



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

JÉSSICA MENEZES VALIM

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE APOB E LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA BRASILEIRA**

Brasília

2016

JÉSSICA MENEZES VALIM

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE APOB E LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA BRASILEIRA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Ceilândia, da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para obtenção do
grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Vivian Tais Fernandes Cipriano

Brasília

2016

JÉSSICA MENEZES VALIM

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE APOB E LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA BRASILEIRA**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(UniCeub)

Profa. Msc. Calliandra Maria de Souza Silva
(UnB)

Brasília

2016

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar o conhecimento e ao meu filho, que sempre me inspirou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

Ao meu noivo Pedro Augusto Lares que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, sempre me dando força e me ajudando. Obrigado por contribuir com tantos ensinamentos, tanto conhecimento, tantas palavras de força e ajuda.

Quero agradecer também ao meu filho Bernardo, que embora não tivesse conhecimento do TCC me iluminou de maneira especial com seu sorriso, sua alegria e seus carinhos a quem eu rogo todas as noites por fazer parte da minha vida.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, me apoiarem e investirem na minha educação, sempre me incentivando a realizar meus sonhos, superar novos desafios e nunca desistir.

À professora Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, que aceitou me orientar neste trabalho. Obrigada por compartilhar seu conhecimento, sua paciência, por sua ajuda, compreensão e por ser essa professora maravilhosa. Palavras me faltam para agradecer-te o suficiente! Agradeço também a co-orientadora Vivian Cipriano.

Agradecimentos ao Dr Luzitano Ferreira e ao Dr Carlos Barros pela parceria e colaboração das amostras de pacientes.

A todos que me apoiaram, me ajudaram e influenciaram de alguma forma a minha chegada até aqui, só tenho que agradecer muito, muito obrigada!

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune e multissistêmica com manifestações diversas e de etiologia multifatorial. Dentre estas, a doença arterial coronariana continua a ser uma das principais causas de mortalidade no LES. Os fatores de risco cardiovasculares tais como hipertensão e a dislipidemias estão associados com a doença arterial coronariana no LES. As dislipidemias ocorrem devido a um desequilíbrio entre Apo A ateroprotetora e a B aterogênica. Alguns polimorfismos descritos para o gene APOB mostram forte associação com a doença arterial coronariana e dislipidemias em diferentes patologias. No entanto, nenhum estudo associava o polimorfismo deste gene e características clínicas em LES. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar a correlação do polimorfismo Inserção/Deleção do gene APOB na ocorrência de LES em uma população brasileira. O estudo caso-controle foi composto de 257 pacientes portadores de LES e o grupo controle de 128 indivíduos sem descrição de critérios para doenças autoimunes. Foram obtidas amostras de sangue total e as características clínicas dos pacientes com LES extraídas de seus prontuários. Para a genotipagem desta região foi utilizada a técnica PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism -polymerase chain reaction*). Verificou-se que houve diferença estatística na distribuição genotípica entre o grupo caso e controle ($P=0,039$), sendo que o genótipo I/D teve maior representação no grupo caso. Os indivíduos heterozigotos do grupo caso apresentaram maior ocorrência de dislipidemia, hipertensão arterial, trombose arterial, AVC, mas também lesões discoides e fotossensibilidade.. Tais resultados sugerem associação do polimorfismo estudado com a ocorrência de LES na população estudada.

Palavras-chave: APOB. Polimorfismo. Lúpus Eritematoso sistêmico.

ABSTRACT

Systemic Lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease of multisystem various manifestations and multifactorial etiology. Coronary artery disease remains a major cause of mortality in SLE. The cardiovascular risk factors such as hypertension and dyslipidemia are associated with coronary artery disease in SLE. Lipid disorders occur due to an imbalance between Apo A atheroprotective and B atherogenic. Some polymorphisms described for APOB gene show strong association with coronary artery disease and dyslipidemia in different pathologies. However, no studies have associated this gene polymorphism and clinical characteristics in SLE. The objective of this study is to investigate the correlation between polymorphism Insertion / Deletion of APOB gene in the occurrence of SLE in a Brazilian population. The case-control study consisted of 257 patients with SLE and the control group of 128 individuals with no description of criteria for autoimmune diseases. Whole blood samples were obtained and the clinical characteristics of patients with SLE extracted from their records. For genotyping of this region, we used the PCR-RFLP technique (restriction fragment length polymorphism -polymerase chain reaction. It was found that there was statistically significant difference in the genotype distribution between the case and control groups ($P = 0.039$), with genotype I / D had greater representation in the case group. the heterozygous individuals in the case group showed higher incidence of dyslipidemia, hypertension, arterial thrombosis, stroke but also discoid and photosensitivity lesions .. These results suggest association of the polymorphism studied the occurrence of SLE in the population studied.

Keywords: APOB. Polymorphism. Systemic Lupus erythematosus.

LISTA

DE TABELAS

Tabela 1 - Polimorfismo do Inserção/Deleção do gene da APOB em pacientes com LES e grupo controle – Distribuição genotípica e alélica.

.....

18

Tabela 2 - Frequências do genótipo Inserção/Deleção do gene da APOB em indivíduos com LES por sinais e sintomas clínicos apresentados.

.....

19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

Apo – Apolipoproteína

ApoB – Apolipoproteína B

RFLPs – Polomorfismos do fragmento de restrição

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

HDL – Lipoproteína de alta densidade

CT – Colesterol total

TG – Triglicerídeos

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

μl - Microlitro

P – p-valor

PCR – Reação em cadeia da polimerase

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

χ^2 – qui-quadrado

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ACR – *American College of Rheumatology*

IC OR – **Odds Ratio**

OR – **Odds Ratio**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. <i>Participantes da pesquisa</i>	15
4.2. <i>Extração de DNA</i>	15
4.3. <i>PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo</i>	16
4.4. <i>Análise Estatística</i>	17
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO	20
7. CONCLUSÃO	23
8. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica, que tem etiologia multifatorial envolvendo fatores genéticos, hormonais, ambientais e fatores emocionais (Morais and Isenberg 2015, Tunncliffe, Singh-Grewal et al. 2015). A doença é caracterizada por uma alta produção de anticorpos contra auto antígenos, formando complexos imunes que levam à perda do controle imunorregulatório e da tolerância imunológica, causando danos a vários tecidos e partes do corpo (Chen, Wu et al. 2015, Gluhovschi, Gluhovschi et al. 2015, Pieterse and van der Vlag 2015, Yaniv, Twig et al. 2015).

Dentre os fatores genéticos ligados ao LES, verificou-se que há uma íntima relação entre determinadas mutações e a dislipidemia, pois a doença está relacionada com alterações do perfil lipídico e o metabolismo de lipoproteínas (Wilhelm and Major 2012). E que o tecido adiposo tem grande influência sobre o sistema imune, o que estaria diretamente relacionado, já que essa é provocada pelas células de defesa (Amaya-Amaya, Sarmiento-Monroy et al. 2013, Benvenuti, Gatto et al. 2015, Frostegård 2015, Tselios, Koumaras et al. 2015)

Sua incidência é maior em mulheres e menos comum em crianças (Schur and Hahn 2014). Clinicamente, observam-se manifestações musculoesqueléticas, onde as mais comuns são artrite, dor muscular e fraqueza. As manifestações clínicas neurológicas são as mudanças de humor, depressão e psicose. Com relação às manifestações renais, encontram-se proteinúria ou hematúria, hipertensão, edema dos membros inferiores, alterações na retina, nefrose ou insuficiência renal aguda, sendo que, quando a insuficiência renal aguda atinge crianças, a doença se torna mais grave e progressiva (Yu, Gershwin et al. 2014, Inês, Silva et al. 2015).

Para diagnóstico laboratorial inicial, deve ser feito um hemograma completo com contagem de plaquetas, reagentes de fase aguda (taxa de sedimentação de eritrócitos e de proteína C-reativa), contagem de reticulócitos, eletrólitos, função hepática e renal (Jesus Cameira Croca 2016). Outros exames complementares podem ser feitos para a constatação de alterações hematológicas como leucopenia e/ou linfopenia e/ou plaquetopenia e/ou anemia hemolítica e alterações do sedimento urinário (Li, Xu et al. 2015).

O genoma humano influencia profundamente a fisiologia, comportamento e mente. Apenas 1,1% a 1,4% dos 2,9 a 3,2 bilhões de nucleotídeos têm função conhecida, como codificador de proteínas. Cada pessoa (com exceção de gêmeos idênticos) possui um genoma único e, embora dois genomas sejam 99,9% idênticos, ainda existe 3,2 bilhões de pares de bases de nucleotídeos que compõem o genoma que diferem entre si (Consortium 2012, Harrow, Frankish et al. 2012).

O polimorfismo genético é a variação genética na sequência de alelos, na sequência de bases nucleotídicas ou na estrutura cromossômica, que ocorre com uma frequência maior que 1% na população. O tipo de polimorfismo em evidência na literatura é o de base única, conhecido como Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polimorphism* - SNP), que consiste em uma variação da identidade de um nucleotídeo singular num sítio particular do genoma (Yunis 2012, Lee 2013).

O estudo do polimorfismo genético e sua relação com a existência de patologias é de grande importância visto que existem vários estudos epidemiológicos apontam para o *background* genético como um risco dentro do contexto da patogenia. É visto então a importância do envolvimento do sistema imune, bem como a ação de suas proteínas e células (Burel, Apte et al. 2016, Heng, Regan et al. 2016).

Lipoproteínas são partículas esféricas formadas por um núcleo de lipídeos neutros, não polares, que estão envolvidos por substâncias relativamente polares como fosfolipídios, colesterol livre e proteínas. As apolipoproteínas (apo) são os componentes proteicos das lipoproteínas e são divididas em apo A (apoA-I, apoA-II e apoA-IV), apo B (apoB-100 e apoB-48), apo C (apoC-I, apoC-II e apoC-III) e apo E, que variam em tamanho e na sua composição química. As apos participam da formação das cinco classes de lipoproteínas: os quilomícrons, HDL, LDL, ILI e VLDL (Toth, Barter et al. 2013, Heng, Regan et al. 2016).

A apolipoproteína B, apoB é uma proteína polimórfica composta por 4536 aminoácidos, que são responsáveis pelo transporte do colesterol para as células periféricas, na apoB podem ocorrer várias mutações polimórficas, entre elas as mutações mais estudadas são os sítios polimórficos: XbaI (éxon 26) e o EcoRI (éxon 29), vários polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLPs) do gene da APOB estão sendo estudados geneticamente e se observa que alguns alelos podem estar

associados com fatores de risco cardiovasculares e com as concentrações e níveis lipídicos plasmáticos em diversas populações. Sendo assim, estas lipoproteínas são consideradas ateriogênicas (Starcevic, Letonja et al. 2014, Zhang, Zhang et al. 2015)

A apoB pode ser encontrada em duas formas: a apoB-100 e apoB-48. A primeira atua na ligação das partículas de LDL nas células, sendo produzida no fígado, é um dos componentes das lipoproteínas aterogênicas, como as VLDL, ILD e LDL, onde o colesterol nesse caso é variável. A apo-48 é encontrada nos quilomícrons, é produzida no intestino e sua metabolização é hepática. As mutações que ocorrem no gene da apoB podem gerar várias alterações no metabolismo das lipoproteínas, por exemplo, uma produção anormal da apoB, o aumento ou diminuição do catabolismo e alteração na secreção das partículas da apoB-100 e/ou apoB-48, podem alterar a capacidade aterogênica da apoB (Starcevic, Letonja et al. 2014).

O gene da apoB-100 diminui a ligação ao receptor da LDL e pode levar a um aumento dos níveis de colesterol, nessa mutação foi observado a substituição do aminoácido glicina pela arginina na posição 3500 da proteína apoB, mutação no gene que codifica a apoB-100 pode levar a hipercolesterolemia, pela deficiência no acoplamento da LDL no receptor celular. Por esse fato, a apoB tem sido relacionada com a presença de doença arterial coronariana e formação de placas ateroscleróticas (Gong, Zhang et al. 2013, Rath, Niedzwiecki et al. 2015).

Pouco se sabe sobre associações entre apolipoproteínas e LES. Um estudo recente desenvolvido por Kiani e colaboradores (2015), mostrou que nem as lipoproteínas cardioprotetoras ou nem as ateriogênicas foram associadas com medidas de arteriosclerose subclínica em uma série de pacientes portadores de LES. No entanto, este estudo contou com apenas 58 participantes, e, portanto, necessita de amostragem maior para sua validação.

2. JUSTIFICATIVA

A doença arterial coronariana continua a ser uma das principais causas de mortalidade no Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Os fatores de risco cardiovasculares tradicionais, tais como hipertensão, hiperlipidemia, a obesidade, e a homocisteína (Tselios, Koumaras et al. 2015), estão associados com a doença arterial coronariana no LES, mas parece que estes fatores não são o principal fator de risco para aterosclerose no paciente com Lúpus (Esdaile, Abrahamowicz et al. 2001).

Por outro lado, a classificação tradicional de dislipidemias que considera a medida da lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e lipoproteína de muito de baixa densidade não fornece informação sobre função das lipoproteínas. É necessário considerar que as apolipoproteínas têm composição diferente, metabólica, e propriedades aterogênicas que possam produzir mais conhecimento sobre o funcionamento das lipoproteínas na patogenia do LES.

As dislipidemias ocorrem devido a um desequilíbrio entre Apo A ateroprotetora e a B aterogênica, resultando em um desarranjo no transporte lipídico e, eventualmente, no desenvolvimento da doença aterosclerótica (Reiss, Voloshyna et al. 2015).

Além disto, alguns polimorfismos descritos para o gene APOB mostram forte associação com a doença arterial coronariana e dislipidemias em diferentes patologias (Chiodini, Barlera et al. 2003, Phillips, Goumidi et al. 2011). No entanto, até a presente data, nenhum estudo associava o polimorfismo deste gene e características clínicas em LES.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

O objetivo deste estudo foi investigar a associação do polimorfismo Inserção/Deleção do gene da APOB com a ocorrência de LES em uma amostra brasileira.

3.2. *Objetivos Específicos*

- a)** Identificar a frequência do polimorfismo Inserção/Deleção do gene da APOB em pacientes com LES atendidos por um hospital do Distrito Federal, Brasil;
- b)** Comparar estas frequências gênicas com aquelas observadas em indivíduos não portadores de doenças crônicas, habitantes da mesma região, e promover, desta forma, um estudo de caso-controle;
- c)** Investigar se o polimorfismo Inserção/Deleção do gene da APOB está associado com a susceptibilidade à patologia autoimune LES e suas características clínicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Participantes da pesquisa*

Os participantes da pesquisa foram divididos em grupo caso e grupo controle, com trezentos e oitenta e cinco amostras de sangue total, sendo o grupo caso pacientes portadores de LES (257 mulheres, entre os 18 e 76 anos, idade de 37 ± 12 anos) e os participantes do grupo controle sem descrição de critérios para doenças autoimunes foram incluídos neste estudo (128 mulheres, entre os 18 e 74 anos, com idade média de 35 ± 13 anos).

Os pacientes foram recrutados em uma unidade hospitalar do Distrito Federal. Todos os pacientes preencheram os critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 (TAN et al., 1982) e revisados em 1997 (HOCHBERG, 1997), aceitos universalmente para LES.

Prontuários dos pacientes com LES foram cuidadosamente estudados, o comprometimento renal e o perfil dos autoanticorpos, e outras características clínicas foram registradas. O comprometimento renal foi definido como proteinúria considerada maior que 0,5g/24 horas ou comprovada por biópsia de nefrite lúpica. Foram utilizados valores mais altos para o título de anti-dsDNA e o menor para o nível C3. O número de critérios do ACR nos pacientes de LES atendidos, o índice de *SLE Disease Activity* (SLEDAI) e o Lúpus Internacional de Colaboração Clínicas (SLICC) / Índice de Danos ACR foram determinados em cada paciente.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da FEPECS (ANEXO 1).

4.2. *Extração de DNA*

O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit *Invisorb Spin Blood Mini Kit* (250) da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A concentração de DNA foi determinada em corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/ μ L.

4.3. PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo

A técnica da PCR permite que uma região selecionada do genoma (gene APOB, localização 2p23-24), seja amplificada milhões de vezes.

As sequências de oligonucleotídeos utilizadas neste trabalho foram (fabricante: IDT Technologies):

Senso 5'-CAGCTGGCGATGGACCCGCCGA-3'

Antisenso 5'-ACCGGCCCTGGCGCCCGCCAGCA-3'

Este par de oligonucleotídeos flanqueia a região do exon 1 do gene da APOB, que altera o comprimento da região do peptídeo sinal da proteína (rs11279109).

As condições de termociclagem foram 94°C por 2 minutos (denaturação inicial), seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, acompanhada de 62°C por 80 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 60 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi termociclador Techne modelo TC-512.

Em cada reação, foram utilizados 4,0 µL de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/µL; 2,5 µL de tampão 10x (10 mM de Tris e 50 mM de KCl); 0,5 µL de MgCl₂ (Fermentas), 0,5 µL de dNTPs (2,5mM; LGC); 0,5 µL de Taq-Polimerase (Fermentas, 5U/µL); 1,5µL de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (10 pM); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação.

O produto desta PCR é um fragmento de 375 pb para o genótipo I/I; 366pb para o genótipo D/D; e dois fragmentos de 375 pb e 366 pb para I/D.

Os produtos da PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio em uma potência de 100W por 20 minutos.

4.4. Análise Estatística

A aderência ao equilíbrio Hardy-Weinberg para a frequência genotípica em controles foi analisada pelo teste do qui-quadrado com um grau de liberdade. As frequências genotípica e alélica nos pacientes com LES foram comparadas ao grupo controle por meio do teste qui-quadrado em modelos recessivos e dominantes. A associação de características clínicas para cada genótipo foi analisada com o teste qui-quadrado e foi o nível de significância adotado foi de 5%. Também foram calculadas *Odds ratio* (OR) das frequências alélicas e genotípicas com um intervalo de confiança (IC) de 95%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. RESULTADOS

As frequências genóticas do polimorfismo Inserção/Deleção do gene da ApoB nos indivíduos sadios estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P = 0,090$). A distribuição genotípica do polimorfismo Inserção/Deleção do gene da ApoB diferenciou-se significativamente entre indivíduos com LES e os sadios, sendo que o número de indivíduos com os genótipos I/I, I/D e D/D foram, respectivamente, de 109, 123 e 25 no grupo com Lúpus (LES) e de 70, 44 e 14 no grupo controle ($P = 0,039$).

Também houve diferença significativa na frequência alélica de I e D, sendo respectivamente de 341 e 173 nos indivíduos com Lúpus e de 184 e 72 no grupo controle ($OR = 0,77$; $P = 0,121$). Ao comparar a representação dos alelos, tem-se que o alelo I foi menos frequente nos pacientes com Lúpus (66,3%) que no grupo controle (71,9%).

Além disto, é digno de nota que quase metade dos indivíduos do grupo com Lúpus eram heterozigotos (47,9%), enquanto esta porcentagem era 34,4% no grupo controle ($P = 0,012$; $OR = 1,75$) conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Polimorfismo do Inserção/Deleção do gene da APOB em pacientes com LES e grupo controle – Distribuição genotípica e alélica.

	Grupo				P	OR	IC (OR)
	Lúpus		Controle				
	N	%	N	%			
I/I	109	42,4	70	54,7			
I/D	123	47,9	44	34,4	0,039	na	na
D/D	25	9,7	14	10,9			
Total	257	100,0	128	100,0			
I/D	123	47,9	44	34,4	0,012	1,75	1,13-2,72
I/I + D/D	134	52,1	84	65,6			
Total	257	100,0	128	100,0			
I	341	66,3	184	71,9			
D	173	33,7	72	28,1	0,121	0,77	0,55-1,07
Total	514	100,0	256	100,0			

Dentre os pacientes com Lúpus, houve associação significativa ($P < 0,05$) na manifestação de alguns sinais e sintomas entre indivíduos heterozigotos (I/D) e homozigotos (I/I e D/D). Entre os indivíduos com genótipo I/D, nota-se que houve maior frequência de LESÕES DISCOIDES - ACR (58,3% dos heterozigotos, OR = 2,18), fotossensibilidade-ACR (58,5%, OR = 2,78), dislipidemia (100,0%, OR = NA), hipertensão arterial (59,6%, OR = 2,11), trombose arterial (85,7%, OR = 6,82) e AVC (94,1%, OR = 19,8) (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequências do genótipo Inserção/Deleção do gene da APOB em indivíduos com LES por sinais e sintomas clínicos apresentados

	APOB I/D				P	OR	IC (OR)
	I/D		I/I+D/D				
	N	%	N	%			
RASH MALAR	63	48,5%	67	51,5%	0,845	1,05	0,644-1,71
LESÕES DISCOIDES	21	58,3%	15	41,7%	0,027	2,18	1,07-4,43
ÚLCERA MUCOSA	29	51,8%	27	48,2%	0,506	1,22	0,676-2,21
LÚPUS CUTÂNEO	17	60,7%	11	39,3%	0,149	1,80	0,804-4,00
FOTOSENSIBILIDADE	86	58,5%	61	41,5%	<0,001	2,78	1,66-4,65
ALOPÉCIA	70	48,6%	74	51,4%	0,786	1,07	0,654-1,75
VASCULITE	10	43,5%	13	56,5%	0,659	0,824	0,347-1,95
DISLIPIDEMIA	16	100,0%	0	0,0%	<0,001	NA	NA
HIPERTENSÃO ARTERIAL	56	59,6%	38	40,4%	0,004	2,11	1,25-3,54
RAYNAUD	29	35,4%	53	64,6%	0,006	0,471	0,274-0,810
TROMBOSE VENOSA	8	47,1%	9	52,9%	0,945	0,966	0,361-2,58
TROMBOSE ARTERIAL	6	85,7%	1	14,3%	0,047	6,82	0,809-57,4
IAM	2	100,0%	0	0,0%	0,228	NA	NA
AVC	16	94,1%	1	5,9%	<0,001	19,88	2,59-152,3

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, as distribuições genotípica e alélica do grupo controle assemelharam-se às distribuições da população global do banco de dados de frequência alélica do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI para o polimorfismo rs11279109. Porém, observou-se um aumento na proporção de indivíduos heterozigotos I/D em indivíduos portadores de LES, sendo que a presença deste perfil genético conferiu um risco aumentado de 1,75 vezes para a doença autoimune.

Não há registro de estudos deste polimorfismo em pacientes com LES na literatura, e os poucos estudos acerca deste polimorfismo associam a presença do alelo D com infertilidade em homens (Peterlin, Zorn et al. 2006) ou risco para doença renal crônica em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (Железнякова, Лебедева et al. 2014).

Os resultados apresentados demonstraram também que o genótipo heterozigoto para o Íntron 1 do APOB foi considerado como fator de risco para dislipidemia e eventos cardiovasculares como AVC, sendo que para esta última característica, registrou-se um aumento do risco de 19,8 vezes.

A apo B é a maior apolipoproteína presente nos quilomícrons, nas VLDL, IDL e LDL. A apo B exerce papel efetivo na estrutura das partículas de lipoproteína. Cada lipoproteína contém somente uma molécula de apo B, que permanece unida a ela desde sua síntese hepática até sua depuração da circulação. Suas concentrações refletem a massa dessas partículas. Como cada partícula lipoprotéica contém uma só molécula de apo B, e 90% delas estão representadas pelas LDL, para uma mesma concentração de LDL, um aumento na apo B sugere a existência de partículas com menor relação lipídeo/proteína, ou seja, partículas de LDL pequenas e densas (Borba, Bonfá et al. 2000) .

A Apo B atua também realizando a ligação entre a LDL e o receptor celular de LDL, mediando processos de degradação da LDL. No gene APOB foram descritas algumas mutações, sendo que estas interferem na conformação do domínio de ligação da apo B com o receptor B/E, reduzindo a afinidade da LDL por esse receptor

em 20% a 30%, elevando, assim, os níveis circulantes de LDL-c (defeito familiar da apo B100). A meia-vida plasmática da apo B defeituosa é cerca de três a quatro vezes maior que o normal, o que pode torná-la mais oxidada e aumentar sua capacidade aterogênica. Indivíduos afetados geralmente têm valores de LDL-c em torno de 400 mg/dL, embora possam apresentar níveis normais de LDL-c (Borecki and Gomez 2015, Cole, Nikpay et al. 2015, Raj, Bhatti et al. 2015).

Vários estudos sobre apo B e lipídeos foram realizados com o intuito de demonstrar e comparar seu poder preditor de risco de eventos vasculares. Por exemplo, uma série de estudos prospectivos tem demonstrado superioridade da apo B em relação a alguns índices de colesterol como fator de risco de doença vascular (Berkinbayev, Rysuly et al. 2014, Cole, Nikpay et al. 2015, Raj, Bhatti et al. 2015, Rankinen, Sarzynski et al. 2015).

Na maioria dos estudos em pacientes com LES, a dislipidemia refere-se à elevada concentração de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL). Neste sentido, a prevalência de dislipidemia no LES varia entre 36,3%, no momento do diagnóstico, a 60% ou mesmo mais elevada ao fim de 3 anos de acompanhamento na coorte de 918 pacientes (Urowitz, Gladman et al. 2008). No nosso estudo apenas 16 pacientes eram portadores de dislipidemia, perfazendo 6,2% do grupo caso. No entanto, todos estes pacientes eram portadores do genótipo I/D, e assim, reafirma a associação da apolipoproteína B defeituosa e o desfecho dislipidemia.

Os mecanismos patogênicos responsáveis pelo padrão de lúpus de dislipidemia não foram completamente elucidados; no que diz respeito ao impacto da dislipidemia em doença cardiovascular, pesquisas têm mostrado que o aumento da CT é um preditor independente de eventos cardiovasculares (AVCs, incluindo infarto miocárdio e acidente vascular cerebral) bem como aterosclerose subclínica (Manzi, Meilahn et al. 1997, Bhatt, Handa et al. 2006, Boucelma, Haddoum et al. 2011, Holmqvist, Simard et al. 2015). Em particular, CT prediz o aumento da formação de placas calcificação arterial coronariana (Kiani, Post et al. 2011).

Neste sentido, o presente estudo contribuiu para uma melhor descrição da patogênese das apolipoproteínas em eventos cardiovasculares nos pacientes portadores da doença auto-imune, dado que o genótipo heterozigoto de APOB

também foi relacionado com hipertensão arterial, trombose e AVC. Adicionalmente, foi demonstrada associação significativa entre o genótipo heterozigoto e a presença de lesões discoides e fotossensibilidade. No entanto, sabe-se que na farmacoterapia, o uso de estatinas, utilizadas no tratamento da hipercolestoremia, e de eventos cardiovasculares, tem como alvo terapêutico a redução do LDL, aumento do HDL, mas registram-se como efeito adverso urticárias e secura da pele, podendo levar a fotossensibilidade.

Sendo assim, a associação estatística destes critérios ACR e o polimorfismo de APOB é um evento que precisa ser cuidadosamente avaliado, indicando aqui, uma necessidade de elucidação clínica do contexto.

7. CONCLUSÃO

Considerando os dados apresentados, o resultado deste estudo sugere uma possível associação do polimorfismo intron 1 do gene APOB com a ocorrência de LES em uma amostra brasileira. Observou-se que a presença do genótipo heterozigoto foi maior em indivíduos que possuíam a doença, a deleção de informação genético no intron 1 pode representar maior risco para LES.

Este estudo contribui para a verificação da associação do gene APOB na patogênese do LES em diferentes populações. Ressalta-se que a população brasileira é altamente miscigenada, de grande variabilidade genética e possui distribuição alélica e genotípica muito parecida com a população mundial, segundo dados do NCBI.

Além das associações significativamente estatísticas entre o genótipo heterozigoto I/D e LES, os resultados também foram capazes de encontrar associação estatística entre genótipo heterozigoto e diversas manifestações clínicas. Observa-se que a ocorrência de dislipidemia, hipertensão arterial, trombose arterial e AVC fotossensibilidade, seguem o disposto na literatura que demonstra associação de distúrbios na proteína apob e tais sintomas, mas o atual estudo complementa a elucidação da patogênese dado que contribui com a descrição do background genético. Entretanto, nossos resultados divergem da literatura ao considerar a associação de polimorfismo APOB, e possivelmente sua proteína alterada com fotossensibilidade e lesões discoides na pele.

Contudo, destaca-se que sendo o LES uma doença complexa, multifatorial, que pode apresentar variações em sua frequência, manifestação clínica e gravidade nas diferentes etnias e raças (González, Toloza et al. 2014) e que pode ter, atrelados à sua patogênese e desenvolvimento, fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, é interessante e necessário que haja maior investigação em diferentes populações para que se tenha um resultado mais sólido acerca da influência do polimorfismo do gene APOB e a ocorrência, manifestação clínica e gravidade de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

8. REFERÊNCIAS

- Amaya-Amaya, J., J. C. Sarmiento-Monroy, J. Caro-Moreno, N. Molano-González, R. D. Mantilla, A. Rojas-Villarraga and J.-M. Anaya (2013). "Cardiovascular disease in latin american patients with systemic erythematosus: a cross-sectional study and a systematic review." **Autoimmune diseases** 2013.
- Benvenuti, F., M. Gatto, M. Larosa, L. Iaccarino, L. Punzi and A. Doria (2015). "Cardiovascular risk factors, burden of disease and preventive strategies in patients with systemic erythematosus: a literature review." **Expert opinion on drug safety** 14(9): 1373-1385.
- Berkinbayev, S., M. Rysuly, A. Mussayev, K. Blum, N. Baitasova, A. Mussagaliyeva, G. Dzhunusbekova, B. Makhatov, A. Mussayev and A. Yeshmanova (2014). "Apolipoprotein gene polymorphisms (APOB, APOC111, APOE) in the development of coronary heart disease in ethnic groups of Kazakhstan." **Journal of genetic syndrome & gene therapy** 5(2): 216.
- Bhatt, S. P., R. Handa, G. S. Gulati, S. Sharma, R. M. Pandey, P. Aggarwal, L. Ramakrishnan and S. Shankar (2006). "Atherosclerosis in Asian Indians with systemic erythematosus." **Scandinavian Journal of Rheumatology** 35(2): 128-132.
- Borba, E. F., E. Bonfá, C. G. C. Vinagre, J. A. F. Ramires and R. C. Maranhão (2000). "Chylomicron metabolism is markedly altered in systemic erythematosus." **Arthritis & Rheumatism** 43(5): 1033-1040.
- Borecki, I. B. and F. Gomez (2015). "Parent-of-origin effects of the APOB gene on adiposity in young adults."
- Boucelma, M., F. Haddoum, H. Chaudet, G. Kaplanski, N. Mazouni-Brahimi, A. Rezig-Ladjouze, M. Brouri and A. Berrah (2011). "Cardiovascular risk and disease." **International angiology: a journal of the International Union of Angiology** 30(1): 18-24.
- Burel, J. G., S. H. Apte and D. L. Doolan (2016). "Systems Approaches towards Molecular Profiling of Human Immunity." **Trends in Immunology** 37(1): 53-67.
- Chen, J., M. Wu, J. Wang and X. Li (2015). "Immunoregulation of NKT Cells in Systemic Erythematosus." **Journal of Immunology Research** 2015.
- Chiodini, B. D., S. Barlera, M. G. Franzosi, V. L. Beceiro, M. Inrona and G. Tognoni (2003). "APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis." **Atherosclerosis** 167(2): 355-366.
- Cole, C. B., M. Nikpay and R. McPherson (2015). "Gene–environment interaction in dyslipidemia." **Current opinion in lipidology** 26(2): 133-138.
- Consortium, G. P. (2012). "An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes." **Nature** 491(7422): 56-65.

Esdaile, J. M., M. Abrahamowicz, T. Grodzicky, Y. Li, C. Panaritis, R. D. Berger, R. Côté, S. A. Grover, P. R. Fortin and A. E. Clarke (2001). "Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic erythematosus." **Arthritis & Rheumatism** 44(10): 2331-2337.

Frostegård, J. (2015). "Prediction and management of cardiovascular outcomes in systemic Lúpus erythematosus." **Expert review of clinical immunology** 11(2): 247-253.

Gluhovschi, C., G. Gluhovschi, L. Petrica, S. Velcirov and A. Gluhovschi (2015). "Pregnancy Associated with Systemic Erythematosus: Immune Tolerance in Pregnancy and Its Deficiency in Systemic Erythematosus—An Immunological Dilemma." **Journal of immunology research**.

Gong, Y., L. Zhang, P. Bie and H. Wang (2013). "Roles of ApoB-100 gene polymorphisms and the risks of gallstones and gallbladder cancer: a meta-analysis." **PloS one** 8(4): e61456.

González, L. A., S. M. Toloza and G. S. Alarcón (2014). "Impact of race and ethnicity in the course and outcome of systemic erythematosus." **Rheumatic Disease Clinics of North America** 40(3): 433-454.

Harrow, J., A. Frankish, J. M. Gonzalez, E. Tapanari, M. Diekhans, F. Kokocinski, B. L. Aken, D. Barrell, A. Zadissa and S. Searle (2012). "GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project." **Genome research** 22(9): 1760-1774.

Heng, H. H., S. Regan and J. Y. Christine (2016). "Genotype, environment, and evolutionary mechanism of diseases." **Environmental Disease** 1(1): 14.

Holmqvist, M., J. F. Simard, K. Asplund and E. V. Arkema (2015). "Stroke in systemic erythematosus: a meta-analysis of population-based cohort studies." **RMD open** 1(1): e000168.

Inês, L., C. Silva, M. Galindo, F. J. López-Longo, G. Terroso, V. C. Romão, I. Rúa-Figueroa, M. J. Santos, J. M. Pego-Reigosa and P. Nero (2015). "Classification of Systemic Erythematosus: Systemic International Collaborating Clinics Versus American College of Rheumatology Criteria. A Comparative Study of 2,055 Patients From a Real-Life, International Systemic Lúpus Erythematosus Cohort." **Arthritis care & research** 67(8): 1180-1185.

Jesus Cameira Croca, S. (2016). **Studies of serology and vascular ultrasound in patients with systemic erythematosus-focus on cardiovascular disease**, UCL (University College London).

Kiani, A. N., H. Fang, E. Akhter, C. Quiroga, N. Simpson, P. Alaupovic, L. S. Magder and M. Petri (2015). "Apolipoprotein-Containing Lipoprotein Subclasses and Subclinical Atherosclerosis in Systemic Erythematosus." **Arthritis care & research** 67(3): 442-446.

Kiani, A. N., W. S. Post, L. S. Magder and M. Petri (2011). "Predictors of progression in atherosclerosis over 2 years in systemic erythematosus." **Rheumatology** 50(11): 2071-2079.

Lee, T. F. (2013). **The Human Genome Project: Cracking the genetic code of life, Springer.**

Li, X., B. Xu, Y. Ma, X. Li, Q. Cheng, X. Wang, G. Wang, L. Qian and L. Wei (2015). "Clinical and laboratory profiles of primary Sjogren's syndrome in a Chinese population: A retrospective analysis of 315 patients." **International journal of rheumatic diseases** 18(4): 439-446.

Manzi, S., E. N. Meilahn, J. E. Rairie, C. G. Conte, T. A. Medsger, L. Jansen-McWilliams, R. B. D'Agostino and L. H. Kuller (1997). "Age-specific Incidence Rates of Myocardial Infarction and Angina in Women with Systemic Erythematosus: Comparison with the Framingham Study." **American Journal of Epidemiology** 145(5): 408-415.

Morais, S. A. and D. A. Isenberg (2015). "296. A Study of the Influence of Ethnicity on Serology and Clinical Features in ." **Rheumatology** 54(suppl 1): i164-i165.

Peterlin, B., B. Zorn, M. Volk and T. Kunej (2006). "Association between the apolipoprotein B signal peptide gene insertion/deletion polymorphism and male infertility." **Molecular human reproduction** 12(12): 777-779.

Phillips, C. M., L. Goumidi, S. Bertrais, M. R. Field, R. McManus, S. Hercberg, D. Lairon, R. Planells and H. M. Roche (2011). "Gene-nutrient interactions and gender may modulate the association between ApoA1 and ApoB gene polymorphisms and metabolic syndrome risk." **Atherosclerosis** 214(2): 408-414.

Pieterse, E. and J. van der Vlag (2015). "Breaking immunological tolerance in systemic erythematosus." **Chronic inflammation in conditions associated with a deficient clearance of dying and dead cells, their remnants, and intracellular constituents:** 27.

Raj, R., J. S. Bhatti, S. K. Badada and P. W. Ramteke (2015). "Genetic basis of dyslipidemia in disease precipitation of coronary artery disease (CAD) associated type 2 diabetes mellitus (T2DM)." **Diabetes/metabolism research and reviews** 31(7): 663-671.

Rankinen, T., M. A. Sarzynski, S. Ghosh and C. Bouchard (2015). "Are there genetic paths common to obesity, cardiovascular disease outcomes, and cardiovascular risk factors?" **Circulation research** 116(5): 909-922.

Rath, M. W., A. Niedzwiecki and J. C.-E. Cha (2015). Transgenic mouse expressing human apo (a) and human apo (B-100) with disabled vitamin C gene produces human Lp (a), Google Patents.

Reiss, A. B., I. Voloshyna, J. De Leon, N. Miyawaki and J. Mattana (2015). "Cholesterol Metabolism in CKD." **American Journal of Kidney Diseases** 66(6): 1071-1082.

Schur, P. H. and B. H. Hahn (2014). "Epidemiology and pathogenesis of systemic Lúpus erythematosus." **UpToDate TW (Last updated Sep 15, 2014). Maltham, WA. Accessed 8: 12.**

Starcevic, J. N., M. S. Letonja, Z. J. Praznikar, J. Makuc, A. C. Vujkovic and D. Petrovic (2014). "Polymorphisms XbaI (rs693) and EcoRI (rs1042031) of the ApoB gene are associated with carotid plaques but not with carotid intima-media thickness in patients with diabetes mellitus type 2." **Vasa** 43(3): 171-180.

Toth, P. P., P. J. Barter, R. S. Rosenson, W. E. Boden, M. J. Chapman, M. Cuchel, R. B. D'Agostino, M. H. Davidson, W. S. Davidson and J. W. Heinecke (2013). "High-density lipoproteins: a consensus statement from the National Lipid Association." **Journal of clinical lipidology** 7(5): 484-525.

Tselios, K., C. Koumaras, D. D. Gladman and M. B. Urowitz (2015). **Dyslipidemia in systemic erythematosus: just another comorbidity?** Seminars in arthritis and rheumatism, Elsevier.

Tunncliffe, D. J., D. Singh-Grewal, S. Kim, J. C. Craig and A. Tong (2015). "Diagnosis, Monitoring, and Treatment of Systemic Erythematosus: A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines." **Arthritis care & research** 67(10): 1440-1452.

Urowitz, M. B., D. Gladman, D. Ibañez, P. Fortin, J. Sanchez-Guerrero, S. Bae, A. Clarke, S. Bernatsky, C. Gordon, J. Hanly, D. Wallace, D. Isenberg, E. Ginzler, J. Merrill, G. S. Alarcón, K. Steinsson, M. Petri, M. A. Dooley, I. Bruce, S. Manzi, M. Khamashta, R. Ramsey-Goldman, A. Zoma, G. Sturfelt, O. Nived, P. Maddison, J. Font, R. van Vollenhoven, C. Aranow, K. Kalunian, T. Stoll and c. Systemic international collaborating (2008). "Accumulation of coronary artery disease risk factors over three years: Data from an international inception cohort." **Arthritis Care & Research** 59(2): 176-180.

Wilhelm, A. J. and A. S. Major (2012). "Accelerated atherosclerosis in systemic erythematosus: mechanisms and prevention approaches." **International journal of clinical rheumatology** 7(5): 527-539.

Yaniv, G., G. Twig, D. B.-A. Shor, A. Furer, Y. Sherer, O. Mozes, O. Komisar, E. Slonimsky, E. Klang and E. Lotan (2015). "A volcanic explosion of autoantibodies in systemic erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients." **Autoimmunity reviews** 14(1): 75-79.

Yu, C., M. E. Gershwin and C. Chang (2014). "Diagnostic criteria for systemic erythematosus: a critical review." **Journal of autoimmunity** 48: 10-13.

Yunis, J. (2012). **Molecular structure of human chromosomes**, Elsevier.

Zhang, X., W. Zhang, S. L. Saraf, M. Nouraie, J. Han, M. Gowhari, J. Hassan, G. Miasnikova, A. Sergueeva and S. Nekhai (2015). "Genetic polymorphism of APOB is associated with diabetes mellitus in sickle cell disease." **Human genetics** 134(8): 895-904.

Железнякова, А., Н. Лебедева, О. Викулова, В. Носиков, М. Шамхалова and М. Шестакова (2014). "РИСК РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА ДЕТЕРМИНИРОВАН ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ NOS3, APOB, KSNJ11, TCF7L2." Сахарный диабет(3).