resultados deste estudo foi constatado um aumento da prevalência e extensão de calcificações coronarianas em pacientes com AR, que se correlacionou levemente com o tabagismo (RC 1,02 p=0,04) (64). Em apenas 1 estudo, o tabagismo não foi mais prevalente em pacientes com AR (65).

Pacientes com AR têm índices de massa corporal mais elevados do que os controles na população em geral (61, 63).

Alguns estudos investigaram os níveis de lipídios na AR e os resultados são controversos. Svenson et al encontraram níveis menores de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de muito baixa densidade e lipoproteína de alta densidade em pacientes com AR e espondiloartropatias sem tratamento para doença de base em comparação com controles saudáveis. Tais níveis foram diretamente relacionados com a atividade inflamatória (66, 67). Paradoxalmente, foram observados níveis maiores de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade e lipoproteína (a) em mulheres portadoras de AR em comparação com mulheres híginas (68). Outros autores também encontraram níveis aumentados de lipoproteína(a) na AR (69-71). De acordo com observações anteriores, Dursunoglu et al demonstraram uma correlação positiva entre níveis séricos de proteína C reativa (PcR) e níveis de lipoproteína (a), enquanto a correlação com lipoproteínas de alta densidade foi negativa ($r=0,83$ e $P<0,0001$; $r=-0,49$ e $P<0,0001$, respectivamente) (72). Quanto à avaliação de associação do diabetes mélico (DM) com AR, em 1460 portadores de AR, a prevalência de DM não foi diferente da população em geral (73).

A presença de auto-anticorpos IgG contra lipoproteína de baixa densidade oxidada tem sido constatada na AR (74, 75). Ela se correlacionou com o grau de aterosclerose nas carótidas de pacientes com AR e sua presença ocorreu independente de fatores de risco para DCV (75).

3.1.7 Fatores de risco cardiovasculares próprios da AR

Com base nos dados disponíveis, não é possível explicar o excesso de risco cardiovascular em portadores de AR através dos fatores de risco convencionais (28, 29). A seguir, são enumerados alguns fatores de risco cardiovascular inerentes ao curso da artrite e ao seu manejo terapêutico.

Alguns estudos têm evidenciado a associação de glicocorticóide com DCV e mortalidade (76-78). O mecanismo exato através do qual a prednisona poderia afetar as coronárias permanece incerto. Sabe-se que pode aumentar o colesterol ou os triglicerídeos de modo dose-dependente (79), causar hipertensão por retenção de sal e água (80), levar à intolerância aos carboidratos (81) e elevar os níveis de homocisteína (78). Outros pesquisadores não constataram uma associação direta entre uso de glicocorticóide e mortalidade por DCV (48, 82). O aumento da espessura da parede de artérias carótidas comuns e femorais não foi mais significativo em pacientes com AR em uso de antiinflamatórios, glicocorticóides ou metotrexato (MTX) (55).

O uso de MTX também pode contribuir com risco cardiovascular (RCV) pelo potencial de induzir hiperhomocisteinemia (55, 83). Esta pode ser diminuída pelo uso concomitante de ácido fólico (84). Apesar desta observação, numa coorte de 1240 pacientes com AR foi verificado um benefício substancial na sobrevivência dos usuários de MTX, principalmente em função da redução de eventos cardiovasculares (85). A

sulfasalazina pode desempenhar o mesmo papel também pelo seus efeitos no metabolismo do folato (86).

O componente inflamatório da aterosclerose apresenta algumas similaridades com a AR, como níveis elevados de proteína C reativa (PcR), citocinas e fibrinogênio. É possível que a inflamação sistêmica da AR acelere a aterosclerose (52). Os níveis elevados de PcR associam-se a um risco aumentado de ECV (87-89). Além da PcR, outros marcadores da inflamação que se relacionam com ECV incluem IL-6, moléculas intercelulares de adesão do tipo 1 solúveis, amilóide sérico A e fibrinogênio (28, 90, 91). Níveis aumentados de VSG também têm se correlacionado com risco aumentado para doença aterosclerótica na AR (64, 92).

Em estudo de casos de AR e controles pareados por idade, sexo, raça e fatores de risco para aterosclerose no qual os pacientes foram submetidos a método de imagem ultra-sonográfico para avaliar risco aterosclerótico em artérias carótidas e femorais, foi constatado um maior risco nos pacientes com doença de mais longa evolução (93).

Apesar da presença de fatores de RCVs próprios da AR ser crítica, a coexistência destes com fatores tradicionais parece modificar o efeito de ambos. Ao medir a espessura das camadas íntima e média de carótidas de portadores de AR, pesquisadores verificaram uma significativa interação entre o número de fatores de RCVs e VSG, sugerindo que o efeito da VSG variou conforme o número de fatores de RCVs presentes. A gravidade das manifestações clínicas da AR foi mais relevante do que os fatores de risco tradicionais no aumento da espessura das camadas arteriais em jovens em comparação com pacientes mais idosos (92).

3.1.8 Disfunção endotelial na AR

A disfunção do endotélio é caracterizada pela perda das suas propriedades de vasodilatação, anticoagulação ou antiinflamatórias (9). A vasodilatação é uma propriedade facilmente avaliada. Ela pode ser estudada pela administração de vasodilatadores endotélio-dependentes ou independentes. A acetilcolina estimula a liberação de ON pelas células endoteliais via eNOS, gerando o relaxamento do músculo liso da camada média. Outros vasodilatadores, como a nitroglicerina, agem diretamente na musculatura sem a mediação de ON (94). A documentação de disfunção endotelial (DE) é diretamente relacionada a um risco aumentado para aterosclerose coronariana (18), à gravidade de doença coronariana (17) e à doença coronariana em pacientes jovens (19). A DE tem sido reportada em diversos estudos na AR (10-16).

Bergholm e colaboradores verificaram que, em comparação com controles saudáveis, pacientes com AR de diagnóstico recente e sem uso de droga modificadora de doença têm DE medida através de uma resposta diminuída à administração tanto de acetilcolina, quanto de nitroprussiato de sódio. Tal DE foi revertida com o tratamento adequado da AR (10). A DE foi demonstrada também em pacientes jovens portadores de AR de longa duração (16).

Com a intenção de verificar a presença de DE e o aumento da produção de ON via iNOS, pesquisadores mediram o fluxo sanguíneo basal e após administração de acetilcolina, nitroprussiato de sódio e NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) no antebraço de pacientes com AR e controles. A L-NMMA é um análogo da arginina que bloqueia a geração de ON tanto via eNOS, quanto via iNOS. Assim, a diminuição do fluxo sanguíneo abaixo do basal após a administração de L-NMMA avalia a contribuição do ON de ambas as vias (eNOS e iNOS) para a vasodilatação. No grupo da AR, foram observados um fluxo sanguíneo basal aumentado, respostas diminuídas a acetilcolina e

nitroprussiato intra-arteriais, e uma maior redução do fluxo após administração de L-NMMA. As respostas aos vasodilatadores foram inversamente correlacionadas às concentrações séricas de TNF- α (nitroprussiato: $r=-0,67$, $p=0,002$; acetilcolina: $r=-0,64$, $p<0,005$). Em conjunto, estes achados sugerem uma atividade aumentada da iNOS e uma resposta prejudicada ao ON junto à parede vascular. Este prejuízo em gerar vasodilatação pode ser causado por síntese diminuída de ON pela eNOS ou aumento da degradação de ON (14).

A DE pode ser melhorada com o tratamento efetivo da AR (12, 85). O TNF- α é uma citocina com papel central na iniciação e amplificação da cascata inflamatória tanto na AR, quanto na aterogênese. Pacientes com AR tratados com infliximabe (anticorpo monoclonal anti-TNF- α) tiveram melhorada a DE prévia (12).

Pacientes com AR e portando o marcador genético HLA-DRB1*0404 têm pior DE em comparação com outros casos de AR. Tal achado sugere a implicância de fatores genéticos no desenvolvimento de DE e, conseqüentemente, DCV (95).

3.2 Óxido nítrico

3.2.1 Síntese do óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é um gás com peso molecular de 30 daltons, se difunde livremente através das membranas celulares e tem uma meia-vida de apenas poucos segundos (96). A síntese do ON ocorre pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOSs - *nitric oxide synthases*). As NOS catalisam a reação de oxidação da L-arginina, gerando ON e L-citrulina. Três isoformas foram descritas: a neuronal (nNOS) e a

endotelial (eNOS), que são expressas constitutivamente no meio intracelular, e uma terceira indutível (iNOS).

As NOS constitutivas produzem quantidades pequenas de óxido nítrico por períodos curtos. Em contraste, a NOS induzida por estímulo inflamatório, por exemplo, gera grandes e sustentadas concentrações de ON (97).

3.2.2 Efeitos biológicos do óxido nítrico

Os efeitos biológicos do ON variam enormemente de acordo com seu local de produção, quantidade gerada e dos alvos dentro do ambiente onde é liberado. O papel do ON pode ser tanto protetor e mantenedor da homeostase, quanto deletério. Por exemplo, a reação do ON com ânion superóxido gera peroxinitrito, um radical livre altamente tóxico que lesa proteínas, danifica o ácido desoxirribonucléico (DNA – *deoxyribonucleic acid*) e promove apoptose. Na parede endotelial, a reação do ON com o grupo heme da guanilato ciclase, ativa esta enzima possibilitando o aumento de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e o relaxamento da musculatura lisa vascular (98).

3.2.2.1 Efeitos biológicos da óxido nítrico sintase neuronal

A nNOS é expressa no sistema nervoso central, sistema nervoso autônomo de grandes vasos e trato gastrointestinal, plaquetas, células pancreáticas e epiteliais (96, 97). É estimulada por N-metil-D-aspartato, insulina e trombina. Os principais efeitos da nNOS são promover a motilidade gastrointestinal e servir como mediador na neurotransmissão (97).

3.2.2.2 Efeitos biológicos da óxido nítrico indutível

A iNOS é expressa nos macrófagos, células endoteliais, condrócitos, hepatócitos, sinoviócitos, células do músculo liso e outros. Sua expressão é induzida por citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α), imunocomplexos, produtos microbianos e estresse mecânico (98).

A quantidade em excesso de ON produzida pela iNOS tem potencial pró-inflamatório e deletério às células e tecidos circunjacentes. Dentre suas ações pró-inflamatórias destacam-se a produção de radicais livres tóxicos, como o peroxinitrito, ativação de fatores de transcrição, citotoxicidade, promoção da apoptose de macrófagos, tímócitos CD4+CD8+ e condrócitos, e estímulo da produção de TNF- α e da atividade de células assassinas naturais (NK – *natural killer cells*) (97).

3.2.2.3 Efeitos biológicos da óxido nítrico endotelial

A eNOS é expressa nas células endoteliais, neurônios e células miocárdicas. Sua produção é estimulada por acetilcolina, adenosina di-fosfato, trombina, fator de crescimento endotelial e alterações de forças no fluxo sanguíneo (97).

Além de relaxamento da musculatura lisa vascular, o ON oriundo do endotélio inibe a adesão plaquetária (99) e leucocitária (100), a proliferação celular na musculatura lisa (101) e a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (102)

3.2.2.4 Óxido nítrico na AR

Em diversos trabalhos, níveis elevados de ON têm sido relatados tanto no soro, quanto no líquido sinovial de portadores de AR (103-109).

Ueki e colaboradores demonstraram um aumento significativo de ON sérico em pacientes com AR em comparação com pacientes com osteoartrite ($33,4 \pm 4,0$, $p < 0,01$) e controles saudáveis ($35,9 \pm 4,5$, $p < 0,01$). Os níveis séricos de ON correlacionaram-se significativamente com rigidez matinal, número de articulações doloridas e edemaciadas, Pcr, IL-6 e TNF- α (108). Em 2003, um estudo conduzido com 115 pacientes confirmou aumento na produção de ON na AR em comparação com controles saudáveis, porém não houve correlação com atividade da doença avaliada por Pcr e VSG (107).

Em trabalho desenvolvido na Universidade de São Paulo, foram verificados maiores níveis de nitrito e nitrato no líquido sinovial de pacientes com AR em relação aos casos de osteoartrose. O aumento destes níveis é indicação indireta de produção aumentada de ON (103). Dentro da articulação a produção aumentada de ON em resposta ao estímulo de citocinas exerce uma série de efeitos catabólicos nas funções dos condrócitos que podem determinar degradação da cartilagem articular. Dentre eles, citam-se inibição da síntese de colágeno e proteoglicanos, ativação de metaloproteinases, decréscimo na expressão de antagonistas de receptores de IL-1 e indução de apoptose (97). Inversamente, a produção de ON pela eNOS pode servir como função protetora, ou antiinflamatória, prevenindo a adesão e a liberação de substâncias oxidativas por neutrófilos ativados na microvasculatura (34). Deste modo, polimorfismos dos genes da eNOS poderiam ter impacto na suscetibilidade e gravidade da AR.

3.3 Gene da óxido nítrico sintase endotelial

O gene da eNOS (figura 1) situa-se no braço curto do cromossomo 7 (7q35-36), contem 26 exons ao longo de 21 kilobases de DNA genômico e codifica um RNA

mensageiro de 4052 nucleotídeos (34). Desde que foi seqüenciado pela primeira vez em 1993, muitas variações têm sido descritas na região promotora, exons e íntrons (110).

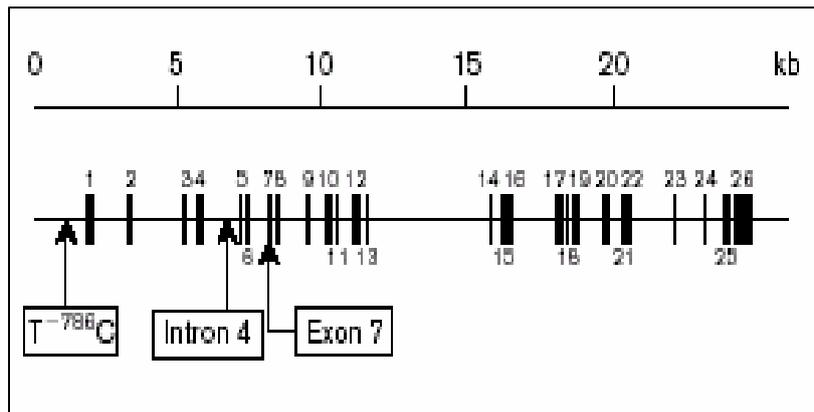


Figura 1. Organização do gene da eNOS e localização dos polimorfismo mais estudados (indicado nos retângulos). A linha superior indica a escala em kilobases. O gene da eNOS é composto por 26 exons. Adaptado de Tanus et al, 2001(111).

3.3.1 Polimorfismos da óxido nítrico sintase e doença aterosclerótica

Como a regulação da produção de óxido nítrico no nível do endotélio se dá através da expressão de eNOS, o gene codificador de tal enzima é um potencial candidato para suscetibilidade de doença aterosclerótica (20). Justamente por isso, alguns de seus polimorfismos têm sido avaliados quanto à associação com doença aterosclerótica em estudos de caso-controle. Os três polimorfismos mais comumente avaliados são o T-786C da região promotora, o Glu298Asp no éxon 7 e uma repetição em tandem (VNTRs - *variable number of tandem repeats*) de 27 pares de bases no íntron 4.

Já foram publicados muitos estudos transversais ou de caso-controle de associações entre polimorfismos da eNOS e doenças vasculares. Os resultados são conflitantes, principalmente aqueles provenientes de estudos pequenos e com baixo poder estatístico. Dentre os resultados positivos, o T-786C foi associado com espasmo coronariano (112), os VNTRs do íntron 4 foram associados com infarto do miocárdio (113) e doença arterial periférica e coronariana (114), e o Glu298Asp também foi associado com doença arterial coronariana (115-117).

Recente meta-análise que incluiu 26 estudos de caso-controle avaliou a associação entre doença coronariana e homozigose para os polimorfismos citados acima. Os resultados evidenciaram que as homozigoses para os alelos “a” do íntron-4 e Asp298 determinam risco moderado para DCV (RC 1,31; IC 95% 1,13-1,51; e RC, 1,34; IC 95%, 1,03-1,75; respectivamente) (22). Posteriormente, os autores divulgaram também associação estatisticamente significativa (RC 1,30, IC 95% 1,01-1,66) do polimorfismo T-786C e DCV (21).

3.3.2 Funcionalidade dos polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial

A funcionalidade dos polimorfismos da eNOS foi o alvo de poucas publicações na literatura científica. Polimorfismos que repercutem na suscetibilidade de doenças deveriam estar associados às alterações fisiológicas ou bioquímicas relevantes nos seus portadores.

Nakayama e colaboradores avaliaram o caráter funcional do polimorfismo T-786C através de ensaio de luciferase. Após a fusão de fragmentos da região flanqueadora 5' do gene da eNOS contendo o polimorfismo T-786C com o gene

luciferase repórter, foi verificado um decréscimo significativo da atividade de transcrição em comparação com o gene normal (118).

Quanto à funcionalidade dos VNTRs do íntron 4, os resultados são controversos. Dois trabalhos demonstraram resultados antagônicos, um documentando um aumento de níveis de nitritos e nitratos, medidas indiretas da produção de ON, no soro de indivíduos saudáveis portadores de homozigose para o alelo "a" (119), enquanto noutro níveis diminuídos foram relatados em portadores saudáveis do alelo "a" (120). É interessante ressaltar que tais relatos foram descritos em indivíduos hígidos e cujos fatores ambientais, como o tabagismo e outros fatores de risco para DCV, não foram levados em consideração.

O polimorfismo Glu298Asp no éxon 7 promove a substituição de glutamato por aspartato na posição 298 da eNOS. Em 2000, Tesouro demonstrou que tal alteração aumentava a suscetibilidade para clivagem possivelmente por proteases endógenas (121). O polimorfismo Glu298Asp foi associado a uma produção basal de ON reduzida em indivíduos hígidos em comparação com não portadores desta variante alélica. O achado foi documentado através da menor resposta à infusão de L-NMMA intra-arterial no antebraço (122).

3.4 Prevalência dos polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial nas doenças reumatológicas

Além da AR, outras doenças reumatológicas com processo inflamatório crônico têm um maior risco cardiovascular, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) (23). Também a disfunção endotelial tem sido observada tanto no LES, quanto na granulomatose de Wegener, poliarterite nodosa, síndrome de Churg-Strauss, doença de

Kawasaki e esclerose sistêmica (26, 123). Estas informações têm justificado a publicação de uma série de estudos relacionando polimorfismos da eNOS e doenças reumatológicas (tabela I).

Na AR, duas publicações avaliaram a frequência de polimorfismos da eNOS. Em estudo realizado com a inclusão de irmãos portadores de AR provenientes de 200 famílias, os indivíduos foram genotipados com o objetivo de encontrar marcadores genéticos de 16 genes que fossem compartilhados por ambos os afetados da mesma família. O íntron 13 da eNOS não foi ligado à suscetibilidade para AR (linkage analysis) (124). Ao avaliar 200 pacientes com AR e 251 controles de mesma origem étnica, pesquisadores espanhóis não encontraram diferença significativa na frequência dos polimorfismos T-786C e Glu298Asp (45).

Salvarani em 2003, verificou que no grupo de pacientes com arterite de células gigantes existiam mais portadores do alelo Asp298 (Asp/Asp ou Glu/Asp) do que no grupo controle ($p = 0,0001$, RC = 3,3, IC 95% 1,7-6,3) (24). Noutro trabalho do mesmo grupo italiano, o alelo Asp298 foi mais freqüente nos pacientes com doença de Behçet do que nos controles ($p_{\text{corr}} = 0,0006$, RC 2,1; IC 95% CI 1,5-3,3), porém não houve diferença em relação aos alelos VNTR do íntron 4 (25). Um estudo sul-coreano confirmou os achados de Salvarani em Behçet (26). Contrariamente, um terceiro estudo apontou diferenças significativas nos polimorfismos dos VNTRs do íntron 4 (RC= 1,9, $P=0,0069$) e no T-786C (RC = 2,5, $P=0,0016$), que não havia sido avaliado no Behçet, mas não foi estatisticamente significativa a diferença com relação ao Glu298Asp (27). Em pacientes com esclerose sistêmica, o alelo Asp298 também foi mais freqüente, porém não houve diferença estatisticamente significativa no polimorfismo T-786C (125).

No LES, foram publicados 3 estudos. No primeiro, não foi verificada diferença entre pacientes com LES e controles para VNTRs do íntron 4, enquanto, entre os portadores de LES, o genótipo “ab” foi fator de risco para nefrite (RC=3,28; IC 95%

1,04-10,2, P=004) (126). Contrariando o estudo anterior, autores colombianos verificaram que o genótipo “ab” foi protetor para LES, enquanto o genótipo “bb” foi associado à doença. Ainda, não houve associação de LES com Glu298Asp ou T-786C (127). Um terceiro estudo obteve resultados negativos, tanto para suscetibilidade, quanto para nefrite, para associação de VNTRs do íntron 4 e T-786C (128).

Tabela 1. Associações entre polimorfismos do gene da eNOS e doenças reumatológicas

Doenças	Origem étnica	Casos/ controles	Polimorfismos do gene eNOS§		
			Região promotora T-786C	Intron 4	Éxon 7 Glu298Asp
Artrite reumatóide					
Gonzalez-Gay et al (45)	C	200/251	NS		NS
ACG					
Salvarani et al(24)	C	91/133	3,3 (1,7-6,3)		NS
Esclerose Sistêmica					
Fatini et al (125)	C	73/112	NS		1,9 (1,0-3,4)
Doença de Behçet					
Salvarani et al (25)	C	73/135		NS	2,1 (1,5-3,3)
Kim et al (26)	A	65/80		NS	4,3 (1,7-11)
Karasneh et al (27)	T	193/106	2,5 (1,2-5,4)	2,2 (1,3-3,8)	NS ¶
LES					
Lee et al (126)	A	88/95		NS *	
Serrano et al (127)	C / N	88/199	NS	2,9 (1,6-5,3)	NS
Douglas et al (128)	C / N	227/275	NS		NS

§Dados estão apresentados como razão de chances e intervalos de confiança de 95%;ACG=arterite de células gigantes; LES=lupus eritematoso sistêmico; C=caucasóide, N=negróide, T=turca; A=asiática; NS=não significativo; *associação com nefrite; ¶associação com alelo Asp.

4 JUSTIFICATIVA

A justificativa do presente estudo é advinda da necessidade da identificação de marcadores genéticos associados à suscetibilidade e gravidade da AR com vistas à prevenção das complicações da evolução da doença. Conforme discutido acima, os polimorfismos dos genes da eNOS são candidatos interessantes, mas os resultados da literatura ainda são escassos. Além disso, os marcadores genéticos podem variar conforme a constituição genética de cada população, sendo importante a obtenção de dados específicos para a nossa população.

5 OBJETIVOS DO ESTUDO

5.1 Objetivo geral

Avaliar a associação da suscetibilidade para a AR e de suas características clínicas, laboratoriais e radiológicas com o polimorfismo T-786C do gene da eNOS.

5.2 Objetivos específicos

- A) Verificar a frequência do polimorfismo T-786C em uma população de pacientes com AR e grupo controle.
- B) Comparar a frequência do polimorfismo T-786C entre uma população de pacientes com AR e grupo controle.
- C) Verificar a associação do polimorfismo T-786C com dados demográficos, clínicos, laboratoriais e radiográficos em pacientes com AR.

6 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Worthington J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2005.
2. Barton A, Ollier W. Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14(3):260-9.
3. Wordsworth P, Bell J. Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50(6):343-6.
4. Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzschel H, et al. HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40(2):341-51.
5. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005;4(3):130-6.
6. Prior P, Symmons DP, Scott DL, Brown R, Hawkins CF. Cause of death in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1984;23(2):92-9.
7. Mutru O, Laakso M, Isomaki H, Koota K. Cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Cardiology* 1989;76(1):71-7.
8. Myllykangas-Luosujarvi R, Aho K, Kautiainen H, Isomaki H. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22(6):1065-7.
9. Buckley CD, Ed Rainger G, Nash GB, Raza K. Endothelial cells, fibroblasts and vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(7):860-3.
10. Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavaara S, Makimattila S, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1637-41.

11. Hermann F, Forster A, Chenevard R, Enseleit F, Hurlimann D, Corti R, et al. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(3):461-4.
12. Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2002;106(17):2184-7.
13. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Ollier WE. Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: influence of HLA-DRB1 alleles. *Autoimmun Rev* 2004;3(4):301-4.
14. Yki-Jarvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(7):630-4.
15. Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Passauer J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis* 2005.
16. Hansel S, Lassig G, Pistrosch F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis* 2003;170(1):177-80.
17. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, et al. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997;129(1):111-8.
18. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101(9):948-54.
19. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996;78(11):1210-4.

20. Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis* 2001;154(3):521-7.
21. Rossi GP, Maiolino G. Do meta-analyses of association studies of endothelial nitric oxide synthase variants and ischemic heart disease provide conclusive answers? *Circulation* 2004;110(11):e305-6; author reply e305-6.
22. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;109(11):1359-65.
23. Bjornadal L, Yin L, Granath F, Klareskog L, Ekbom A. Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95. *J Rheumatol* 2004;31(4):713-9.
24. Salvarani C, Casali B, Nicoli D, Farnetti E, Macchioni P, Catanoso MG, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(11):3219-23.
25. Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Olivieri I, Ciancio G, Cantini F, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease. *J Rheumatol* 2002;29(3):535-40.
26. Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(11):1083-7.
27. Karasneh JA, Hajeer AH, Silman A, Worthington J, Ollier WE, Gul A. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(5):614-7.
28. Dessein PH, Joffe BI, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(3):R634-43.

29. del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001;44(12):2737-45.
30. Kelley WN, Ruddy, S., Sledge, C.B. eds. *Textbook of Rheumatology*. 5 ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997.
31. Marques Neto JF, Gonsalves, H.T. et al. Estudo multicêntrico da prevalência da Artrite Reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. *Revista Brasileira de Reumatologia* 1993;33:169-73.
32. Wolfe AM. The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys. *Bull Rheum Dis* 1968;19(2):518-23.
33. Doran MF, Pond GR, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis Rheum* 2002;46(3):625-31.
34. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268(23):17478-88.
35. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):315-24.
36. Harris ED. *Rheumatoid Arthritis*. Philadelphia: WB Saunders; 1997.
37. Goldring SR. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14(4):406-10.
38. Miossec P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16(3):218-22.

39. Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, Weyand CM. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol* 1999;90(1):65-78.
40. Dörner T, Burmester GR. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(3):246-52.
41. Bauerova K, Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* 1999;18 Spec No:15-20.
42. van der Helm-van Mil AH, Wesoly JZ, Huizinga TW. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17(3):299-304.
43. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30(11):1205-13.
44. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* 2005;77(6):1044-60.
45. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sanchez E, Lopez-Nevot MA, Amoli MM, Garcia-Porrua C, et al. Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(9):1182-5.
46. Pascual M, Lopez-Nevot MA, Caliz R, Koeleman BP, Balsa A, Pascual-Salcedo D, et al. Genetic determinants of rheumatoid arthritis: the inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene promoter polymorphism. *Genes Immun* 2002;3(5):299-301.
47. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37(4):481-94.

48. Wallberg-Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol* 1997;24(3):445-51.
49. Kvalvik AG, Jones MA, Symmons DP. Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992. *Scand J Rheumatol* 2000;29(1):29-37.
50. Symmons DP, Jones MA, Scott DL, Prior P. Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: early presenters continue to do well. *J Rheumatol* 1998;25(6):1072-7.
51. Navarro-Cano G, Del Rincon I, Pogolian S, Roldan JF, Escalante A. Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity. *Arthritis Rheum* 2003;48(9):2425-33.
52. Goodson NJ, Wiles NJ, Lunt M, Barrett EM, Silman AJ, Symmons DP. Mortality in early inflammatory polyarthritis: cardiovascular mortality is increased in seropositive patients. *Arthritis Rheum* 2002;46(8):2010-9.
53. Bartoloni Bocci E, Marchesi S, Delle Monache F, Vaudo G, Giordano A, Ragni Alunni F, et al. [Subclinical atherosclerosis in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity]. *Reumatismo* 2005;57(1):16-21.
54. Park YB, Ahn CW, Choi HK, Lee SH, In BH, Lee HC, et al. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: morphologic evidence obtained by carotid ultrasound. *Arthritis Rheum* 2002;46(7):1714-9.
55. Kumeda Y, Inaba M, Goto H, Nagata M, Henmi Y, Furumitsu Y, et al. Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1489-97.

56. del Rincon I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A. Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1833-40.
57. Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation* 1999;100(9):951-7.
58. Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon WM, Maseri A, Goronzy JJ, et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation* 1999;100(21):2135-9.
59. Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999;100(21):2124-6.
60. Warrington KJ, Kent PD, Frye RL, Lymp JF, Kopecky SL, Goronzy JJ, et al. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study. *Arthritis Res Ther* 2005;7(5):R984-91.
61. Voigt LF, Koepsell TD, Nelson JL, Dugowson CE, Daling JR. Smoking, obesity, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis. *Epidemiology* 1994;5(5):525-32.
62. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum* 1996;39(5):732-5.
63. Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* 1997;40(11):1955-61.

64. Chung CP, Oeser A, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani AK, Sokka T, et al. Increased coronary-artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis: relationship to disease duration and cardiovascular risk factors. *Arthritis Rheum* 2005;52(10):3045-53.
65. Hazes JM, Dijkmans BA, Vandenbroucke JP, de Vries RR, Cats A. Lifestyle and the risk of rheumatoid arthritis: cigarette smoking and alcohol consumption. *Ann Rheum Dis* 1990;49(12):980-2.
66. Svenson KL, Lithell H, Hallgren R, Selinus I, Vessby B. Serum lipoprotein in active rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory arthritides. I. Relativity to inflammatory activity. *Arch Intern Med* 1987;147(11):1912-6.
67. Svenson KL, Lithell H, Hallgren R, Vessby B. Serum lipoprotein in active rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory arthritides. II. Effects of anti-inflammatory and disease-modifying drug treatment. *Arch Intern Med* 1987;147(11):1917-20.
68. Yoo WH. Dyslipoproteinemia in patients with active rheumatoid arthritis: effects of disease activity, sex, and menopausal status on lipid profiles. *J Rheumatol* 2004;31(9):1746-53.
69. Asanuma Y, Kawai S, Aoshima H, Kaburaki J, Mizushima Y. Serum lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotypes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42(3):443-7.
70. Park YB, Lee SK, Lee WK, Suh CH, Lee CW, Lee CH, et al. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;26(8):1701-4.
71. Rantapaa-Dahlqvist S, Wallberg-Jonsson S, Dahlen G. Lipoprotein (a), lipids, and lipoproteins in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50(6):366-8.
72. Dursunoglu D, Evrengul H, Polat B, Tanriverdi H, Cobankara V, Kaftan A, et al. Lp(a) lipoprotein and lipids in patients with rheumatoid arthritis: serum levels and relationship to inflammation. *Rheumatol Int* 2005;25(4):241-5.

73. Hakala M, Ilonen J, Reijonen H, Knip M, Koivisto O, Isomaki H. No association between rheumatoid arthritis and insulin dependent diabetes mellitus: an epidemiologic and immunogenetic study. *J Rheumatol* 1992;19(6):856-8.
74. Sherer Y, Gerli R, Vaudo G, Schillaci G, Gilburd B, Giordano A, et al. Prevalence of antiphospholipid and oxidized low-density lipoprotein antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:299-303.
75. Wada Y, Kuroda T, Murasawa A, Tanabe N, Nakano M, Gejyo F. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein (LDL) and carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23(4):482-6.
76. del Rincon I, O'Leary DH, Haas RW, Escalante A. Effect of glucocorticoids on the arteries in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(12):3813-22.
77. Myllykangas-Luosujarvi R, Aho K, Isomaki H. Death attributed to antirheumatic medication in a nationwide series of 1666 patients with rheumatoid arthritis who have died. *J Rheumatol* 1995;22(12):2214-7.
78. Ettinger WH, Goldberg AP, Applebaum-Bowden D, Hazzard WR. Dyslipoproteinemia in systemic lupus erythematosus. Effect of corticosteroids. *Am J Med* 1987;83(3):503-8.
79. Zimmerman J, Fainaru M, Eisenberg S. The effects of prednisone therapy on plasma lipoproteins and apolipoproteins: a prospective study. *Metabolism* 1984;33(6):521-6.
80. Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg MC. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1992;93(5):513-9.
81. Axelrod L. Glucocorticoid therapy. *Medicine (Baltimore)* 1976;55(1):39-65.
82. Raynauld JP. Cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis: how harmful are corticosteroids? *J Rheumatol* 1997;24(3):415-6.

83. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Boers GH, Haagsma CJ, Thomas CM, et al. Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(6):658-65.
84. Morgan SL, Baggott JE, Lee JY, Alarcon GS. Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention. *J Rheumatol* 1998;25(3):441-6.
85. Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet* 2002;359(9313):1173-7.
86. Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, et al. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999;58(2):79-84.
87. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Pineiro A, Garcia-Porrúa C, Testa A, Llorca J. High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005;32(7):1219-23.
88. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336(14):973-9.
89. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000;342(12):836-43.
90. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118(12):956-63.

91. Wallberg-Jonsson S, Cvetkovic JT, Sundqvist KG, Lefvert AK, Rantapaa-Dahlqvist S. Activation of the immune system and inflammatory activity in relation to markers of atherothrombotic disease and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29(5):875-82.
92. Del Rincon I, Freeman GL, Haas RW, O'Leary D H, Escalante A. Relative contribution of cardiovascular risk factors and rheumatoid arthritis clinical manifestations to atherosclerosis. *Arthritis Rheum* 2005;52(11):3413-3423.
93. Abu-Shakra M, Polychuck I, Szendro G, Bolotin A, Jonathan BS, Flusser D, et al. Duplex study of the carotid and femoral arteries of patients with rheumatoid arthritis: a controlled study. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35(1):18-23.
94. Kaplan MJ, McCune WJ. New evidence for vascular disease in patients with early rheumatoid arthritis. *Lancet* 2003;361(9363):1068-9.
95. Gonzalez-Juanatey C, Testa A, Garcia-Castelo A, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Vidan J, et al. HLA-DRB1 status affects endothelial function in treated patients with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 2003;114(8):647-52.
96. Bernardeau C, Dernis-Labous E, Blanchard H, Lamarque D, Breban M. Nitric oxide in rheumatology. *Joint Bone Spine* 2001;68(6):457-62.
97. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1141-51.
98. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15(5):831-45.
99. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2(8567):1057-8.
100. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(11):4651-5.

101. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83(5):1774-7.
102. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 1993;334(2):170-4.
103. Novaes GS, de Mello SB, Laurindo IM, Palacios FA, Cossermelli W. [Intra-articular nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1997;52(2):55-9.
104. Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 1995;96(5):2357-63.
105. McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996;184(4):1519-24.
106. St Clair EW, Wilkinson WE, Lang T, Sanders L, Misukonis MA, Gilkeson GS, et al. Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *J Exp Med* 1996;184(3):1173-8.
107. Choi JW. Nitric oxide production is increased in patients with rheumatoid arthritis but does not correlate with laboratory parameters of disease activity. *Clin Chim Acta* 2003;336(1-2):83-7.
108. Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23(2):230-6.
109. Grabowski PS, England AJ, Dykhuizen R, Copland M, Benjamin N, Reid DM, et al. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. Detection using the fasting urinary nitrate:creatinine ratio. *Arthritis Rheum* 1996;39(4):643-7.

110. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000;70(4):241-51.
111. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001;11(8):719-25.
112. Nakayama M, Yoshimura M, Sakamoto T, Shimasaki Y, Nakamura S, Ito T, et al. Synergistic interaction of T-786-->C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene and smoking for an enhanced risk for coronary spasm. *Pharmacogenetics* 2003;13(11):683-8.
113. Ichihara S, Yamada Y, Fujimura T, Nakashima N, Yokota M. Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol* 1998;81(1):83-6.
114. Fowkes FG, Lee AJ, Hau CM, Cooke A, Connor JM, Lowe GD. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and nitric oxide synthase (ecNOS) genes and risks of peripheral arterial disease and coronary heart disease: Edinburgh Artery Study. *Atherosclerosis* 2000;150(1):179-85.
115. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999;100(14):1515-20.
116. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(7):1506-10.
117. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32(3):521-6.

118. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999;99(22):2864-70.
119. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Blangero J, Almasy L, et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):3147-53.
120. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245(1):190-3.
121. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(6):2832-5.
122. Veldman BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, et al. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *J Hypertens* 2002;20(10):2023-7.
123. Cerinic MM, Valentini G, Sorano GG, D'Angelo S, Cuomo G, Fenu L, et al. Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2003;32(5):285-95.
124. John S, Myerscough A, Marlow A, Hajeer A, Silman A, Ollier W, et al. Linkage of cytokine genes to rheumatoid arthritis. Evidence of genetic heterogeneity. *Ann Rheum Dis* 1998;57(6):361-5.
125. Fatini C, Gensini F, Sticchi E, Battaglini B, Angotti C, Conforti ML, et al. High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) in patients with systemic sclerosis. *Am J Med* 2002;112(7):540-4.

126. Lee YH, Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with the development of lupus nephritis. *Lupus* 2004;13(3):188-91.
127. Serrano NC, Paez C, Correa PA, Anaya JM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004;31(11):2163-8.
128. Douglas G, Reilly C, Dooley MA, Page G, Cooper G, Gilkeson G. Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004;31(9):1756-62.

7 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

T-786C ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE POLYMORFISM IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Claiton Viegas Brenol¹, João Carlos Tavares Brenol², Andrei Gibbon Neves³,
Felipe Birriel⁴, Marcele Rizzatti⁴, Paulo Franciscatto⁴, Rafael Pereira⁴,
José Artur Bogo Chies⁵, Ricardo Machado Xavier⁶

Supported in part by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas
de Porto Alegre

1. MD Postgraduate student: Medical Sciences; Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
2. PhD in Medicine: Medical Sciences, UFRGS. Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.
3. Graduate student in Biological Sciences, UFRGS.
4. Graduate students in Medicine, UFRGS.
5. PhD in Life Sciences – Immunology, Paris VI University. Assistant Professor in the Genetics Department, UFRGS.
6. PhD in Immunology, Shimane University, Japan. Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.

Address reprint request and correspondence to:

Ricardo Machado Xavier, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos, 2350, sala 645
90035-003 - Porto Alegre, Brasil.
E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Objective: To examine potential associations of the T-786C polymorphism in the promoter region of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene with susceptibility to and clinical expression of rheumatoid arthritis (RA).

Methods: One hundred and five consecutive Caucasoid patients with diagnosis of RA, satisfying the American College of Rheumatology criteria, who were recruited from the outpatient clinic of the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and 100 Caucasoid healthy controls from the same geographic area were genotyped by polymerase chain reaction for the T-786C polymorphism in the promoter region of the eNOS gene. Clinical, demographic, laboratory and radiographic data from 87 patients were evaluated for the association with specific genotypic and allelic distribution.

Results: The distribution of the T-786C genotype and alleles did not differ significantly between RA patients and controls. The frequency of extra-articular manifestations was significantly greater among the carriers of the C/C genotype than among carriers of the T allele ($P=0.022$). C/C homozygous individuals were significantly associated with extra-articular manifestations comparing with T/T and T/C carriers ($P=0.026$, OR 4.9, 95% CI 1.3-18.9). C Allele was significantly associated with extra-articular manifestations of RA ($P=0.016$, $P_{corr}=0.032$, OR 2.8, 95% CI 1.2-6.5).

Conclusion: The results presented in this study do not provide support for a major role of eNOS T-786C in the susceptibility for RA. However, the findings provide evidences of an association between the T-786C polymorphism of the eNOS gene and extra-articular manifestations of RA.

Key-words: rheumatoid arthritis; polymorphism; T-786C; eNOS; endothelial nitric oxide synthase

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis is a systemic inflammatory disease of unknown etiology (1). It is basically characterized by chronic, erosive and symmetric synovitis preferentially involving peripheral joints and by the presence of rheumatoid factor in most of the patients. In spite of probable environmental factors triggering the onset of the disease, the importance of the genetic component in the etiopathogenesis of RA is clear (2). The genes related to the major histocompatibility complex explain less than 50% of the genetic contribution of susceptibility to disease (3). Besides increasing the risk for the disease, the HLA-DR class II polymorphisms are related to a poorer prognosis (4). Therefore, the identification of additional genes associated with RA susceptibility and severity is a pressing need.

RA is associated with an increased mortality, and the expected survival of RA patients is decreased by 3-10 years, depending on the severity and age of onset of the disease (5). The major cause of death in RA is cardiovascular disease (CVD). Moreover, the cardiovascular mortality in RA is higher than in the general population (6-8).

Endothelial dysfunction (ED) has been reported in several studies in RA (9-15). The ED is in great part generated by the decreased bioavailability of nitric oxide (NO) in endothelium. The presence of ED is directly related to an elevated risk of coronary atherosclerosis (16-18), to severity of coronary disease (16), and to coronary disease in younger patients (18).

As the regulation of the production of NO in the endothelium is mediated by the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), the gene codifying this enzyme is a potential candidate for the susceptibility to atherosclerosis (19). A recent meta-analysis that comprised 26 case-control studies showed an association between

coronary atherosclerosis and the eNOS polymorphisms. The homozygosity for Asp298 allele variant and the “a” allele of the variable number of tandem repeats in the intron 4, as well as the T-786C polymorphism, were associated with CVD (20, 21).

Besides RA, other chronic inflammatory rheumatic disorders, such as systemic lupus erythematosus (SLE), have a higher cardiovascular mortality than age matched population (22). Also, there are some rheumatic diseases presenting with ED. Among them, Behçet’s disease, giant cell arteritis, systemic sclerosis and SLE have been associated with eNOS polymorphisms (23-26).

On the basis of the available evidence, it is not possible to explain the excessive cardiovascular risk in patients with RA through the conventional risk factors (27, 28). Furthermore, extra-articular manifestations and markers of systemic inflammation confer an additional risk for atherosclerosis and cardiovascular death among patients with RA, even after controlling for traditional cardiovascular risk factors and comorbidities (29, 30). In this regard, for their association with atherosclerosis and other inflammatory chronic diseases, the eNOS gene polymorphisms constitute plausible candidates for the susceptibility and phenotypic markers of RA.

The aim of the present study is to investigate associations between the polymorphism T-786C of the promoter region of the eNOS gene and RA clinical manifestations and susceptibility in a Caucasoid South Brazilian population.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls

The study population was comprised of 105 Caucasoid patients with diagnosis of RA, satisfying the American College of Rheumatology criteria (31), from outpatient clinic of the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The

patients had their medical records reviewed for documentation of clinical, laboratory and radiographic data. Eighty-seven patients had complete medical information for the analysis. Extra-articular manifestations evaluated were rheumatoid nodules, amyloidosis, vasculitis and episcleritis. The pattern of joint involvement and the presence of rheumatoid nodules were evaluated by physical examination. X-rays of the hands and feet were obtained for classification between erosive and non-erosive disease by an expert radiologist and a rheumatologist. Atlantoaxial subluxation was documented through X-ray or computed tomography. Amyloidosis and vasculitis were diagnosed by histopathology. The rheumatoid factor was identified by nephelometry. The control group was composed of 100 Caucasoid healthy volunteers. The controls were from the urban population of Porto Alegre, capital of the southernmost state of Brazil, the same geographic area of the patients. Blood samples were obtained for DNA extraction. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre and informed consent was obtained from all patients.

T-786C genotyping

DNA was isolated from peripheral blood cells using the protocol described by Lahiri and Nurnberger (32). DNA samples were stored at -20°C.

The T-786C point variation at the promoter region was analyzed employing the specific primers described in González Ordóñez et al. (33). PCR samples were prepared to a final volume of 25 µl as follows: 1µl of DNA (0.2 - 0.5 µg), 2.5 µl of 10X PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 1ul of 50mM MgCl₂, 1ul of 3mM dNTP mix, 1 µl of 10pmol primer mix and 1U of Taq DNA polymerase. The samples underwent 35 cycles at 98°C for 35 sec, 62°C for 50 sec, and 72°C for 50 sec. The amplified 180-bp fragment was digested with MspI (4h at 37°C), producing 140 bp and 40 bp fragments

(wild-type T allele) or 90-bp, 50-bp and 40-bp fragments (variant -786C allele). Resulting fragments were visualized in 3% agarose gel.

Statistical analysis

Data were analyzed using EPI-INFO version 6 and SPSS for Windows version 12.0. The sample size permitted 80% power to detect a 15% difference (OR 1.8) in the frequency of C alleles between cases and controls at 5% significance level. The association between categorical variables was tested using chi-square (with Yates' correction if necessary) or Fisher's exact tests. The quantitative variables with normal distribution were tested with Student's T test and analysis of variance. When heterogeneity of variances was detected or variables presented non-normal distributions, non-parametric tests were applied (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis). A P value ≤ 0.05 was considered statistically significant. All presented P values are two-tailed. When significance was achieved, corrected P values (P_{corr}) were calculated by multiplying P by the number of alleles compared. The populations were in Hardy-Weinberg equilibrium for the alleles analyzed.

RESULTS

The allele and genotype frequencies of the eNOS T-786C did not differ significantly between the 105 patients and 100 controls as shown in table I.

In table II, are shown the distribution of the genotypes of the T-786C, clinical features and demographic characteristics of 87 RA patients. The frequency of extra-articular manifestations was significantly greater in C/C homozygous patients comparing with patients with the other genotypes ($P=0.022$). The odds of the of the C/C genotype patients to present extra-articular manifestations were significantly greater compared

with the heterozygous and T/T homozygous patients taken together ($P=0.026$, OR 4.9, 95% CI 1.3-18.9) (table III). There was no statistically significant difference among genotypic groups in respect to demographic characteristics, age of onset of the disease, presence of rheumatoid factor, time of diagnosis, erosions, rheumatoid nodules or atlantoaxial subluxation.

The comparisons between the frequencies of C and T alleles and clinical features of RA patients are shown in table IV. It was observed a significant association between the C allele and extra-articular manifestations ($P=0.016$, $P_{\text{corr}}=0.032$, OR 2.8, 95% CI 1.2-6.5). There were no statistically significant differences verified among alleles concerning demographic characteristics, age of onset of the disease, positivity of rheumatoid factor, time of diagnosis, erosions, rheumatoid nodules or atlantoaxial subluxation.

DISCUSSION

The findings of the present study did not show statistically significant differences between patients and controls, but suggest that there is an association between the homozygosity for C allele of the polymorphism T-786C and a more severe RA clinical phenotype. The results supporting the hypothesis are the association between the C/C genotype and extra-articular manifestations compared with T/T and T/C carriers ($P=0.026$, OR 4.9, 95% CI 1.3-18.9), as well as the higher frequency of C allele among patients with extra-articular manifestations of RA ($P=0.016$, $P_{\text{corr}}=0.032$, OR 2.8, 95% CI 1.2-6.5).

NO is produced constitutively by endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) synthases, and, in higher concentrations, by inducible NOS (iNOS) after inflammatory stimulation. Nitric oxide-dependent tissue injury has been implicated in a variety of

rheumatic diseases, including rheumatoid arthritis (34). The documentation of increased serum and intraarticular nitrite and nitrate levels in patients with rheumatoid arthritis is an indirect evidence of the overproduction of ON (35, 36). This overproduction is probably promoted by the stimuli of inflammatory cytokines, including IFN- α , TNF- α and IL-1 β , and determines joint tissue degradation (37). Conversely, the production of NO by eNOS may serve a protective, or anti-inflammatory, function by preventing the adhesion and release of oxidants by activated neutrophils in the microvasculature (34). As assessed by luciferase reporter gene assays, the T-786C mutation resulted in a significant reduction in eNOS gene promoter activity, suggesting that the T-786C mutation in the eNOS gene reduces the endothelial NO synthesis. Thus, it seems reasonable to assume that this altered eNOS expression might play a role in the perpetuation and increase of the inflammatory cascade. Particularly in RA, it could predispose to a more severe disease. This explanation corroborates the finding of a higher frequency of extra-articular manifestations in the C/C genotype patients. In the other hand, there was no association of the T-786C with erosions. Possible explanations are the high percentage (90.8%) of erosive disease among the patients studied and the reduced sample size to detect modest effects. This high prevalence of erosions probably is related to the duration of the disease, since the median of the arthritis duration was 7 years, and because most of the patients are from lower socioeconomic classes, which correlates with a poorer prognosis (38). Moreover, the sample was selected from the outpatient clinic of a university hospital, which is a reference center for rheumatic diseases with a higher number of severe cases than the general practice.

As mentioned before, RA is related to the development of CVD. In this view, the association between T-786C and more severe RA is interesting, because this polymorphism is a genetic risk factor for CVD too. In 2004, Gonzalez-Gay et al studied the influence of genetic factors in the risk of atherosclerosis in RA patients. The authors

found that RA patients carrying the HLA-DRB1*0404 allele exhibit severe ED (12). The data presented here suggest the need to examine carefully the relationship between T-786C polymorphism, disease severity and atherosclerosis in RA.

The allele and genotype frequencies of the eNOS T-786C did not differ significantly between the 105 patients and 100 controls. The controls included were Caucasian subjects living in the same geographic area and from similar ethnic origins of the patients, descending from European immigrants (mainly of Portuguese, German and Italian). Were excluded from control group individuals under 30 years of age to avoid including any future case of RA, since the peak of incidence of RA is between the fourth and fifth decades. The subjects were unrelated and showed no phenotypic signs of interethnic admixture. This ethnic uniformity is relevant because there are documented interethnic differences in the frequencies of the eNOS polymorphisms (39). In the population studied, the frequencies of the eNOS T-786C alleles and genotypes were lower than that found in American Caucasians (C allele 35% vs. 42%; C/C homozygous 12% vs. 16%) (39). These lower frequencies could explain a possible lack of power to detect statistically significant differences of minor magnitude between patients and controls. However, the present finding confirm the result from a previous Spanish publication with a higher sample size, 200 RA patients and 251 ethnically matched Caucasoid controls, that found no significant differences neither in genotype and allele frequencies nor in the presence of rheumatoid factor. The results were negative for two eNOS polymorphisms, T-786C and Glu298Asp (40).

In conclusion, the results presented in this study do not provide support for a major role of eNOS T-786C in the susceptibility for RA. However, the findings provide evidences of an association between the T-786C polymorphism of the eNOS gene and extra-articular manifestations of RA. Further studies are needed to confirm this association and to elucidate the role played by this polymorphism in the pathogenesis of

clinical manifestations and CVD in RA. The identification of severity markers is required to guide treatment strategies that may delay the progression of RA and its complications.

REFERENCES

1. Worthington J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2005.
2. Barton A, Ollier W. Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14(3):260-9.
3. Wordsworth P, Bell J. Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50(6):343-6.
4. Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzschel H, et al. HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40(2):341-51.
5. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005;4(3):130-6.
6. Prior P, Symmons DP, Scott DL, Brown R, Hawkins CF. Cause of death in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1984;23(2):92-9.
7. Mutru O, Laakso M, Isomaki H, Koota K. Cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Cardiology* 1989;76(1):71-7.
8. Myllykangas-Luosujarvi R, Aho K, Kautiainen H, Isomaki H. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22(6):1065-7.
9. Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavaara S, Makimattila S, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1637-41.

10. Hermann F, Forster A, Chenevard R, Enseleit F, Hurlimann D, Corti R, et al. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(3):461-4.
11. Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2002;106(17):2184-7.
12. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Ollier WE. Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: influence of HLA-DRB1 alleles. *Autoimmun Rev* 2004;3(4):301-4.
13. Yki-Jarvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(7):630-4.
14. Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Passauer J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis* 2005.
15. Hansel S, Lassig G, Pistrosch F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis* 2003;170(1):177-80.
16. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, et al. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997;129(1):111-8.
17. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101(9):948-54.
18. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996;78(11):1210-4.

19. Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis* 2001;154(3):521-7.
20. Rossi GP, Maiolino G. Do meta-analyses of association studies of endothelial nitric oxide synthase variants and ischemic heart disease provide conclusive answers? *Circulation* 2004;110(11):e305-6; author reply e305-6.
21. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;109(11):1359-65.
22. Bjornadal L, Yin L, Granath F, Klareskog L, Ekbom A. Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95. *J Rheumatol* 2004;31(4):713-9.
23. Salvarani C, Casali B, Nicoli D, Farnetti E, Macchioni P, Catanoso MG, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(11):3219-23.
24. Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Olivieri I, Ciancio G, Cantini F, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease. *J Rheumatol* 2002;29(3):535-40.
25. Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(11):1083-7.
26. Karasneh JA, Hajeer AH, Silman A, Worthington J, Ollier WE, Gul A. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(5):614-7.
27. Dessein PH, Joffe BI, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(3):R634-43.

28. del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001;44(12):2737-45.
29. Del Rincon I, Freeman GL, Haas RW, O'Leary D H, Escalante A. Relative contribution of cardiovascular risk factors and rheumatoid arthritis clinical manifestations to atherosclerosis. *Arthritis Rheum* 2005;52(11):3413-3423.
30. Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2005;52(3):722-32.
31. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):315-24.
32. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19(19):5444.
33. Ordonez AJ, Carreira JM, Franco AG, Sanchez LM, Alvarez MV, Garcia EC. Two expressive polymorphisms on the endothelial nitric oxide synthase gene (intron4, 27 bp repeat and -786 T/C) and the venous thromboembolism. *Thromb Res* 2000;99(6):563-6.
34. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15(5):831-45.
35. Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23(2):230-6.
36. Novaes GS, de Mello SB, Laurindo IM, Palacios FA, Cossermelli W. [Intra-articular nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1997;52(2):55-9.
37. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1141-51.

38. Markenson JA. Worldwide trends in the socioeconomic impact and long-term prognosis of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1991;21(2 Suppl 1):4-12.
39. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001;11(8):719-25.
40. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sanchez E, Lopez-Nevot MA, Amoli MM, Garcia-Porrua C, et al. Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(9):1182-5.

Table I. Frequencies of the genotypes and alleles of the T-786C eNOS polymorphism in patients with rheumatoid arthritis (RA) and controls*

Variables	RA patients	Control subjects	P
Genotypes	N=105 (%)	n=100 (%)	
T/T	45 (42.8)	42 (42)	
T/C	49 (46.7)	46 (46)	0.942 *
C/C	11 (10.5)	12 (12)	
Alleles	n=210 (%)	n=200 (%)	
C	71 (33.8)	70 (35)	0.881 ¶
T	139 (66.2)	130 (65)	

* Qui-square. ¶ Qui-square with Yates' correction.

Table II. Demographic and clinical features of 87 patients with RA and genotypic distribution of the T-786C eNOS polymorphism

characteristics	Genotypic distribution				P§
	RA patients	among RA patients			
	n=87	T/T n=35	T/C n=41	C/C n=11	
Female	70 (80.5)	26 (74.3)	36 (87.8)	8 (72.7)	0.263
Age#	54.8 (±11.3)	53.4 (±11.4)	56.3 (±11.4)	53.5 (±10.9)	0.505
Age of diagnosis#	46.1 (±11.8)	43.8 (±11.9)	47.9 (±12.1)	46.5 (±10)	0.347
Age of the onset of symptoms#	42.8 (±11.3)	40.7 (±12.2)	44.2 (±11)	44 (±10)	0.469
Duration of diagnosis‡	7 (5.2-12)	8 (5.9-12.8)	6.5 (5.2-11.2)	6.8 (4.8-7.5)	0.387
Rheumatoid factor positivity	79 (90.8)	32 (91.4)	36 (87.8)	11 (100)	0.465
Erosions	79 (90.8)	31 (88.6)	38 (92.7)	10 (90.9)	0.826
Extra-articular manifestations	16 (18.4)	3 (8.6)	8 (19.5)	5 (45.5)	0.022*
Rheumatoid nodules	12 (13.8)	3 (8.6)	6 (14.6)	3 (27.3)	0.285
Atlantoaxial subluxation	5 (13.8)	2 (5.7)	2 (4.9)	1 (9.1)	0.867
Vasculitis	2 (2.3)	-	1 (2.4)	1 (9.1)	-
Amyloidosis	2 (2.3)	-	2 (4.9)	-	-
Episcleritis	1 (1.1)	-	-	1 (9.1)	-

¶ Data are presented as number (percentage) of patients between each genotypic group, except when indicated. § Comparisons between each genotypic group (chi-square, analysis of variance or Kruskal-Wallis' test). # Values are presented in years with mean and standard deviation. ‡ Values are presented in years with median, percentiles 25 and 75. *P < 0.05.

Tabela III. Demographic and clinical features of 87 patients with RA and genotypic distribution of the T-786C eNOS polymorphism (C/C vs. T/T+T/C)¶

	Genotypic distribution			
	among RA patients		Odds ratio (95% CI)	P§
	C/C n=11	T/T + T/C n=76		
Female	8 (72.7)	67 (89.3)	0.677 (0.1-4.4)	0.839
Age#	53.5 (10.9)	55.0 (11.5)	-	0.691
Age of diagnosis#	46.5 (10.0)	46.1 (12.1)	-	0.909
Age of the onset of symptoms#	44.1 (10.0)	42.6 (11.6)	-	0.738
Duration of diagnosis‡	6.8 (4.8-7.5)	7.3 (5.5-12.1)	-	0.307
Rheumatoid factor positivity	11 (100)	68 (89.5)	-	-
Erosions	10 (90.9)	69 (90.8)	1.0 (0.1-50.2)	1.000
Extra-articular manifestations	5 (45.5)	11 (14.5)	4.9 (1.3-18.9)	0.026*
Rheumatoid nodules	3 (27.3)	9 (11.8)	2.8 (0.5-11.7)	0.174
Atlantoaxial subluxation	1 (9.1)	4 (5.3)	1.8 (0.1-20.6)	0.5
Vasculitis	1 (9.1)	1 (1.3)	7.5 (0.1-596.1)	0.238
Amyloidosis	-	2 (2.6)	-	-
Episcleritis	1 (9.1)	-	-	-

¶ Data are presented as number (percentage) of patients between each genotypic group, except when indicated. § Comparisons between each genotypic group (qui-square with Yates' correction, Fisher's exact test, Student's T test ou Mann-Whitney's teste). # Values are presented in years with mean and standard deviation. ‡ Values are presented in years with median, percentiles 25 and 75. *P < 0.05.

Tabela IV. Clinical features of 87 patients with RA and allelic distribution of the T-786C eNOS polymorphism allelic distribution

	C n=63 (%)	T n=111 (%)	Odds ratio (95% CI)	P§
Rheumatoid factor positivity	58 (92.1)	100 (90.1)	1.3 (0.4-5.0)	0.890
Erosions	58 (92.1)	100 (90.1)	1.3 (0.4-5.0)	0.890
Extra-articular manifestations	18 (28.6)	14 (12.6)	2.8 (1.2-6.5)	0.016*
Rheumatoid nodules	12 (19.0)	12 (10.8)	1.9 (0.7-5.0)	0.199
Atlantoaxial subluxation	4 (6.3)	6 (5.4)	1.2 (0.2-5.2)	0.867
Vasculitis	3 (4.8)	1 (0.1)	5.5 (0.4-291.3)	0.271
Amyloidosis	2 (3.1)	2 (1.8)	1.8 (0.12-25.1)	0.918
Episcleritis	2 (3.1)	-	-	-

¶ Data are presented as number (percentage) of patients between each allelic group, except when indicated. § qui-square with Yates' correction or Fisher's exact test.

* $P_{\text{corr}}=0.032$.

8 VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS

POLIMORFISMO T-786C DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL NA ARTRITE REUMATÓIDE

Claiton Viegas Brenol¹, João Carlos Tavares Brenol², Andrei Gibbon Neves³,
Felipe Birriel⁴, Marcele Rizzatti⁴, Paulo Franciscatto⁴, Rafael Pereira⁴,
José Artur Bogo Chies⁵, Ricardo Machado Xavier⁶

Financiado parcialmente pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

1. Mestrando no PPG de Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
2. Doutor em Medicina: Ciências Médicas pela UFRGS. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da UFRGS.
3. Graduando em Ciências Biológicas pela UFRGS.
4. Graduandos em Medicina pela UFRGS.
5. Doutor em Ciências da Vida, especialidade de Imunologia, pela Universidade de Paris VI. Professor Adjunto do Departamento de Genética da UFRGS.
6. Doutor em Imunologia pela Universidade de Shimane, Japão. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da UFRGS

Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Endereço para correspondência:

Ricardo Machado Xavier, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos, 2350, sala 645

90035-003 - Porto Alegre, Brasil.

E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

Objetivo: avaliar associações potenciais entre o polimorfismo T-786C da região promotora do gene da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) com a expressão clínica e suscetibilidade para artrite reumatóide (AR).

Métodos: Cento e cinco pacientes caucasóides com diagnóstico de artrite reumatóide, satisfazendo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia, que foram recrutados no ambulatório do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e 100 controles caucasóides saudáveis oriundos da mesma área geográfica dos pacientes foram genotipados através de reação de polimerase em cadeia para o polimorfismo T-786C da região promotora do gene da eNOS. Dados clínicos, demográficos, laboratoriais e radiográficos de 87 pacientes foram avaliados quanto à associação com genótipos e alelos específicos.

Resultados: A distribuição do genótipo T-786C e alelos não se diferenciou significativamente entre os pacientes portadores de AR e controles. A frequência das manifestações extra-articulares foi significativamente maior entre os portadores do genótipo C/C em comparação com os pacientes portadores do alelo T ($P=0,0026$, RC 4,9; 95% CI 1,3-18,9). O alelo C foi significativamente associado com as manifestações extra-articulares da AR ($P=0,016$, $P_{corr}=0,032$, RC 2,8, IC 95% 1,2-6,5).

Conclusão: Os achados apresentados não evidenciaram um papel importante do polimorfismo estudado na suscetibilidade para a AR. No entanto, os resultados evidenciaram uma associação entre o polimorfismo T-786C do gene da eNOS e manifestações extra-articulares da AR.

Palavras-chave: artrite reumatóide; polimorfismos; T-786C; eNOS; óxido nítrico sintase endotelial.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia auto-imune (1). Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas e a maioria dos pacientes apresenta fator reumatóide positivo. Apesar de prováveis fatores ambientais deflagrarem o início da doença, a existência do componente genético na etiopatogênese da AR é claro (2). Os genes relacionados ao HLA explicam menos de 50% da contribuição genética para suscetibilidade da AR (3). Além de aumentar o risco de desenvolver AR, os polimorfismos do HLA-DR de classe II são relacionados a um pior prognóstico (4). Assim, a identificação de novos genes associados à suscetibilidade e gravidade da AR é uma necessidade premente.

Pacientes portadores de AR têm uma sobrevida menor que a da população em geral. A expectativa de vida pode diminuir de 3 a 10 anos dependendo da gravidade da doença e da idade de início da mesma (5). A principal causa de morte em pacientes com AR é a doença cardiovascular (DCV). Além disso, a mortalidade por DCV é maior na AR em comparação com a população em geral (6-8).

A disfunção endotelial (DE) tem sido reportada em diversos estudos na AR (9-15). A DE é, em grande parte, gerada pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (ON) no endotélio. A documentação de disfunção endotelial é diretamente relacionada a um risco aumentado para aterosclerose coronariana (16-18), à severidade de doença coronariana (16), e à doença coronariana em pacientes jovens (18)

Como a regulação da produção de óxido nítrico no endotélio se dá através da expressão da óxido nítrico sintase endotelial, o gene codificador de tal enzima, eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*), é um potencial candidato para suscetibilidade de doença aterosclerótica (19). Recente meta-análise que incluiu 26 estudos de caso-

controle verificou a associação entre doença coronariana aterosclerótica e polimorfismos de eNOS. As homozigoses para os alelos Asp298 e alelo “a” dos VNTRs do íntron 4, bem como o polimorfismo T-786C, estiveram associados à presença de doença cardíaca isquêmica (20, 21).

Além da AR, outras doenças reumatológicas, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), têm mortalidade cardiovascular aumentada com relação à população da mesma faixa etária (22). Outras doenças reumatológicas também apresentam DE e os polimorfismos da eNOS foram associados com Behçet, arterite de células gigantes, esclerose sistêmica e LES (23-26).

Com base nos dados disponíveis, não é possível explicar o excesso de risco cardiovascular em portadores de AR através dos fatores de risco convencionais (27, 28). Além disso, manifestações extra-articulares e marcadores de inflamação sistêmica conferem risco adicional para aterosclerose e morte cardiovascular entre pacientes com AR, mesmo após o controle de fatores de risco cardiovascular tradicionais e comorbidades (29, 30). Assim, por suas associações com aterosclerose e outras doenças inflamatórias crônicas, os polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial constituem plausíveis genes candidatos para suscetibilidade e marcadores fenotípicos da AR.

O objetivo do presente estudo é investigar a associação dos polimorfismos T-786C da região promotora do gene da eNOS com AR e suas manifestações clínicas em uma amostra de pacientes e controles saudáveis da região sul do Brasil.

PACIENTES E MÉTODOS

População em estudo

A população do estudo foi composta por 105 pacientes caucasóides de amostra de conveniência de pacientes com diagnóstico de AR atendidos pelo Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Todos os pacientes

preenchem os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia para AR (31). Estes pacientes tiveram o DNA genômico coletado e armazenado. Os pacientes tiveram seus arquivos médicos revisados para a obtenção de dados clínicos, laboratoriais e radiológicos. Oitenta e sete pacientes apresentavam registros médicos completos para a análise. As manifestações extra-articulares avaliadas foram nódulos reumatóides, amiloidose, vasculite e episclerite. O padrão de acometimento articular e a presença de nódulos reumatóides foram verificados através de avaliação clínica descritiva. Radiografias de mãos e pés foram obtidas para a classificação entre doença erosiva e não erosiva por radiologista ou reumatologista experientes. A subluxação atlantoaxial foi documentada através de radiografia ou tomografia computadorizada de coluna cervical. Amiloidose e vasculite foram diagnosticadas por histopatologia. O fator reumatóide foi identificado através de nefelometria.

Os controles são 100 voluntários caucasóides saudáveis e originados da região urbana de Porto Alegre, da mesma forma que os pacientes estudados. A amostra para extração de DNA genômico foi coletada após consentimento informado. O protocolo foi submetido às Comissões Científica e de Ética do HCPA para sua realização.

Detecção do polimorfismo T-786C

O DNA do sangue periférico foi extraído de acordo com o método descrito por Lahiri e Nurnberger (32). O DNA genômico foi estocado a -20°C e mantido no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O polimorfismo T-786C foi analisado utilizando os *primers* específicos conforme descritos por González Ordóñez et al (33). As amostras da reação foram preparadas da seguinte maneira: 1 μl de DNA (0,2-0,5 μg), 2,5 μl de tampão 10X contendo 30 mM de dNTP e 10 pmol de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase (volume total da reação de 25 μl). As

amostras foram submetidas a 35 ciclos em uma temperatura de 98° por 35 segundos, 62° por 50 segundos e 72° por 50 segundos. O fragmento amplificado de 180 pares de bases (pb) foi digerido com MspI (4 horas a 37°), produzindo fragmentos de 140 pb e 40 pb correspondentes à presença dos alelos normais ou fragmentos de 90 pb, 50 pb e 40 pb relacionados a variante alélica -786C. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se os programas EPI-INFO versão 6 e SPSS para Windows versão 12.0. A presente amostra permitiu um poder de 80% com nível de significância de 5% para identificar uma diferença de 15% (OR 1,8) na frequência do alelo C entre os casos e controles. A análise da associação entre as variáveis categóricas, incluindo as frequências alélicas e genotípicas, foi feita através do teste do qui-quadrado (com correção de Yates em tabelas 2X2) ou teste exato de Fisher. Variáveis quantitativas com distribuição normal foram testadas com a utilização de teste T de Student para amostras independentes ou Mann-Whitney, e de análise de variância. Diante da ocorrência de heterogeneidade de variâncias, foi aplicado teste de análise de variância não-paramétrico (Kruskal-Wallis). Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os valores de P apresentados são bicaudais. Quando significativos, os valores de P foram corrigidos (P_{corr}) multiplicando P pelo número de alelos comparados. As populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambos os alelos analisados.

RESULTADOS

As frequências alélicas e genóticas do T-786C dos 105 pacientes e 100 controles estão demonstradas na tabela I. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre casos e controles.

A tabela II demonstra a distribuição genotípica do T-786C e as características clínicas e demográficas de 87 pacientes com artrite reumatóide. A frequência de manifestações extra-articulares foi significativamente maior nos homozigotos C/C ($P=0,022$). As chances dos pacientes portadores da homozigose C/C apresentarem manifestações extra-articulares foram significativamente maiores em comparação com heterozigotos e homozigotos T/T ($P=0,026$, RC 4,9, IC 95% 1,3-18,9) (tabela III). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos genotípicos nas características demográficas, bem como idade de início dos sintomas, tempo de diagnóstico, presença de fator reumatóide, erosões, nódulos reumatóides e subluxação atlantoaxial.

As comparações entre as frequências dos alelos C e T e os dados clínicos dos pacientes portadores de artrite reumatóide estão demonstrados na tabela IV. Foi observada associação significativa da presença do alelo C e manifestações extra-articulares ($P=0,016$, $P_{corr}=0,032$, RC 2,8, IC 95% 1,2-6,5). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os alelos quanto à presença de fator reumatóide, erosões, nódulos reumatóides e subluxação atlantoaxial.

DISCUSSÃO

Os achados do presente estudo não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes e o grupo controle, mas sugerem que existe uma associação entre a homozigose para o alelo C do polimorfismo T-786C e um fenótipo clínico mais grave de AR. Os resultados que suportam esta hipótese são a associação

entre os portadores do genótipo C/C e manifestações extra-articulares em comparação com portadores dos genótipos T/T e T/C, assim como a maior frequência do alelo C entre os pacientes com manifestações extra-articulares de AR.

O óxido nítrico (ON) é produzido constitutivamente pelas sintases endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), e, em maiores concentrações, pela sintase indutível (iNOS) após estímulo inflamatório. O dano tecidual dependente do óxido nítrico tem sido implicado numa variedade de doenças reumatológicas, incluindo a AR (34). A documentação do aumento intra-articular e no soro dos níveis de nitrito e nitrato em pacientes portadores de AR é uma evidência indireta do aumento de produção de ON (35, 36). Este aumento da produção de ON é proporcionada pelo estímulo de citocinas inflamatórias, incluindo IFN- α , TNF- α e IL-1 β , determinando degradação da cartilagem (37). Inversamente, a produção de ON pela eNOS pode servir como função protetora, ou antiinflamatória, prevenindo a adesão e a liberação de substâncias oxidativas por neutrófilos ativados na microvasculatura (34). Como documentado em ensaio de luciferase com gene repórter, a mutação T-786C resultou em uma significativa redução da atividade promotora do gene da eNOS, este achado sugere que tal mutação pode reduzir a síntese de ON advindo do endotélio. Assim, parece razoável assumir que esta expressão alterada de eNOS pode ter um papel na perpetuação e aumento da cascata inflamatória. Particularmente na AR, isto poderia predispor a uma doença mais agressiva. Esta explicação corrobora o achado de uma frequência maior de manifestações extra-articulares nos portadores do genótipo C/C. Por outro lado, não houve associação do T-786C com erosões. Possíveis explicações são a alta percentagem (90,8%) de doença erosiva entre os pacientes estudados, já que a mediana do tempo de duração da artrite foi de 7 anos e a maioria dos pacientes é pertencente a classes socioeconômicas mais baixas, e o reduzido tamanho da amostra para detectar efeitos menores. Pacientes pertencentes a classes sociais mais baixas apresentam um pior prognóstico à AR (38).

Além do mais, a amostra selecionada é oriunda de centro de referência em reumatologia, maior número de casos graves do que a prática clínica em geral.

Como mencionado anteriormente, a AR está relacionada ao desenvolvimento de DCV. Neste cenário, a associação entre o polimorfismo T-786C e uma artrite reumatóide mais grave é interessante, porque esta mutação é também um fator de risco genético para DCV. Em 2004, Gonzalez-Gay et al estudou a influência de fatores de risco genéticos para aterosclerose em pacientes com AR. Os autores verificaram que pacientes com AR portadores do alelo HLA-DRB1*0404 exibiam DE severa (12). Estes dados aqui apresentados sugerem a necessidade de examinar cuidadosamente a relação entre o polimorfismo T-786C, gravidade de doença e aterosclerose na AR.

As freqüências dos alelos e genótipos do eNOS T-786C não diferiram significativamente entre os 105 pacientes com AR e os 100 controles. Os controles incluídos eram caucasóides que habitavam a mesma área geográfica que os pacientes e de mesma origem étnica, descendendo de imigrantes europeus (principalmente portugueses, alemães e italianos). Foram excluídos os controles com idade inferior aos 30 anos para evitar a inclusão de futuros casos de AR, desde que o pico de incidência da doença situa-se entre a quarta e quinta décadas. Os indivíduos eram não relacionados e não demonstravam sinais fenotípicos de miscigenação étnica. Esta uniformidade étnica é relevante porque existem diferenças nas freqüências genotípicas do gene da eNOS entre etnias (39). Na população estudada, as freqüências dos alelos e genótipos do polimorfismo T-786C foram menores do que as encontradas em caucasóides americanos (alelo C 35% vs. 42%; homozigotos C/C 12% vs. 16%) (39). Estas freqüências menores poderiam explicar uma possível falta de poder para detectar diferenças de menor magnitude entre pacientes e controles. Apesar disto, o presente achado confirma o resultado de um estudo espanhol prévio com maior número de pacientes e controles, 200 pacientes e 251 controles caucasóides, que não demonstrou diferenças nas freqüências

alélicas e genótípicas ou na presença de positividade para o fator reumatóide. Os resultados foram negativos para dois polimorfismos de eNOS, T-786C e Glu298Asp (40).

Concluindo, os resultados apresentados neste estudo não evidenciam um papel importante deste polimorfismo na suscetibilidade para AR. No entanto, os achados evidenciam uma associação entre o polimorfismo T-786C do gene da eNOS e manifestações extra-articulares da AR. Mais estudos são necessárias para confirmar esta associação e para elucidar o papel deste polimorfismo na patogênese das manifestações clínicas e DCV da AR. A identificação de novos marcadores de gravidade são requeridos para guiar estratégias de tratamento que posterguem a progressão da AR e suas complicações.

REFERÊNCIAS

1. Worthington J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2005.
2. Barton A, Ollier W. Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14(3):260-9.
3. Wordsworth P, Bell J. Polygenic susceptibility in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50(6):343-6.
4. Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzschel H, et al. HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40(2):341-51.
5. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005;4(3):130-6.
6. Prior P, Symmons DP, Scott DL, Brown R, Hawkins CF. Cause of death in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1984;23(2):92-9.

7. Mutru O, Laakso M, Isomaki H, Koota K. Cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Cardiology* 1989;76(1):71-7.
8. Myllykangas-Luosujarvi R, Aho K, Kautiainen H, Isomaki H. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22(6):1065-7.
9. Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavaara S, Makimattila S, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1637-41.
10. Hermann F, Forster A, Chenevard R, Enseleit F, Hurlimann D, Corti R, et al. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(3):461-4.
11. Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2002;106(17):2184-7.
12. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Ollier WE. Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: influence of HLA-DRB1 alleles. *Autoimmun Rev* 2004;3(4):301-4.
13. Yki-Jarvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(7):630-4.
14. Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Passauer J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis* 2005.
15. Hansel S, Lassig G, Pistrosch F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis* 2003;170(1):177-80.

16. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, et al. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997;129(1):111-8.
17. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101(9):948-54.
18. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996;78(11):1210-4.
19. Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis* 2001;154(3):521-7.
20. Rossi GP, Maiolino G. Do meta-analyses of association studies of endothelial nitric oxide synthase variants and ischemic heart disease provide conclusive answers? *Circulation* 2004;110(11):e305-6; author reply e305-6.
21. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;109(11):1359-65.
22. Bjornadal L, Yin L, Granath F, Klareskog L, Ekbom A. Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95. *J Rheumatol* 2004;31(4):713-9.
23. Salvarani C, Casali B, Nicoli D, Farnetti E, Macchioni P, Catanoso MG, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(11):3219-23.
24. Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Olivieri I, Ciancio G, Cantini F, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease. *J Rheumatol* 2002;29(3):535-40.

25. Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(11):1083-7.
26. Karasneh JA, Hajeer AH, Silman A, Worthington J, Ollier WE, Gul A. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(5):614-7.
27. Dessein PH, Joffe BI, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(3):R634-43.
28. del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001;44(12):2737-45.
29. Del Rincon I, Freeman GL, Haas RW, O'Leary D H, Escalante A. Relative contribution of cardiovascular risk factors and rheumatoid arthritis clinical manifestations to atherosclerosis. *Arthritis Rheum* 2005;52(11):3413-3423.
30. Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2005;52(3):722-32.
31. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):315-24.
32. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19(19):5444.
33. Ordonez AJ, Carreira JM, Franco AG, Sanchez LM, Alvarez MV, Garcia EC. Two expressive polymorphisms on the endothelial nitric oxide synthase gene (intron4, 27 bp repeat and -786 T/C) and the venous thromboembolism. *Thromb Res* 2000;99(6):563-6.

34. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15(5):831-45.
35. Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23(2):230-6.
36. Novaes GS, de Mello SB, Laurindo IM, Palacios FA, Cossermelli W. [Intra-articular nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1997;52(2):55-9.
37. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1141-51.
38. Markenson JA. Worldwide trends in the socioeconomic impact and long-term prognosis of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1991;21(2 Suppl 1):4-12.
39. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001;11(8):719-25.
40. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sanchez E, Lopez-Nevot MA, Amoli MM, Garcia-Porrua C, et al. Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(9):1182-5.

Tabela I. Genótipos e freqüências alélicas do polimorfismo T-786C em pacientes com artrite reumatóide (AR) e controles.

	Artrite reumatóide	Controles	P
Genótipos	n=105 (%)	n=100 (%)	
T/T	45 (42,8)	42 (42)	
T/C	49 (46,7)	46 (46)	0,942 *
C/C	11 (10,5)	12 (12)	
Alelos	n=210 (%)	n=200 (%)	
C	71 (33,8)	70 (35)	0,881 ¶
T	139 (66,2)	130 (65)	

* Qui-quadrado; ¶ Qui-quadrado com correção de Yates.

Tabela II. Características demográficas e clínicas dos pacientes com artrite reumatóide (AR) e distribuição genotípica do eNOS-786¶

	Todos				P§
	pacientes com AR	Pacientes com AR divididos por genótipos			
		T/T	T/C	C/C	
	n=87	n=35	n=41	n=11	
Sexo feminino	70 (80,5)	26 (74,3)	36 (87,8)	8 (72,7)	0,263
Idade#	54,8 (±11,3)	53,4 (±11,4)	56,3 (±11,4)	53,5 (±10,9)	0,505
Idade do diagnóstico#	46,1 (±11,8)	43,8 (±11,9)	47,9 (±12,1)	46,5 (±10)	0,347
Idade de início dos sintomas#	42,8 (±11,3)	40,7 (±12,2)	44,2 (±11)	44 (±10)	0,469
Tempo de diagnóstico‡	7 (5,2-12)	8 (5,9-12,8)	6,5 (5,2-11,2)	6,8 (4,8-7,5)	0,387
Fator reumatóide positivo	79 (90,8)	32 (91,4)	36 (87,8)	11 (100)	0,465
Erosões	79 (90,8)	31 (88,6)	38 (92,7)	10 (90,9)	0,826
Manifestações extra-articulares	16 (18,4)	3 (8,6)	8 (19,5)	5 (45,5)	0,022*
Nódulos reumatóides	12 (13,8)	3 (8,6)	6 (14,6)	3 (27,3)	0,285
Subluxação atlanto-axial	5 (13,8)	2 (5,7)	2 (4,9)	1 (9,1)	0,867
Vasculite	2 (2,3)	-	1 (2,4)	1 (9,1)	-
Amiloidose	2 (2,3)	-	2 (4,9)	-	-
Episclerite	1 (1,1)	-	-	1 (9,1)	-

¶ Dados apresentados como número de pacientes e percentagem dentro de cada genótipo entre parênteses, exceto quando indicado. § Comparação entre diferentes grupos genotípicos (qui-quadrado, análise de variância ou teste de Kruskal-Wallis). # Dados apresentados como média e desvio padrão; ‡ Dados apresentados como mediana, percentis 25 e 75. *p < 0,05.

Tabela III. Características clínicas dos pacientes com artrite reumatóide de acordo com a distribuição genotípica (C/C vs. T/T+T/C)¶

	C/C n=11	T/T+T/C n=76	Razão de chances (IC 95%)	P§
Sexo feminino	8 (72,7)	67 (89,3)	0,677 (0,1-4,4)	0,839
Idade#	53,5 (10,9)	55,0 (11,5)	-	0,691
Idade do diagnóstico#	46,5 (10,0)	46,1 (12,1)	-	0,909
Idade de início dos sintomas#	44,1 (10,0)	42,6 (11,6)	-	0,738
Tempo de diagnóstico†	6,8 (4,8-7,5)	7,3 (5,5-12,1)	-	0,307
Fator reumatóide positivo	11 (100)	68 (89,5)	-	-
Erosões	10 (90,9)	69 (90,8)	1,0 (0,1-50,2)	1,000
Manifestações extra-articulares	5 (45,5)	11 (14,5)	4,9 (1,3-18,9)	0,026*
Nódulos reumatóides	3 (27,3)	9 (11,8)	2,8 (0,5-11,7)	0,174
Subluxação atlanto-axial	1 (9,1)	4 (5,3)	1,8 (0,1-20,6)	0,5
Vasculite	1 (9,1)	1 (1,3)	7,5 (0,1-596,1)	0,238
Amiloidose	-	2 (2,6)	-	-
Episclerite	1 (9,1)	-	-	-

¶ Dados apresentados como número de pacientes e percentagem dentro de cada grupo alélico entre parênteses, exceto quando indicado. § Comparação entre diferentes grupos genotípicos (qui-quadrado com correção de Yates, teste exato de Fisher, teste T de Student ou teste de Mann-Whitney).# Dados apresentados como média e desvio padrão;† Dados apresentados como mediana, percentis 25 e 75.*p < 0,05. Qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher.* p<0,05.

Tabela IV. Características clínicas dos pacientes com artrite reumatóide de acordo com a distribuição alélica¶

	C n=63 (%)	T n=111 (%)	Razão de chances (IC 95%)	P§
Fator reumatóide positivo	58 (92,1)	100 (90,1)	1,3 (0,4-5,0)	0,890
Erosões	58 (92,1)	100 (90,1)	1,3 (0,4-5,0)	0,890
Manifestações extra-articulares	18 (28,6)	14 (12,6)	2,8 (1,2-6,5)	0,016*
Nódulos reumatóides	12 (19,0)	12 (10,8)	1,9 (0,7-5,0)	0,199
Subluxação atlanto-axial	4 (6,3)	6 (5,4)	1,2 (0,2-5,2)	0,867
Vasculite	3 (4,8)	1 (0,1)	5,5 (0,4-291,3)	0,271
Amiloidose	2 (3,1)	2 (1,8)	1,8 (0,12-25,1)	0,918
Episclerite	2 (3,1)	-	-	-

¶ Dados apresentados como número de pacientes e percentagem dentro de cada grupo alélico entre parênteses, exceto quando legendado;

§ Qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher;

* $p_{corr}=0,032$.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I – Protocolo de pesquisa

PROTOCOLO DO AMBULATÓRIO DE ARTRITE REUMATÓIDE

PRIMEIRA CONSULTA Data : __ / __ / ____ COLETOU DNA? Data : __ / __ / ____

Identificação:

Nome: _____

Pront: _____ / ____

Cor: 1branco 2negro 3 amarelo

Sexo: 1M 2F DN: __ / __ / ____

Idade: _____

Dados da AR:

Início dos sintomas : _____ / _____ mês / ano

Data do diagnóstico: _____ / _____ mês / ano

Critérios Diagnósticos Preenchidos:

Critérios revisados de Classificação da Artrite Reumatóide do Colégio Americano de Reumatologia (ACR)1987 (21).

- 1) Rigidez matinal: Rigidez matinal periarticular ou articular com duração de pelo menos uma hora antes da melhora máxima possível;
- 2) Artrite em 3 ou mais áreas articulares: pelo menos três áreas articulares devem apresentar artrite ou o derrame articular observados por um médico. As 14 áreas possíveis são: direitas ou esquerdas: IFP, MCF, punho, cotovelo, joelho, tornozelo, e MTF.
- 3) Artrite nas articulações das mãos em pelo menos uma das seguintes áreas: punho, MCF ou IFP com inflamação
- 4) Artrite simétrica: Comprometimento simultâneo das mesmas áreas articulares (como definidas em 2) em ambos os lados do corpo (o comprometimento bilateral de IFP, MCF, o MTF é aceitável sem simetria absoluta.
- 5) Nódulos reumatóides: Nódulos subcutâneos sobre as proeminências ósseas, ou superfícies extensoras ou em regiões periarticulares, observados por um médico.
- 6) Fator reumatóide sérico positivo.

- 7) Alterações ao exame radiográfico: alterações típicas da AR nas mãos ou punhos, incluindo erosões ou osteopenia periarticular.

Para a classificação de um paciente como portador de AR é necessária a presença de quatro dos sete critérios. Os critérios 1 a 4 devem estar presentes durante pelo menos quatro semanas.

Os pacientes com outros diagnósticos clínicos não são excluídos.

IFP: interfalangeana proximal, MCF: metacarpofalangeana, MTF: metatarsofalangeana.

HAQ: _____

Fator Reumatóide: 1 positivo 2 negativo persistentemente positivo 1 S 2 N

Título mais alto: _____ (nefelometria) _____ (látex)

Classe Funcional da AR:

- I. capacidade para atividades diárias usuais
- II. capacidade para auto-cuidados e atividades no trabalho, mas limitado no lazer
- III. capacidade para auto-cuidados, as limitado no trabalho e lazer
- IV. limitação nos auto-cuidados

Manifestações Extra-Articulares:

vasculite pele () vasculite sistêmica () nódulos reumatóides () Felty () Amiloidose ()
pneumonite () episclerite () pericardite () subluxação atlanto-axial ()

Tratamento Farmacológico Prévio:

- 1) glicocorticoide: 1S 2N dose: _____ período: _____
- 2) metotrexato: 1S 2N dose: _____ período: _____
- 3) difosfato de cloroquina: 1S 2N dose: _____ período: _____

- 4) hidroxicloroquina: 1S 2N dose: período:
5) sulfasalazina: 1S 2N dose: período:
6) azatioprina: 1S 2N dose: período:
7) leflunomide: 1S 2N dose: período:
8) biológico: 1S 2N qual? Período:
9) AINE : 1 S 2 N

Suspendeu por:

Falha () () () ()

Toxicidade

() Qual ? _____

9.2 ANEXO II – Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO GÊNICO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA ARTRITE REUMATÓIDE

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Os portadores de artrite reumatóide apresentam mais chance de ter problemas cardiovasculares do que outras pessoas, como o infarto, a angina, o derrame cerebral, a trombose das pernas e a embolia pulmonar.

Este estudo está sendo realizado para tentar identificar os fatores de risco para problemas cardiovasculares em pessoas com artrite.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Será coletada uma amostra de sangue. O exame de sangue será destinado à avaliação genética e só será utilizado para a análise de genes relacionados ao aumento de risco cardiovascular e à atividade da artrite. O uso dessa parte do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado. Também serão levantadas informações sobre a sua artrite através de exame físico, avaliação laboratorial e radiológica.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

1. Avaliar o estágio de evolução da artrite de cada paciente, permitindo prevenir problemas futuros
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a artrite reumatóide e sobre as doenças cardiovasculares

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, podendo causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma)

HÁ A POSSIBILIDADE DESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em 2005, e para avaliar o risco genético apenas através dos genes da óxido nítrico sintetase. No entanto, é possível que mais genes e outros fatores relacionados ao risco cardiovascular em pacientes com artrite reumatóide possam vir a ser analisados mais adiante. Outra possibilidade é que em 5 ou 10 anos os pacientes sejam contatados novamente para verificar se houve surgimento de problemas cardiovasculares de fato.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala com um X apenas uma das opções abaixo:

() Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise dos genes da óxido nítrico sintetase.

() Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise dos genes da óxido nítrico sintetase e de outros genes relacionados à doença cardiovascular e à artrite reumatóide que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 200__.

Pesquisadores responsáveis:

Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tel: (051) 2101 8340; FAX: (051) 3331 3834

Claiton Brenol

Tel: (051) 9916 6026

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde:

Telefone: (051) 2101 8304

9.3 ANEXO III – Critérios diagnósticos da artrite reumatóide do Colégio Americano de Reumatologia

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA ARTRITE REUMATÓIDE [4] :

1. Rigidez articular matinal com duração maior ou igual à 1 hora até a máxima melhora
2. Artrite de 3 ou mais áreas articulares simultaneamente observado pelo médico, dentre as 14 áreas possíveis: interfalangeanas proximais, metacarpofalangenas, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos e metatarsofalangeanas direitas ou esquerdas.
3. Artrite das articulações das mãos em ao menos 1 área (interfalangeanas proximais, metacarpofalangenas, ou punhos).
4. Artrite simétrica das mesmas áreas articulares em ambos os lados do corpo. Não é necessário simetria absoluta.
5. Presença de nódulos subcutâneos junto a superfícies extensoras, proeminências ósseas ou justa-articulares.
6. Fator reumatóide sérico positivo.
7. Erosões articulares e/ou periarticulares com diminuição da densidade óssea, nas mãos ou punhos, observadas em exames radiológicos.

Para fins de classificação de doença, o(a) paciente deve apresentar ao menos 4 dos 7 critérios. Pacientes com 2 critérios clínicos não são excluídos. Termos como AR clássica, definitiva ou provável não devem ser aplicados.