

LIA KUBELKA DE CARLOS BACK

**LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: PESQUISA DE MARCADORES  
MOLECULARES DE SUSCEPTIBILIDADE E PROGNÓSTICO**

**FLORIANÓPOLIS  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LIA KUBELKA DE CARLOS BACK**

**LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: PESQUISA DE MARCADORES  
MOLECULARES DE SUSCEPTIBILIDADE E PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada como  
requisito parcial à obtenção do  
grau de Mestre em Biotecnologia  
pelo Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Federal de Santa Catarina

Orientadora: Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza

Florianópolis  
2007

“O homem deve ir sempre em busca daquilo que não está na órbita dos conhecimentos comuns, a fim de dilatar a vida para campos fecundos que, dominados pelo **saber** e pela **experiência**, lhe permitam alcançar progressivamente maior perfeição. Em cada novo dia em que sua vida penetre, deverá encontrar um estímulo para aproveitá-la melhor, e também algo que o inspire acerca do que deve fazer para que os vindouros superem os atuais e lhe proporcionem, ao vivê-los, o benefício de sentir-se bem, seguro e feliz.”

**Carlos Bernardo Gonzáles Pecotche**

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mecanismo imunopatológico do LES.....	23
FIGURA 2: Via de sinalização IL-18/ IL-18R .....	29
FIGURA 3: Gene <i>IL18</i> e os principais SNP estudados em relação a diversas patologias .....	30
FIGURA 4: Estrutura e interações entre PD-L-PD-1 e outros membros da família B7-CD28 .....	32
FIGURA 5: Possíveis sítios de ligação dos fatores de transcrição RUNX1, NF B, e E-box localizados no íntron 4 do gene <i>PDCD1</i> . O SNP PD1.3 está localizado no primeiro sítio de ligação para o RUNX1.....	34
FIGURA 6: Via de metabolização do estrógeno e as principais enzimas envolvidas no processo.....	37
FIGURA 7: Estrutura do gene <i>CYP1A1</i> e os SNP mais estudados.....	40
FIGURA 8: Análise dos polimorfismos do gene <i>CYP1A1</i> através da metodologia de PCR- <i>RFLP</i> .....	57
FIGURA 9: Análise do polimorfismo do gene <i>IL18-607</i> .....	57
FIGURA 10: Análise dos polimorfismos dos genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> por multiplex.....	60
FIGURA 11: Análise do polimorfismo do gene <i>IL18 -137</i> por PCR-SSP.....	60

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Regiões cromossômicas associadas ao desenvolvimento do LES.....	21
TABELA 2. Principais genes candidatos na susceptibilidade ao desenvolvimento de LES.....	22
TABELA 3. Seqüências dos iniciadores utilizados para as análises por PCR-RFLP.....	51
TABELA 4. Seqüência dos iniciadores utilizados para a análise por PCR -SSP multiplex.....	51
TABELA 5. Seqüência de iniciadores utilizados para análise por PCR-SSP.....	52
TABELA 6. Protocolo de reação para cada SNP analisado por PCR-RFLP.....	53
TABELA 7. Características das endonucleases de restrição utilizadas na análise de cada SNP por RFLP.....	55
TABELA 8. Protocolo de reação para cada SNP analisado por PCR-SSP.....	57
TABELA 9. Comparação das freqüências dos alelos, dos genótipos dos portadores das variantes do SNP A4889G <i>CYP1A1*2C</i> entre pacientes com LES e indivíduos controles.....	61
TABELA 10. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos dos portadores das variantes do SNP A4889G <i>CYP1A1*2C</i> entre pacientes com nefrite e pacientes sem nefrite.....	62
TABELA 11. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos dos portadores das variantes do SNP C4887A <i>CYP1A*4</i> entre pacientes com LES e indivíduos controles.....	63
TABELA 12. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos dos portadores das variantes do SNP C4887A <i>CYP1A1*4</i> entre pacientes com nefrite e pacientes sem nefrite.....	64
TABELA 13. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos dos portadores das variantes do SNP <i>CYP1A1*2A</i> entre pacientes com LES e indivíduos controles.....	65
TABELA 14. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP <i>CYP1A1*2A</i> entre pacientes com e sem nefrite.....	66

TABELA 15. Comparação das freqüências (%) dos alelos do <i>locus GSTM1</i> entre pacientes com LES e indivíduos controles.....	67
TABELA 16. Comparação das freqüências (%) dos alelos do <i>locus GSTM1</i> entre pacientes com e sem nefrite.....	68
TABELA 17. Comparação das freqüências (%) dos alelos do <i>locus GSTT1</i> entre pacientes com LES e indivíduos controles.....	68
TABELA 18. Comparação das freqüências (%) dos alelos do <i>locus GSTT1</i> entre pacientes com e sem nefrite.....	69
TABELA 19. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP <i>IL18 -137</i> (G, C) entre pacientes com LES e indivíduos controles.....	69
TABELA 20. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP <i>IL18 -137</i> (G,C) entre pacientes com e sem nefrite.....	70
TABELA 21. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP <i>IL18 -607</i> (C,A) entre pacientes com LES e indivíduos controles.....	71
TABELA 22. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP <i>IL18 -607</i> (C,A) entre pacientes com e sem nefrite.....	72
TABELA 23 Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP <i>PDCD1 1.3</i> (G,A) entre pacientes com LES e indivíduos controles.....	73
TABELA 24. Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP <i>PDCD1 1.3</i> (G,A) entre pacientes com ou sem nefrite.....	74
TABELA 25. Modelo que melhor explicou o desfecho de polimorfismos relacionados à susceptibilidade ao desenvolvimento de manifestações renais, à regressão logística.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>
IFN	<i>Interferon alfa</i>
IFN	<i>Interferon gama</i>
IL	Interleucina
H4TF-1	<i>Histone H4 gene transcription factor 1</i>
LES	Lupus eritematoso sistêmico
NK	<i>Natural killers</i>
PDCD1	<i>Program death receptor one</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RFLP	Restriction Fragment Length polymorphism
RUNX1	Runt Related transcripcion factor
SHP-2	<i>SH-2 Domain-Containing Phosphatases</i>
SNP	<i>Single Nucleotide polymorphisms</i>
SSP	Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers
TCR	Receptor de célula T
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
FAS	<i>TNF receptor superfamily member 6</i>
FASL	<i>TNF receptor superfamily member 6 ligant</i>



## **AGRADECIMENTOS**

É com grande alegria que escrevo aqui meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma participaram dessa importante etapa na minha vida.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos pacientes que me doaram um pouquinho do seu tempo e paciência e me ensinaram a olhar para a vida de uma maneira diferente. Espero algum dia poder contribuir de alguma forma com algo de bom para essas pessoas. E também aos indivíduos controles. Obrigada por terem tornado esse trabalho possível.

À Profa. Dra. Iliáda Rainha de Souza, por não ter apenas me orientado durante todos esses anos de forma incrível, mas pela amizade, carinho, por ter me passado a paixão pela genética e pela ciência, no sentido mais puro da palavra.

Aos meus colegas do LAPOGE: ao Filipe Martins Mello, pela grande ajuda na busca por pacientes, formulação dos questionários, busca por dados; a Diane Galiotto, Tiago Moretti, Cíntia Coelho, Ticiania Farias e Aline Sereia por toda a disposição e bom humor para me ajudarem sempre que foi preciso.

Ao Dr. Ivânio Alves Pereira e Dra Adriana Fortes Zimmermann, por me abrirem as portas no HU, e pelo grande apoio na pesquisa, tornando ela possível.

Ao Prof. Dr Milton Ozório Moraes, membro da banca examinadora, e todos os colegas do Laboratório de Hanseníase (FIOCRUZ) por me apresentarem o maravilhoso mundo dos SNPs.

A Prof. Dra. Célia Monte Barardi, por ter sido minha ´tutora`nesses dois anos de curso e por fazer parte da banca examinadora.

Aos outros professores membros da banca examinadora desta dissertação, Profa. Dra. Karin Braun-Prado e Prof. Dr. Edmundo Grisard.

Aos professores, colegas e funcionários do curso de Pós Graduação em Biotecnologia, que propiciaram a minha formação e me apoiaram no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao órgão de suporte financeiro, Conselho Nacional de Desenvolvimento e pesquisa (CNPq), que viabilizou a realização do projeto.

Em especial...

A todos os membros da minha família que sempre me apoiaram em todas as etapas.

Aos meus sogros Maria Helena de Carlos Back e Nelson Back por toda força, carinho, amizade, apoio e exemplo.

A minha cunhada Isabela de Carlos Back Giuliano, por estar ao meu lado no momento mais importante da minha vida, pelo grande exemplo e pela grande ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus avós Glycia Fernandes Kubelka e Werner Kubelka (meu alemão chato preferido), por terem participado sempre da minha trajetória.

A minha tia Claire Fernandes Kubelka, por ter me mostrado o caminho da pesquisa, pela força, amizade, incentivo, carinho e exemplo. E ao meu tio Ricardo Galler também por todo apoio, incentivo e exemplo.

As minhas melhores amigas e irmãs Elisa Kubelka Freitas e Clara Kubelka Fernandes, por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos e por ajudarem a tornar nossa família tão especial.

Aos meus pais Beatriz Kubelka Fernandes e Paulo Cocchi Fernandes, pelo apoio incondicional, dedicação, por terem sempre me proporcionado todas as oportunidades e por serem responsáveis pela pessoa que me tornei hoje, uma pessoa feliz e que ama o que faz; espero continuar sempre sendo a pesquisadora predileta de vocês.

Ao meu marido e grande amor, Leonardo de Carlos Back, por todo apoio e dedicação durante todos esses anos, por ser essa pessoa maravilhosa e por estar sempre ao meu lado.

A minha filha, Victoria Kubelka de Carlos Back, o melhor resultado inesperado, o melhor presente que eu podia receber. O real sentido da vida. Um sorriso ilumina o meu dia!

## RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é o protótipo das doenças autoimunes, caracterizada pela produção de anticorpos contra componentes do núcleo celular em associação com diversas manifestações clínicas. As complicações patológicas primárias em pacientes com LES são a inflamação, vasculite, depósito de imunocomplexos e outras manifestações que contribuem para um quadro patológico sistêmico, grave e crônico. A doença ocorre principalmente em mulheres (proporção de 9:1) em idade reprodutiva. A etiologia exata do LES ainda permanece desconhecida e provavelmente envolve interações complexas e multifatoriais entre diversos fatores genéticos e ambientais. A interação entre muitos genes pode atenuar ou acentuar a susceptibilidade à doença. Foram descritas associações do LES com genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), genes que codificam receptores *Fc* e genes que codificam citocinas. Foram descritas também associações positivas com o alelo 4887A (*CYP1A1\*4*), envolvido na metabolização de hormônios e xenobióticos e com o alelo +7146A (PD1.3), receptor que regula negativamente células auto-reativas. Este trabalho teve como objetivo investigar a associação entre o LES e polimorfismos nos genes *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *IL18* e *PDCD1* em um estudo caso-controle com 98 pacientes e 108 indivíduos controles, na população do estado de Santa Catarina. Também foram analisados os diferentes alelos em relação ao desenvolvimento de nefrite, grave manifestação clínica do LES. Foram utilizadas técnicas de PCR-RFLP e PCR-SSP, seguidas de eletroforese em gel de agarose para determinar os genótipos individuais. Os resultados obtidos não demonstraram nenhuma associação entre o LES e as variantes alélicas de *IL18* -137C, 4889G (*CYP1A1\*2C*), 6235C (*CYP1A1\*2A*), *GSTM1* e *GSTT1*. O alelo +7146A (PD1.3) embora não tenha apresentado significativamente uma associação positiva, provavelmente, devido à baixa frequência desse alelo e ao reduzido tamanho da amostra, mostra uma tendência à associação. Foi encontrada uma

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a prototype of autoimmune diseases, characterized by the production of antibodies against components of the cellular nucleus in association with several clinical manifestations. The primary pathological complications in patients with SLE are inflammation, vasculite, deposit of immunocomplexes and other manifestations that contribute with a systemic, serious and chronic pathological picture. The disease occurs mainly in women (proportion of 9:1) during reproductive age. The exact etiology of the SLE is still not elucidated and it probably involves complex interactions among several genetic and environmental factors. The interaction among several genes can decrease or accentuate the susceptibility to the disease. Associations with genes were described for SLE, with genes of the major histocompatibility complex (MHC), genes that codify *Fc* receptors and genes that codify cytokines. Some studies have also described positive associations with allele 4887\*A (*CYP1A1\*4*), involved in the hormones and xenobiotics metabolism, and with the allele +7146A (*PD1.3*), that negatively regulate auto-reactive cells. This work had the objective of investigate the association among SLE development and polymorphisms in the genes *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *IL18* and *PDCD1* in a case-control study involving 98 patient and 108 individuals as control, in the population of the Santa Catarina State. The frequencies for this allele were also analyzed in the presence of nephritis, an serious clinical manifestation of the SLE. Techniques of PCR-RFLP and PCR-SSP had been used, followed by electrophoresis in agarose gel to determine the individual genotypes. The results had not demonstrated association between SLE and the alleles variants *IL18* -137C, 4889G (*CYP1A1\*2C*), 6235C (*CYP1A1\*2A*), *GSTM1* and *GSTT1* genes. The allele +7146A (*PD1.3*) did not show a positive association with SLE because the difference was not statistically significative, but it shows an indication for the development of the disease. A negative association between the variant 4887A (*CYP1A1\*4*) and the SLE was demonstrated (OR = 0,355 IC 95% 0,161 - 0,774, p= 0,008). The interaction between SNPs *IL18* -607A and 4887A (*CYP1A1\*4*) demonstrated an association with protection in relation to SLE (OR= 0,318 IC 95% 0,133 - 0,758, p= 0,010). A positive association between allele 4889G (*CYP1A1\*2C*) and the nephritis occurrence (OR= 3,645 IC 95% 1,39 - 9,58 p=0,009) were found. Also a allelic frequency of 6235C (*CYP1A1\*2A*) were increased in patients with nephritis in relation to the patients without nephritis (OR= 2,270 IC 95% 1,96 - 6,278, p= 0,015). These data show an important role of gene *CYP1A1* in the susceptibility and prognostic of the SLE.



# SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>14</b>
1.2 – <i>Auto-imunidade</i> .....	15
1.3 - <i>Lupus Eritematoso Sistêmico</i> .....	16
1.3.1 - <i>Susceptibilidade Génética</i> .....	18
1.3.2 - <i>Mecanismo imunopatológico</i> .....	22
1.3.2.1 - <i>Disfunções da resposta Imunológica</i> .....	23
Gene <i>IL18</i> .....	28
Gene <i>PDCD1</i> .....	31
1.3.3 - <i>Aspectos hormonais</i> .....	34
1.3.3.1- <i>Biotransformação de xenobióticos fase I</i> .....	37
Gene <i>CYP1A1</i> .....	39
1.3.3.2 - <i>Biotransformação de xenobióticos fase II</i> .....	42
Gene <i>GSTM1</i> .....	43
Gene <i>GSTT1</i> .....	44
<b>2 - Justificativa .....</b>	<b>45</b>
<b>3 - Objetivos .....</b>	<b>46</b>
3.1 - <i>Objetivo geral</i> .....	46
3.2 - <i>Objetivos específicos</i> .....	46
<b>4 - Pacientes e Indivíduos Controles .....</b>	<b>48</b>
4.1 - <i>Aspectos éticos</i> .....	48
<b>5 - Materiais e Métodos.....</b>	<b>49</b>
5.1 - <i>Separação e conservação das amostras</i> .....	49
5.2 - <i>Extração e purificação do DNA genômico</i> .....	50
5.3 - <i>Reação da cadeia da polimerase (PCR)</i> .....	51
5.3.1 - <i>Genotipagem de SNP pelo método da PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragments Length Polymorphisms)</i> .....	52
5.4 - <i>Análise estatística</i> .....	60
<b>6 - Resultados .....</b>	<b>62</b>
6.1 - <i>Dados do questionário</i> .....	62
6.2 - <i>Análise do polimorfismo CYP1A1*2C (A4889G)</i> .....	62
6.3 – <i>Análise do polimorfismo CYP1A1*4 (C4887A)</i> .....	64
6.4 - <i>Análise do polimorfismo CYP1A1*2A (T6235C)</i> .....	66
6.5 - <i>Análise do polimorfismo GSTM1</i> .....	68

	2
6.6 - <i>Análise do polimorfismo GSTT1</i> .....	69
6.7 - <i>Análise do polimorfismo IL18 -137</i> .....	70
6.8 - <i>Análise do polimorfismo IL18 -607</i> .....	71
6.9 - <i>Análise do polimorfismo PDCD1 1.3</i> .....	73
6.10 - <i>Análise das variantes relacionadas à susceptibilidade ao desenvolvimento de manifestações renais por regressão logística</i> .....	75
<b>7 – Discussão</b> .....	<b>77</b>
7.1 - <i>Gene CYP1A1</i> .....	77
7.2 - <i>Genes GSTM1 e GSTT1</i> .....	82
7.3 - <i>Gene IL18</i> .....	84
7.4 - <i>Gene PDCD1</i> .....	85
<b>8 – Conclusões</b> .....	<b>87</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>88</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>107</b>
<i>ANEXO I</i> .....	107
<i>TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO</i> .....	107
<i>Informações aos participantes,</i> .....	107
<i>ANEXO II</i> .....	108

## 1. Introdução

Atualmente, o termo “doenças de etiologia complexa” é utilizado quando se refere ao grupo de doenças que resultam da combinação de fatores genéticos e não genéticos. Fazem parte desse grupo as doenças auto-imunes, os distúrbios neurológicos e neurodegenerativos e doenças como hipertensão, diabetes, obesidade e câncer. Ao contrário das desordens mendelianas, para as quais a mutação de um gene em dose simples ou dupla é considerado suficiente para a expressão de uma anomalia, o paradigma mais adequado para a grande maioria das doenças comuns envolve o conceito de susceptibilidade genética. Nesse caso, um indivíduo geneticamente susceptível pode vir a manifestar a doença, ou não, dependendo da interação do seu genótipo com outros fatores como idade, sexo, dieta, exposição ambiental, atuação hormonal, atuação do seu sistema imunológico, entre outros (ROXO, 2003).

O lupus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença de etiologia complexa e é considerado o protótipo das doenças auto-imunes sistêmicas, sendo caracterizada pela produção de um grande conjunto de auto-anticorpos contra componentes do núcleo celular, ativação do sistema complemento, deposição de imunocomplexos e lesões a órgãos e tecidos (MOK & LAU, 2003). Fatores étnicos e a heterogeneidade genética contribuem para complexidade e variedade das manifestações clínicas (WONG & TSAO, 2006). A etiologia exata da doença ainda permanece desconhecida.



## 1.2 – Auto-imunidade

Todas as evidências disponíveis indicam que os processos imunopatológicos nas doenças auto-imunes utilizam células do sistema imune e mediadores semelhantes àqueles observados nas reações imunológicas protetoras (PARSLOW *et al.*, 2004).

O sistema imunológico está constantemente exposto a antígenos próprios sem induzir a estimulação dos linfócitos, o que é conhecido como tolerância ao próprio. A tolerância ao próprio não é uma característica herdada, e sim o resultado de vários mecanismos destinados a distinguir entre linfócitos com potencial de ligar-se a componentes próprios e aqueles com especificidade de ligação muito maior em determinantes antigênicos expressos por antígenos estranhos. A diversidade imunológica é decorrente da combinação de segmentos gênicos altamente polimórficos para formar as moléculas receptoras. A formação do repertório de receptores é um processo randômico, seguido de um procedimento de seleção, que resulta na inibição dos linfócitos que exibem reatividade ao próprio, daqueles que carecem desta reatividade. Como a tolerância ao próprio é adquirida somaticamente, ela é sujeita a falhas, particularmente em virtude da complexidade dos eventos necessários para criar um reservatório de linfócitos preparados para reconhecer qualquer antígeno estranho e ignorar as proteínas próprias (PARSLOW *et al.*, 2004). A auto-imunidade é usualmente classificada de acordo com a natureza do tecido alvo. Vários fatores contribuem para o desenvolvimento da auto-imunidade:

- anormalidades imunológicas que afetam as células apresentadoras de antígeno (APC) ou os linfócitos;
- as bases genéticas que predisõem à auto-imunidade;

- sexo;
- lesão tecidual;
- infecções bacterianas e virais.

Acredita-se ser pouco provável que qualquer anormalidade imunológica isoladamente possa levar ao desenvolvimento de seqüelas observadas numa reação imunológica destrutiva. A associação de múltiplas anormalidades do sistema imune, a contribuição de células e tecidos não imunológicos, uma variedade de determinantes genéticos de risco e fatores ambientais podem ser todos necessários para induzir o quadro que se manifesta clinicamente como resposta imunopatológica (RIOUX & ABBAS, 2005). As combinações de componentes importantes para o desenvolvimento de doença podem, na verdade, diferir de um paciente para outro, contribuindo assim para a complexidade dessas patologias (SWAPAN *et al.*, 2004).

### **1.3 - Lupus Eritematoso Sistêmico**

Em 1895 William Osler descreveu as manifestações sistêmicas do LES. A descoberta do fenômeno da célula do lupus eritematoso (LE) marcou o início das pesquisas sobre a doença.

As complicações patológicas primárias em pacientes com lupus são a inflamação, vasculite, depósito de imunocomplexos e outras manifestações que contribuem para um quadro patológico sistêmico, grave e crônico. A etiologia exata do LES ainda permanece desconhecida e provavelmente envolve interações complexas e multifatoriais entre diversos fatores genéticos e ambientais (MOK & LAU, 2003).

O LES não exibe nenhum padrão clínico característico. É uma doença aguda ou insidiosa em seu início, apresentando-se de forma crônica, remittente e recorrente, frequentemente febril, caracterizada principalmente por lesões na pele, articulações, rins e membranas serosas (SATO *et al.*, 2002).

O comprometimento renal constitui uma característica freqüente e grave no LES. Em 75% dos pacientes verifica-se a presença de nefrite, na necropsia. A nefrite, nos pacientes com LES, é caracterizada pela deposição de imuno-complexos que propiciam a inflamação glomerular e tubulointerstitial levando a insuficiência renal crônica em mais de 30% dos pacientes afetados. Ocorre dor torácica pleurítica em aproximadamente 50% dos pacientes e as manifestações pulmonares também ocorrem com freqüência (DAVIDSON & ARANOW, 2006).

Em aproximadamente 80% dos casos há presença de anemia normocítica e normocrômica devido à mielosupressão (WILLIAM, 2000). No entanto, praticamente qualquer outro órgão do corpo pode ser atingido também. A apresentação clínica do LES é tão variável que o American College of Rheumatology (ACR) estabeleceu critérios para diagnóstico dessa doença (SLEDAI – Anexo 2).

A prevalência do lupus na população americana varia de 15 a 122 casos a cada 100.000 indivíduos na população, dependendo da etnia, sexo e idade. Não há estudos epidemiológicos realizados no Brasil, mas há uma estimativa, com bases nessas freqüências de cerca de 16.000 a 80.000 casos no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2005; WONG & TSAO, 2006).

Semelhantemente a muitas doenças auto-imunes, o LES é uma doença que ocorre predominantemente em mulheres. Afeta 10 a 12 vezes mais mulheres em relação ao homem e embora possa ocorrer em qualquer idade, é

mais freqüente entre os 20 e 45 anos, com maior incidência próxima aos 30 anos. A razão mulheres-para-homens é de 9:1, mas comparativamente, quando a doença se desenvolve durante a infância ou após 65 anos de idade, a razão mulheres-para-homens é de apenas 2:1. A doença é descrita como sendo mais comum e mais grave em mulheres afro-americanas (WONG & TSAO, 2006).

### **1.3.1 - Susceptibilidade Génética**

As doenças de etiologia complexa resultam de uma interação de diversas variantes genéticas e exposição a fatores ambientais. O estudo de mecanismos de segregação em famílias, utilizado com sucesso na identificação de doenças de herança mendeliana, trouxe pouco sucesso na identificação de genes de susceptibilidade a essas patologias de origem multifatorial (ZONDERVAN & CARDON, 2004).

Existem diversas variações polimórficas (freqüência igual ou maior que 1% na população) ao longo do genoma, entre elas estão os SNP (*single nucleotide polymorphism*), inserções, deleções de nucleotídeos ou de genes inteiros, cópias gênicas ou variações de seqüências repetitivas. As variações mais encontradas são os SNP, que podem ocorrer nos éxons, no íntrons, regiões promotoras, regiões reguladoras e regiões intergênicas. Apenas uma pequena porção (~60.000) dos SNP conhecidos encontram-se em regiões codificantes, e apenas cerca de 30.000 desses SNP resultam em troca de aminoácidos nas proteínas expressas. O restante (~30.000) estão localizados em regiões codificantes, mas não alteram a seqüência de aminoácidos da proteína e são denominados SNP sinônimos. Mais de 1.4 milhões de SNP foram identificados no sequenciamento inicial do genoma humano, mas há uma estimativa de que existam

aproximadamente 7 milhões de SNP com frequência maior que 5% na população (e mais ~4 milhões com frequência entre 1 e 5%) (MEYLING *et al.*; 2006). Esses tipos de variações são compartilhadas nas diferentes regiões geográficas e populações. Em um conjunto de 1.5 milhões de SNP ao longo do genoma, aproximadamente 80% demonstram a frequência do alelo recessivo maior que 0,05 em pelo menos uma população étnica, desses SNP, apenas 10% ocorrem exclusivamente em apenas um grupamento étnico (Ásia, África e Europa). Apesar da maioria da variabilidade ser compartilhada nas diferentes populações, as frequências alélicas podem ser extremamente diferentes de uma população para outra. Essa diferença é muito importante para os estudos de associação genética (PLENGE & RIOUX, 2006).

Devido a essa ampla distribuição ao longo do genoma e a grande variabilidade em diferentes populações, esses marcadores são extremamente utilizados nos estudos de associação genética (WANG, 2005).

A genética do LES vem sendo estudada desde o início da década de 70 quando foram encontradas as primeiras associações com os alelos do HLA (antígenos leucocitários humanos) (HARLEY *et al.*, 2006).

A causa do LES é baseada na perda da tolerância a componentes próprios. Genes codificando proteínas com funções significativas no sistema imunológico vêm sendo considerados bons candidatos a marcadores de susceptibilidade (WONG & TSAO, 2006).

Parentes de primeiro grau de pacientes com LES possuem uma probabilidade vinte vezes mais alta de desenvolver LES do que a população em geral, taxas de concordância em pares de gêmeos idênticos estão entre as mais altas das doenças auto-imunes, estando entre 24 a 58%, em comparação a de 3

a 10% em gêmeos não idênticos. A probabilidade de desenvolver outra doença auto-imune também é aumentada em parentes de primeiro grau de pacientes com LES em relação a parentes de indivíduos controles. Esses dados demonstram o mecanismo genético complexo e poligênico, onde, a princípio, pelo menos 100 genes parecem estar envolvidos com a doença em humanos. Alguns desses genes promovem o desenvolvimento do LES enquanto outros influenciam clínica ou biologicamente a expressão da doença. A produção de auto-anticorpos parece ser dependente desses fatores genéticos, como indica a prevalência acima de 70 a 80% de anticorpos antinucleares em famílias de pacientes com LES (TSAO, 2004).

Cada gene presumivelmente afeta algum aspecto da regulação imune, degradação de proteínas, transporte de peptídeos através das membranas celulares, resposta imune, complemento, sistema reticuloendotelial (incluindo fagocitose), imunoglobulinas, apoptose e hormônios sexuais. Portanto combinações de variações em diferentes genes podem resultar em respostas anormais distintas e produzir processos patológicos separados e diferentes expressões clínicas (KRISHNAN *et al.*; 2006).

Duas abordagens diferentes têm sido utilizadas nos estudos dos fatores genéticos envolvidos no lupus. A primeira são os estudos das famílias, onde são rastreadas regiões cromossômicas de associação, através da utilização de marcadores microssatélites, e a segunda, os estudos de associação entre a doença e genes candidatos. A escolha desses genes candidatos é, normalmente, realizada seguindo alguns critérios como função conhecida ou suposta, ou localização cromossômica. Genes candidatos devem, em geral, ser polimórficos (PERDRINGER *et al.*, 2003; RIOUX & ABBAS, 2005; RIGBY *et al.*, 2006).

Diversos estudos de rastreamento genômico indicam regiões cromossômicas do genoma associadas ao LES, algumas delas estão listadas na

Tabela 1.

Tabela 1 - Regiões cromossômicas associadas ao desenvolvimento do LES , indicadas pelo alto valor do *LOD score* (HARLEY *et al.*, 2006).

<b>Localização</b>	<b>LOD score</b>	<b>Genes</b>
<b>1q23</b>	4,0	<i>FCGR2A/FCRG3A</i>
<b>1q31-32</b>	3,8	?
<b>1q41-42</b>	3,3	?
<b>2q37</b>	4,2	<i>PDCD1</i>
<b>4p16</b>	3,8	?
<b>6p21-p12</b>	4,2	<i>HLA-DR</i>
<b>11p13</b>	3,4	?
<b>12q24</b>	3,3	?
<b>16q12</b>	3,4	?

*LOD score* = *logarithm of the odds* (na base 10). Um *LOD score* de valor igual ou maior que 3 geralmente indica que dois loci estão geneticamente ligados.

Muitos genes têm sido citados como candidatos a uma participação importante no LES, mas para que se comprove a participação efetiva desses genes no desenvolvimento da doença são necessários mais estudos em diferentes populações. Alguns desses genes já se encontram bem estabelecidos como associados à doença. Entre eles determinados alelos do HLA de classe II, e genes do complemento, que fazem parte da região de classe III do MHC. Além desses, outros genes têm sido apontados como genes candidatos, pois seus produtos parecem ter importância no mecanismo de desenvolvimento da doença (WONG & TSAO, 2006). Os principais genes associados à susceptibilidade ao LES encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais genes candidatos na susceptibilidade ao desenvolvimento de LES (CROKER & KIMBERLY, 2005).

Gene	Polimorfismo	Alelo de susceptibilidade	Confirmação
<b>CRP</b>	+1846 G/A	+1846A	Não
<b>CTLA4</b>	+49 A/G	+49G	Não
	CT60 A/G	CT60G	Não
<b>FCGR2A</b>	V176F	F176	Sim
	H131R	R131	Sim
<b>FCGR3A</b>	1232T	232T	Sim (asiáticos)
	-386 C/G	-386C	Não
	-120 A/T	-120A	Não
<b>FCRL3</b>	-169 T/C	-169T	Não
<b>MBL</b>	G54D	D54	Sim
<b>MCP1</b>	-2518 A/G	-2518G	Sim
<b>MHC</b>	DRB1	DRB1*1501	Sim
<b>PDCD1</b>	PD-1.3 A/G	PD-1.3A	Sim
<b>PTPN22</b>	R620W	W620	Sim
<b>TYK2</b>	V362F	F362	Não
	1684S	S684	Não

Na nefrite, tanto o risco da doença quanto o risco de gravidade são influenciados por polimorfismos de genes que codificam moléculas importantes no processo imunopatológico da doença (TARZY & COOK, 2003; LAUWERYS & WAKELAND, 2005). Mas esses estudos ainda são restritos.

### 1.3.2 - Mecanismo imunopatológico

A causa do LES permanece desconhecida, mas a existência de um número aparentemente ilimitado de anticorpos contra constituintes próprios nesses pacientes indica que o problema fundamental no LES é a manutenção da auto-tolerância (Figura 1). Várias anormalidades do sistema imune foram observadas nos pacientes, mas ainda não se sabe totalmente quais são as primárias e quais são de origem secundária ao processo patológico (SHLOMCHIK, 2001; LIPSKY, 2001).



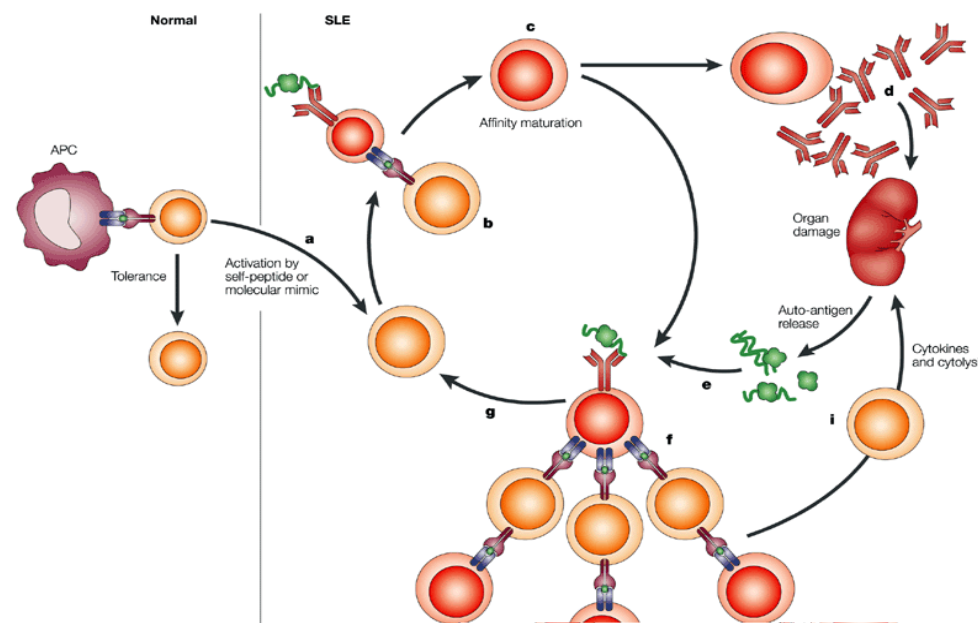


Figura 1 - Mecanismo imunopatológico do lupus eritematoso sistêmico (SHLOMCHIK, 2001).

### 1.3.2.1 - Disfunções da resposta Imunológica

O papel do sistema imune inato no LES está muito relacionado ao processo de retirada de auto-antígenos e corpos apoptóticos de circulação. No LES, deficiências em proteínas do complemento C2, C4 e C1q podem resultar em uma eliminação anormal dos fragmentos de corpos apoptóticos (MANDERSON *et al.*, 2004).

A co-estimulação das células dendríticas através de receptores *Fc* e TLR9 permite a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo os interferons tipo I (GREGERSEN & BEHRENS, 2006). Um avanço importante recente para o entendimento da patogênese do LES foi a demonstração que as vias dos interferons encontram-se fortemente ativadas nessa patologia (BAECHLER *et al.*, 2003). Foi observado em alguns pacientes com infecções virais crônicas e alguns tipos de câncer que a administração de IFN- $\gamma$  recombinante promovia a produção de auto-anticorpos contra antígenos nucleares e ocasionalmente levavam ao

desenvolvimento de sintomas clínicos associados ao LES ou outras doenças auto-imunes (RÖNNBLUM *et al.*, 1990; GOTA & CALABRESE, 2003). Estudos mais recentes de expressão gênica identificaram uma “assinatura” dos interferons na maioria dos pacientes com LES ativo (BAECHLER *et al.*, 2003; BENNETT *et al.*, 2003). Os interferons parecem contribuir para a patogênese da doença através de diversos mecanismos, incluindo efeitos diretos e indiretos nas células apresentadoras de antígenos, nas células T e células B, integrando a imunidade inata e adaptativa (MARSHAK-ROTHSTEIN, 2006). Segundo o modelo proposto por Rönnblom & Alm (2001), as células dendríticas e os macrófagos (ativados através dos receptores TLR7 e TLR9, que reconhecem moléculas de RNA e DNA, respectivamente) aumentariam a expressão de moléculas co-estimulatórias e começariam a produzir interferons tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias. Auto-antígenos, que são apresentados por essas células apresentadoras de antígenos, estimulariam as células T auto-reativas que promoveriam a ativação, expansão clonal e diferenciação de um número abundante de células B produtoras de auto-anticorpos.

As citocinas são as principais moléculas mediadoras da diferenciação e ativação das células T e B. O LES era considerado uma doença de resposta predominantemente mediada por Th2 (OGAWA *et al.*, 1992), mas recentes estudos indicam a existência de níveis circulantes de diversas citocinas produzidas por células Th1 pró-inflamatórias, como a IL-18 e IL-12, aumentadas em pacientes com LES (WONG *et al.*, 2000; AMERIO *et al.*, 2002; ROBAK *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2004; CALVANI *et al.* 2004).

Outras citocinas como IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , também possuem um papel importante no mecanismo na imunopatologia do LES (DEAN, *et al.*, 2000). A IL-

10 encontra-se aumentada em pacientes lúpicos e é um potente estimulador de células B possuindo um importante papel na hiper-reatividade das mesmas e no desenvolvimento da auto-imunidade (CSISZÁR, *et al.*, 2000). Foi detectado que a produção de IFN- em pacientes com LES está associada com a maior atividade da doença (VIALLARD *et al.*, 1999).

Na nefrite, os imuno-complexos no sub-endotélio em contato com o espaço extra-vascular parece recrutar células inflamatórias. O isotipo de anticorpo depositado também influencia na patogenicidade. Essa deposição de auto-anticorpos faz com que ocorra uma cascata de sinalização para eventos inflamatórios (TIPPING & KITCHING, 2005).

Apesar da deposição de auto-anticorpos nos rins ser um importante componente patogênico na nefrite do LES, tem sido amplamente reconhecido que sinais e da imunidade inata também contribuem para a doença renal. Os imuno-complexos ativam diretamente as células renais, via TRLs estimulando a produção de mediadores anti-inflamatórios. As citocinas também podem induzir as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, aumentando a probabilidade de recrutarem células inflamatórias após o contato com os imuno-complexos (SESIN *et al.*, 2005). Posteriormente, as células B, células T, macrófagos e células dendríticas migram para os rins já com o processo inflamatório. A ordem de ativação dessas células e a ordem em que chegam ao sítio de inflamação ainda não se encontram muito bem estabelecidas (SCHIFFER *et al.*, 2003).

Os auto-anticorpos atuam como mediadores definitivos da lesão tecidual. A maior parte das lesões viscerais é mediada por imunocomplexos (hipersensibilidade do tipo III). Complexos de DNA e anticorpos anti-DNA podem

ser detectados em glomérulos e pequenos vasos sanguíneos (ROBSON & WALPORT, 2001).

Células T anormalmente ativadas estimulam as células B a produzirem auto-anticorpos no LES. Além disso, essas células T anormais apresentam uma maior redução na apoptose em relação as células T normais. Em nível bioquímico, essas células T lúpicas apresentam receptores (TCRs) anormais que participam do processo de sinalização que inclui um baixo nível de excitação e uma resposta ao cálcio intracelular aumentada (VRATSANOS, *et al.*, 2001; PANG *et al.*, 2002). A remodelação dos TCRs induzida pela redução da expressão da cadeia  $\alpha$  e a associação de uma molécula mais potente FcR parece ser responsável ao menos em parte, pelo aumento da excitabilidade das células T no LES. Assim, a sinalização dos TCRs parece estar alterada em diversos níveis no LES, produzindo um fenótipo de célula T hiper-responsiva que pode ajudar no estímulo à produção de auto-anticorpos pelas células B (KRISHNAN *et al.*; 2006).

Outra hipótese que vem sendo formulada é a de que os linfócitos T tenham participação direta na lesão tecidual ocorrida na doença. Em alguns ratos com nefrite, foram encontrados infiltrados de células T, indicando a possibilidade de que elas também possam causar dano tecidual (SHLOMCHIK *et al.*, 2001).

De maneira similar às células T, as células B isoladas de pacientes lúpicos também apresentam um aumento na fosforilação da tirosina e aumento do fluxo de cálcio intracelular seguido de ativação. Como resultado, as células T auto-reativas não só ativam as células B, mas também promovem uma troca de classe por recombinação e uma hipermutação somática aumentando a produção de auto-anticorpos (LIOSSIS, *et al.*, 1996; NAGY *et al.*, 2005).

Em adição à estimulação por contato, a interação entre as células B e as células T é facilitada por diversas citocinas como IL-10 e requer moléculas acessórias como CD40/CD40L e B7/CD28/CTLA-4 que são importantes no processo de desenvolvimento da auto-imunidade (MOK & LAU, 2003).

A ativação de linfócitos não requer apenas a apresentação do antígeno, mas também um segundo sinal através da expressão de receptores co-estimulatórios como CD28 e CD40. A deficiência desses receptores causa alterações nas resposta das células T e B (LENSCHOW *et al.*, 1996; GREWAL & FLAVEL, 1998). No entanto também existe um sistema de regulação negativa para a resposta a antígenos. O CTLA-4 é um receptor que envia um sinal negativo as células T ativadas, regulando o sinal positivo dos receptores CD28, e é conhecido por sua associação com diversas doenças auto-imunes (WONG *et al.*, 2005). O PD-1 é outro receptor de regulação negativa induzido não só pela ativação das células T como nos outros receptores, mas também pelas células B e células mielóides, sugerindo um amplo espectro na regulação imunológica (ISHIDA *et al.*, 1992; AGATA *et al.*, 1996; NISHIMURA & HONJO, 2001; OKAZAKI & HONJO, 2006).

A interação do PD-1 com seus ligantes PD-L1 e PD-L2, resulta em um sinal negativo através do recrutamento SHP-2 à fosforilação do resíduo de tirosina na região citoplasmática (FREEMAN *et al.*, 2000; OKAZAKI *et al.*, 2001; LATCHMAN *et al.*, 2001). Camundongos da cepa C57BL/6 com deficiência de PD-1 desenvolvem artrite e glomerulonefrite semelhantes ao lúpus (NISHIMURA *et al.*, 1999) e camundongos BALB/c PD-1 deficientes desenvolvem uma cardiomiopatia fatal com depósito de IgG (NISHIMURA *et al.*, 2001).

### **Gene *IL18***

É uma glicoproteína semelhante a IL-1 do ponto de vista estrutural, e, à semelhança da IL-1, é sintetizada como precursor que é então processado pela caspase-1, produzindo a citocina madura. É secretada principalmente por macrófagos e células dendríticas (células apresentadoras de antígenos) (LIEW *et al.*, 2003). A sinalização ocorre através do receptor de IL-18 (IL-18R), um heterodímero, que consiste em uma unidade ligante IL-18R e uma subunidade sinalizadora IL-18R. Após a ligação com o receptor a sinalização ocorre como nas outras citocinas IL-1 e receptores *Toll-like* que ativam a quinase IRAK4 e a molécula adaptadora MyD88 (Figura 2) (GUTCHER *et al.*, 2006). A IL-18 foi originalmente descoberta pela sua capacidade de induzir a liberação do IFN- e outros mediadores pró-inflamatórios de macrófagos, e desde então, constatou-se que ela também influencia a expressão de outras citocinas. A IL-18 possui atividade imunoregulatória e em sinergismo com a IL-12, por exemplo, ela potencializa a produção de IFN- e GM-CSF por células B, T e NK, promove também a atividade das células NK e estimula a proliferação das células T ativadas (REDDY, 2004). Recentemente, foi relatado que a IL-18 também age nos linfócitos T e nas células NK diretamente e assim, pode mediar a resposta imune Th2 na ausência de IL-12 (BIET *et al.*, 2002).

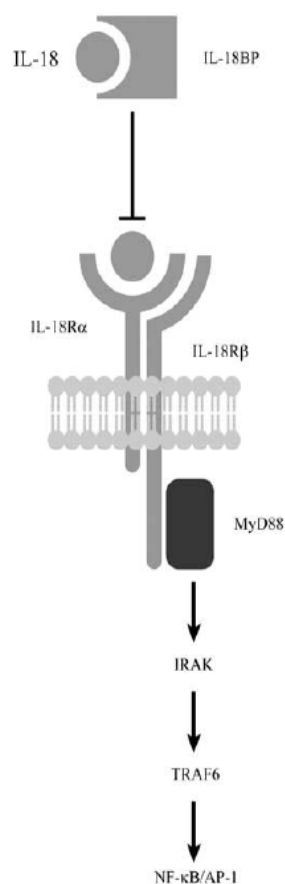


Figura 2 – Via de sinalização IL-18/ IL-18R (THOMPSON & HUMPHRIES, 2007).

A síndrome auto-imune similar ao LES no modelo animal de camundongos *lpr* é caracterizada pela linfadenopatia crônica e produção de auto-anticorpos, levando à morte precoce por insuficiência renal. A ativação de células T *helper* é um dos eventos que ocorre nessa doença em camundongos assim como no LES em seres humanos. Entre as citocinas dependentes de linfócitos T *helper*, o IFN- $\gamma$  possui um papel importante na ativação anormal das células e no desenvolvimento da patologia. A IL-18, indutora de o IFN- $\gamma$  nos linfócitos T e células NK pode contribuir com a doença nesse modelo, pois as células do camundongo *lpr* são hipersensíveis a IL-18 e altos níveis dessa citocina são expressos. A utilização de anticorpos anti-IL-18 fez com que a doença regredisse nesse modelo animal (BOSSU *et al.*, 2003).

O gene da IL-18 foi clonado por Okamura *et al.* (1995), e encontra-se localizado no cromossomo 11q22.2-q22.3. É composto por 6 éxons (Figura 3). A expressão da proteína é regulada pela região promotora do gene (TONE *et al.*, 1997; MARSHALL *et al.*, 1999; SUGIURA *et al.*, 2002).

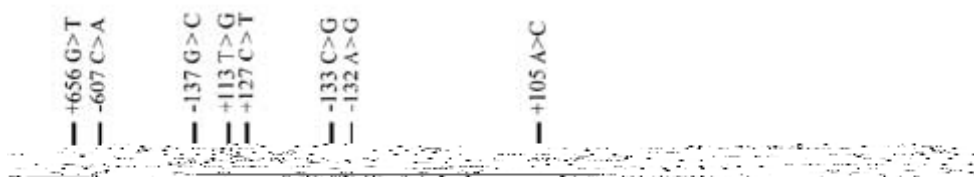


Figura 3 – Gene *IL18* e os principais SNP estudados em relação a diversas patologias (THOMPSON & HUMPHRIES, 2007).

Polimorfismos nesse gene vêm sendo relacionados com diversas patologias incluindo as auto-imunes. Dois SNPs nas posições -607 e -137 na região promotora demonstram associação com a susceptibilidade ao diabetes (KRETOWSKI *et al.*, 2002), enterocolite necrosante (HENINGER *et al.*, 2002), sarcoidose (TAKADA *et al.*, 2002) e artrite reumatóide (SIVALINGAM *et al.*, 2003). No SNP -607 ocorre uma troca de C para A. E na posição -137 ocorre uma alteração de um G para C. Esses pontos da região promotora parecem ser sítio de ligação para os fatores de transcrição *CREB* e *H4TF-1*, respectivamente. Na posição -607, a modificação do nucleotídeo C para A parece interromper o potencial de ligação da proteína *CREB* e na posição -137 a modificação de nucleotídeos afeta o sítio de ligação com a proteína *H4TF*. Em um ensaio de atividade de transcrição do promotor gênico, após estímulo, uma menor atividade



de transcrição foi observada para os alelos A e C nas posições -607 e -137 respectivamente (GIEDRAITIS *et al.*, 2001).

Apesar desses polimorfismos não terem sido analisados ainda em pacientes com LES, níveis elevados de IL-18 foram encontrados em pacientes e foram associados com a atividade da doença (WONG *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2004) e algumas manifestações clínicas (WONG *et al.*, 2002).

### **Gene *PDCD1***

A ativação das células T é um processo complexo, dependente de diversos sinais intracelulares que são iniciados através dos TCRs e modulados por receptores de sinalização co-estimulatória ou inibitória. Receptores como CD28 e ICOS (*Activation Inducible Lymphocyte Immunomediatory Molecule*) são necessários para a ativação dessas células. Em contraste, receptores como CTLA-4 e PD-1 produzem um sinal negativo em relação à ativação dos linfócitos (Figura 4) (RUDD & SCHNEIDER, 2003; RILEY & JUNE, 2005). O equilíbrio entre a sinalização positiva e negativa parece ser essencial para manutenção da tolerância e prevenção do processo auto-imune (TIVOL *et al.*, 1996; CARRENO & COLLINS, 2002).

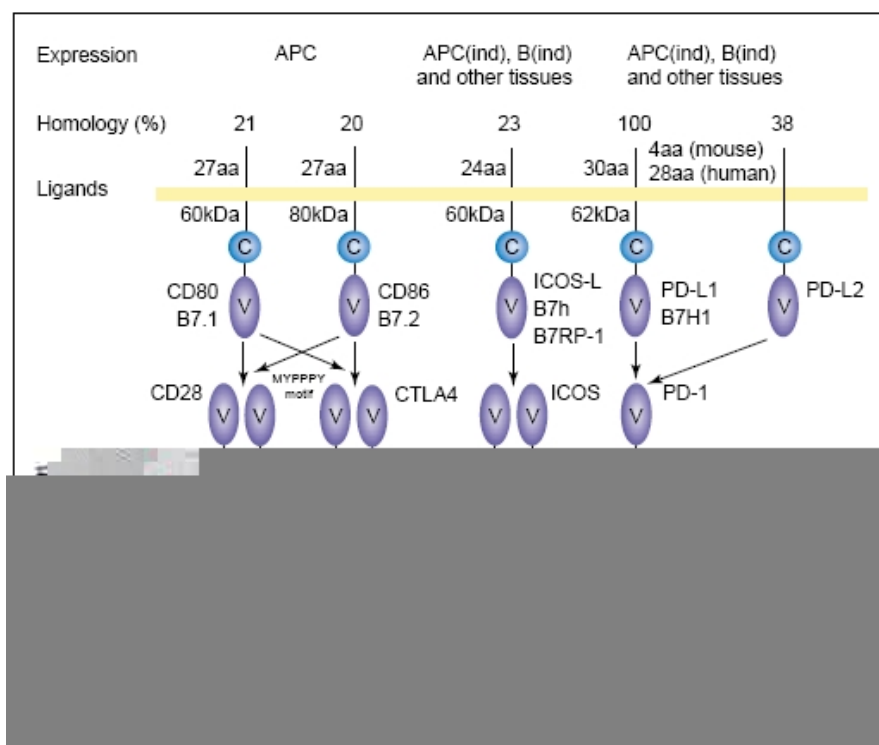


Figura 4 – Estrutura e interações entre PD-L-PD-1 e outros membros da família B7-CD28 (NISHIMURA & HONJO, 2001).

A PD-1 (*programmed death 1*) foi isolada em 1992 através da técnica de hibridação subtrativa, como uma molécula em que sua expressão era aumentada por estímulos apoptóticos em duas linhagens celulares diferentes (ISHIDA *et al.*, 1992). É membro da família de receptores CD28, que são proteínas transmembrana tipo 1, com um único domínio IgV na região extracelular. Na porção citoplasmática da PD-1 contém dois domínios imunoinibitórios ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) e ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*), sendo o último essencial para a função inibitória da molécula (OKAZAKI *et al.*, 2001). A PD-1 possui a importante função de modular a ativação de linfócitos. Pertence à superfamília das imunoglobulinas. Especificamente, através da ativação, PD-1 é expressa pelos linfócitos B e T, e quando se liga a seus ligantes, PD-L1 e PD-L2 (presentes em células apresentadoras de

antígenos), que são expressos em diversos tecidos, ocorre uma atenuação na resposta das células B e T (FERREIROS-VIDAL *et al.*, 2004).

Experimentos com o camundongo com deficiência do gene *pd1* demonstraram o desenvolvimento de glomérulo-nefrite similar ao lúpus ou cardiomiopatia auto-imune, dependendo da cepa analisada (NISHIMURA *et al.*, 1999; NISHIMURA *et al.*, 2001).

O gene *PDCD1* se encontra localizado no cromossomo 2q37.3, *locus* de susceptibilidade ao LES (PROKUNINA *et al.*, 2002) e é composto por 5 exons (TSAO, 2004).

Prokunina *et al.* (2002) rastrearam o gene *PDCD1* e identificaram sete SNPs, dos quais um SNP no intron 4, posição 7146 (G A), denominado PD1.3, demonstrou estar associado com o desenvolvimento do LES em famílias e em casos esporádicos de pacientes europeus (OR=2,6, p=0,00001) e de mexicanos (OR=3,5, p=0,0009). O alelo variante desse SNP parece alterar o sítio de ligação para o fator de transcrição RUNX1, o que poderia provocar uma alteração na transcrição da molécula (Figura 5). O PD-1.3A também parece estar associado à artrite reumatóide soronegativa (OR=1,75, p=0,015) em europeus (PROKUNINA & ALARCON-RIQUELME, 2004). Na população chinesa esse SNP não apresentou variação não sendo então polimórfico para essa população (KONG *et al.*, 2005).

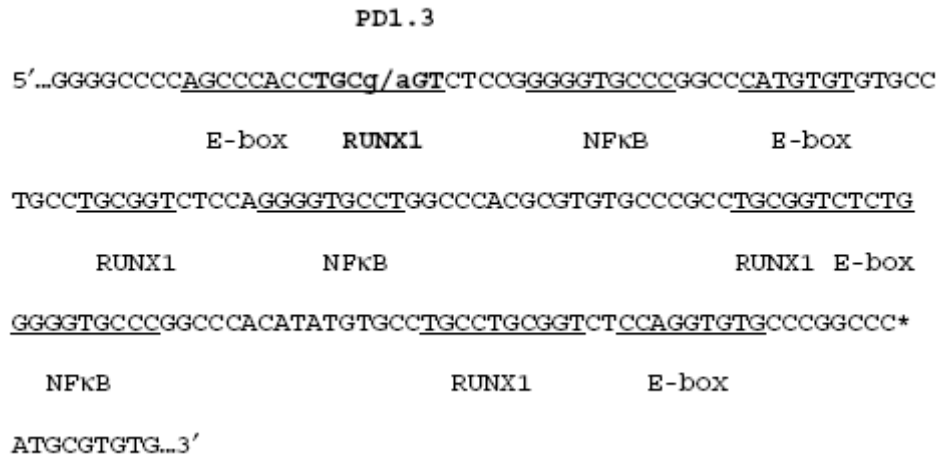


Figura 5 – Possíveis sítios de ligação dos fatores de transcrição RUNX1, NF B,e E-box localizados no íntron 4 do gene *PDCD1*. O SNP PD1.3 está localizado no primeiro sítio de ligação para o RUNX1 (PROKUNINA *et al.*, 2002).

### 1.3.3 - Aspectos hormonais

A evidência de anormalidades hormonais é fundamentada principalmente na observação de que o LES é muito mais freqüente em mulheres de idade fértil (CERVERA *et al.*, 1993; FORMIGA *et al.*, 1999). Além disso, o LES foi observado em alguns homens com síndrome de Klinefelter, e algumas anormalidades do metabolismo de estrogênio foram notadas tanto em homens quanto em mulheres com LES (FRENCH & HUGHES, 1983; LAHITA & BRADLOW, 1987). Essas observações sugerem um papel dos hormônios sexuais endógenos na predisposição à doença. O metabolismo anormal do estrógeno foi demonstrado em pacientes de ambos os sexos, com aumento da 16 -hidroxilação resultando em significativo aumento nas concentrações de 16 -hidroxiesterona (LAHITA *et al.*, 1987). Os metabólitos 16 são estrógenos de alta potência. Também foi observado em pacientes lúpicas baixas concentrações plasmáticas de hormônios androgênicos, incluindo testosterona e seus derivados (JUNGERS *et al.*, 1982;

LAHITA *et al.*, 1987). A atividade excessiva de estrógenos e a atividade androgênica inadequada podem favorecer uma alteração da resposta imunológica.

Concentrações de estrógenos fisiológicas ou supra-fisiológicas facilitam a resposta humoral, permitindo o aumento da proliferação de células B e produção de anticorpos (EVANS *et al.*, 1997; KANDA & TAMAKI, 1999). Contrariamente, altas doses de estrógenos inibem a resposta das células T, como a proliferação e produção de IL-2 (MCMURRAY *et al.*, 2001). Estudos também indicam uma indução no aumento da produção de IL-10, citocina importante na imunopatologia do LES influenciado pelo estrógeno (MOK & LAU, 2003). Outro estudo realizado aponta a estimulação pelo estradiol de moléculas CD154 (membro da superfamília gênica de ligantes de TNF), que interagem com moléculas CD40 estimulando o crescimento e diferenciação de células B (LI *et al.*, 2006).

Os estrógenos, juntos, podem agravar o LES prolongando a sobrevivência das células auto-imunes, estimulando o aumento da produção de citocinas Th2 e estimulando as células B a produzirem auto-anticorpos. A inibição da resposta Th1 e o aumento da expressão de CD40L nas células T lúpidas pode indiretamente promover uma resposta Th2 e permitir a hiperatividade das células B (MOK & LAU, 2003).

Muitos outros efeitos também têm sido estudados como relacionados ao estrógeno, sendo eles: o envolvimento na regulação dos mecanismos de apoptose através de fatores como o FAS, FASL, IFN e óxido nítrico (estimulando a apoptose das células T regulatórias); a ajuda na sobrevivência de células B auto-retivas; aberrações nas interações entre células B e células T, entre outras (VIDAVER, 2002).

Como o estrógeno regula a expressão de inúmeros genes, parece estar envolvido na regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Essa proteína mostrou um aumento em camundongos tratados com estrógeno, promovendo um aumento na sobrevivência de células B que normalmente seriam eliminadas por sinais de tolerância (BYNOE *et al.*, 2000).

De acordo com um grande estudo epidemiológico realizado, tanto o uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal obtiveram uma associação discreta com o aumento do risco de desenvolvimento do LES (SANCHEZ-GUERRERO,1995). Também foi detectado que as crises do LES ocorrem em maior quantidade em épocas de rápidas mudanças hormonais como na gravidez, pós-parto, estimulação da ovulação para fertilização *in vitro*, e administração de estrógenos exógenos (GUBALLA *et al.*, 2000; MOK *et al.*, 2001). Já a atividade da doença tem a tendência de diminuir quando as pacientes entram na menopausa (MOK *et al.*, 1999). Outros estudos relatam que esses tipos de terapia não possuem influência sobre o desenvolvimento ou agravamento da patologia (ASKANASE, 2004). Mas esse mecanismo ainda não se encontra totalmente elucidado e existem alguns trabalhos contraditórios.

Assim, de acordo com esses dados os hormônios estradióis parecem ter um papel importante no mecanismo patológico do LES e alteração tanto nas vias de metabolização quanto nas vias de síntese desses hormônios, podem contribuir para o desenvolvimento ou agravamento da doença.

Devido à importância dos fatores hormonais e de metabolização de xenobióticos no mecanismo patológico do LES, polimorfismos nos genes

relacionados a essas atividades podem apresentar um papel importante na susceptibilidade genética ao desenvolvimento do LES, bem como a relação com algumas manifestações clínicas. A Figura 6 representa a via de metabolização do estradiol e as principais enzimas envolvidas (THOMPSON & AMBROSONE, 2000).

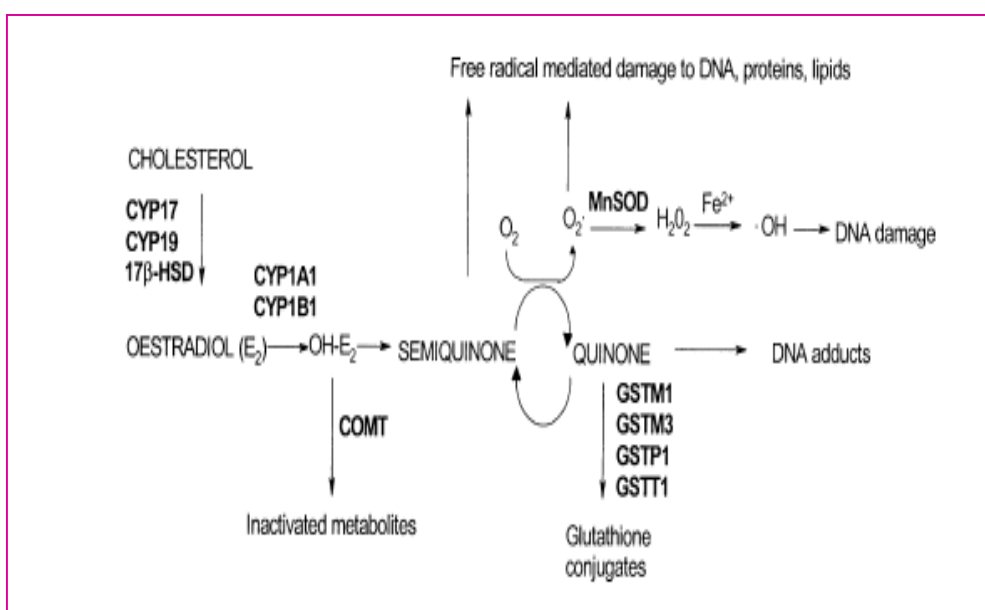


Figura 6 – Via de metabolização do estrógeno e as principais enzimas envolvidas no processo (THOMPSON & AMBROSONE, 2000).

### 1.3.3.1- Biotransformação de xenobióticos fase I

As enzimas do citocromo P450 são monoxigenases responsáveis pela catálise da biotransformação de diversos xenobióticos e muitos compostos endógenos importantes em processos bioquímicos incluindo a biossíntese de hormônios esteróides, prostaglandinas e leucotrienos. As reações dependentes do citocromo P450 aumentam a hidrofiliabilidade de substratos através da introdução de um centro reativo à molécula do substrato (fase I), que posteriormente pode ser conjugado a compostos endógenos como ácido glucurônico, sulfato, glutatona ou glicina (fase II). Apesar das enzimas P450

mediarem reações primárias de detoxificação, certos substratos são metabolicamente ativados resultando em intermediários reativos com um aumento de toxicidade e potencial mutagênico. A variação inter-individual e a expressão desses genes pode ter conseqüências toxicológicas (SHIMADA *et al.*, 1994; TUCKER, 1994; NEBERT & RUSSELL, 2002).

A superfamília dos genes do citocromo P450 é subdividida e classificada de acordo com as recomendações do comitê de nomenclatura (NELSON *et al.*, 1996), com base na identidade de aminoácidos, critérios filogenéticos e organização gênica. A diversidade dessa superfamília vem de um extensivo processo de duplicação gênica e provavelmente, casos de ampliações, conversões, perdas gênicas e transferência lateral (NELSON *et al.*, 1999). Em humanos, existem aproximadamente 55 genes e 25 pseudogenes pertencentes a essa família (WERCK-REICHART & FEYEREISEN, 2000).

Os genes das enzimas P450 são regulados por fatores endógenos, como hormônios e citocinas ou diversos tipos de xenobióticos. Um grande número de agentes infecciosos ou inflamatórios também demonstram causar alterações nos níveis de expressão dessas enzimas (TAMÁSI *et al.*, 2003). Citocinas e a molécula de óxido nítrico parecem ser mediadores dessa resposta. As citocinas possuem um efeito direto na expressão das enzimas P450 e também induzem a óxido nítrico sintetase (NOS2) o que resulta na produção de óxido nítrico durante a resposta imune celular (MORGAN *et al.*, 1998; RENTON, 2001; MORGAN, 2001).



### **Gene *CYP1A1***

O gene *CYP1A1* codifica uma enzima pertencente à superfamília citocromo. Essa proteína localiza-se no retículo endoplasmático (MIYOSHI & NOGUSHI, 2003). É uma molécula altamente induzível. A *CYP1A1* catalisa a hidroxilação C-2, C-6 e C15 do estradiol, mas tem sido mais estudada como a principal enzima ativada por compostos constituintes da fumaça de cigarro, e outros poluentes como os hidrocarbonetos poliaromáticos, dioxina e derivados, aminas aromáticas e nitrosaminas além de outros (MITRUNEN & HIRVONEN, 2003).

A enzima *CYP1A1* é predominantemente expressa nos tecidos extra-hepáticos e está envolvida no metabolismo do estradiol através da catalisação da reação de hidroxilação C-2. É possível que polimorfismos genéticos no gene que codifica a enzima afetem sua atividade, tornando certos indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças, como diversos tipos de câncer e o LES (YEN *et al.*, 2003).

Diversas citocinas incluindo IL-1, IL-6, TNF- e TGF- demonstraram suprimir a expressão do *CYP1A1* em linhagens celulares de hepatoma humano (FUKUDA & SASSA, 1994; MUNTANE-RELAT *et al.*, 1995). O fator de transcrição NF- B induzido por citocinas, parece inibir a interação física com o receptor Ah resultando na regulação negativa da enzima *CYP1A1* (MORGAN, 2001).

A localização do *CYP1A1* é no cromossomo 15, na posição 15q22-q24. Esse gene contém oito introns confirmados, seis dos quais são alternativos. Existem provavelmente dois promotores alternativos e sete exons. Esse gene

produz através do *splicing* alternativo quatro tipos de transcritos, provavelmente codificando quatro proteínas distintas ([www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Assembly](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Assembly)).

Existem pelo menos 12 variantes alélicas do gene *CYP1A1* descritas (NEBERT & DALTON, 2006). Entre as mais estudadas encontram-se os alelos *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP1A1\*3* e *CYP1A1\*4* (Figura 7).



Figura 7 – Estrutura do gene *CYP1A1* e os SNPs mais estudados (adaptado de CASCORBI *et al.*, 1996).

O primeiro polimorfismo descrito (*CYP1A1* \* 2A) caracteriza-se por uma mutação pontual na região 3' que flanqueia o gene na posição 6235, ocorrendo uma transição de timina para citosina (T6235C), originando um sítio de restrição para a enzima *Msp1* (CASCORBI *et al.*, 1996). Esse alelo possui uma frequência de aproximadamente 31% em orientais e 12% em populações europeias (KAWAJARI *et al.*, 1990; PETERSEN *et al.*, 1991). Os estudos em relação ao papel desse polimorfismo ainda são controversos. Esse alelo tem sido associado com diversos tipos de neoplasias (MANSON *et al.*, 2005).

No alelo polimorfo *CYP1A1\*2C* a alteração está localizada na região codificadora do gene (exon sete) e é uma transição de adenina para guanina na

posição 4889 (A4889G), resultando na substituição do aminoácido isoleucina por valina no resíduo 462 da região de ligação do grupo heme (sítio ativo da enzima) (HAYASHI *et al.*, 1991). Experimentos demonstraram que esse polimorfismo está associado a um aumento na indução da enzima em até três vezes (MITRUNEN & HIRVONEN, 2003). Esse alelo é mais raro em populações de origem europeia em relação ao Japão, onde a frequência é de aproximadamente 20% (CASCORBI *et al.*, 1996). Essa variante também tem sido frequentemente relacionada com alguns tipos de câncer como pulmão (CASCORBI *et al.*, 1996), mama (BOYAPATI *et al.*, 2005), ovário (AKTAS *et al.*, 2002), entre outros. Também foram encontradas associações com algumas doenças auto-imunes como a doença de Behcet (YEN *et al.*, 2004), algumas manifestações clínicas da artrite reumatóide (YEN *et al.*, 2003) e com o LES (von SCHMIEDEBERG *et al.*, 1999).

O alelo *CYP1A1*\*3 (T5639C), assim como o *CYP1A1*\*2A, é também uma substituição T C, mas foi detectado apenas na população afro-americana com uma frequência de 17% e suas conseqüências fenotípicas ainda não são bem conhecidas (CASCORBI *et al.* 1996).

A quarta variante, *CYP1A1*\*4, caracteriza-se por uma mutação pontual no exon 7, onde ocorre uma transversão de citosina para adenina (C4887A), o que leva à mudança do aminoácido treonina para asparagina no códon 461 na região de ligação do grupamento heme. Esse polimorfismo parece estar associado a uma atividade mais baixa em relação ao metabolismo da progesterona (KAWAJIRI *et al.*, 1991). Também foram encontradas diversas associações desse alelo com doenças auto-imunes. Mas em alguns estudos, esse alelo parece ter um efeito protetor em relação à auto-imunidade e em outros parece ser

um fator de risco. Em artrite reumatóide, um estudo com a população de Taiwan detectou um efeito protetor em relação ao desenvolvimento da doença (YEN *et al.*, 2003). Também foi demonstrado um efeito protetor em relação ao desenvolvimento de espondilite anquilosante também na população de Taiwan (YEN *et al.*, 2003). Já para a artrite psoriática, foi demonstrada uma associação de risco com esse alelo (YEN *et al.*, 2004). Também foi realizado um estudo com pacientes com LES em Taiwan onde essa variante se apresentou como um fator de risco para o desenvolvimento da doença (YEN *et al.*, 2003).

#### **1.3.3.2 - Biotransformação de xenobióticos fase II**

As glutatona S-transferases (GST) são um importante sistema enzimático do mecanismo celular de detoxificação que protege as células contra espécies reativas de oxigênio através da conjugação da glutatona com compostos eletrofílicos. Durante esse processo, a glutatona é transformada na forma oxidada, que deve ser reduzida pela NADPH-glutatona redutase. A habilidade da célula de manter os níveis de glutatona é extremamente importante para a manutenção da integridade celular. As enzimas GSTs estão envolvidas na biotransformação de xenobióticos que incluem carcinógenos ambientais, espécies reativas de oxigênio e agentes quimioterapêuticos (HAYES & PULFORD, 1995). Essas enzimas também demonstraram uma ação como inibidores da via *jun quinase*, importante no mecanismo de sinalização para a ativação de genes citoprotetores (ADLER *et al.*, 1999). Alterações nesses genes podem resultar na potencialização do estresse oxidativo celular (HAYES & STRANGE, 2000).

Existem grandes evidências de que as espécies reativas de oxigênio possuem um papel importante no LES (COMSTOCK *et al.*, 1997; BAE *et al.*, 2002). O peróxido de hidrogênio é uma molécula reativa lipofílica derivada do oxigênio que penetra nas membranas lipídicas e é capaz de causar danos ao DNA (ALLAN *et al.*, 1988). Pacientes com LES possuem menor capacidade de reparar DNA com danos oxidativos e os linfócitos de pacientes com LES apresentam maiores taxas de apoptose (EMLEN *et al.*, 1994; EVANS *et al.*, 2000). Esse DNA com danos oxidativos liberado pelas células apoptóticas pode servir como antígeno para os anticorpos anti-DNA (BLOUNT *et al.*, 1989). Em comparação ao DNA nativo, esse DNA com danos oxidativos é capaz de gerar títulos maiores de auto-anticorpos. Assim, os mecanismos de detoxificação celular podem apresentar um importante papel no LES, promovendo uma proteção contra os danos oxidativos causado pelas espécies reativa de oxigênio (AHSAN *et al.*, 2003).

### **Gene GSTM1**

O gene *GSTM1* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p13.3) e contém cinco subunidades codificantes *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5* (LIZARD-NACOL *et al.*, 1999). Os substratos para a enzima *GSTM1* incluem os epóxidos intermediários reativos gerados pela ativação de hidrocarbonetos poliaromáticos pelas enzimas do citocromo P450. A presença ou ausência do gene *GSTM1* constitui um dialelismo. A ausência do gene *GSTM1*, identificado no genótipo *GSTM1*-nulo (*GSTM1*\*0/*GSTM1*\*0), é observada em taxas que variam de 20 a 70% nas diferentes populações investigadas, sendo que a frequência de indivíduos que não expressam essa enzima é maior em

populações de origem europeia em relação a orientais e africanas (BAILEY *et al.*, 1998; ROTH *et al.*, 2000). O genótipo nulo leva a uma ausência total da atividade da respectiva enzima (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996; GARCIA-CLOSAS *et al.*, 1999; MITRUNEM & HIRVUNEM, 2003).

### **Gene *GSTT1***

O gene humano *GSTT1* está localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q11.23). Como o *GSTM1*, o *GSTT1* também apresenta o alelo nulo (*GSTT1\*0*), resultado da deleção do gene (MITRUNEM & HIRVUNEM, 2003), e ocasiona a ausência de atividade da enzima (GARCIA-CLOSAS *et al.*, 1999; GUDMUNSDSDOTTIR *et al.*, 2001), detectados em indivíduos homozigotos (*GSTT1\*0/GSTT1\*0*). Os substratos da enzima *GSTT1* incluem substâncias químicas com um amplo uso industrial, como cloridrato de metila (um agente de metilação), brometo de metila (agrotóxico), óxido de etileno, que é um agente amplamente utilizado para esterilização e um produto intermediário na produção de fibras de poliésteres e surfactante não-iônico, e diclorometano (um solvente) (GARCIA-CLOSAS *et al.*, 1999). Assim como o *GSTM1*, o *GSTT1* também tem sido relacionado com a susceptibilidade a patologias de origem multifatorial, como artrite reumatóide e LES (KANG *et al.*, 2005; YUN *et al.*, 2005), e a deleção em homozigose do gene tem variado de 11 a 38% nas populações estudadas (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996).

## 2 - Justificativa

Atualmente as doenças auto-imunes se encontram entre uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo, acometendo aproximadamente 3% da população mundial. Os aspectos psicológicos, físicos e econômicos dessas patologias são muitas vezes devastadores, pois atingem amplamente adultos jovens. Recentemente, novas terapias desenvolvidas, como os antagonistas do fator de necrose tumoral (TNF ), por exemplo, têm alcançado grandes avanços, mas os danos causados por essas terapias ainda são extremamente prejudiciais.

A descoberta de que o desenvolvimento da auto-imunidade é fortemente influenciado por polimorfismos genéticos, traz a esperança de que ao entender melhor a genética da auto-imunidade, possam se desenvolver terapias e métodos de diagnóstico e prognóstico mais eficazes (RIOUX & ABBAS, 2005).

Apesar de não existirem análises estatísticas precisas no Brasil em relação ao LES, o que se observa é um grande número de pacientes com essa e outras patologias auto-imunes, sendo necessários mais estudos em relação às mesmas na população brasileira. O LES é uma doença altamente debilitante e geralmente possui uma sobrevida de dez anos para as pacientes que estejam em tratamento, podendo variar de acordo com a gravidade da doença. Por esse motivo e pela dificuldade muitas vezes de um diagnóstico rápido e claro, torna-se necessário o desenvolvimento de marcadores diagnósticos mais precisos, além da tradicional detecção dos anticorpos e marcadores de prognóstico que possam ajudar na condução do melhor tratamento.

## 3 - Objetivos

### 3.1 - Objetivo geral

Pesquisar as variantes genéticas possivelmente relacionadas com o desenvolvimento do LES em pacientes e indivíduos controles e determinar as freqüências dos alelos e dos genótipos dos genes estudados.

### 3.2 - Objetivos específicos

Obter amostras de DNA de células sangüíneas de pacientes com LES e indivíduos normais (grupo-controle), na população de Santa Catarina.

Organizar um banco de DNA com as amostras acima citadas, que será utilizado para as análises moleculares.

Pesquisar se as variantes do gene *CYP1A1* (\*2C ou A4889G, \*2A ou T6235C e \*4 ou C4887A) possuem relação com a susceptibilidade ao desenvolvimento do LES.

Pesquisar se os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* estão relacionados com o desenvolvimento do LES.

Pesquisar se as variantes do gene *IL18 -137* e *IL18 -607* possuem relação na susceptibilidade ao desenvolvimento do LES.

Verificar se o SNP no gene *PDCD1* (PD1.3 ou +7146) possui relação na susceptibilidade ao desenvolvimento do LES.

Calcular as freqüências dos alelos e dos genótipos em relação aos *loci* analisados e verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg.



Identificar genótipos ou alelos (marcadores moleculares) de associação com o desenvolvimento de nefrite nos pacientes com LES.

Realizar análise de regressão logística para identificar possíveis combinações de alelos que possam influenciar no desenvolvimento da doença.

## 4 - Pacientes e Indivíduos Controles

### 4.1 - Aspectos éticos

Este projeto faz parte de um projeto mais abrangente denominado **“Marcadores de susceptibilidade ao lupus eritematoso sistêmico”**. Este estudo maior tem como objetivo avaliar a associação de diversos genes com o desenvolvimento e agravamento do LES num estudo caso-controle. Esse projeto foi submetido ao Comitê de Ética da UFSC, sob número 231/2003 e aprovado em 15 de dezembro de 2003.

Todos os indivíduos participantes foram esclarecidos do conteúdo do projeto e sobre o sigilo de suas informações pessoais, e assinaram um termo de consentimento livre esclarecido antes de terem seu sangue coletado e o questionário realizado (ANEXO I).

### 4.2 - Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue periférico dos pacientes e dos indivíduos controles foram obtidas no Hospital Universitário da UFSC (HU).

O grupo de pacientes foi constituído por 98 indivíduos, sendo que destes apenas três pacientes são do sexo masculino, diagnosticados pela equipe de reumatologia do HU, de acordo com os critérios adotados pela ACR (*American College of Rheumatology*). Foram encaminhados para coleta do material biológico onde foram coletados 10 ml de sangue com EDTA, para posterior extração de DNA e armazenamento do soro.

O grupo controle foi constituído por 108 indivíduos saudáveis, que iriam se submeter a exames de rotina, durante o primeiro e segundo semestres de 2005, no laboratório do HU.

Devido à má qualidade de algumas amostras de DNA ou alguns outros problemas inerentes à técnica utilizada, o número de indivíduos analisados para os *loci* estudados diferiu em relação aos números acima citados.

#### **4.3 - Questionário epidemiológico e caracterização clínica**

Os pacientes e os indivíduos controles também foram submetidos a entrevistas onde dados familiares, epidemiológicos e clínicos foram obtidos através de um questionário (ANEXO II).

## **5 - Materiais e Métodos**

### **5.1 - Separação e conservação das amostras**

10ml de amostra de sangue contendo EDTA foram centrifugados a 3000 rotações por min (centrifuga *ependorf* 5415D, rotor – F-45-24-11- de ângulo fixo de 45°, para 24 tubos de 1,5 a 2 ml com diâmetro máximo de 11 mm), durante 20 min, para separação do plasma (que foi estocado a – 20°C, para futuras pesquisas) e da camada de linfócitos (*buffy coat*), a qual foi utilizada para obtenção de DNA genômico.

## 5.2 - Extração e purificação do DNA genômico

O procedimento utilizado para a extração do DNA sanguíneo foi através do método TRITON – X. (ERLICH, 1992).

Em microtubos de 1,5ml, foi adicionado 300µl de “buffy coat” separados da amostra de sangue correspondente, cujas células foram lisadas por meio de 1ml de solução LISE I (Tris/HCl 0,01M, pH 7,6; sacarose 0,32M; MgCl<sub>2</sub> 5,0mM; Triton X-100%). Esta técnica consiste, basicamente, no rompimento mecânico e/ou enzimático das hemácias, para isso utiliza-se o agitador orbital. Os tubos foram centrifugados por 2 min a 12.000 rpm (centrifuga *ependorf* 5415D, rotor – F-45-24-11- de ângulo fixo de 45°, para 24 tubos de 1,5 a 2ml com diâmetro máximo de 11mm). Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e adicionado novamente 1ml de tampão de LISE I, com nova agitação e centrifugação. Esses passos foram repetidos até que o sobrenadante e o sedimento estivessem transparentes, sem hemácias. Após esse último descarte do sobrenadante, foi adicionado 300 µl de tampão de LISE II (Tris/HCl 0,01M, pH 8,5; KCl 50mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM; Nonidet – 40 – Polietoxietanol 0,45%; Tween 20 ou 80 – 0,45%), e com a ponteira o sedimento foi homogeneizado, onde encontravam-se os núcleos dos leucócitos. Adicionou-se a esta solução, 5µl de proteinase K a 10µg/ml. Incubou-se em banho-maria por 1h a 65°C. Após esse procedimento, as amostras foram colocadas na estufa a 37°C por 12 h, e posteriormente incubadas a 95°C por 10 min para desnaturação da proteinase K.

Após a extração, foi realizada a leitura da densidade óptica do DNA e foram preparadas soluções de uso na concentração de 20ng/µl em solução tampão.

As amostras agora constituem um banco de DNA organizado a partir do número de matrícula dos indivíduos, contendo seus dados epidemiológicos. Este banco de DNA genômico foi estocado a -20°C e será utilizado em análises moleculares futuras.

### 5.3 - Reação da cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR foi usada para amplificar regiões específicas do DNA genômico utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores apropriados (Tabelas 1, 2 e 3) para a amplificação das regiões de interesse. Para a detecção dos diferentes genótipos foram utilizados dois tipos diferentes de PCR. O primeiro grupo de SNP foi analisado através da PCR-RFLP (por análise de fragmento de restrição) e o segundo foi analisado através da técnica de PCR-SSP (iniciador específico).

Tabela 3- Seqüências dos iniciadores utilizados para as análises por PCR-RFLP.

<b>LOCUS</b>	<b>Iniciadores 5' 3'</b>	
<i>CYP1A*2C e *4</i>	M2F- CTG TCT CCC TCT GGT TAC AGG AAG C	CASCORBI <i>et al.</i> , 1996.
	M2R- TTC CAC CCG TTG CAG CAG GAT AGC C	
<i>CYP1A*2A</i>	C44 - TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT	CARTENSEN <i>et al.</i> , 1993.
	C47 CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT	
<i>IL-18 (-607)</i>	F – CTT TGC TAT CAT TCC AGG AA	TAKADA <i>et al.</i> , 2002.
	R – TAA CCT CAT TCA GGA CTT CC	
<i>PDCD1 +7146</i>	PD1.3F- CCC CAG GCA GCA ACC TCA AT	SANGHERA <i>et al.</i> , 2004.
	PD1.3R- GAC CGC AGG CAG GCA CAT AT	

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores utilizados para a análise por PCR -SSP multiplex

<b>LOCUS</b>	<b>Iniciadores 5' 3'</b>	
<i>GSTM1</i>	G1- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C	ABDEL- RAHMAN <i>et al.</i> , 1996
	G2- GTT GGG CTC AAA TAT ACG CTG G	
<i>HBB</i> -globina (controle de PCR)	B1- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	
	B2- GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	
<i>GSTT1</i>	T1- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	
	T2- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA	

Tabela 5 - Sequência de iniciadores utilizados para análise por PCR-SSP.

<b>LOCUS</b>	<b>Iniciadores 5' 3'</b>	
<i>IL-18 (-137)</i>	F1- CCC CAA CTT TTA CGG AAG AAA AG	TAKADA <i>et al.</i> , 2002
	F2- CCC CAA CTT TTA CGG AAG AAA AC	
	F- CCA ATA GGA CTG ATT ATT CCG CA	
	R- AGG AGG GCA AAA TGC ACT GG	

### 5.3.1 - Genotipagem de SNP pelo método da PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragments Length Polymorphisms)

Para a genotipagem dos SNPs *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP1A1\*4* (Figura 8), *PDCD1 1.3* e *IL18 (-607)* foi realizado o método da PCR seguido pela análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (*RFLP*).

Os reagentes citados na Tabela 6 foram misturados em um único microtubo de 1,5 ml (mistura de reação), para cada SNP analisado, para garantir a homogeneidade das reações. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras analisadas em cada PCR. Em cada

microtubo de 0,2 ml foi pipetado o volume total da mistura da reação e a amostra de DNA genômico a ser amplificada. Foi utilizado um controle negativo com todos os reagentes da mistura de reação e água no lugar do DNA, com o objetivo de detectar possíveis contaminações por DNA exógeno. Foi utilizado também, um controle positivo, o qual já é amplificado em PCR de rotina do laboratório. Os microtubos foram levados ao termociclador Mastercycler – (Eppendorf) e submetidos a seus respectivos programas (Tabela 6).

Tabela 6 – Protocolo de reação para cada SNP analisado por PCR-RFLP.

<b>Reagentes</b>	<b>CYP1A1*2C e *4</b>	<b>CYP1A1*2A</b>	<b>IL-18 (-607)</b>	<b>PDCD1</b>
Tampão 10X	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl
dNTP 10mM	1,0µl	1,0µl	1,0µl	0,45µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,25µl	0,75µl	0,60µl	0,50µl
Iniciador R (50µM )	3µl (5 µl CypA + 5 µl	0,20µl	0,20µl	0,20µl
Iniciador F (50 µM)	CypB + 190 µl H <sub>2</sub> O)	0,20µl	0,20µl	0,20µl
Taq polimerase (5U)	0,25µl	0,25µl	0,20µl	0,20µl
H <sub>2</sub> O ultra-pura	13µl	17,4µl	16,1µl	18,95µl
DNA (20ng/ µl)	1,0µl	2,5µl	4,0µl	2,0µl
TOTAL	21 µl	25 µl	21µl	23µl
Programas	35 ciclos: 94 °C por 30seg 63 °C por 30seg 72 °C por 30seg	1 ciclo: 94 °C por 5min  30 ciclos: 94 °C por 1min 56 °C por 1min 72 °C por 1,5min  1 ciclo: 72 °C por 2min	1 ciclo: 94 °C por 3min  35 ciclos: 94 °C por 20seg 57 °C por 40seg 72 °C por 40seg  1 ciclo: 72 °C por 3min	1 ciclo: 95 °C por 10min  33 ciclos: 94 °C por 15seg 60 °C por 30seg 72 °C por 15seg
BSA (adjuvante para a Taq)	<b>X</b>	0,20µl	0,20µl	<b>X</b>

Os produtos de amplificação gênica foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Sigma), aplicando-se 5 µl do produto da reação e 1,5 µl do tampão de amostra no gel com concentração de 1% submetendo a corrida eletroforética de 100V por 20 min. Para o preparo dos géis e para a corrida eletroforética foi utilizado tampão TBE 0,5X (5,4g de Tris-HCL, 2,75g de ácido



bórico, 2 ml de EDTA dissódico 0,5M pH 8,0 e água para completar o volume de 1000 ml). Após a corrida eletroforética o gel, corado com brometo de etídeo (5µg/ml) foi visualizado no aparelho transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentado.

Após a PCR realizou-se a segunda etapa através da clivagem com as respectivas endonucleases de restrição para cada SNP analisado.

A detecção dos SNPs *CYP1A1\*2C* e *IL18* (-607) através da análise dos fragmentos de restrição foi realizada com a adição da respectiva endonuclease de restrição (New England Biolabs) (Tabela 7), 0,20µl de BSA e 1,5µl de seu respectivo tampão (NEB2) ao microtubo contendo o produto da PCR.

A detecção dos SNP *CYP1A1\*2C*, *CYP1A1\*4*, *PDCD1* 1.3 foi realizada através da adição de 6µl de produto da PCR a 4 µl da mistura da reação para RFLP, contendo, 1,5 µl de tampão (NEB 2 ou 3 respectivamente), endonuclease de restrição (*New England Biolabs*), 0,2 µl de BSA, e água ultra-pura para completar o volume final (10 µl). As unidades utilizadas para cada enzima bem como a temperatura e tempo de incubação encontram-se descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características das endonucleases de restrição utilizadas na análise de cada SNP por RFLP.

Gene	Nucleotídeo	Alelos	Fragmento amplificado pb	Endonuclease de restrição	Sítio de restrição 5´ 3´	Fragmentos de restrição pb
<b>PDCD1</b> <b>PD1.3</b>	+7146	G, A	180	<i>Pst</i> I 0,3U 37°C overnight	CTGCA G Cliva o alelo A	130 e 50
<b>IL18</b>	-607	C, A	301	<i>Mse</i> I 2U 37°C overnight	T TAA Cliva os dois alelos	199,73 e29 (CC) 101, 98,73 e 29 (AA) 199, 101,98,73 e29 (CA)
<b>CYP1A1*2C</b>	+4889	A, G	204	<i>Bsr</i> DI 0,5U 65°C overnight	GCAATGNN ... Cliva o alelo A	149 e 55
<b>CYP1A1*4</b>	+4887	C, A	204	<i>Bsa</i> I 2,5U 55°C overnight	GGTCT(N)1 ... Cliva o alelo C	139 e 65
<b>CYP1A1*2A</b>	+6235	T, C	340	<i>Msp</i> I 1U 37°C overnight	C CGG Cliva o alelo C	200 e 140

Os produtos de digestão (5,5 µl) foram misturados a 1,5 µl do corante para corrida eletroforética (azul de bromofenol + xileno cianol), e foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídio (5µg/ml) a 90V por 30 min. Utilizou-se um marcador de 100pb (New England Biolabs), como referência na análise dos fragmentos encontrados em cada amostra. Após a corrida eletroforética o gel foi visualizado no aparelho transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

Para os polimorfismos analisados do gene CYP1A1 foi utilizado gel de agarose a 2,5% (Figura 8).



Figura 8 – Análise dos polimorfismos do gene *CYP1A1* através da metodologia de PCR-RFLP. **(1)** marcador de peso molecular de 100pb; **(2)** indivíduo com genótipo AA (204 pb) para o SNP *CYP1A1 A4889G* (\*2C); **(3)** indivíduo heterozigoto AG (204pb, 149pb e 55pb) para o SNP *CYP1A1 A4889G* (\*2C); **(4)** indivíduo homozigoto GG (149pb e 55pb) para o SNP *CYP1A1 A4889G* (\*2C); **(5)** marcador de peso molecular de 100pb; **(6)** indivíduo homozigoto CC (204pb) para o SNP *CYP1A1 A4887C* (\*4); **(7)** indivíduo heterozigoto CA (204pb, 139pb e 65pb) para o SNP *CYP1A1 A4887C* (\*4); **(8)** indivíduo homozigoto AA (139 e 65pb) para o SNP *CYP1A1 A4887C* (\*4); **(9)** marcador de peso molecular de 100pb; **(10)** indivíduo TT (200pb e 140pb) para o SNP *CYP1A1 T6235C* (\*2A); **(11)** indivíduo heterozigoto TC (340pb, 200pb e 140pb) para o SNP *CYP1A1 T6235C* (\*2A); **(12)** indivíduo homozigoto CC (340pb) para o SNP *CYP1A1 T6235C* (\*2A).

Para a detecção dos alelos do SNP *IL18 -607* foi utilizado gel de agarose na concentração de 4% (Figura 10).

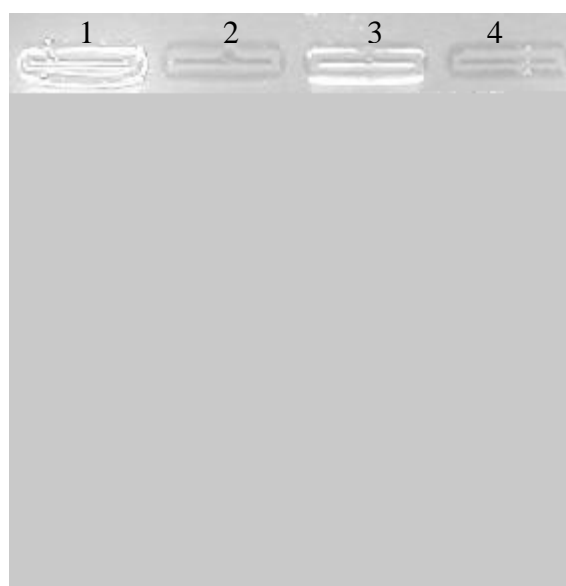


Figura 9 – Análise do polimorfismo do gene *IL18-607* **(1)** Marcador de peso molecular de 100pb; **(2)** indivíduo homozigoto CC (199pb, 73pb e 29pb); **(3)** indivíduo heterozigoto CA (199pb, 101pb, 98pb, 73pb e 29pb); **(4)** indivíduo homozigoto AA (101pb, 98pb, 73pb e 29pb).

### **5.3.2 - Genotipagem de SNP e deleções gênicas pelo método da PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers*)**

Para genotipagem dos polimorfismos *IL18* (-137), *GSTT1* e *GSTM1* foi utilizada a técnica de PCR-SSP. Esta técnica baseia-se em detectar a presença ou ausência da seqüência-alvo específica. Assim, iniciadores específicos são utilizados para cada alelo a ser analisado.

Para o SNP *IL18* -137, os reagentes citados na Tabela 8 foram misturados em dois microtubos de 1,5 ml cada um contendo uma mistura de reação utilizando um iniciador específico para cada alelo: um específico para o alelo G (F1) e outro para o alelo C (F2), assim como um iniciador para controle interno de amplificação (F). Já para os genes *GSTT1* e *GSTM1*, todos os reagentes foram misturados em apenas um microtubo. O volume de cada reagente utilizado foi multiplicado pelo número de amostras analisadas em cada PCR. Em cada microtubo de 0,2 ml foi pipetado o volume total da mistura da reação e a amostra de DNA genômico a ser amplificada. Foi utilizado um controle negativo com todos os reagentes da mistura de reação e H<sub>2</sub>O no lugar do DNA, com o objetivo de detectar possíveis contaminações por DNA exógeno. Foi utilizado também, um controle positivo, o qual já é amplificado em PCRs de rotina do laboratório. Os microtubos foram levados ao termociclador Mastercycler (Eppendorf) e submetidos a seus respectivos programas (Tabela 8).

Tabela 8 - Protocolo de reação para cada SNP analisado por PCR-SSP.

<b>Reagentes</b>	<b>GSTs (Multiplex)</b>	<b>IL-18 (-137)</b>
Tampão 10X	2,5µl	1 µl
dNTP 10mM	1µl	0,30 µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,25µl	0,28 µl
Iniciadores (50µM – cada)	0,5µl	0,12 µl
<i>Taq</i> polimerase (5U)	0,3µl	0,08 µl
H <sub>2</sub> O ultra-pura	14,5µl	8,1 µl
DNA (20ng/ µl)	5µl	2 µl
TOTAL	20µl	10 µl
Programa	1 ciclo: 94 °C por 5min  30 ciclos: 94 °C por 2min 59 °C por 1min 72 °C por 1min  1 ciclo: 72 °C por 4min	1 ciclo: 94°C por 2min  5 ciclos: 94°C por 20seg 68°C por 60seg  25 ciclos: 94°C por 20seg 62°C por 20seg 72°C por 40seg

Após as reações de amplificação foi realizada uma eletroforese para a visualização dos resultados, aplicando-se 5,5 µl do produto da reação em gel de agarose (Sigma) a 2,5% submetendo a corrida eletroforética de 100V por 30 minutos. O preparo do gel foi realizado conforme o item 5.3.1.

Nesse caso, a verificação dos resultados se dá pela ausência ou presença da banda para cada iniciador específico utilizado (Figura 11 e Figura 12).

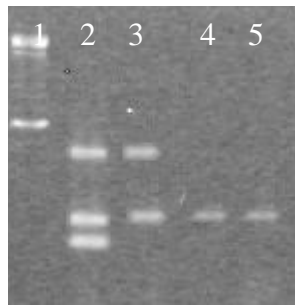


Figura 10 – Análise dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* por multiplex. **(1)** Marcador de peso molecular de 100pb; **(2)** indivíduo *GSTT1* positivo e *GSTM1* positivo (480pb, 268pb e 215pb); **(3)** indivíduo *GSTT1* positivo e *GSTM1* nulo (480pb e 215pb); **(4)** indivíduo *GSTT1* nulo e *GSTM1* nulo (215pb).



Figura 11 – Análise do polimorfismo do gene *IL18 -137* por PCR-SSP. **(1)** marcador de peso molecular de 100pb **(2)** indivíduo homocigoto GG; **(3)** indivíduo heterocigoto GC; **(4)** indivíduo heterocigoto GC.

#### 5.4 - Análise estatística

As freqüências alélicas e genotípicas dos *loci* analisados foram estimadas por contagem gênica e foi utilizado o teste de  $\chi^2$  para verificar se as amostras encontravam-se de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg.

A significância estatística das diferenças das freqüências genotípicas e alélicas, observadas entre pacientes e controles foi estimada pela análise das

tabelas de contingência 2X2 e o valor de  $P$  foi determinado pelo teste exato de Fisher (com auxílio do programa *Graphpad Instat 3*). O valor de  $P$  igual a 0,05 foi adotado como limite de significância para todos os testes estatísticos realizados.

A OR (*odds ratio*), ou razão de chances, foi calculada através da fórmula  $OR=(axd)/(bxc)$  (WOOLF, 1955), sendo a, b, c e d as freqüências absolutas de indivíduos obtidas em uma tabela de contingência 2X2. O valor de OR exprime quantas vezes a doença é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator comparando com indivíduos sem o fator. Sempre que o valor de alguma célula (a, b, c ou d) era zero, foi realizada a correção de Haldane, segundo a fórmula:  $OR= [(a+0,5)x(d+0,5)/(b+0,5)x(c+0,5)]$ . Valor de OR igual a um, indica que o fator não está associado à característica analisada; valores superiores a um indicam uma associação do fator com a característica e valores inferiores a um indicam que há uma menor probabilidade de se desenvolver aquela característica. No caso de doença, indica que é um fator de proteção e não de risco como para os valores acima de um.

Também foram realizadas análises de regressão logística para calcular o risco estimado através da OR para os SNP analisados entre os pacientes com e sem nefrite. Para essa análise foram assumidos os valores de 1 para indivíduos que apresentavam pelo menos um alelo mutante e 0 para indivíduos homocigotos selvagens. O pacote estatístico SPSS versão 12.0 foi utilizado para as análises de regressão logística.

## 6 - Resultados

### 6.1 - Dados do questionário

Dos questionários obtidos dos pacientes apenas 84 estavam completos e foram utilizados para análise. Nesse questionário encontravam-se alguns dados epidemiológicos e as principais manifestações clínicas associadas ao LES. A manifestação clínica mais freqüente entre os pacientes foi a presença de artrite (80% dos entrevistados), seguida de distúrbios hematológicos (37%) e hipertensão. A freqüência de distúrbios neurológicos foi de 28%, sendo que 9 pacientes relataram depressão e 11 possuíam algum outro tipo de distúrbio.

Os dados em relação ao desenvolvimento de nefrite foram obtidos através da pesquisa direta ao prontuário das pacientes, assim esse dado foi obtido para 92 pacientes, que possuíam registro de ausência ou presença de nefrite.

### 6.2 - Análise do polimorfismo *CYP1A1\*2C (A4889G)*

As freqüências genóticas desse SNP encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes quanto nos indivíduos controles. Não houve uma diferença significativa entre a distribuição das freqüências alélicas e genóticas entre os pacientes e os indivíduos controles (Tabela 9). A análise de comparação das freqüências desse SNP não apresentou associação negativa nem positiva com o LES (Tabela 9).



Tabela 9 - Comparação das frequências dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *CYP1A1\*2C* (A,G) entre pacientes com LES e indivíduos controles.

	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P
	(%)	n	(%)	n			
<b>Portadores</b>							
A	94,68	88	97,96	96	0,852	0,481-1,508	0,653
G	39,36	37	34,69	34	1,174	0,68-2,20	0,653
<b>Alelos</b>							
A	77,66	-	81,63	-	0,782	-	-
G	22,34	-	18,36	-	1,279	0,607-1,528	0,600
<b>Genótipos</b>							
A/A	60,64	57	65,31	64		-	-
A/G	34,04	32	32,65	32	1,065	0,559-2,027	0,960
G/G	5,32	5	2,04	2	2,697	ND	ND
<b>HWE</b>	<b>0,534</b>		<b>0,589</b>				

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Foi também analisada a distribuição das frequências alélicas e genóticas entre os pacientes que não apresentavam nefrite e os que apresentavam. Ambos os grupos de pacientes apresentaram as frequências de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 10).

O aumento da frequência do alelo *CYP1A1\*2C* apresentou uma associação com a ocorrência de nefrite, estatisticamente significativa (OR = 2,409; IC 95% 1,149 – 5,095;  $P = 0,018$ ), indicando que o alelo 4889G (\*2C) nesse estudo se apresenta como um fator de risco para o desenvolvimento de manifestações renais em pacientes com LES, o que pode levar a um quadro de agravamento da doença.

Tabela 10 – Comparação das freqüências dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *CYP1A1\*2C* (A,G) entre pacientes de LÊS com ou sem nefrite.

	<b>Pacientes com nefrite (%) n=36</b>	<b>Pacientes sem nefrite (%) n=51</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Portadores</b>					
A	91,67	94,12	<b>0,521</b>	<b>0,295 – 0,918</b>	<b>0,022</b>
G	52,77	29,41	<b>1,920</b>	<b>1,089 – 3,391</b>	<b>0,023</b>
<b>Alelos</b>					
A	69,40	84,31	<b>0,423</b>		
G	30,60	15,70	<b>2,409</b>	<b>1,149 – 5,095</b>	<b>0,018</b>
<b>Genótipos</b>					
A/A	47,22	70,59			
A/G	44,44	27,45	2,114	0,784 – 5,750	0,158
G/G	8,34	1,96	4,545	ND	ND
<b>HWE (P)</b>	<b>0,777</b>	<b>0,618</b>			

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### 6.3 – Análise do polimorfismo *CYP1A1\*4* (C4887A)

No estudo do polimorfismo *CYP1A1\*4* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) tanto os pacientes quanto os indivíduos controles. Na Tabela 11 encontram-se listadas as freqüências dos genótipos, dos alelos e dos portadores de cada alelo, encontradas para os pacientes e indivíduos controles.

Tabela 11 – Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *CYP1A\*4* (C, A) entre pacientes com LES e indivíduos controles.

	<b>Pacientes</b>		<b>Controles</b>		<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>			
<b>Portadores</b>							
C	97,91	93	96,94	101	<b>2,283</b>	<b>1,081-4,878</b>	<b>0,029</b>
A	13,54	13	30,61	34	<b>0,479</b>	<b>0,205-0,925</b>	<b>0,029</b>
<b>Alelos</b>							
C	92,19	-	83,16	-	2,39	-	-
A	7,81	-	16,84	-	0,418	0,155-1,104	0,084
<b>Genótipos</b>							
C/C	86,46	83	69,38	68	<b>2,817</b>	-	-
C/A	11,46	11	27,55	27	<b>0,440</b>	<b>0,147-0,778</b>	<b>0,009</b>
A/A	2,08	2	3,06	3	0,674	0,077-5,097	1,00
<b>HWE</b>	<b>0,393</b>						

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na análise de associação foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na presença do genótipo 4887C/A entre paciente e indivíduos controles (OR = 0,440; IC 95% 0,147– 0,778;  $P = 0,009$ ). Essa associação possui efeito protetor, pois a frequência de portadores do alelo 4887<sup>a</sup>(\*4) foi maior nos indivíduos do grupo controle em relação aos pacientes, indicando que nesse estudo, indivíduos portadores do alelo mutante possuem uma menor probabilidade de desenvolver o LES. Esse efeito protetor se manteve quando os pacientes foram estratificados em relação à nefrite, que é uma das conseqüências graves da doença.

Na análise da distribuição das freqüências dos alelos e dos genótipos entre os pacientes com ou sem nefrite (Tabela 12), tanto o grupo de grupo de pacientes que apresentava nefrite quanto os sem esse tipo de manifestação, verificou-se que a distribuição de suas freqüências genóticas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 12 – Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *CYP1A1*\*4 (C,A) entre pacientes de LES com ou sem nefrite.

	<b>Pacientes com nefrite (%) n=34</b>	<b>Pacientes sem nefrite (%) n=55</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Portadores</b>					
C	100	96,36	<b>3,113</b>	<b>1,09 – 9,146</b>	<b>0,028</b>
A	6,06	18,18	<b>0,321</b>	<b>0,109 – 0,901</b>	<b>0,028</b>
<b>Alelos</b>					
C	96,96	89,09	3,915	-	-
A	3,03	10,90	0,255	0,055 – 1,029	0,056
<b>Genótipos</b>					
C/C	93,94	81,82	3,44	-	-
C/A	6,06	14,55	0,379	0,052 – 2,137	0,386
A/A	0	3,36	0,319	ND	ND
<b>HWE (P)</b>	<b>0,856</b>	<b>0,061</b>			

$P$  = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na análise das freqüências alélicas e genóticas entre pacientes com ou sem

manifestação renal. Ocorreu uma associação significativa entre os portadores do alelo 4887A (\*4) como fator de proteção ao desenvolvimento de manifestações renais (OR=0,321, IC 95% 0,109 – 0,901,  $P= 0,028$ ).

#### 6.4 - Análise do polimorfismo *CYP1A1\*2A* (T6235C)

A distribuição das frequências genóticas dessa variante em relação aos pacientes não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. No grupo de indivíduos controles analisados, as frequências se mantiveram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não houve uma diferença significativa entre a distribuição das frequências alélicas e genóticas entre os pacientes e indivíduos controles (Tabela 13). A análise desse SNP não apresentou associação negativa nem positiva com o LES.

Tabela 13- Comparação das frequências dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *CYP1A1\*2A* entre pacientes com LES e indivíduos controles.

	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P
	%	n	%	n			
<b>Portadores</b>							
T	94,85	89	96,70	88	0,559	0,103-2,753	0,662
C	5,15	25	3,30	29	1,591	0,336-8,08	0,756
<b>Alelos</b>							
T	84,53	-	81,86	-	1,223	-	-
C	15,46	-	18,13	-	0,826	0,42-1,82	0,752
<b>Genótipos</b>							
TT	74,22	69	67,03	62	1,416	-	-
TC	20,61	20	29,67	26	0,616	0,301-1,412	0,207
CC	5,15	5	3,29	3	1,649	ND	ND
<b>HWE</b>	<b>0,001</b>		<b>0,989</b>				

$P$  = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na análise da distribuição das frequências entre os pacientes com ou sem nefrite (Tabela 14), o grupo dos pacientes com essa manifestação apresentou uma distribuição das frequências genóticas fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto o grupo de pacientes sem nefrite apresentou as frequências

de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weiberg. Esse desvio pode estar relacionado à estratificação da amostra que fez com que o número se tornasse reduzido, ou por problemas com a técnica de *RFLP*, mas o grupo de pacientes sem manifestações renais não apresentou esse desvio.

Nos cálculos de associação não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as freqüências genóticas e de portadores da variante em pacientes com ou sem manifestação renal. Foi encontrada uma diferença significativa nas freqüências alélicas entre os pacientes com ou sem manifestações renais (OR= 2,720, IC 95% 0,1,196 – 6,278,  $p = 0,0,15$ ), indicando uma maior freqüência do alelo 6235C (\*2A) em pacientes com manifestações renais em relação aos sem manifestações renais. Todos os indivíduos com o genótipo 6235C/C (\*2A/\*2A) apresentaram o desenvolvimento de nefrite, indicando um possível fator de risco para esse tipo de manifestação.

Tabela 14 - Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP CYP1A1\*2A (T,C) entre pacientes com e sem nefrite.

	<b>Pacientes com nefrite(%) n=33</b>	<b>Pacientes sem nefrite (%) n=53</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Portadores</b>					
T	84,85	100,00	0,528	0,278 – 1,002	0,050
C	36,36	22,64			
<b>Alelos</b>					
T	74,24	88,67	<b>0,368</b>	-	-
C	25,76	11,32	<b>2,270</b>	<b>1,196 - 6,278</b>	<b>0,015</b>
<b>Genótipos</b>					
TT	63,63	77,35	0,512	-	-
TC	21,21	22,64	0,920	0,282 – 2,952	1,00
CC	15,15	0	20,65	ND	ND
<b>HWE</b>	<b>0,010</b>	<b>0,351</b>			

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy Weinberg.

## 6.5 - Análise do polimorfismo *GSTM1*

Para esse polimorfismo foi assumido o equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois como a análise molecular realizada não diferencia os homozigotos positivos dos heterozigotos, para os cálculos de associação partiu-se da hipótese de que o grupo controle e o grupo de pacientes encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não houve uma diferença significativa entre a distribuição das freqüências entre os pacientes e indivíduos controles (Tabela 15). A análise desse SNP não apresentou associação negativa nem positiva com o LES.

Tabela 15 - Comparação das freqüências (%) dos alelos do *locus GSTM1* entre pacientes com LES e indivíduos controles.

<b>Genótipos</b>	<b>Pacientes</b>		<b>Controles</b>		<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>			
Positivo	55,31	52	50,93	55	-	-	-
Nulo	44,68	42	49,07	53	0,838	0,463- 1,519	0,631

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança

Na análise da distribuição das freqüências alélicas entre os pacientes com ou sem manifestação renal (Tabela 16) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ou sem nefrite (OR= 0,597, IC 95% 0,326 – 1,092,  $p = 0,098$ ).

Tabela 16 - Comparação das freqüências (%) dos alelos do *locus GSTM1* entre pacientes com e sem nefrite.

Genótipos	Pacientes		OR	IC 95%	P
	com nefrite (%) n=33	sem nefrite (%) n=52			
<b>Positivo</b>	62,50	50,0	-	-	-
<b>Nulo</b>	37,50	50,0	0,597	0,326 – 1,092	0,098

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança.

## 6.6 - Análise do polimorfismo *GSTT1*

Para esse polimorfismo foi assumido o equilíbrio de Hardy-Weinberg, pelas mesmas razões expostas no item 6.5 com relação ao gene *GSTM1*.

Não houve uma diferença significativa entre a distribuição das freqüências entre os pacientes e indivíduos controles (Tabela 17). A análise desse SNP não apresentou associação negativa nem positiva com o LES (OR= 0,442; IC 95% 0.160-1.190 ;  $P = 0.118$ ).

Tabela 17- Comparação das freqüências (%) dos alelos do *locus GSTT1* entre pacientes com LES e indivíduos controles.

Genótipos	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P
	(%)	n	(%)	n			
<b>Positivo</b>	92,39	85	84,31	86	-	-	-
<b>Nulo</b>	7,60	7	15,68	16	0,442	0.160-1.190	0.118

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança

Na análise da distribuição das freqüências alélicas e genotípicas entre os pacientes com ou sem manifestação renal (Tabela 18), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ou sem manifestação renal (OR= 1,155, IC 95% 0,362 –3,713,  $P = 1,00$ ).

Tabela 18 - Comparação das freqüências (%) dos alelos do *locus GSTT1* entre pacientes com e sem nefrite.

<b>Genótipos</b>	<b>Pacientes com nefrite (%) n=33</b>	<b>Pacientes sem nefrite (%) n=52</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Positivo</b>	91,18	92,15	-	-	-
<b>Nulo</b>	8,82	7,84	1.155	0,362 – 3,713	1,00

*P* = Probabilidade; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança

### 6.7 - Análise do polimorfismo IL18 -137

As freqüências genóticas do *IL18 -137* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes quanto nos indivíduos controles. Na Tabela 19 encontram-se listadas as freqüências dos genótipos e dos alelos obtidas para os pacientes e indivíduos controles.

Tabela 19 - Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *IL18 -137* (G, C) entre pacientes com LES e indivíduos controles.

	<b>Pacientes</b>		<b>Controles</b>		<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>			
<b>Portadores</b>							
-137G	90,32	83	91,30	85	0,946	0,537-1,665	0,945
-137C	39,78	37	38,04	36	1,057	0,601-1,861	0,945
<b>Alelos</b>							
-137G	75,27	-	76,63	-	1,165	-	-
-137C	24,73	-	23,37	-	1,077	0,536-2,166	0,953
<b>Genótipos</b>							
G/G	60,21	55	61,96	57	0,929	-	-
G/C	30,10	28	29,34	28	1,037	0,526-2,044	1,00
C/C	9,68	9	8,69	8	1,125	0,375 – 3,392	1,00
<b>HWE</b>	<b>0,221</b>		<b>0,085</b>				

*P* = Probabilidade; OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy Weinberg.

Não houve uma diferença significativa entre a distribuição das freqüências dos alelos entre os pacientes e os indivíduos controles. A análise desse SNP não apresentou associação negativa nem positiva com o LES.

Na análise da distribuição das freqüências dos alelos, dos genótipos e de portadores dos alelos, entre os pacientes com ou sem nefrite, (Tabela 20) o grupo



de pacientes com nefrite apresentou um desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências do grupo de pacientes sem nefrite se encontraram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 20 - Comparação das frequências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *IL18* -137 (G,C) entre pacientes com e sem nefrite.

	<b>Pacientes com nefrite (%) n=32</b>	<b>Pacientes sem nefrite (%) n=54</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Portadores</b>					
-137G	87,50	90,74	1,234	0,699 – 2,181	0,524
-137C	34,38	44,44	0,802	0,641 – 1,415	0,500
<b>Alelos</b>					
-137G	76,56	73,15	1,199		
-137C	23,44	26,85	0,834	0,419 – 1,660	0,694
<b>Genótipos</b>					
G/G	65,63	55,55	0,489		
G/C	21,88	35,19	0,516	0,166 – 1,559	0,291
C/C	12,50	9,26	1,400	ND	ND
<b>HWE</b>	<b>0,027</b>	<b>0,339</b>			

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy Weinberg.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com ou sem comprometimento renal.

### 6.8 - Análise do polimorfismo *IL18* -607

As frequências genóticas do *IL18* -607 não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes quanto nos indivíduos controles. Isso provavelmente se deve ao fato de que nesse polimorfismo, a frequência do genótipo heterozigoto é mais alta do que os dois homozigotos, não só nesse estudo, mas em outras populações estudadas também, provocando esse desvio. Na Tabela 21 encontram-se listadas as frequências dos genótipos, dos alelos e dos portadores dos alelos, encontradas para os pacientes e indivíduos controles.

Tabela 21- Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *IL18* -607 (C,A) entre pacientes com LES e indivíduos controles.

	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P
	(%)	n	(%)	n			
<b>Portadores</b>							
-607C	88,42	82	91,46	75	0,713	0,235-2,166	0,675
-607A	71,58	67	68,29	56	1,169	0,584-2,341	0,755
<b>Alelos</b>							
-607C	58,42	-	61,59	-	0,785	-	-
-607A	41,58	-	34,41	-	1,270	0,668-2,363	0,498
<b>Genótipos</b>							
C/C	28,42	26	31,71	29	0,855	-	-
C/A	60,00	56	59,76	49	1,01	0,529-1,930	1,00
A/A	11,58	11	8,54	7	1,403	0,473-4,257	0,675
<b>HWE</b>	<b>0,022</b>		<b>0,018</b>				

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy Weinberg.

Não houve uma diferença significativa entre a distribuição das freqüências dos alelos entre os paciente e indivíduos controles. A análise desse SNP não apresentou associação com o desenvolvimento do LES.

Foram também analisadas as freqüências dos alelos e dos genótipos em pacientes com ou sem manifestações renais para verificar se há associação com esse polimorfismo (Tabela 22). Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa.

Tanto o grupo de pacientes com nefrite, quanto os sem nefrite, estavam de acordo com o em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 22 - Comparação das frequências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *IL18* -607 (C,A) entre pacientes com e sem nefrite.

	<b>Pacientes nefrite (%) n=33</b>	<b>Pacientes sem nefrite (%) n=54</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Portadores</b>					
-607C	87,80	88,88	1,047	0,655-1,674	0,930
-607A	68,75	72,22	0,955	0,597-1,527	0,930
<b>Alelos</b>					
-607C	59,38	58,33	1,043		
-607A	40,63	41,67	0,959	0,523-1,758	1,000
<b>Genótipos</b>					
C/C	31,25	27,77	1,182		
C/A	56,25	61,11	0,818	0,307-2,181	0,823
A/A	12,50	11,11	1,143	ND	ND
<b>HWE</b>	<b>0,272</b>	<b>0,060</b>			

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy Weinberg.

### 6.9 - Análise do polimorfismo *PDCD1* 1.3

As frequências genotípicas do *PDCD1* 1.3 dos pacientes não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, nos indivíduos do grupo controle, as frequências se encontram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na Tabela 23 encontram-se listadas as frequências dos alelos e dos genótipos encontradas para os pacientes e indivíduos controles.

Tabela 23 - Comparação das freqüências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP *PDCD1* 1.3 (G,A) entre pacientes com LES e indivíduos controles.

	Pacientes		Controles		OR	IC 95%	P
	(%)	n	(%)	n			
<b>Portadores</b>							
1.3G	95,40	85	98,95	81	0,757	0,321-1,777	0,621
1.3A	16,09	15	12,63	12	1,321	0,563-3,120	0,621
<b>Alelos</b>							
1.3G	90,23	-	93,15	-	0,678	-	-
1.3A	9,77	-	6,84	-	1,475	0,484-4,557	0,621
<b>Genótipos</b>							
G/G	83,91	73	87,37	70	0,936	-	-
G/A	12,64	12	11,58	11	0,873	0,320-2,377	0,954
A/A	3,16	3	1,05	1	3,000	ND	ND
<b>HWE</b>	<b>0,009</b>		<b>0,319</b>				

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy Weinberg.

Não ocorreu uma diferença significativa entre a distribuição das freqüências alélicas entre os pacientes e indivíduos controles. Apesar do genótipo homocigoto para o alelo *PD1.3A* nos pacientes ter apresentado uma freqüência aumentada em relação ao grupo controle. Essa diferença não foi estatisticamente significativa possivelmente devido à baixa freqüência desse alelo, necessitando assim de um maior número amostral para detectar a associação. A análise desse SNP não apresentou associação negativa nem positiva com o LES.

Foram também analisadas as freqüências dos alelos e dos genótipos em pacientes com ou sem nefrite para verificar se há associação com esse polimorfismo (Tabela 24).

Entre os pacientes com nefrite, as freqüências apresentaram-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nos pacientes sem nefrite, as freqüências se apresentaram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Como o alelo *PD1.3A* possui uma baixa freqüência, com a estratificação da amostra pode ocorrer o desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 24 - Comparação das frequências (%) dos alelos, dos genótipos e dos portadores das variantes do SNP PDCD1 1.3 (G,A) entre pacientes com ou sem nefrite.

	Pacientes (%) n=30	Pacientes (%) n=51	OR	IC 95%	P
<b>Portadores</b>					
1.3G	100	94,12	1,454	0,632 – 3,366	0,447
1.3A	12,90	17,65	0,688	0,297 – 1,583	0,447
<b>Alelos</b>					
1.3G	93,55	88,24	1,933	-	-
1.3A	6,45	11,76	0,481	0,153 – 1,464	0,241
<b>Genótipos</b>					
G/G	87,10	82,35	1,531	-	-
G/A	12,90	11,76	1,111	ND	ND
A/A	0	5,88	0,258	0,00 – 4,889	0,705
<b>HWE</b>	<b>0,892</b>	<b>0,002</b>			

P = Probabilidade; OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; HWE = equilíbrio de Hardy Weinberg.

Estes resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Apesar de não ocorrer uma associação significativa, o genótipo *PD1.3A/A* ocorreu apenas nos indivíduos sem nefrite.

#### 6.10 - Análise das variantes relacionadas à susceptibilidade ao desenvolvimento de manifestações renais por regressão logística

Foi realizado um teste de regressão logística para cada um dos polimorfismos analisados, comparando os pacientes que apresentavam manifestações renais com os que não apresentavam. Como a amostra estratificada, reduz o tamanho e como consequência o poder de análise de associação, foi utilizado esse tipo de análise para complementar a análise bivariada.

Na Tabela 25 encontra-se apresentado o modelo teórico que melhor explicou a associação de algumas variantes analisadas com o desenvolvimento de manifestações renais no LES, utilizando-se o método condicional anterógrado. Foram obtidos os valores de 0,807 para o teste de *Hosmer and Lemeshow*. O modelo explicou, em média, 68% dos desfechos, explicando 85% dos com a

relação aos que não apresentavam manifestações e 40% dos com manifestações renais. Manteve associação significativa após análise multivariada, a presença do alelo *CYP1A1\*2C* (4889G), como fator de risco para o desenvolvimento de manifestações renais.

Tabela 25 - Modelo que melhor explicou o desfecho de polimorfismos relacionados à susceptibilidade ao desenvolvimento de nefrite, através do método de regressão logística.

<b>Polimorfismo</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<i>CYP1A1 4889G (*2C)</i>	0,009	3,645	1,39 – 9,58
<i>CYP1A1 4887A (*4)</i>	0,120	0,311	0,071 – 1,35
<i>GSTM1</i>	0,161	0,506	0,195 – 1,31
<i>IL18 -607</i>	0,529	1,430	0,470 – 4,41
<i>IL18 -137</i>	0,119	0,436	0,154 – 1,24
Constante	0,336	0,624	

*P* = Probabilidade; *OR* = *Odds Ratio*; *IC* = Intervalo de Confiança

Devido ao número de amostras reduzido após estratificação, a análise da combinação entre diferentes alelos na susceptibilidade ao desenvolvimento de manifestações renais não apresentou nenhuma significância (dados não demonstrados).

## 7 – Discussão

O Lupus Eritematoso Sistêmico é uma doença auto-imune multissistêmica, com um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas. Possui etiologia ainda não elucidada e compromete de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes, levando muitos a óbito. No Brasil, os dados estatísticos em relação a essa patologia e a outras doenças auto-imunes ainda são muito escassos, por isso a importância de se realizar estudos, a fim de se entender um pouco mais sobre a doença e como ela se comporta nessa população.

### 7.1 - Gene *CYP1A1*

A *CYP1A1* é uma enzima chave na fase I da biotransformação de xenobióticos. É responsável pelo primeiro passo na metabolização dos hidrocarbonetos poliaromáticos (aductos de DNA), assim como a participação no metabolismo de inúmeras substâncias endógenas como os hormônios esteróis, substâncias derivadas dos ecosanóides entre outras (MASSON *et al.*, 2005; NEBERT & DALTON, 2006). A importante interface entre sistema imunológico e hormonal já é bem estabelecida e parece ter um importante papel no desenvolvimento do LES.

A evidência mais marcante da participação hormonal no mecanismo imunopatológico do LES, vem principalmente das observações clínicas. A proporção de ocorrência da doença na proporção de 9 mulheres para um homem, a faixa etária de maior prevalência durante a idade reprodutiva e o aumento das

crises durante a gravidez apontam para um importante papel dos hormônios estrógenos no desenvolvimento do LES (GRIMALDI, 2006).

No presente estudo foram analisados três polimorfismos do gene *CYP1A1* (C4887A, A4889G e T6235C), que parecem alterar o metabolismo do estrógeno.

De acordo com uma meta-análise realizada por Masson *et al.* (2005), a frequência genotípica de indivíduos homocigotos para o alelo 6235T (*CYP1A1\*2A*) é de 13% entre asiáticos, 1% em europeus e 6% em americanos afro-descendentes. Para o alelo 4889G (*CYP1A1\*2C*) é de 5% em asiáticos, 0,7% em caucasóides e é ausente em americanos afro-descendentes, sendo que em alguns estudos foram encontradas frequências de até 3% em europeus. Existem menos estudos em relação às frequências do alelo 4887A (*CYP1A1\*4*), mas na meta-análise de Masson *et al.* (2005) foi encontrado o valor de 0,2% em europeus. Em um estudo com a população brasileira do Rio de Janeiro, foi encontrada uma frequência de 5% em euro-brasileiros e 1% em indivíduos afro-brasileiros (AMORIM *et al.*, 2004).

Para o alelo 4889G (*CYP1A1\*2C*), em relação aos nossos dados não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa em relação a susceptibilidade ao desenvolvimento do LES.

Verificamos que o alelo 4889G (*CYP1A1\*2C*) se apresentou como um fator de risco estatisticamente significativo no desenvolvimento de nefrite. Essa significância obtida na análise bivariada foi confirmada pela realização da análise multivariada através de regressão logística, que demonstrou uma significância ainda maior. Para confirmação desses dados torna-se necessária a ampliação da amostra para verificar o real papel desses SNPs na susceptibilidade ao desenvolvimento de nefrite no LES.



Também foi observado que as freqüências encontradas para o alelo mutante 4889G (*CYP1A1\*2C*) nos indivíduos controles no presente estudo foram maiores do que as descritas na literatura (AMORIN *et al.*, 2004; MASSON *et al.*, 2005). Mas um estudo realizado na população brasileira com três populações afro-brasileiras e uma população de euro-brasileiros também detectou uma alta freqüência (11% em descendentes de europeus e 12-15% em afro-descendentes) do alelo 4889G (*CYP1A1\*2C*) nos grupos analisados (GASPAR *et al.*, 2002). Essa diferença nas freqüências provavelmente ocorre devido a grande complexidade étnica da população brasileira.

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre o desenvolvimento do LES e a presença do alelo 6235C (*CYP1A1\*2A*) nesse estudo. Em relação à nefrite, nossos dados demonstram um aumento na freqüência desse alelo nos indivíduos com manifestação renal em relação aos indivíduos sem manifestação renal.

Alguns trabalhos na literatura indicam um desequilíbrio de ligação entre os alelos 6235T (*CYP1A1\*2A*) e 4889G (*CYP1A1\*2C*) (MASSON *et al.*, 2005). Von Schmiedeberg (1999), em um estudo com pacientes da população alemã encontrou uma associação entre a presença do alelo 4889G (*CYP1A1\*2C*) e o desenvolvimento do LES, mas não encontrou associação com o alelo 6235C (*CYP1A1\*2A*).

Em relação ao alelo 4887A (*CYP1A1\*4*) foi verificada uma associação de proteção ao desenvolvimento do LES. Ao contrário dos outros dois alelos estudados, essa variante foi descrita como não estando em desequilíbrio de ligação com os mesmos (MASSON *et al.*, 2005). Em relação às manifestações renais, um estudo realizado por YEN *et al.*, 2003, relatou uma associação entre o

genótipo 4887C/A como fator de risco para o desenvolvimento do LES e pacientes com a presença do alelo 4887A (*CYP1A1\*4*) apresentam maior prevalência de manifestações renais, na população de Taiwan. A contradição entre esses resultados e os obtidos no presente estudo, pode ocorrer devido às diferenças étnicas entre as duas populações ou também ao fato de o grupo controle do estudo com a população em Taiwan apresentar um desvio em relação ao equilíbrio de HW.

Quando analisado o comprometimento renal, esse estudo demonstrou uma maior frequência de portadores do alelo 4887A (*CYP1A1\*4*) nos pacientes que não apresentaram nefrite em relação aos que apresentaram, confirmando a tendência de proteção desse alelo encontrada na análise de associação com a doença.

Em relação ao papel funcional dessas variante, estudos com o polimorfismo 6235C (*CYP1A1\*2A*) da expressão basal ou induzida de RNAm em linfócitos e na placenta obtiveram resultados inconsistentes (COSMA *et al.*, 1993; LANDI *et al.*, 1994; GARTA *et al.*, 2003). Para o polimorfismo 4889G (*CYP1A1\*2C*) um estudo encontrou níveis aumentados de RNAm associados a essa variante (CROFTS *et al.*, 1994). Em outro estudo, a presença de ambos os alelos permitiu um aumento de até duas vezes a expressão basal do gene (TAIOLI *et al.*, 1999). Em relação alelo 4887A (*CYP1A1\*4*), um trabalho encontrou associação, com a mudança na atividade da enzima (GARTA *et al.*, 2003). Mas segundo Schwarz *et al.*, (2001), esse polimorfismo fez com que a enzima apresentasse diferentes propriedades cinéticas e uma maior atividade em relação ao metabolismo de benzo- -pirenos. Outros trabalhos relataram que esse alelo possui uma menor atividade em relação ao metabolismo da progesterona,

hormônio que parece ter um papel na imunopatologia do LES (CROFTS, *et al.*, 1994; MITRUNEN & HIRVONEN, 2003). Além disso, a enzima CYP1A1 também é responsável pela inativação da prostaglandina G<sub>2</sub> e essas substâncias também parecem ter um papel importante no processo auto-imune (NERBERT & RUSSELL, 2002).

Como os estudos funcionais ainda são controversos, mais pesquisas são necessárias para se determinar ao certo o papel dessas variantes na atividade da enzima. Possivelmente a mudança na atividade das enzimas que possuem variação seja dependente do substrato que esteja sendo metabolizado. Tanto o SNP 4889G (*CYP1A1\*2C*) quanto o 4887A (*CYP1A1\*4*) estão localizados no sítio de ligação com o grupamento heme (sítio ativo da molécula) e parecem ter uma tendência a aumentar a atividade enzimática. Com o aumento da atividade dessa enzima, talvez possa ocorrer um aumento na quantidade de espécies reativas causando um aumento de lesões celulares e na produção de auto-anticorpos contra antígenos nucleares. Esses polimorfismos também podem influenciar na regulação hormonal (YEN *et al.*, 2003) que influi diretamente na regulação da resposta imunológica e no desenvolvimento da doença. Apesar dos dados clínicos demonstrarem o importante papel hormonal no LES, poucos estudos foram realizados no sentido de elucidar esse mecanismo. A associação dos polimorfismos do gene *CYP1A1* com a doença e com as manifestações renais é mais um fator que demonstra a importância dessas substâncias no processo auto-imune. E talvez possam ser no futuro utilizados como possíveis marcadores de diagnóstico e prognóstico para essa patologia.

## 7.2 - Genes *GSTM1* e *GSTT1*

As enzimas da família das glutathionas transferases catalisam a conjugação da glutathione (tripeptídeo que consiste em glicina, ácido glutâmico e cisteína) a compostos eletrofílicos, resultando em espécies menos reativas e mais facilmente excretáveis. Os substratos das reações catalisadas por essas enzimas incluem pré-carcinógenos e espécies reativas de oxigênio que podem causar diversos efeitos no organismo (ROSSINI *et al.*, 2002).

Um possível papel da relação de diversas doenças como câncer, asma, artrite reumatóide entre outras, e ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* vem sendo amplamente estudada. Na população brasileira existem poucos trabalhos publicados em relação a esses polimorfismos, sendo que a maioria relacionada ao desenvolvimento de câncer.

Um estudo realizado com a população brasileira por Rossini *et al.*, 2002, encontrou uma frequência de 42,1% de indivíduos homocigotos para a deleção do gene *GSTM1*. Para o gene *GSTT1*, a frequência de indivíduos homocigotos para a deleção foi de 25,4%. Em outro estudo realizado com as populações de São Paulo e Bahia, foram encontradas as frequências para o alelo *GSTM1* nulo de 55,4% em euro-brasileiros, 41,4% em mestiços e 32,8% em afro-brasileiros. Para o alelo nulo do gene *GSTT1* foram encontradas as frequências de 23,8% em euro-brasileiros, 17,2% em mestiços e 26,3% em afro-brasileiros (GATTÁS *et al.*, 2004).

Essas enzimas possuem um papel chave na detoxificação biológica. O gene *GSTT1* é altamente conservado evolutivamente e possui papel crucial na fase II da biotransformação de diversos fármacos e substâncias químicas. Já o *GSTM1* está relacionado principalmente a inativação de intermediários

carcinogênicos de hidrocarbonetos poliaromáticos. Essas moléculas também possuem participação no metabolismo do estrógeno. Diversas linhas de pesquisa também apontam o papel desses genes na desativação de espécies reativas de oxigênio, que parecem estar envolvidos em processos celulares como a inflamação (BOLT & THIER, 2006).

Kang *et al.* (2005), realizou uma análise desses polimorfismos em pacientes com LES na população coreana. Nessa análise não foi encontrada associação com o desenvolvimento do LES, mas apenas uma associação com o perfil de auto-anticorpos. No presente estudo, também não foi encontrada nenhuma associação com o desenvolvimento da doença. Entretanto a freqüência de *GSTT1* nulo está aumentada nos indivíduos controles (15,68%), em relação aos pacientes (7,60%). Com o aumento da amostra, talvez esse efeito protetor possa vir a se confirmar.

Em relação à análise de pacientes com nefrite, também não foi encontrada nenhuma associação significativa. Nesse caso a ausência do gene *GSTM1* apareceu com mais freqüência nos indivíduos sem manifestações renais (50%), em relação aos pacientes com comprometimento renal (37,50%). Como a amostra foi estratificada o com número um pouco reduzido, não foi possível obter significância estatística, mas sinaliza um possível efeito protetor a ausência desse gene.

Apesar de existirem indicações da importância dessas enzimas no processo auto-imune, o mecanismo exato em relação a esse papel ainda não se encontra muito bem esclarecido e mais estudos em diferentes populações necessitam ser realizados.

### 7.3 - Gene *IL18*

A IL-18 é uma citocina pertencente à família da IL-1, que possui importante papel como molécula imunomoduladora. Apesar de o LES ser uma patologia com excesso de resposta Th2, estudos recentes demonstram níveis elevados de IL-18 em algumas doenças auto-imunes inclusive no LES, demonstrando que ambas as citocinas de resposta Th1 quanto Th2 podem estar elevadas nesses pacientes (PARK *et al.*, 2004; CALVANI *et al.*, 2005). Isso indica a complexidade dos fatores imunopatológicos envolvidos no LES e a diversidade de manifestações clínicas existentes. Além disso, a IL-18 tem a propriedade de induzir a polarização Th1 ou Th2, dependendo do contexto estimulatório (NAKANISHI *et al.*, 2001).

Não existem ainda descritos na literatura estudos de associação dos polimorfismos descritos no gene *IL18* e o desenvolvimento do LES. Mas alguns estudos com artrite reumatóide, enterocolite necrosante, sarcoidose demonstram um papel importante desses polimorfismos em relação às doenças auto-imunes. Foi relatada uma menor taxa de transcrição do gene na presença dos alelos mutantes *IL18 -137C* e *IL18 -607A* (CARDOSO *et al.*, 2004). Assim a presença desses alelos poderia ser um fator de proteção em relação às doenças auto-imunes, em que os níveis de IL-18 encontram-se aumentados.

Um estudo realizado com a população caso-controle realizado com a população espanhola para verificar associação desses alelos com o desenvolvimento de artrite reumatóide detectou uma freqüência do alelo *IL18 -607A* de 38,8% e para o alelo *IL18 -137C*, a freqüência encontrada foi de 27% (RUEDA *et al.*, 2005). Essas freqüências encontram-se similares as obtidas no presente estudo. Sendo que as freqüências genotípicas também sofreram desvio

em relação ao equilíbrio de HW, pois a frequência de heterozigotos para o SNP - 607 nesse gene é aumentada e isso se reproduz em diversas análises (GIEDRAITIS *et al.*, 2001; SIVALINGAM, *et al.*, 2003; JANSSEN *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005).

Nesse estudo foram analisadas as frequências dos dois alelos mais estudados nesse gene: *IL18* -137 e *IL18* -607. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a presença dos mesmos e o desenvolvimento do LES. Na análise multivariada dos pacientes com nefrite ocorreu uma tendência à proteção em relação ao alelo mutante, mas como a amostra ainda é reduzida, não foi significativa.

#### **7.4 - Gene *PDCD1***

A proteína PD-1 é um imunoreceptor de membrana responsável pelos sinais inibitórios em relação à ativação de linfócitos e por isso essencial para a manutenção da tolerância imunológica, pois evita a ativação descontrolada de células auto-reativas (ALARCÓN-RIQUELME, 2006).

Em estudo realizado com famílias de origem nórdica, empregando uma gama de 340 microsátélites espalhados pelo genoma humano, foi identificado um locus no cromossomo 2q37.3 que foi denominado, *SLEB2*, que se encontrava em forte associação com o desenvolvimento do LES (MAGNUSSON *et al.*, 2000). Através da análise de diversos SNPs nessa região, se chegou ao gene *PDCD1* como candidato a associação como LES. Essa associação foi confirmada em um estudo realizado por Prokunina *et al.*, (2002), que encontrou uma relação entre uma substituição G → A (PD-1.3) na posição +7146, no intron 4 do gene em uma população da Suécia. Essa associação foi confirmada em também com uma população americana de origem mexicana e americanos de origem europeia.

Alguns trabalhos também demonstraram uma associação desse gene com o desenvolvimento de manifestações renais não LES (JOHANSSON *et al.*, 2005). Apesar desse SNP se encontrar em uma região intrônica, foi demonstrado experimentalmente que esse alelo encontra-se posicionado no sítio de ligação com o fator de transcrição RUNX1. A seqüência desse intron, possui pelo menos quatro repetições ricas em conteúdo GC que podem ser importantes para ligações também com outros fatores de transcrição como NF B, por exemplo (PROKUNINA *et al.*, 2002). Assim, essa variação pode alterar a atividade da molécula, podendo aumentar a susceptibilidade a auto-imunidade.

Na população brasileira, um estudo realizado por Braun-Prado (2006), obteve a freqüência do alelo *PD1.3A* de 10% em indivíduos euro-brasileiros e de 6% em indivíduos afro-brasileiros. A freqüência desse alelo obtida para os indivíduos controles no presente estudo foi de 6,84% e 9,77% para os pacientes.

Não foi encontrada nenhuma associação entre a variante do SNP *PD-1.3* e o desenvolvimento de LES na população analisada no presente estudo, apesar da literatura relatar uma associação desse alelo com o desenvolvimento da doença. Como essa variante possui uma freqüência extremamente baixa essa associação talvez possa não ter sido detectada devido ao tamanho amostral insuficiente.

Apesar de não ter ocorrido significância estatística, a freqüência do genótipo AA da variante +7146 (*PD-1.3*) foi maior em pacientes sem nefrite em relação aos pacientes com nefrite.



## 8 – Conclusões

Neste trabalho foi descrito pela primeira vez um estudo de associação caso-controle para LES em uma população do sul do Brasil.

A freqüência de nefrite encontrada nos pacientes analisados foi de 39%, estando de acordo com os dados encontrados na literatura.

Foi observada ausência de associação entre a ausência dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e o desenvolvimento do LES e ou de nefrite.

Foi observada ausência de associação entre os alelos *IL18 -137C*, *IL18-607A* e o desenvolvimento do LES e ou nefrite.

Foi detectada associação negativa (proteção) do alelo 4887A (*CYP1A1\*4*) com o LES, sendo a OR = 0,355, IC 95% 0,161-0,774,  $p=0,008$ .

Foi detectada associação negativa (proteção) dos portadores do alelo 4887A (*CYP1A1\*4*) com o desenvolvimento de nefrite, sendo OR = 0,321, IC 95% 0,109-0,901,  $p=0,028$ .

Foi detectada associação positiva (fator de risco) do alelo 6235C (*CYP1A1\*2A*), com o desenvolvimento de nefrite, sendo OR = 2,270, IC 95% 1,196 - 6,278,  $p=0,015$ .

Foi detectada associação positiva (fator de risco) do alelo 4889G (*CYP1A1\*2C*) com o desenvolvimento da nefrite no LES, sendo OR = 3,645, IC 95% 1,39 -9,58,  $p=0,009$ .

Foi observada associação negativa (não estatisticamente significativa) entre o genótipo +7146AA (PD1.3AA) e o desenvolvimento de nefrite em pacientes com LES.

## Referências Bibliográficas

ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R. A.; ANWAR, W. A.; AU, W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Letters**, v.107, n.2, p.229-233, 1996.

ADLER, V.; YIN, Z.; FUCHS, S. Y.; BEZERRA, M.; ROSARIO, L.; TEW, K. D.; PINCUS, M. R.; SARDANA, M.; HENDERSON, C. J.; WOLF, C.R.; DAVIS, R.J.; RONAI, Z. Regulation of JNK signaling pathway by GSTPp. **EMBO**, v.18, p.1321-1334, 1999.

AGATA, Y.; KAWASAKI, A.; NISHIMURA, H.; ISHIDA, Y.; TSUBATA, T.; YAGITA, H.; HONJO, T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. **International Immunology**, v.8, p.765-772, 1996.

ASKANASE, A. D. Estrogen therapy in systemic lupus erythematosus. **Treatments in Endocrinology**, v.3, n.1, p.19-26, 2004.

BAECHLER, E. C.; BATLIWALLA, F. M.; KARYPIS, G.; GAFFNEY, P. M.; ORTMANN, W. A.; ESPE, K. J.; SHARK, K. B.; GRANDE, W. J.; HUGHES, K. M.; KAPUR, V.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.100, p.2610-2616, 2003.

BAE, S. C.; KIM, S. J.; SUNG, M. K. Impaired antioxidant status and decreased dietary intake of antioxidants in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology International**, v.22, n.6, p.238-243, 2002.

BAILEY, L. R.; ROODI, N.; VERRIER, C. S.; YEE, C. S.; DUPONT, W. D.; PARL, F. F. Breast cancer risk and *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms: evidence of lack of association in Caucasians and African Americans. **Cancer Research**, v.58, p.65-70, 1998.

BENNETT, L.; PALUCKA, A. K.; ARCE, E.; CANTRELL, V.; BORVAK, J.; BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. **Journal of Experimental Medicine**, v.197, n.6, p.711-723, 2003.

BIET, F.; LOCHT, C.; KREMER, L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. **Journal of Molecular Medicine**, v.80, n.3, p.147-162, 2002.

BLOUNT, S.; GRIFFITHS, H. R.; LUNEC, J. Reactive oxygen species induce antigenic changes in DNA. **FEBS Letters**, v.245, p.100-104, 1989.

BOLT, H. M.; THEIR, R. Relevance of the deletion polymorphisms of glutathione S-transferase *GSTT1* and *GSTM1* in pharmacology and toxicology. **Current Drug Metabolism**, v.7, n.6, p.613 – 628, 2006.

BOSSU, P.; NEUMANN, D.; DEL GIUDICE, E.; CIARAMELLA, A.; GLOUGUEN, I.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A.; DI CARLO, E.; MUSIANI, P.; MERONI, P. L.; CASELLI, G.; RUGGIERO, P.; BORASCHI, D. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.100, p.14181-14186, 2003.

BOYAPATI, S. M.; SHU, X. O.; GAO, Y. T.; CAI, Q.; JIN, F.; ZHENG, W. Polymorphisms in CYP1A1 and breast carcinoma risk in a population-based case-control study of Chinese women. **Cancer**, v.103, n.11, p.2228-2235, 2005.

BRAUN-PRADO, K.; **Estudo do polimorfismo dos genes IL4, IL13 e PDCD1 e investigação de possíveis interações gênicas no pênfigo foliáceo endêmico.** Curitiba 2006. Tese (Doutorado em genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

BYNOE, M. S.; GRIMALDI, C. M.; DIAMOND, B.; Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naïve B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.97, p.2703-2708, 2000.

CALVANI, N. RICHARDS, H. B.; TUCCI, M.; PANNARALE, G.; SILVESTRIS, F. Up-regulation of IL-18 and predominance of a Th-1 immune response is a hallmark of lupus nephritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.138, p.171-178, 2004.

CARDOSO, S. M.; DEFOR, T. E.; TILLEY, L. A.; BIDWELL, J. L.; WEISDORF, D. J.; MACMILLAN, M. L. Patient interleukin-18 GCG haplotype associates with improved survival and decreased transplant-related mortality after unrelated-donor bone marrow transplantation. **British Journal of Haematology**, v.126, n.5, p.704-710, 2004.

CARRENO, B.M.; COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.29-53, 2002.

CARTER, L; FOUSSER, L.; JUSSIF, J.; FITZ, L.; DENG, B.; WOOD, C.; COLLINS, M.; HONJO, T.; FREEMAN, G.; CARRENO, B. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. **European Journal of Immunology**, v.32, p.634-643, 2002.

CARTENSEN, U.; ALEXANDRIE, A. K; HÖGSTEDT, B.; RANNUG, A.; BRATT, I.; HAGMAR, L. B – and T lymphocyte micronuclei in chimney sweeps with respects to genetic polymorphism for *CYP1A1* and *GST1* (class Mu). **Mutation Research**, n. 289, p. 187-195, 1993.

CASCORBI, I.; BROCKMÖLLER, J.; ROOTS, I. A C4887A Polymorphis in exon 7 of Human *CYP1A1*: Population Frequency, Mutation Linkages, and Impact of Lung Cancer Susceptibility. **Cancer Research**, v. 56, p. 4965-4969, 1996.

CERVERA, R.; KHAMASHTA, M. A.; FONT, J.; SEBASTIANI, G. D.; GIL, A.; LAVILLA, P.; DOMENECH, I.; AYDINTUG, A. O.; JEDRYKA-GORAL, A.; DE RAMON, E. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. **Medicine**, v.72, n.2, p.113-124, 1993.

COMSTOCK, G. W.; BURKE, A. E.; HOFFMAN, S. C.; HELZLSOUER, K. J.; BENDICH, A.; MASI, A. T.; NORKUS, E. P.; MALAMET, R. L.; GERSHWIN, M. E. Serum concentrations of alpha tocopherol, beta carotene, and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Annals of Rheumatic Diseases**, v.56, n.5, p.323-325, 1997.

COSMA, G; CROFTS, F.; CURRIE, D.; WIRGIN, I.; TONIOLO, P.; GARTE, S. J.; Racial differences in restriction fragment length polymorphisms and messenger RNA inducibility of the human *CYP1A1* gene. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.2,p.53-57, 1993.

CROFTS, F.; TAIOLI, E.; TRACHMAN, J.; COSMA, G. N.; CURRIE, D.; TONIOLO, P.; GARTE, S. J. Funcional significance of different human *CYP1A1* genotypes. **Carcinogenesis**, v.15, p.2961-2963, 1994.

CROKER, J. A.; KIMBERY, R.P. Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. **Current Opinion in Rheumatology**, v.17, p.529-537, 2005.

CSISZÁR, A.; NAGY, G. Y.; GERGELY, P.; POZSONYI, T.; PÓCSIK, E. Increased interferon-gamma, IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Immunology**, v.122, p.464-470, 2000.

DAVIDSON, A.; ARANOW, C. Pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v.15, n.5, p.468-475, 2006.

DEAN, G. S.; TYRRELL-PRICE, J.; CRAWLEY, E.; ISENBERG, D. A. Cytokines and systemic lupus erythematosus. **Annals of Rheumatic Diseases**, v.59, p.243-251, 2000.

EMLLEN, W.; NIEBUR, J.; KADERA, R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Immunology**, v.152, n.7, p.3685-3692, 1994.

ERLICH, H. A. HIA-DQ alpha typing of forensic specimens. **Forensic Science International**, v.53, n.2, p.227-228, 1992.

EVANS, M. J.; MACLAUGHLIN, S.; MARVIN, R. D.; ABDOU, N. I. Estrogen decreases in vitro apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from woman with normal menstrual cycles and decreases TNF-alpha production in SLE but not in normal cultures. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.82, n.3, p.258-262, 1997.

FERREIROS-VIDAL, I.; GOMEZ-REINO, J.J.; BARROS, F.; CARRACEDO, A.; CARREIRA, P.; GONZALEZ-ESCRIBANO, F.; LIZ, M.; MARTIN, J.; ORDI, J.; VICARIO, J.L.; GONZALEZ, A. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v.50, n.8, p.2590-2597, 2004.

FORMIGA, F.; MOGA, I.; PAC, M.; MITJAVILA, F.; RIVERA, A.; PUJOL, R. Mild presentation of systemic lupus erythematosus in elderly patients assessed by SLEDAI. SLE Disease Activity Index. **Lupus**, v.8, n.6, p.462-465, 1999.

FREEMAN, G.J.; LONG, A. J.; IWAI, Y.; BOURQUE, K; CHERNOVA, T.; NISHIMURA, H.; FITZ, L. J.; MALENKOVICH, N.; OKAZAKI, T.; BYRNE, M. C.; Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **Journal of Experimental Medicine**, v.192, 1027-1034, 2000.

FRENCH, M. A.; HUGHES, P. Systemic lupus erythematosus and Klinefelter's syndrome. **Annals of Rheumatic Diseases**, v.42, p.471-473, 1983.

FUKUDA, Y.; SASSA, S. Suppression of cytochrome P450 by interleukin-6 in human HepG2 hepatoma cells. **Biochemistry and Pharmacology**, v.47, p.1187-1194, 1994.

GARCIA-CLOSAS, M., KELSEY, K. T., HANKINSON, S. E., SPIEGELMAN, D., SPRINGER, K., WILLETT, W. C., SPEIZER, F. E., HUNTER, D. J. Glutathione S-Transferase Mu and Theta Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 22, p.1960 – 1964, 1999.

GARTA, S.; GANGULY, S.; TAIOLI, E. Effect of genotype on steady-state CYP1A1 gene expression in human peripheral lymphocytes. **Biochemical Pharmacology**, v.65, p.441-445, 2003.

GASPAR, P. A.; KVITKO, K.; PAPADOPOLIS, L. G.; HUTZ, M. H.; WEIMER, T. A. High frequency of CYP1A1\*2C allele in Brazilian populations. **Human Biology**, v.74, n.2, p.235-242, 2002.

GATTÁS, G. J. F.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J. A.; SIRAQUE, M. S.; KOHLER, P.; GOMES, L.; REGO, M. A. V.; BYDLOWSKI, S. P. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.37, p.451-458, 2004.

GIEDRAITIS, V.; HE, B.; HUANG, W. X.; HILLERT, J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. **Journal of Neuroimmunology**, v.112, p.146-152, 2001.

GOTA, C.; CALABRESE, L. Induction of clinical autoimmune disease by therapeutic interferon- $\gamma$ . **Autoimmunity**, v.36, p.511-518, 2003.

GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune diseases – disorders of immune homeostasis. **Nature Reviews Genetics**, v.7, n.12, p.917-928, 2006.

GREWAL, I. S.; FLAVEL, R. A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. **Annual Reviews Immunology**, v.16, p.111-135, 1998.

GRIMALDI, M. C. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. **Current Opinion in Rheumatology**, v.18, p.456-461, 2006.

GUBALLA, N.; SAMMARITANO, L.; SCHWARTZMAN, S.; BUYON, J.; LOCKSHIN, M.D. Ovulation induction and in vitro fertilization in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. **Arthritis and Rheumatism**, v.43, p.550-556, 2000.

GUTCHER, I.; URICH, E.; WOLTER, K.; PRINZ, M.; BECHER, B. Interleukin 18-independent engagement of interleukin 18 receptor-alpha is required for autoimmune inflammation. **Nature Immunology**, v.7, n.9, p.946-953, 2006.

GUDMUNSDOTTIR, K.; TRYGGVADOTTIR, L.; EYFJORD, J. E. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene. **Cancer Biomarkers and Prevention**, v.10, n.11, p.1169-1173, 2001.

HARLEY, J. B.; KELLY, J. A.; KAUFMAN, K. M. Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. **Seminars in immunopathology**, v.28, p.119-130, 2006.

HAYASHI, S.; WATANABE, J.; NAKACHI, K.; KAWAJIRI, K. Genetic linkage of lung cancer-associated *MspI* polymorphisms with amino acid replacement in heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. **Journal of Biochemistry**, v.110, p.407-411, 1991.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferases supergene family: regulation of GST and the contribution of isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.445-600, 1995.

HAYES, J. D.; STRANGE, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, v.61; p.154-166, 2000.

HENINGER, E.; TRESZL, A.; KOCSIS, I.; DERFALVI, B.; TULASSAY, T.; VASARHELYI, B. Genetic variants of the interleukin-18 promoter region (-607) influence the course of necrotising enterocolitis in very low birth weight neonates. **European Journal of Pediatrics**, v.161, n.7, p.410-411, 2002.

HOCHBERG, M. C. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In Wallace D J., Hahn BH (eds).

ISHIDA, Y.; AGATA, Y.; SHIBAHARA, K.; HONJO, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO**, v.11, p.3887-3895, 1992.

JOHANSSON, M.; ARLESTIG, L.; MOLLER, B.; RANTAPAA-DAHLQVIST, S. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v.52, n.6, p.1665-1669, 2005.



JANSSEN, R.; GRUTTERS, J. C.; RUVEN, H. J.; ZANEN, P.; SATO, H.; WELSH, K. I.; DU BOIS, R. M.; VAN DEN BOSCH, J. M. No association between interleukin-18 gene polymorphisms and haplotypes in Dutch sarcoidosis patients. **Tissue Antigens**, v.63, n.6, p.578-583, 2004.

JUNGERS, P.; DOUGADOS, M.; PELISSIER, C. ; KUTTENN, F. ; TRON, F.; LESAVRE, P. ; BACH, J. F. Influence of oral contraceptive therapy on the activity of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v.25, p.454-457, 1982.

KANDA, N.; TAMAKI, K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.103, p.282-288, 1999.

KANG, T-Y.; SOHEMY, A. E. ; CORNELIS, M. C. ; ENY, K. M. ; BAE, S-C. Glutathione S-transferase genotype and risk of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.14, p.381-384, 2005.

KAWAJARI, K.; NAKACHI, K; IMAI, K.; YOSHII, A.; SHONIDA, N.; WATANABE, J. Identification of genetically high risk individual to lung câncer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. **FEBS Letters**, v.263, p.131-133, 1990.

KONG, E. K.; PROKUNINA-OLSSON, L.; WONG, W. H.; LAU, C. S.; CHAN, T. M.; ALARCON-RIQUELME, M.; LAU, Y.L. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. **Arthritis and Rheumatism**, v.52, n.4, p.1058-1062, 2005.

KRETOWSKI, A.; MIRONCZUK, K.; KARPINSKA, A.; BOJARYN, U.; KINALSKI, M.; PUCHALSKI, Z.; KINALSKA, I. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. **Diabetes**, v.51, n.11, p.3347-3349, 2002.

KRISHNAN, S.; CHOWDHURY, B.; TSOKOS, G. C. Autoimmunity in systemic lupus erythematosus: Integrating genes and biology. **Seminars in Immunology**, v.18, p.230-243, 2006.

LAHITA, R. G.; BRADLOW, H. L.; GINZLER, E.; PANG, S.; NEW, M. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v.30, p.241-248, 1987.

LAHITA, R. G.; BRADLOW, H. L. Klinefelter's syndrome: hormone metabolism in hypogonadal males with systemic lupus erythematosus. **Journal of Rheumatology**, v.14, p.154-157, 1987.

LANDI, M. T.; BERTAZZI, P. A.; SHIELDS, P. G.; CLARK, G.; LUCIER, G. W.; GARTE, S. J.; COSMA, G.; CAPORASO, N. E. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. **Pharmacogenetics**, v.4, p.242-246, 1994.

LATCHMAN, Y.; WOOD, C. R.; CHERNOVA, T.; CHAUDHARY, D.; BORDE, M.; CHERNOVA, I.; IWAI, Y.; LONG, A. J.; BROWN, J. A.; NUNES, R. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nature Immunology**, v.2, p.261-268, 2001.

LAUWERYS, B. R.; WAKELAND, E. K. Genetics of lupus nephritis. **Lupus**, v.14, p.2-12, 2005.

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell co-stimulation. **Annual Reviews Immunology**, v.14, p.233-258, 1996.

LI, X.; RIDER, V.; KIMLER, B. F.; ABDOU, N. I. Estrogen does not regulate CD154 mRNA stability in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.15, p.852-857, 2006.

LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; MCINNES, I. B. Role of interleukin 18 in rheumatoid arthritis. **Annals of Rheumatic Diseases**, v.63, p.48-50, 2003.

LIOSSIS, S. N.; KOVACS, B.; DENNIS, G.; KAMMER, G. M.; TSOKOS, G. C. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. **Journal of Clinical Investigation**, v.98, p.2549-2557, 1996.

LIPSKY, P. E. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. **Nature Immunology**, v.2, n.9, p.764-766, 2001.

LIZARD-NACOL, S., COUDERT, B., COLOSETTI, P., RIEDINGER, J.-M., FARGEOT, P., BRUNET-LECOMTE, P. Glutathione S-Transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. **Breast Cancer Research**, v.1, n.1, p.81 – 87, 1999.

MAGNUSSON, V.; LINDQVIST, A. K.; CASTILLEJO-LOPEZ, C.; KRISTJANSDDOTTIR, H.; STEINSSON, K.; GRONDAL, G.; STURFELT, G.; TRUEDSSON, L.; SVENUNGSSON, E.; LUNDBERG, I.; GUNNARSSON, I.; BOLSTAD, A. I.; HAGA, H. J.; JONSSON, R.; KLARESKOG, L.; ALCOCER-VARELA, J.; ALARCON-SEGOVIA, D.; TERWILLIGER, J. D.; GYLLENSTEN, U. B.; ALARCON-RIQUELME, M. E. Fine mapping of the SLEB2 locus involved in susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Genomics**, v.70, n.3, p.307-314, 2000.

MANDERSON A. P.; BOTTO M.; WALPORT, M. J. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. **Annual Reviews Immunology**, v.22, p.431-456, 2004.

MANSON, L. F.; SHARP, L.; COTTON, S.C.; LITTLE, J. Cytochrome P-450 1A1 gene polymorphisms and risk of breast cancer: a huge review. **American Journal of Epidemiology**, v.161, p.901-915, 2005.

MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, v.6, p.823-835, 2006.

MARSHALL, J. D.; ASTE-AMEZAGA, M.; CHEHIMI, S. S.; MURPHY, M.; OLSEN, H.; TRINCHIERI, G. Regulation of human IL-18 mRNA expression. **Clinical Immunology**, v.90, n.1, p.15-21, 1999.

MCMURRAY, R. W.; NDEBELE, K.; HARDY, K. J.; JENKINS, J. K. 17-beta-estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor. **Cytokine**, v.14, p.324-333, 2001.

MEYLING, H. C.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v.6, p.117-129, 2006.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation Research**, v.544, n.1, p.9-41, 2003.

MOK, C. C.; LAU, C. S.; HO, C. T.; WONG, R. W. Do flares of systemic lupus erythematosus decline after menopause? **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v.28, p.360-365, 1999.

MOK, C. C.; LAU, C. S.; WONG, R. W. S. Use of exogenous estrogens in systemic lupus erythematosus. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.30, p.426-435, 2001.

MOK, C. C.; LAU, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus, **Journal of Clinical Pathology**, v.56, p.481-490, 2003.

MORGAN, E. T.; SEWER, M. B.; IBER, H.; GONZALEZ, F. J.; LEE, Y-H.; TUKEY, R. H. Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P-450. **Drug Metabolism and Disposition** v.26, p.1232-1240, 1998.

MORGAN, E. T. Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: why and how? **Drug Metabolism and Disposition** v.29, p.207-212, 2001.

MUTANE-RELAT, J.; OURLIN, J-C.; DOMERGUE, J.; MAUREL, P. Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. **Hepatology**, v.22, p.1143-1153, 1995.

NAGY, G.; KONCZ, A.; PERL, A. T and B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. **Critical Reviews Immunology**, v.25, p.123-140, 2005.

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.12, n.1, p.53-72, 2001.

NATH, S. K.; KILPATRICK, J.; HARLEY, J. B. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. **Current Opinion in Immunology**, v.16, n.6, p.794-800, 2004.

NELSON, D.; R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.; J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D. J.; WATERMAN, M. R.; GOTOH, O.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GUNSALUS, I. C.; NEBERT, D. W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v.6, n.1, p.1-42, 1996.

NELSON, D. R. Cytochrome P450 and the individuality of species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.369, n.1, p.1-10, 1999.

NEBERT, D. W.; RUSSELL, D. W. Clinical importance of the cytochrome P450. **Lancet**, v.360, p.1155-1162, 2002.

NEBERT, D. W.; DALTON, T. P. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v.6, n.12, p.947-960, 2006.

NISHIMURA, H.; NOSE, M.; HIAI, H.; MINATO, N.; HONJO, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. **Immunity**, v.11, p.141-151, 1999.

NISHIMURA, H.; OKAZAKI, K.; TANAKA, Y.; HARA, M.; MATSUMORI, A.; SASAYAMA, S.; MIZOGUCHI, A.; HIAI, H.; MINATO, N.; Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor deficient mice. **Science**, v.291, p.319-322, 2001.

NISHIMURA, H.; HONJO, T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. **Trends in Immunology**, v.265-268, 2001.

OGAWA, N.; ITOH, M.; GOTO, Y. Abnormal production of B cell growth factor in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Immunology**, v.89, p.26-31, 1992.

OKAZAKI, T.; HONJO, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. **Trends in Immunology**, v.27, n.4, p.195-201, 2006.

OKAZAKI, T.; MAEDA, A.; NISHIMURA, H.; KUROSAKI, T.; HONJO, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signalling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.98, p.13866-13871, 2001.

PANG, M.; TSUZAKA, K.; YOSHIMOTO, K.; AMANO, K.; ABE, T. Defective expression and tyrosine phosphorylation of the T cell receptor zeta chain in peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v.129, p.160-168, 2002.

PARK, M. C.; PARK, Y. B.; LEE, S. K. Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v.23, p.225-229, 2004.

PARSLOW, T.G.; STITES, D.P.; TERR, A.I.; IMBODEN, J.B. **Imunologia Médica**. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

PERDRINGER, A; WERNER-LEYVAL, S.; ROLLOT-ELAMRANI, K. The genetic basis for systemic lupus erythematosus. **Joint Bone Spine**, v.70, p.103-108, 2003.

PETERSEN, D. D.; McKINNEY, C. E.; IKEYA, K.; SMITH, H. H.; BALE, A. E.; McBRIDGE, O. W. Human CYP1A1 gene: cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. **American Journal of Human Genetics**, v.48, p.720-725, 1991.

PLENGE, R.; RIOUX, J. D. Identifying susceptibility genes for immunological disorders: patterns, power and proof. **Immunological Reviews**, v.210, p.40-51, 2006.

PROKUNINA, L.; CASTILLEJO-LOPEZ, C.; OBERG, F.; GUNNARSSON, I.; BERG, L.; MAGNUSSON, V.; BROOKES, A.J.; TENTLER, D.; KRISTJANSDDOTTIR, H.; GRONDAL, G. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. **Nature Genetics**, v. 32, p. 666–669, 2002.

PROKUNINA, L.; ALARCON-RIQUELME, M. The genetic basis of systemic lupus erythematosus – knowledge of today and thoughts for tomorrow. **Human Molecular Genetics**, v.13, n.1, p.143-148, 2004.

REDDY, P. Interleukin-18: recent advances. **Current Opinion in Hematology**, v.11, n.6, p.405-410, 2004.

RENTON, K. W. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. **Pharmacological Therapy**, v.92, p.147-163, 2001.

RIGBY, R. J.; FERNANDO M. M. A.; VYSE, T. J. Mice, humans and haplotypes – the hunt for disease genes in SLE. **Rheumatology**, n.45, p. 1062-1067, 2006.

RILEY, J. A.; JUNE, C. H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. **Blood**, v.105, n.1, p.13-21, 2005.

RIOUX, J.D.; ABBAS, A.K. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. **Nature**, v.435, p.584-589, 2005.

ROBAK, E.; ROBAK, T.; WOZNIACKA, A.; ZAK-PRELICH, M.; SYSA-JEDRZEJOWSKA, A.; STEPIEN, H. Pro-inflammatory interferon-gamma – inducing monokines (interleukin-12, interleukin-18, interleukin-15) – serum profile in patients with systemic lupus erythematosus. **European Cytokine Network**, v.13, n.3, p.364-368, 2002.

ROBSON, M. G.; WALPORT, M. J. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). **Clinical and Experimental Allergy**, v.31, n.5, p.678, 2001.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D.C.M.; AMORIM, L. M. F.; MACEDO, J. M. B.; GALLO, C. V. M.; PINTO, L. F. R. Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.233-240, 2002.

ROTH, M. J.; DAWSEY, S. M.; WANG, G. Q.; TANGREA, J. A. ZHOU, B.; RATNASINGHE, D.; WOODSON, K. G.; OLIVERO, O. A.; POIRIER, M. C.; FRYE, B. L.; TAYLOR, P. R.; WESTON, A. Association between GSTM\*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the high risk region of Linxian, China. **Cancer Letters**, v.156, p.73-81, 2000.

ROXO, V. M. S.; **Estudo de associação entre as variantes dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1, TNF, LTA e FAS e o pênfigo endêmico**. Curitiba 2003. Tese (Doutorado em genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2003.

RUDD, C. E.; SCHNEIDER, H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v.3, n.7, p.544-556, 2003.

RUEDA, B.; GONZALEZ-GAY, M. A.; MATARAN, L.; LOPEZ-NEVOT, M.A.; MARTIN, J. Interleukin-18-promoter polymorphisms are not relevant in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v.65, n.6, p.444-448, 2005.

SANCHEZ-GUERRERO, J.; LIANG, M. H.; KARLSON, E. W.; HUNTER, D. J. COLDITZ, G. A. Postmenopausal estrogen therapy and the risk for developing systemic lupus erythematosus. **Annals of Internal Medicine**, v.122, p.430-433, 1995.

SATO, I. E.; BONFÁ, E. D.; CONSTALLAT, L. T. L.; SILVA, N. A.; BRENOL, J. C. T.; SANTIAGO, M. B.; SZAJUBOK, J. C. M.; RACHID, A.; BARROS, R. T.;

SCHWARZ, D.; KISSELEV, P.; CASCORBI, I.; SCHUNCK, W. H.; ROOTS, I. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. **Carcinogenesis**, v.22, n.3, p.453-459, 2001.

VASCONCELOS, M. Consenso brasileiro para o tratamento do lupus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.42, n.6, p.362-370, 2002.

SIVALINGAM, S. P.; YOON, K. H.; KOH, D. R.; FONG, K. Y. Single-nucleotide polymorphisms of the interleukin-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients: protective effect of AA genotype. **Tissue Antigens**, v.62, p.498-504, 2003.

SHANGHERA, D. K.; MANZI, S.; BONTEMPO, F.; NESTLERODE, C.; KAMBOH, M. I. Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. **Human Genetics**, v.115, p.393-398, 2004.

SCHIFFER, L.; SINHA, J.; WANG, X.; HUANG, W.; VON GERSDORFF, G.; SCHIFFER, M.; MADAIO, M. P.; DAVIDSON, A. Short term administration of costimulatory blockade and cyclophosphamide induces remission of systemic lupus erythematosus nephritis in NZB/W F1 mice by a mechanism downstream of renal immune complex deposition. **Journal of Immunology**, v.171, p.489-497, 2003.

SEGIN, C. A.; YIN, X.; ESMON, C. T. ; BUYON, J. P. ; CLANCY, R. M. Shedding of endothelial protein C receptor contributes to vasculopathy and renal injury in lupus: in vivo and in vitro evidence. **Kidney**, v.68, p.110-120, 2005.

SHLOMCHIK, M. J.; CRAFT, J. E.; MAMULA, M. J. From T to B back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, v.1, p.147-153, 2001

SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M.; INUI, Y.; GUENGERICH, F. P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. **Journal of Pharmacological Experimental Therapy**, v.270, p.414-423, 1994.

SIVALINGAM, S.P.; YOON, K.H.; KOH, D.R.; FONG, K.Y. Single-nucleotide polymorphisms of the interleukin-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients: protective effect of AA genotype. **Tissue Antigens**, v.62, p.498-504, 2003.



SUGIURA, T.; KAWAGUCHI, Y.; HARIGAI, M.; TERAJIMA-ICHIDA, H.; KITAMURA, Y.; FURUYA, T.; ICHIKAWA, N.; KOTAKE, S.; TANAKA, M.; HARA, M.; KAMATANI, N. Association between adult-onset Still's disease and interleukin-18 gene polymorphisms. *Genes and Immunity*, v.3, n.7, p.394-399, 2003.

SWAPAN, K.N.; KILPATRIK, J.; HARLEY, J.B. Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. **Current Opinion in Immunology**, v.16, p.794-800, 2004.

TAIOLI, E.; BRADLOW, H. L.; GARBERS, S. V.; SEPKOVIC, D. W.; OSBORNE, M. P.; TRACHMAN, J.; GANGULY, S.; GARTE, S. J. Role of estradiol metabolism and CYP1A1 polymorphisms in breast cancer risk. *Cancer Detection and Prevention*, v.23, n.3, p.232-237, 1999.

TAMÁSI, V.; VERECZKEY, L.; FALUS, A.; MONOSTORY, K. Some aspects of interindividual variations in the metabolism of xenobiotics. **Inflammation Research**, v.52, p.322-333, 2003.

TAKADA, T.; SUZUKI, E.; MOROHASHI, K.; GEYCO, F. Association of single nucleotide polymorphism in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population. **Tissue Antigens**, v.60, p.36-42, 2002.

TARZI, R. M.; COOK, H. T. Role of Fcγ receptors in glomerulonephritis. **Nephron. Experimental Nephrology**, v.95, p.7-12, 2003.

THOMPSON, S. R.; HUMPHRIES, S. E. Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. **Genes and Immunity**, v.1, p.1-9, 2007.

THOMPSON, P. A.; AMBROSONE C. Molecular Epidemiology of Genetic Polymorphisms in Estrogen Metabolizing Enzymes in Human Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 27, p. 125-134, 2000.

TIVOL, E. A.; SCHWEITZER, A. N.; SHARPE, A. H. Costimulation and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v.8, n.6, p.822-830, 1996.

TONE, M.; THOMPSON, S. A.; TONE, Y.; FAIRCHILD, P. J.; WALDMANN, H. Regulation of IL-18 (IFN-γ-inducing factor) gene expression. **Journal of Immunology**, v.159, n.13, p.6155-6163, 1997.

TSAO, B. P. Update on human systemic lupus erythematosus genetics. **Current Opinion in Rheumatology**, v.16, p.513-521, 2004.

TUCKER, G. T. Clinical implications of genetic polymorphisms in drug metabolism. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p.417-424, 1994.

TIPPING, P. G.; KITCHING, A. R. Glomerulonephritis, Th1 and Th2: What's new? **Clinical Experimental Immunology**, v.142, p.207-215, 2005.

WHYATT, R. M.; BELL, D. A.; JEDRYCHOWSKI, W.; SANTELLA, R. M.; GARTE, S. J.; COSMA, G.; MANCHESTER, D. K.; YOUNG, T. L.; COOPER, T. B.; OTTMAN, R.; PERERA, F. P. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta and modulation by CYP1A1 induction and genotype. **Carcinogenesis**, v.19, p.1389-1392, 1998.

VIDAVER, R. Molecular and clinical evidence of the role of estrogen in lupus. **Trends in Immunology**, v.23, n.5, p.229-230, 2002.

VIALARD, J. F.; PELLEGRIN, J. L.; RANCHIN, V.; SCHAEVERBEKE, T.; DEHAIS, J.; LONGY-BOURSIER, M. Th1 (IL-2 and IFN-gamma) and Th2(IL-4, IL-10) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Immunology**, v.115, p.189-195, 1999.

VRATSANOS, G. S.; JUNG, S.; PARK, Y. M.; CRAFT, J. CD4(+) T cells from lupus prone-mice are hyperresponsive to T cell receptor engagement with low and high affinity peptide antigens: a model to explain spontaneous T cell activation in lupus. **Journal of Experimental Medicine**, v.193, p.329-337, 2001.

Von SCHMIEDEBERG, S.; FRITSCHKE, E.; RONNAU, A. C.; SPECKER, C.; GOLKA, K.; RICHTER-HINTZ, D.; SCHUPPE, H. C.; LEHMANN, P.; RUZICKA, T.; ESSER, C.; ABE, E.; GLEICHMANN, E. Polymorphisms of the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP and NAT-2 in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.455, p.147-152, 1999.

WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R. Cytochromes P450: a success story. **Genome Biology**, v.1, n.6, p.3003.1-3003.9, 2000.

WILLIAM, E. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. **Journal of Clinical Pathology**, v.53, n.6, p.424-432, 2000.

WONG, C. K.; LI, E. K.; HO, C.Y.; LAM, C. W. K. Elevation of plasma interleukin-18 concentration is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v.39, p.1078-1081, 2000.

WONG, C. K.; HO, C.Y.; LI, E. K.; TAM, L. S.; LAM, C. W. K. Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Immunology**, v.130, n.2, p.345-351, 2002.

WONG, C. K.; LIT, L. C.; TAM, L. S.; LI, E. K.; LAM, C. W. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v.44, n.8, p.989-994, 2005.

WONG, M.; TSAO, B. P. Current topics in human SLE genetics. **Seminars in Immunology**, v.28, p.97-107, 2006.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**, v.19, n.4, p.251-253, 1955.

YEN, J-H.; CHEN, C-J.; TSAI, W-C.; LIN, C-H.; OU, T-T.; HU, C-J.; LIU, H-W. Cytochrome P450 and manganese superoxide dismutase genes polymorphisms in systemic lupus erythematosus. **Immunological Letters**, v.90, p.19-24, 2003.

YEN, J. H.; TSAI, W. C.; LIN, C. H.; OU, T. T. ; HU, C. J. ; LIU, H. W. Cytochrome p450 1A1 gene polymorphisms in patients with psoriatic arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v.33, n.1, p.19-23, 2004a.

YEN, J.H.; TSAI, W. C. ; LIN, C. H. ; OU, T. T. ; HU, C. J. ; LIU, H. W. Cytochrome P450 1A1 and manganese superoxide dismutase gene polymorphisms in Behcet's disease. **Journal of Rheumatology**, v.31, n.4, p.736-740, 2004b.

YUN, B. R.; EL-SOHEMY, A.; CORNELIS, M. C.; BAE, S. C. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v.32, n.6, p.992-997, 2005.

ZONDERVAN, K.; T.; CARDON, L.; R. The complex interplay among factors that influence allelic association. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.89-100, 2004.

**BANCO DE DADOS EM MEIO ELETRÔNICO:**

NCBI: [www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Acembly](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Acembly) (acesso: 01/11/2006).

Sociedade Brasileira de Reumatologia: [www.reumatologia.com.br](http://www.reumatologia.com.br) (acesso 05/08/2006).

## ANEXOS

### ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM APOIO DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

### **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

#### **Informações aos participantes,**

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos da saúde e genéticos de pacientes que desenvolveram, lupus eritematoso e controles saudáveis. Para isto pedimos a colaboração para doar 10 ml de sangue periférico (com anticoagulante EDTA), e para responder um questionário que dura aproximadamente cinco minutos. O questionário e a coleta de material serão feitas por pessoas que fazem parte desta pesquisa e que são devidamente treinados para este fim.

Deixamos claro que a participação dos pacientes nesta pesquisa é voluntária e as informações aqui coletadas, bem como dos resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. Caso o paciente não queira mais participar da pesquisa, poderá reaver sua amostra de DNA.

Toda a equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Caso não queira mais fazer parte da pesquisa, pode entrar em contato pelo telefone (48) 331-9804.

#### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu declaro que concordo em participar desta pesquisa na condição de voluntário de acordo com os critérios acima expostos:

Data: \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**ANEXO II**

**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB**  
**Departamento de Clínica Médica/CCS**  
**Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico**

**NOME:** \_\_\_\_\_ **PRONTUÁRIO/HU:** \_\_\_\_\_

**IDADE:** \_\_\_\_\_ anos **SEXO:** ( )F ( )M **COR da Pele:** \_\_\_\_\_

**PROCedência:** \_\_\_\_\_ **NATural de:** \_\_\_\_\_

**ESTado CIVil:** ( )S ( )C ( )D ( )V **OCUPação:** \_\_\_\_\_

**ENDereço:** \_\_\_\_\_

**TELEfone:** \_\_\_\_\_ **EMAIL:** \_\_\_\_\_

**TEMPO de doença diagnosticada:** \_\_\_\_\_

**HISTória FAMiliar:** Lupus: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_

Outras D. Reumat.: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_

**MANIFestações INICiais:** ( ) Febre ( ) Alopecia  
 ( ) Fenômeno de Raynaud ( ) Rash Malar  
 ( ) Rash Discóide ( ) Fadiga  
 ( ) Artrite ( ) Fotossensibilidade  
 ( ) Úlcera oral ou nasal ( ) Serosite  
 ( ) Distúrbio Renal ( ) Distúrbio Neurológico  
 ( ) Distúrbio Hematológico ( ) Hipertensão Arterial  
 ( ) Vasculite  
 ( ) Outras? Quais? \_\_\_\_\_

**Evolução: INTERNações:** ( )S ( )N Quantas? \_\_\_\_\_ Motivos? \_\_\_\_\_

**MANIFestações ASSOCIadas:** ( )S ( )N Quais? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**SOBRE**Posição com alguma  Esclerodermia

outra doença reumatológica:  Sjögren

Dermatomiosite

SAF

Fibromialgia

Outras Quais? \_\_\_\_\_

**OBS**ervações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**SINT**omatologia **RE**cente:  Febre

Alopecia

(últimos 10 dias)

Fenômeno de Raynaud

*Rash* Malar

*Rash* Discóide

Fadiga

Artrite

Fotossensibilidade

Úlcera oral ou nasal

Serosite

Distúrbio Renal

Distúrbio Neurológico

Distúrbio Hematológico

Hipertensão Arterial

Vasculite

Outras? Quais? \_\_\_\_\_

**Tratamento Atual: CORTI**coesteróides:  S  N Qual? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**AZATioprina:**  S  N Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**ANTIMALárico:**  S  N Qual? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**METOtrexato:**  S  N Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**CICLOSPorina:**  S  N Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**CICLOFosfamida:**  S  N Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**AINE:**  S  N Qual? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**ANALGésicos:**  S  N Qual? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**Outros:** ( )S ( )N Quais? \_\_\_\_\_  
 Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**Idade da MENARCA:** \_\_\_\_\_anos **MENOPAUSA:** ( )S ( )N Idade: \_\_\_\_\_anos

**GESTA:** \_\_\_\_\_ **PARA:** \_\_\_\_\_ **FASE do Ciclo Reprodutivo:** ( )Menacme  
 ( )Climatério

**Tratamento HORMONAL Antes do Diagnóstico:** ( )S ( )N Qual? ( )AC ( )Outro

**Tratamento MEDICAMENTOSO Antes do Diagnóstico:** ( )S ( )N  
 Quais? \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**História de Uso de DROGAS: Álcool:** ( )S ( )N Tipo? \_\_\_\_\_

Qtde? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

Cigarro: ( )S ( )N Cigarros/dia: \_\_\_\_\_

Drogas Ilícitas: ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_



**SLEDAI**  
**(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)**  
**Modificação SELENA**

Avaliação Global do Médico \_\_\_\_\_

0      1      2      3  
Nula   Leve   Média   Severa

**Score SLEDAI**

Marque se o descriptor estiver presente no momento da visita ou nos 10 dias anteriores.

<b>Pes</b>	<b>Pres.</b>	<b>Descriptor</b>	<b>Definição</b>
8	( )	Convulsão	Início recente. Excluir causa metabólica, infecciosa ou farmacológica.
8	( )	Psicose	Alterações na habilidade de exercer atividades normais devido a distúrbio severo na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico, conteúdo pobre de pensamentos. Excluir uremia e causas farmacológicas.
8	( )	Síndrome Cerebral Orgânica	Função mental alterada com diminuição da orientação, memória ou outras funções inteligentes, com início abrupto e características clínicas flutuantes. Inclui redução da consciência com capacidade reduzida de concentração e incapacidade de manter-se atento ao ambiente, mais pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, fala incoerente, insônia ou sonolência diurna, ou atividade psicomotora aumentada ou diminuída. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou farmacológicas.
8	( )	Distúrbio Visual	Alterações retinianas do lupus.. Inclui corpos citóides, hemorragias retinianas, hemorragia ou exsudato na coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção ou causas farmacológicas.
8	( )	Distúrbio em Nervo Craniano	Início recente de neuropatia sensorial ou motora envolvendo nervos cranianos.
8	( )	Cefaléia do Lupus	Cefaléia severa e persistente: pode ser migranosa, mas deve ser não-responsiva a analgesia narcótica.
8	( )	AVC	Início recente de AVC. Excluir aterosclerose
8	( )	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos moles nos dedos, infarto periungueal, hemorragia em cunha, ou biópsia ou angiograma provando vasculite.
4	( )	Artrite	Mais do que 2 articulações com dor e sinais de inflamação (i.e. edema, derrame articular ou sensibilidade)
4	( )	Miosite	Fraqueza ou dor muscular proximais, associada com CPK/aldolas elevada ou mudanças no eletromiograma ou biópsia mostrando miosite.
4	( )	Cilindros Urinários	Cilindros de hemácias ou heme-granulares.
4	( )	Hematúria	>5 hemácias/campo. Excluir cálculo, infecção ou outra causa.
4	( )	Proteinúria	>0,5 g/24 h. Início recente ou aumento recente de mais que 0,5 g/24 h.
4	( )	Piúria	>5 leucócitos/campo. Excluir infecção.
2	( )	Rash Novo	Início recente ou recorrência de rash do tipo inflamatório.
2	( )	Alopécia	Início recente ou recorrência de perda de cabelo anormal, em placas ou difusa.
2	( )	Úlceras em Mucosas	Início recente ou recorrência de ulcerações nasais ou orais.
2	( )	Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural ou derrame, ou

			espessamento pleural.
2	( )	Pericardite	Dor de origem pericárdica ou pelo menos 1 dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrocardiográfica.
2	( )	Complemento Baixo	Diminuição no CH50, C3 ou C4 abaixo do limite inferior do laboratório.
2	( )	Agregação de DNA Aumentada	>25% por ensaio Farr or acima da variação normal para o laboratório
1	( )	Febre	>38°C. Excluir causas infecciosas.
1	( )	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas/mm <sup>3</sup> .
1	( )	Leucopenia	<3000 leucócitos/mm <sup>3</sup> . Excluir causas farmacológicas

\_\_\_\_\_ Score Total (soma dos pesos)

<b>Crise Leve ou Moderada ( )</b>	<b>Severa ( )</b>
( ) Mudança no SLEDAI >3 pontos	( ) Mudança no SLEDAI >12 pontos
( ) Úlceras nasofaríngeas Pleurite Pericardite Artrite Febre (LES) Lupus bolhoso, vasculite cutânea, profunda, fotossensível e discóide recente/pior	( ) SNC-LES recente ou pior Vasculite (????) Nefrite Miosite Pk<60.000 Hb<7% ou diminuição na HB>3% Precisando de prednisona em dobro
( ) Aumento na prednisona, mas não para mais que 0,5 mg/kg/dia	( ) Prednisona>0,5 mg/kg/dia
( ) Adicionado AINE ou Plaquenil	( ) Necessidade de Azatioprina, Metotrexato ou Hospitalização pelo LES
( ) Aumento na PGA maior ou igual a 1 mas não maior que 2,5	( ) Aumento no PGA para mais de 2,5

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)