



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA - FCE
FARMÁCIA

ANA LUIZA FERREIRA

POLIMORFISMO DO GENE MCP1 EM PACIENTES LÚPICOS COM SEROSITE.

CEILÂNDIA, DF
2016

ANA LUIZA FERREIRA

POLIMORFISMO DO GENE MCP1 EM PACIENTES LÚPICOS COM SEROSITE.

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia

Área de Concentração: Farmácia

Orientador: Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Co-orientador: Prof.^a Dra. Vivian Tais Cipriano

CEILÂNDIA, DF
2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

ANA LUIZA FERREIRA

POLIMORFISMO DO GENE MCP1 EM PACIENTE LÚPICOS COM SEROSITE.

Banca Examinadora

Orientador: Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

Prof.^a Dra. Calliandra Maria de Souza Silva
(UnB)

CEILÂNDIA, DF

2016

Ficha Catalográfica

Ferreira, Ana Luiza.

Polimorfismo do gene MCP1 em pacientes lúpicos com serosite/ Ana Luiza Ferreira – 2016.

Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Trabalho de conclusão de curso (Curso de Farmácia) –
Universidade de Brasília/ Faculdade de Ceilândia, 2016.

1. Polimorfismo. 2. MCP1. 3. Lupus. 4. Serosite.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar à frente de tudo, me dando força para seguir e chegar até aqui.

À minha amada família, principalmente minha mãe Eraildes, minha avó Belarmina, meu tio Jucimar que contribuíram em tudo para esta realização, à minha prima Natana que sempre viu tudo de perto pelos bate-papos diários, e aos demais familiares pelo apoio e carinho que tem por mim e que com certeza também foram essenciais.

Aos meus amigos da Bahia, que sempre torceram por mim e me apoiaram quando me mudei para Brasília, com um carinho especial para todos da família de D. Zelita, e eu sempre os levarei comigo. Aos meus amigos de colégio que se tornaram meus irmãos de coração, Veruska Dourado, João Moraes, Emily Rocha, Kaio Assis, Thulio Nery, Marcos Paulo Carvalho, Jader Oliveira e Patrícia Silva, que mesmo distantes sempre foram presentes e, da maneira deles, me ajudaram nessa jornada.

Aos meus amigos de curso, verdadeiros presentes que a UnB me deu, que trilharam junto comigo essa jornada árdua, que sofreram comigo em cada dificuldade e que desde o começo estiveram do meu lado, Geovanna de Oliveira Cardozo, Ana Carolina Almeida e Filipe Rhaony. Às meninas do grupo “ensardinhas” que tornaram essa etapa mais leve e divertida, além da eficiência para os trabalhos em equipe. Ao grupo “help universitários” que sempre foi muito útil. Ao meu amigo que me acompanha desde a época do CES até a UnB, Felipe Evangelista, e que esse convívio só fortaleceu nossa amizade.

Agradeço a cada professor que me transferiu seus conhecimentos e experiências, contribuindo para quem eu sou hoje como pessoa e profissional. Muito obrigada a todos os profissionais farmacêuticos que me acompanhou durante meus estágios, ensinando, na prática, o que é ser um farmacêutico ético e prestativo, nada seria dessa conquista sem vocês.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, pelo direcionamento, apoio, aprendizado e paciência. Obrigada

por acreditar em mim, por me apoiar nos momentos mais difíceis da minha graduação. Obrigada por me acolher, aconselhar e por estar ao meu lado nesse início de jornada.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune de caráter sistêmico que possui manifestações clínicas em diversos órgãos, como pele, articulações, serosas e rins, iniciadas pela produção de autoanticorpos contra antígenos nucleares, de superfície celular e proteínas do soro. Muitas citocinas estão elevadas no soro de pacientes com LES e são associadas a pior atividade da doença ou a determinadas manifestações clínicas. O gene MCP1, localizado no braço longo do cromossomo 17, codifica uma proteína da família beta das quimiocinas que são capazes de atrair células mononucleares em processos inflamatórios. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar se há associação do polimorfismo rs1024611 do gene MCP1 em pacientes lúpicos. A genotipagem foi conduzida pelo método PCR-RFLP. A análise dos dados demonstra a associação do polimorfismo do gene MCP1 em LES e o critério Serosite ($P = 0,004$). Além do fato do indivíduo ser portador do genótipo homozigoto dominante (AA) ser fator protetor para Serosite ($OR = 0,460$). Outros critérios clínicos analisados separadamente, como pleurisia, pericardite e derrame pleural, não apresentaram associação com a mutação do gene.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Polimorfismo. MCP1. Serosite.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease that has clinical manifestations in several organs, such as skin, joints, serosa and kidneys, initiated by the production of autoantibodies against nuclear antigens, cell surface and serum proteins. Many cytokines are elevated in the serum of SLE patients and are associated with worse disease activity or certain clinical manifestations. The MCP1 gene, located on the long arm of chromosome 17, encodes a beta-family protein from chemokines that are able to attract mononuclear cells in inflammatory processes. Therefore, the objective of this study was to verify if there is an association of the rs1024611 polymorphism of the MCP1 gene in lupus patients with serositis. Genotyping was conducted using the PCR-RFLP method. Data analysis demonstrates the association of the MCP1 gene polymorphism in SLE and Serositis ($P = 0.004$). In addition, the dominant homozygous (AA) genotype seen to be protective against the development of serositis ($OR = 0.460$). Other clinical criteria analyzed separately, such as pleurisy, pericarditis and pleural effusion, did not correlate with the mutation of the gene.

Keywords: Systemic lupus erythematosus. Polymorphism. MCP1. Clinical. Serositis.

I. SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1	Patogenia das Doenças Autoimunes	11
2.2	Características Gerais das Doenças Autoimunes	12
2.3	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)	14
2.3.1	Aspectos Epidemiológicos do LES	16
2.3.1.1	Fatores Genéticos	19
2.3.1.2	Fatores Enzimáticos	19
2.3.1.3	Lúpus Induzido por Drogas	20
2.3.1.4	Fatores Hormonais	21
2.4	Serosite	23
2.5	Quimiocinas	24
2.5.1	Proteína Quimiotática de Monócito-1	26
2.5.2	Polimorfismos do gene MCP1	27
3	OBJETIVOS.....	29
4	JUSTIFICATIVA.....	30
5	METODOLOGIA	31
5.1	Participantes da pesquisa.....	31
5.2	Extração de DNA e genotipagem	31
5.3	Análise estatística	33
6	RESULTADOS	34
6.1	Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs1024611 no gene MCP1	34
6.2	Frequência genotípica e manifestações clínicas em pacientes lúpicos.....	35
7	DISCUSSÃO.....	40
8	CONCLUSÃO	42
9	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Alterações genéticas têm um papel importante no aparecimento de várias doenças humanas. Mutações e polimorfismos são alterações frequentes do gene. As mutações são caracterizadas pela substituição de bases, alterações na organização ou tamanho de sequências, incorporação de DNA extracromossômico e alterações anafásicas ou da citocinese. Os polimorfismos genéticos são variações na sequência do DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. Algumas dessas variações ocorrem em sequências não-codificantes do gene, que na maioria dos casos não apresentam efeitos em sua função, outras ocorrem em sequências codificantes, levando à síntese de proteínas alteradas. Deste modo, em alguns casos, o polimorfismo do gene pode aumentar a susceptibilidade a neoplasias humanas (LIMA et al, 2006).

As doenças autoimunes (DAI) são caracterizadas por uma patogênese complexa influenciada por fatores ambientais, imunológicos e genéticos que, juntos, fortalecem seu estabelecimento. A variedade de agentes etiológicos dificulta a elucidação acerca dos mecanismos que circundam os processos autoimunes. A distribuição dessas doenças que atingem apenas 3% a 8% da população ainda é uma incógnita, uma vez que 20% a 50% dos linfócitos T e B podem reagir contra o sistema imune próprio num processo denominado autoimunidade (GOODNOW, et al, 2005; RIOUX & ABBAS, 2005).

O somatório de vários agentes etiológicos (ambientais, imunológicos e genéticos) se faz necessário para o desencadeamento e a manutenção de uma DAI. O progressivo entendimento de mecanismos genéticos e imunológicos permitirá definir os eventos cruciais para a manutenção da tolerância imunológica e, conseqüentemente, o entendimento dos fatores que aumentem a suscetibilidade às DAI (GOODNOW, et al, 2005; ABBAS; LITCHMAN, 2007).

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune sistêmica de etiologia desconhecida. As manifestações clínicas visíveis na maioria dos órgãos são iniciadas pela produção de auto-anticorpos contra antígenos nucleares, de superfície celular e proteínas de soro. Um dos mecanismos patogênicos mais frequentemente implicados no LES é a homeostase do linfócito T. A apoptose regula e mantém a

homeostase do linfócito periférico. Portanto, desordens imunológicas, tais como imunodeficiência e autoimunidade, favorecem a desregulação da apoptose de linfócitos. Tal desregulação tem sido especificamente associada ao aumento da apoptose de linfócitos T, fato que tem sido extensivamente documentada em LES (Consenso de Lúpus eritematoso sistêmico, 2008; BORBA et. al, 2008; VARANDA et. al, 2014; KLUMB, 2015).

O LES é considerado uma doença menos comum: suas taxas de prevalência nos Estados Unidos são de 20-150 casos por 100.000 habitantes. Embora sua causa não seja conhecida, admite-se que a interação de fatores genéticos, hormonais e ambientais participe do desencadeamento dessa doença, havendo perda do equilíbrio da imunorregulação celular. Muitas citocinas estão elevadas no soro de pacientes com LES e são associadas a pior atividade da doença ou a determinadas manifestações clínicas (VARANDA et. al, 2014; KLUMB, 2015). A Proteína Quimiotática de Monócito 1 é uma quimiocina responsável pela atração de células mononucleares envolvidas na resposta imune e inflamatória (ROVIN et al., 1994).

O LES causa deposição tissular de complexos antígeno-anticorpos circulantes o que leva a liberação de mediadores e ao influxo de células inflamatórias, expressando-se clinicamente em diversos órgãos, como pele, articulações, rins, sistema nervoso, coração, pulmões e as membranas serosas (APPEL et al, 2004). A serosite é um dos onze critérios de classificação do Lúpus Eritematoso sistêmico e é caracterizada pela inflamação das membranas serosas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar se há correlação entre o polimorfismo do gene MCP1 e serosite em pacientes lúpicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Patogenia das Doenças Autoimunes

O sistema imune é capaz de distinguir antígenos em próprios e não próprios, uma característica primordial. Essa característica única é realizada por linfócitos previamente recrutados e capazes de reconhecer e responder contra os antígenos estranhos e não responder contra autoantígenos. Esta ausência de resposta por parte das células do sistema imune contra os antígenos próprios é denominada

tolerância imunológica e, a perda do controle dos mecanismos que mantêm tal tolerância é referida como autoimunidade. As doenças autoimunes (DAI) são causadas por uma perda insistente dos mecanismos de controle que são responsáveis pela manutenção da tolerância aos antígenos próprios (ABBAS & LITCHMAN, 2007; RICH et.al., 2001).

A partir do momento em que o sistema imune demonstrou possuir especificidade em reconhecer antígenos e capacidade de resposta a antígenos estranhos sem a destruição do próprio, a existência de respostas autoimunes começou a ser considerada. Em 1900, Paul Ehrlich usou a expressão “horror autotóxico” para denominar as reações autoimunes. Cinquenta anos mais tarde, Macfarlane Burnet descreveria o mecanismo de seleção clonal, processo pelo qual os linfócitos autorreativos sofrem apoptose, a fim de se evitarem reações autoimunes. Atualmente, sabe-se que os processos autoimunes são decorrentes do reconhecimento de antígenos próprios por linfócitos autorreativos, e que a consequente ativação dessas células causará as lesões teciduais (ABBAS & LITCHMAN, 2007 ; GOODNOW et. al., 2007 ; TIZZARD,2014).

Desta forma, entender o processo autoimune e seus mecanismos que resultam numa considerável perda de tolerância com consequência na ativação de clones autorreativos, demonstra ser o pontapé inicial e fundamental para a compreensão e elucidação da patogênese das doenças autoimunes (GOODNOW et. al., 2007).

2.2 Características Gerais das Doenças Autoimunes

A autoimunidade demonstra ser um fator importante na causa de doenças em seres humanos, afetando cerca de 1% a 2% da população dos Estados Unidos. Contudo, o termo autoimunidade, por vezes, é utilizado erroneamente para nomear doenças que apresentam reações imunes acompanhadas de lesões teciduais, para as quais até o momento, não foi possível o estabelecimento do envolvimento do sistema imune e, tampouco, dos prováveis autoantígenos. Vale ressaltar que fatores como a simples presença de autoanticorpos, ou mesmo de linfócitos autorreativos, não implica, necessariamente, o desenvolvimento de autoimunidade. Tal detecção pode ser

entendida como consequência, e não causa, de uma lesão tecidual. Desta forma, num infarto de miocárdio, por exemplo, não se pode afirmar como fator causal a presença detectada de anticorpos contra antígenos do miocárdio, e sim como consequência da liberação de antígenos do tecido cardíaco, promovida pela lesão isquêmica, sendo a eliminação de autoantígenos cardíacos circulantes uma característica funcional nesta situação (RICH et.al., 2001; RIOUX & ABBAS, 2005).

As DAI são classificadas em sistêmicas ou órgão-específicas. Desta forma, as respostas imunes contra antígenos e/ou células de vários tecidos produzem doenças sistêmicas, ao passo que a resposta autoimune, contra antígenos de distribuição restrita a tecidos ou grupos celulares, produz doenças órgão-específicas. As DAI também podem ser classificadas pelo tipo de resposta imune responsável pelo início da doença, podendo esta ser humoral (autoanticorpos) ou celular (linfócitos T autorreativos) (WASTOLWSK et. al., 2009 ; RIOUX & ABBAS, 2005; GOODNOW et, al., 2007).

As doenças reumáticas são exemplos mais comuns das DAI. Dentre elas pode-se pontuar o lúpus eritematoso sistêmico (LES), foco do presente trabalho, a artrite reumatóide (AR), a artrite reumatóide juvenil, a síndrome de Sjögren, a esclerose sistêmica e a dermatopolimiosite. Todas as citadas são caracterizadas primariamente por resposta a um ou mais antígenos restritos a certos tecidos ou células onde vários antígenos nucleares, citoplasmáticos e de membrana celular já foram identificados como alvos da resposta autoimune (WASTOLWSK et. al., 2009 ; RIOUX & ABBAS, 2005; GOODNOW et, al., 2007).

Diversos mecanismos efetores são conhecidos por participarem das DAI. Autoanticorpos circulantes, imunocomplexos e linfócitos T autorreativos estão intimamente envolvidos no desencadeamento dessas doenças além de diversos fatores como predisposição genética, fatores hormonais, fatores ambientais e alterações imunológicas (RIOUX ; ABBAS, 2005; GOODNOW et, al., 2007).

A maioria dos estudos genéticos em DAI concentra-se na análise dos genes do MHC (human leukocyte antigen -HLA) e de outros genes envolvidos na resposta imune (GOODNOW et, al., 2007).

2.3 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de causa desconhecida e de natureza autoimune. Pode ser caracterizado pela presença de diversos autoanticorpos. De etiologia não totalmente esclarecida, o desenvolvimento da doença está ligado à predisposição genética e fatores ambientais, como luz ultravioleta e alguns medicamentos. As características clínicas são polimórficas, e a evolução costuma ser crônica, com períodos de exacerbação e remissão e, ainda pode cursar com sintomas constitucionais, artrite, serosite, nefrite, vasculite, miosite, manifestações mucocutâneas, hemocitopenias imunológicas, diversos quadros neuropsiquiátricos, hiperatividade reticuloendotelial e pneumonite (SATO, et. al., 2002; BORCHERS et.al., 2010; BORCHERS et.al., 2004; BORGES, et al., 2014).

É uma doença rara, incidindo, mais frequentemente, em mulheres jovens, ou seja, na fase reprodutiva, na proporção de nove a dez mulheres para um homem, e com prevalência variando de 14 a 50/100.000 habitantes, em estudos norte-americanos. A doença pode ocorrer em todas as raças e em todas as partes do mundo. Na população brasileira, estima-se que para cada 100.00 pessoas, há uma incidência de 8,7 casos de LES. (MANZI, 2001).

A comparação da atividade do LES entre diferentes grupos étnicos foi facilitada ao longo do tempo pelo desenvolvimento de ferramentas padronizadas e validadas para avaliar a atividade da doença, tais como o *SLE Disease Activity Index* (SLEDAI), o *European Consensus Lupus Activity Measure* (ECLAM) e o *Systemic Lupus Activity Measure* (SLAM). Para avaliar o índice de dano é utilizado no mundo todo o *Systemic Lupus International Collaboration clinics/ American College of Rheumatology Damage Index* – (SLICC/ACR). Este último avalia danos irreversíveis em 12 órgãos ou sistemas, relacionados à atividade da doença ou ao seu tratamento (SATO, et. al., 2002; BORCHERS et.al., 2010).

Na prática, para o diagnóstico de LES utilizam-se os critérios de classificação propostos pelo American College of Rheumatology, em 1982, e revisados em 1997 (SATO, et. al., 2002; BORCHERS et.al., 2010). O diagnóstico se fundamenta na presença de, pelo menos, quatro dos onze critérios descritos na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Critérios de classificação do LES baseado no *American College of Rheumatology (ACR)* revisados em 1997.

<i>Critério</i>	<i>Definição</i>
1º Rash malar	Lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
2º Rash discoide	Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3º Fotossensibilidade	Autorrelato ou observação de erupções cutâneas causadas por reação anormal à luz solar.
4º Úlceras orais/nasais	Ulceração oral ou nasofaríngea encontrada.
5º Artrite	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas.
6º Serosite	Pleurite ou pericardite.
7º Desordens renais	Proteinúria persistente >0,5 g/24 horas ou cilindrúria anormal
8º Desordens neurológicas	Convulsões ou psicose.
9º Desordens hematológicas	Anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia ou trombocitopenia.
10º Desordens imunológicas	Presença de anticorpos anti-DNA, anticorpos anti-Sm, anticorpos APL, ou falso teste positivo para sífilis.
11º Anticorpo antinuclear	Título anormal de anticorpos antinucleares.

Fonte: SATO, et. al., 2002 – adaptado.

Tais critérios acima citados foram desenvolvidos com o objetivo de uniformizar os estudos científicos da doença. A avaliação laboratorial pode auxiliar sobremaneira o diagnóstico por ocasião da constatação de alterações hematológicas (leucopenia e/ ou linfopenia e/ou plaquetopenia e/ou anemia hemolítica) e alterações do sedimento urinário. Embora raro, é possível que existam pacientes com lúpus que não apresentem quatro dos critérios de classificação, principalmente quando apresentam anticorpo específico de LES (anti-DNA nativo em títulos moderados/ altos ou anti-Sm) e apenas uma manifestação clínica (WASTOLWSK et. al., 200; SATO, et. al., 2002; BORCHERS et.al., 2010; BORCHERS et.al., 2004; BORGES, et al., 2014).

De particular importância para o diagnóstico, a pesquisa de anticorpos ou fatores antinucleares por imunofluorescência indireta, utiliza como substrato as células HEp-2, conforme proposta do II Consenso Brasileiro sobre Laudos de FAN. A positividade desse teste, embora não específico, serve como triagem em razão de

sua sensibilidade (maior que 95%), sendo altamente improvável a presença da doença se o teste resultar negativo. A pesquisa de anticorpos como anti-DNA nativo, anti-Sm e antinucleosomo podem contribuir para melhor caracterização laboratorial do quadro. Nos raros casos da doença com pesquisa de FAN negativa, particularmente com lesões cutâneas fotossensíveis, recomenda-se a realização da pesquisa de anticorpos anti-Ro/SSa (SATO, et. al., 2002; BORCHERS et.al., 2010).

Na primeira metade do século XX, o LES foi descrito como “de modo geral, uma doença progressiva que se encerra fatalmente”, com um tempo habitual de aparecimento até a morte variando de 3 meses a 1 ano. Em 1950, apenas 50% dos pacientes com lúpus sobreviviam 5 anos após o diagnóstico. Atualmente, devido a melhorias de tratamento e diagnóstico precoce, 80% a 90% dos pacientes sobrevivem pelo menos 10 anos após acometimento da patologia (MATTOS, 2013; BORCHERS et.al., 2010).

2.3.1 Aspectos Epidemiológicos do LES

Devido à complexidade de diagnóstico, obter uma incidência precisa do LES, não demonstra ser uma tarefa simples. Apesar de sua ocorrência ser mundial, esta patologia é encontrada, de maneira mais comum, em determinados países e, dentro destes países, existe a tendência de alguns grupos étnicos desenvolverem mais a condição que outros. Além disso, muitos dos estudos existentes foram baseados em populações de tamanho reduzido e os casos foram identificados na ausência de critérios de diagnóstico padronizados. Alguns dos mais recentes estudos, por exemplo, são baseados em autorrelatos ou em bancos de dados do sistema de saúde. A incidência de LES pode variar num intervalo de 1 a 10 por 100.000 pessoas por ano. Por outro lado, a taxa de prevalência varia de 17 a 48 por 100.000 pessoas na população mundial (MANZI, 2001; LAU, YIN & MOK, 2006; PONS-ESTEL et. al., 2010; TEBBE & ORFANOS, 1997).

Na população mundial, observa-se maior prevalência em afrodescendentes, afrocaribenhas, nativos norte-americanos, indianos, polinésios e chineses em comparação com a população de ascendência europeia. Em países ocidentais industrializados, houve significativo aumento de incidência. Tal fato pode ser

possivelmente explicado devido ao aumento de exposição a fatores ambientais como temperatura regional, umidade relativa do ar, exposição solar entre outros fatores (LAU, YIN & MOK, 2006; PONS-ESTEL et. al.,2010).

Nos Estados Unidos, é observada uma maior prevalência e incidência de LES em negros do que brancos com um risco relativo em torno de 3,0. Ainda nos Estados Unidos, estudos apontam que mulheres afroamericanas apresentam maior prevalência de LES quando comparadas a mulheres de outras origens étnicas. Em um estudo epidemiológico recente, considerando apenas os países europeus, Espanha, Suécia e Islândia foram os que tiveram maior prevalência de LES. Em 2001, um estudo investigou a prevalência de LES no oeste da África, onde foi relatada ser muito baixa (MANZI, 2001 ; MOLOKHIA & MCKEIGUE, 2006).

No Brasil, estima-se que para cada 100.00 pessoas, há uma incidência de 8,7 casos de LES. A mortalidade observada nestes pacientes com LES é cerca de 3 a 5 vezes maior do que a da população geral e está relacionada a atividade inflamatória da doença, especialmente quando há acometimento renal e do sistema nervoso central (SNC), a maior risco de infecções graves decorrentes da imunossupressão e, tardiamente, às complicações da própria doença e do tratamento, sendo a doença cardiovascular um dos mais importantes fatores de morbidade e mortalidade dos pacientes (MANZI, 2001).

O LES é mais comum entre mulheres, numa proporção de aproximadamente 9:1, principalmente comparando-se indivíduos em idade reprodutiva. Esse fato é atribuído a fatores hormonais e principalmente a efeitos do hormônio estrogênio. Os primeiros sintomas começam a surgir principalmente na idade reprodutiva, geralmente entre a 2ª e 4ª décadas de vida, tendo o seu pico de incidência entre 35 e 39 anos. Embora incomum, o início da doença também pode ocorrer numa idade acima dos 65 anos. Conforme relatada em um recente estudo retrospectivo realizado na Tunísia, a frequência de casos de LES em idosos foi de 5,3%, com uma média de idade de 70 anos. Idosos com LES exibem manifestações clínicas e laboratoriais distintas da forma clássica e, por esse motivo, deve ser dada maior atenção a este subgrupo para evitar diagnósticos incorretos (MANZI, 2001; LAU, YIN & MOK, 2006; PONS-ESTEL et. al.,2010; TEBBE & ORFANOS, 1997).

Na infância, as taxas de incidência e prevalência de LES são consideravelmente menores do que as taxas em adultos. A taxa anual de incidência de LES em crianças (<16 anos) foi menor do que 1/100.000 pessoas em estudos

realizados na Europa e na América do Norte PONS-ESTEL et. al., 2010; TEBBE & ORFANOS, 1997).

Nas formas e causas de morte por LES, são encontradas diferenças regionais. Em países considerados industrializados, a morte ocorre, de certa forma, em função da duração da doença. A mortalidade precoce, definida como uma morte ocorrendo dentro de 5 anos a partir do início da doença, está relacionada principalmente à atividade da doença ou a infecções. A mortalidade tardia, ocorrendo após 5 anos do início da doença, é freqüentemente devida a doenças malignas ou cardiovasculares (LAU, YIN & MOK, 2006; PONS-ESTEL et. al.,2010).

Fatores biológicos que modificam o risco de incidência ou morte por LES, como a etnicidade, em oposição aos fatores socioeconômicos e de acesso a cuidados de saúde, podem ser responsáveis pelo aumento da mortalidade por LES. Diferenças étnicas nas características clínicas do LES também têm sido notadas. A doença é geralmente menos severa em pacientes de ancestralidade europeia do que em africanos, asiáticos, hispânicos, mestiços e várias populações indígenas. O LES se desenvolve em uma idade mais precoce em afrodescendentes, com uma diferença média de idade de início de 5-10 anos. Comparados a pacientes eurodescendentes, afrodescendentes exibem uma maior prevalência de nefrite ou insuficiência renal. Estudos recentes encontraram que diferenças nas taxas de mortalidade em diferentes grupos étnicos podem ser explicadas pela prevalência de condições de comorbidade, como hipertensão ou pelo status socioeconômico, que podem afetar o acesso a cuidados de saúde ou a adesão ao tratamento medicamentoso (MANZI, 2001 ; MOLOKHIA; MCKEIGUE, 2006).

As diferenças observadas entre grupos étnicos no início do curso da doença provavelmente refletem o componente genético da etnia, embora as diferenças observadas mais tarde podem indicar o componente não-genético, como status sócio-econômico e acesso a cuidados médicos. Independente de idade e sexo, hispânicos, afro-americanos e asiáticos tendem a apresentar mais manifestações hematológicas, serosas, neurológicas e renais do que indivíduos de outras etnias (MOLOKHIA; MCKEIGUE, 2006).

2.3.1.1 Fatores Genéticos

Estudos populacionais e familiares têm demonstrado que fatores genéticos exercem influência na predisposição às DAI. A prevalência das DAI em gêmeos idênticos, por exemplo, é maior que a prevalência em gêmeos não idênticos, o que reforça a influência de fatores genéticos na patogênese, não se desconsiderando, é claro, a forte participação dos fatores ambientais (WASTOWSKI et al, 2009; RIOUX ; ABBAS, 2005).

Recentemente, o polimorfismo genético de algumas citocinas, como o TNF- α , IL-6 e IL-10, também foram relacionados ao aumento da predisposição ao desenvolvimento de LES e outras patologias de cunho inflamatório, assim como o polimorfismo do TCR e genes de imunoglobulinas (RIOUX; ABBAS, 2005; VINUESA ; COOK, 2007).

Todavia, um importante avanço para o entendimento da predisposição genética nas DAI, mais especificamente no LES, é o estudo de genes envolvidos na apoptose, onde falhas nesses genes podem alterar o mecanismo de morte celular, promovendo e/ou inibindo o processo de lesão tecidual e de liberação de substâncias pró inflamatórias (KARLSON et al, 2007).

2.3.1.2 Fatores Enzimáticos

Genes e proteínas relacionadas à metabolização/detoxificação de xenobióticos são comumente utilizados como marcadores de susceptibilidade em diversas doenças nas quais a etiologia está relacionada à exposição a fatores ambientais. Desta forma, a capacidade de biotransformação de xenobióticos pode estar relacionada com polimorfismos em genes traduzidos em enzimas de metabolização/detoxificação, e conseqüente alteração da atividade das enzimas que participam destes processo (GLESSE, 2011).

Sabe-se que fatores externos e internos têm importante papel no desenvolvimento do LES. Achados apóiam que o estresse oxidativo gerado por agentes endógenos ou exógenos é um fator importante na autoimunidade e que as espécies reativas de oxigênio (ROS) são características marcantes de respostas

inflamatórias. Evidências circunstanciais sugerem que o dano oxidativo, decorrente da baixa eficiência na detoxificação de ROS e outros metabólitos, pode contribuir para a patogênese do LES em uma série de formas, incluindo a promoção da apoptose e conseqüente exposição de antígenos intracelulares ao sistema imune, alteração das propriedades de anticorpo ligado ao DNA e danos na membrana celular (KOVACIC & JACINTHO, 2003 ; ROHR *et al.*, 2008).

Um estudo publicado em 2007 que investigou a associação de potenciais riscos ambientais com base na proximidade de residências a sítios de resíduos perigosos, e genes *gsts* com LES revelou que indivíduos homozigotos para *gstm1* nulo e *gstp1 Ile105Val* em combinação foram associados ao aparecimento precoce do LES. As proteínas codificadas pelos genes *gsts* também catalisam a detoxificação de compostos reativos de oxigênio que podem ser gerados por radiação ultravioleta na luz solar. Eurodescendentes com genótipo *gstm1* nulo homozigoto, que tiveram exposição ocupacional ao sol por um longo tempo, apresentaram um risco três vezes maior de LES do que controles (GLESSE, 2011).

Dados recentes sugeriram que polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não influenciam o risco de LES, mas a deleção de qualquer um dos genes *GSTM1* ou *GSTT1* pode influenciar certas manifestações clínicas da doença. Achados de outro estudo mostraram que a prevalência de auto-anticorpos Ro foi significativamente aumentada entre caucasianos com genótipo *GSTM1* nulo, mas foi um pouco mais fraca entre afro-americanos (KANG *et al.*, 2005, GLESSE, 2011).

Além da possível influência dos genes *GST* na predisposição ao LES, o papel dos polimorfismos dos genes *CYP* em desordens autoimunes, como o LES, também já foi demonstrado (GLESSE, 2011).

2.3.1.3 Lúpus Induzido por Drogas

A influência de drogas no desenvolvimento de processos auto-imunes tem sido demonstrada, principalmente, em síndromes semelhantes ao LES e na esclerose sistêmica (SSc). O lúpus induzido por drogas (LID) é definido como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) idiopático relacionado à exposição contínua a fármacos (por mais de 30 dias), havendo, normalmente, resolução do quadro com a suspensão do medicamento desencadeante (KARLSON *et al.*, 2007; MOTTA *et al.*, 2007).

O primeiro relato de LES induzido pelo uso de um medicamento, a sulfadiazina, foi feito em 1945 e a introdução de novas drogas na prática clínica tem sido acompanhada pelo aumento no número de medicamentos implicados como desencadeantes dessa condição patológica. Ainda não se conhecem os mecanismos envolvidos na fisiopatogenia do LID. Dados experimentais apontam para: a inibição da metilação do ácido desoxirribonucléico (DNA); a ativação de monócitos e distúrbios dos metabólitos de determinadas drogas no processo de tolerância do sistema imunitário. Em todas as situações propostas, uma modificação molecular específica desencadearia a ativação do sistema imunitário, resultando em auto-imunidade (MOTTA et al, 2007).

O lúpus induzido por drogas é mais facilmente diferenciado do lúpus idiopático. No LES induzido há principalmente comprometimento articular, e o acometimento renal e nervoso são pouco freqüentes. A doença sofre remissão com a descontinuação da exposição à droga, mas em alguns casos, é necessário o tratamento do quadro com antiinflamatórios e corticóides. As duas principais drogas até o momento associadas ao LES são a hidralazina e a procainamida (VINUESA et al, 2007; MOTTA et al, 2007).

2.3.1.4 Fatores Hormonais

São várias as evidências que sugerem a participação de fatores hormonais nas DAI. Dentre elas está o fato da sua maior incidência em mulheres (2-4:1 na AR; 5-13:1 no LES; 3:1 na esclerodermia; 9:1 na síndrome de Sjögren e 4-8:1 na doença de Graves) e a diferença na intensidade da resposta imune entre homens e mulheres. Tanto em humanos como em modelos animais é possível diferenciar o perfil de resposta imunológica entre os sexos masculino e feminino. No sexo feminino, a resposta imune celular e humoral são mais fortes, havendo maior concentração sérica de anticorpos e a rejeição a enxertos é também mais exacerbada (TIZARD, 2014; VINUESA et al, 2007).

Além disto, os hormônios sexuais têm papel central nesse dimorfismo de gênero, pois a diferença na produção de anticorpos só é observada após a maturidade sexual, e é grandemente reduzida depois de uma gonadectomia. Os estrógenos demonstraram estimular a resposta de linfócitos B e inibir respostas

mediadas por linfócitos T, ao passo que andrógenos e progesterona inibem ambas as respostas (VINUESA et al, 2007).

Com relação à influência hormonal no LES, verificou-se que andrógenos reduzem a incidência e a gravidade da doença em modelos murinos, já os estrógenos têm ação inversa. Em humanos, o uso de contraceptivos orais por pacientes acometidas por LES resulta na exacerbação dos sintomas. Em tireoidites e na anemia hemolítica os mesmos efeitos hormonais foram observados. Estudos *in vitro* demonstraram os potenciais efeitos diretos dos hormônios sobre as células do sistema imune, como a modulação da produção de citocinas por essas células, incluindo IL-1, IL-6, IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ e TGF- β (VINUESA et al, 2007; RIOUX, 2007).

A hipótese de ação direta dos hormônios sexuais na resposta imune também é reforçada pela presença de receptores para estrógeno em macrófagos sinoviais e linfócitos T CD8 circulantes. Receptores para andrógenos também foram descritos em timócitos. Contudo, a ação hormonal *in vivo* parece ser indireta, mediada por interações com outros fatores imunomoduladores, como hormônios tímicos, hormônio do crescimento e prolactina (VINUESA et al, 2007; RIOUX, 2007).

Em doenças inflamatórias como o LES, a relação direta dos hormônios pode ser explicada, por exemplo, pelo fato dos glicocorticóides demonstrarem ser a principal fonte endógena de agentes antiinflamatórios *in vivo*, interferindo em praticamente todos os estágios da resposta imune. Estrógenos e andrógenos demonstraram modular a expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo e na glândula pituitária. Recentes estudos reforçam o conceito de que os estrógenos aumentam a responsividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) pela inibição da ação dos glicocorticóides sobre o hipotálamo (VINUESA et al, 2007; RIOUX, 2007; BORBA et al, 2008).

Durante a resposta inflamatória do LES bem como em outras diversas patologias de caráter inflamatório, há respostas sistêmicas dentre as quais está a maior secreção de glicocorticóides, que tendem a reduzir o processo inflamatório. Por sua vez, o próprio processo inflamatório estimula o eixo HPA culminando na estimulação da secreção de glicocorticóides pelas adrenais. Nesse processo, os hormônios sexuais podem agir no eixo HPA, além de poderem atuar diretamente sobre a produção de citocinas e de células do sistema imune. Dessa forma, afetam a resposta dos glicocorticóides à inflamação (BORBA et al, 2008).

2.4 Serosite

O LES apresenta diversas manifestações clínicas, sendo frequente a serosite pleural e pericárdica. A serosite pode ser encontrada em aproximadamente 50% dos casos em necropsia de portadores da doença, indicando sua elevada frequência. A serosite é definida como a inflamação das membranas serosas que são membranas de proteção e de cobertura que contém no seu meio uma cavidade virtual composta de uma fina camada de líquido seroso.

A membrana serosa é composta de duas folhas: uma folha visceral que adere ao órgão e uma folha parietal situada contra a parede da cavidade. O líquido seroso permite o deslizamento de uma folha sobre a outra. A serosa tem um nome diferente em função do local onde ela se encontra: denomina-se pleura para os pulmões, pericárdio para o coração e peritônio para o aparelho digestivo. Essa inflamação pode levar à dor, acúmulo de líquido, adesão e até fibrose.

As manifestações pulmonares incluem dor torácica ventilatório-dependente, dispneia, redução do murmúrio vesicular na ausculta, derrame pleural sugerido pela macicez à percussão, confirmado em exame radiológico. O quadro cardíaco inclui dor precordial, atrito pericárdico ou abafamento de bulhas, e o derrame pericárdico pode ser confirmado por ecocardiograma. Em menos de 1% dos casos, há evolução para tamponamento cardíaco. A serosite lúpica apresenta incidência significativa, ao redor de 50% dos casos, com comprometimento pericárdico e pleural, cujas manifestações clínicas podem determinar incapacidade laborativa (DOBBIE, J. W, 1993; CHAMMAS et al., 2014).

A serosite consta como um dos onze critérios que definem o diagnóstico: serosite – pleurite (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico). Em 50% dos pacientes, ocorre o envolvimento pleural ou pulmonar, com pleurite e derrame pleural geralmente bilateral. Pode cursar com hipertensão pulmonar em 12 a 23% dos casos, de intensidade leve a moderada. A inflamação pulmonar aguda cursa com dispneia, tosse, febre, hemoptise, pleurisia, com exame radiológico do

tórax mostrando infiltrado alveolar em bases, com derrame pleural em 50% dos casos.

O derrame pleural causa dor torácica variável com os movimentos respiratórios, dispneia e atrito pleural, com exame radiológico mostrando volumoso derrame pleural que pode ser bilateral. A pericardite ocorre comumente no LES, em aproximadamente 55% dos pacientes, podendo ser clínica ou subclínica, geralmente com discreto derrame pericárdico que raramente evolui para pericardite constrictiva ou tamponamento cardíaco. Em 25% dos casos, a pericardite pode estar associada à miocardite, com espessamento valvar. A pericardite cursa com dor torácica, atrito pericárdico, abafamento de bulhas, pulso paradoxal, estase jugular, com exame radiológico do tórax mostrando aumento da área cardíaca. O ecocardiograma evidencia espessamento pericárdico e derrame pericárdico (SATO, et al., 2002).

A pericardite lúpica e a pleurisia podem apresentar-se de forma leve, quando a doença se encontra estável, não há comprometimento das funções vitais, sem repercussão funcional significativa, caracterizando a doença oligossintomática, em que as doses baixas dos medicamentos, caso estejam em uso, não desencadeiam sintomas secundários significativos. A serosite lúpica nos graus moderado a severo, com sinais e sintomas gerais e específicos exuberantes, associados a alterações laboratoriais significativas, que podem requerer tratamento em regime de internação hospitalar com prescrição de elevadas doses de corticosteróides e imunossupressores, produz significativa gama de efeitos medicamentosos secundários que se somam aos sinais e sintomas da doença, condição que determina incapacidade (CHAMMAS et al., 2014).

2.5 Quimiocinas

As quimiocinas, família de citocinas quimiotáticas, auxiliam na atividade inflamatória dada a capacidade de induzir o recrutamento e ativação de leucócitos, induzem também, a degranulação, além de levarem a liberação de mediadores inflamatórios de células efetoras como os basófilos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. Sabe-se que, em conjunto com selectinas e integrinas, as quimiocinas

agem como orientadoras da migração leucocitária, ao mesmo tempo em que ativam leucócitos, influenciam a hematopoese e modulam a angiogênese. Há, descritos, mais de 50 quimiocinas e 17 receptores.

Proteínas de 8 a 10 kD, as quimiocinas são caracterizadas pela presença de quatro resíduos de cisteína na porção amino-terminal e, dependendo da existência ou não de aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas, podem ser classificadas em quatro famílias. A família das α -quimiocinas caracteriza-se pela inserção de um aminoácido entre os dois primeiros resíduos de cisteína (cisteína-aminoácido-cisteína), já a família das β -quimiocinas, a mais diversa e numerosa, é caracterizada por ter os dois primeiros resíduos de cisteína ligados (cisteína-cisteína), enquanto que a família C é representada principalmente pela linfotactina que apresenta apenas uma cisteína, entretanto as quimiocinas da família CX3C, como a fractalkine, apresentam três aminoácidos entre as duas cisteínas (ROVIN, BH,1998; ROVIN, BH, 2000; SPRINGER, TA, 1995).

As α -quimiocinas que contêm a sequência ácido glutâmico-leucina-arginina precedendo a sequência CXC são quimiotáticas para neutrófilos, já as que não contêm essa sequência são quimiotáticas para linfócitos. As β -quimiocinas em geral não agem nos neutrófilos, mas atraem os monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. Estruturalmente, as β -quimiocinas podem ser subdivididas em duas famílias as constitutivas e as induzidas. Acredita-se que as quimiocinas CC constitutivas participam dos processos habituais de migração leucocitária enquanto que as quimiocinas CC induzidas regulam o recrutamento leucocitário em resposta aos sinais imunológicos, inflamatórios e infecciosos.

A indução da migração dos leucócitos faz-se pela ligação da quimiocina aos receptores específicos da superfície da célula-alvo os quais estão acoplados à proteína G. Na família das α -quimiocinas foram identificados quatro tipos de receptores humanos (CXCR1 a CXCR4), na família das β -quimiocinas observaram-se oito receptores humanos (CCR1 a CCR8), enquanto que na família CX3C foi identificado apenas 1 receptor humano (CX3CR1).

Os receptores de quimiocinas são expressos em diferentes linhagens de leucócitos. Alguns receptores, como o CXCR1, são predominantemente expressos

nos neutrófilos, enquanto o CCR2 é expresso principalmente nos linfócitos T, monócitos, células dendríticas, células B e basófilos. Em condições específicas, os neutrófilos também podem expressar o CCR2 21. Já a expressão de outros receptores de quimiocinas depende do estado de ativação e diferenciação das células. Por exemplo, o CXCR3 é expresso em linfócitos T ativados tipo helper 1 (Th1). Alguns receptores, no entanto, são também expressos em células não hematopoiéticas, incluindo neurônios, astrócitos, células epiteliais e endoteliais, sugerindo que esse sistema de quimiocinas pode exercer outros papéis além de quimiotaxia (NAVRATILOVA, Z., 2006).

2.5.1 Proteína Quimiotática de Monócito-1

A proteína quimiotática de monócito-1, cujo receptor é o CCR2, é uma quimiocina característica da família β cuja produção é regulada por um gene localizado no cromossomo 17, na região 17q11,2-q12. Essa quimiocina tem como propriedade atrair células mononucleares, principalmente monócitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, linfócitos e outras quimiocinas (ROLLINS et al., 1990).

O MCP-1 é produzido pelas células mesangiais renais, endoteliais, epiteliais tubulares, musculares lisas e inflamatórias (monócitos, células T, células Natural Killer), em resposta à interleucina-1 β , interferon- γ , angiotensina II, lipoproteína de baixa densidade (LDL), imunocomplexos de IgG e TNF- α , sendo que a sua expressão é inibida pela prostaglandina E (KOHAN, DE, 1992; SICA et al, 1990; JOCKS et al, 1996).

Além disso, o MCP-1 pode ativar células epiteliais tubulares humanas, induzindo a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) através da via Gi-proteína, proteína quinase C (PKC) e dependente de cálcio intracelular. Outra ação intracelular importante é a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), reconhecido como um fator de transcrição comumente envolvido na resposta imune e inflamatória. Em resumo, a ação quimiotática do MCP-1 pode exacerbar a resposta inflamatória renal pela indução de citocinas e expressão de moléculas de adesão nas células epiteliais tubulares humanas (ORTH et al, 2002).

2.5.2 Polimorfismos do gene MCP1

Nas doenças inflamatórias, a severidade da inflamação do órgão varia consideravelmente entre indivíduos que são afetados pelo mesmo processo patológico. Vários determinantes contribuem para o processo inflamatório, entre eles as quimiocinas que desempenham um papel importante no recrutamento de leucócitos para o tecido. Neste processo, admite-se que o grau de expressão da quimiocina em resposta à injúria imune, regule a intensidade da infiltração leucocitária tissular. O potencial de atividade inflamatória da quimiocina depende, entre outros fatores, da forma da sua expressão gênica, ou seja, em situações em que há polimorfismos do gene algumas formas condicionam produtos mais ativos que outros.

O gene do MCP-1 está localizado no cromossomo 17q11,2-q12. A transcrição do gene do MCP-1 encontra-se sob controle de duas áreas distintas da região 5' flanqueada do gene. A região regulatória proximal confere um nível basal de atividade transcripcional para o gene do MCP-1 e tem se mostrado respondedora a citocinas como: TNF, IL-1 β e interferon- γ . Por sua vez, a região regulatória distal localizada 1,8 a 2,7 Kb acima do sítio de transcrição inicial contém 2 fatores nucleares- κ B essenciais para indução de citocinas da expressão do MCP-1.

Foi identificado polimorfismo bialélico A/G na posição – 2518 do gene MCP-1 na região 5' flanqueada. Monócitos de indivíduos que possuem o alelo G na posição –2518 produzem mais MCP-1 que os portadores do alelo A na mesma posição. O efeito do alelo G parece ser base dependente, tendo em vista que células de indivíduos homozigotos para G na posição –2518 produzem mais MCP-1 que células de heterozigotos G/A (ROVIN, LU & SAXENA, 1999).

Tucci et al. (2004) mostraram que a presença do alelo G na posição –2518 predispõe ao desenvolvimento do LES, além de conferir maior probabilidade de desenvolver glomerulonefrite lúpica.

Entretanto Nunez-Roldán et al. (2001) não conseguiram mostrar associação entre o polimorfismo (A/G) do MCP-1 na posição –2518 e susceptibilidade para LES e associação com vasculite cutânea lúpica.

O polimorfismo do MCP-1 também foi estudado em pacientes portadores de transplante renal e observou-se que indivíduos homozigotos G na posição -2518 apresentavam maior risco de disfunção precoce do enxerto renal (KRUGER et al., 2002).

Em outras áreas clínicas, Gonzales et al.(2002) verificaram a influência da variação genética do MCP-1 na patogênese da doença adquirida pelo vírus humano da imunodeficiência (HIV-1). Adultos homozigotos G na posição -2518 apresentavam redução de 50% no risco de adquirir a infecção HIV-1, no entanto, uma vez infectados, esses pacientes apresentavam 4,5 vezes mais chance de desenvolver demência associada ao HIV-1.

Em outras doenças inflamatórias, como infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), a frequência do genótipo do MCP-1 não diferiu entre os pacientes com HCV e o grupo controle. Contudo, o alelo G foi significativamente mais frequente nos pacientes HCV com fibrose avançada e inflamação severa. Estes mesmos pacientes apresentavam níveis mais elevados de mRNA para MCP-1 no tecido hepático (MUHLBAUER et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é investigar a associação do polimorfismo do gene MCP1(rs1024611) com a ocorrência da característica clínica Serosite em pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

3.2 Objetivos específicos

- a)** Identificar a frequência do polimorfismo da região codante do gene MCP1 (-2518 A/G; rs1024611), cromossomo 17, posição 17q11,2-q12, em pacientes com LES atendidos por um hospital do Distrito Federal, Brasil;
- b)** Executar estudos de associação deste polimorfismo com os critérios clínicos ACR para classificação de Lupus Eritematoso Sistêmico, em especial ao critério Serosite.
- c)** Investigar se o polimorfismo do gene MCP1 (-2518; rs1024611) está associado com a susceptibilidade a algumas características clínicas como pleurisia, pericardite e derrame pleural, associadas a serosite.

4 JUSTIFICATIVA

Existem estudos que demonstram associação do polimorfismo de gene MCP1 com o Lúpus Eritematoso Sistêmico. Embora esses estudos apresentem significância estatística, estudos devem ser feitos em diferentes populações para que confirmem essa correlação e analisar o verdadeiro papel desse polimorfismo no desenvolvimento da doença.

5 METODOLOGIA

5.1 Participantes da pesquisa

Os participantes da pesquisa foram divididos em grupo caso e grupo controle, totalizando 385 indivíduos ao todo, sendo o grupo caso constituído de pacientes portadores de LES (257 mulheres, entre os 18 e 76 anos, idade de 37 ± 12 anos) e o grupo controle sem descrição de critérios para doenças autoimunes foram incluídos neste estudo (128 mulheres entre 18 e 74 anos, com idade média de 35 ± 13 anos).

Todas as participantes do grupo caso obedeceram ao número mínimo de critérios instituídos pela American College of Rheumatology para LES (Tabela 1, introdução). Todas as participantes são pacientes de uma unidade hospitalar do Distrito Federal.

Os prontuários dos pacientes com LES foram cuidadosamente estudados, sendo que, comprometimento renal, 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 durante 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.

A coleta de dados foi executada após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (ANEXO 1).

5.2 Extração de DNA e genotipagem

Todas as amostras foram coletadas por punção venosa para isolamento do 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 através da corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. O rendimento médio alcançado foi de

20 ng/μL. Em seguida, o DNA diluído foi submetido à estratégia PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism Polymerase Chain Reaction*), por meio dos primers específicos, descritos por Hong *et al* ¹⁰², descritos a seguir:

forward primer 5'-CCGAGATGTTCCCAGCACAG3'

reverse primer 5'-CTGCTTTGCTTGTGCCTCTT3'

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em 35 ciclos em um Termociclador Techne modelo TC-512, nas seguintes condições: 1 min a 94 °C; 30 segundos a 92 °C; 3 minutos a 59,6 °C; 1 minuto a 72 °C e finalmente 10 minutos a 72 °C.

Em cada reação foram utilizados 4,0μL de DNA genômico na concentração final de 2,5ng/μL; 2,5μL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl); 0,5μL de MgCl₂ 50mM (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 0,5μL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs; 2,5mM; (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil); 0,5μL de Taq-Polimerase, (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 5U/μL); 1,5μL de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (10μM, *IDT technologies*); completando com água Milli-Q para um volume final de 25μL por reação. O produto desta PCR foi um fragmento de 930pb.

O produto da PCR foi digerido com 1 U de enzima de restrição *Pvu II* (Invitrogen®) em câmara úmida a 37 °C durante toda a noite. Os produtos de digestão foram analisados por eletroforese a 100 V constante, durante 60 minutos em gel de agarose 1,5%, corado com 5% de brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta com o auxílio de um transiluminador (*Eagle Eyes II – Stratagene*). Para o MCP-1, o perfil genotípico A/A foi identificado por uma banda com 930 bp de tamanho. As bandas com 708 e 222 bp de tamanho foram rotuladas como perfil genotípico G/G e para as três bandas com 930, 708 e 222 bp de tamanho, considerou-se A/G

5.3 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 adotado o nível de significância de 5%.

Também foram calculadas Odds ratio (OR) das frequências alélicas e genotípicas, com intervalo de confiança (IC) de 95%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6 RESULTADOS

6.1 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs1024611 no gene MCP1

A frequência genotípica do polimorfismo rs1024611 no gene MCP1 nos controles estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P = 0,7717$). A distribuição genotípica deste polimorfismo não é estatisticamente diferente em relação aos participantes de LES quando comparados com os indivíduos controles (genótipos AA, AG e GG – 136, 109 e 12, respectivamente – contra 84, 40 e 4, respectivamente, $P = 0,059$). O alelo recessivo (G) foi encontrado em 34,4% dos indivíduos do grupo controle, enquanto que no grupo de paciente com Lúpus foi de 47,1% ($P = 0,018$; OR = 0,588). Também houve diferença significativa na frequência alélica de A e G, sendo respectivamente 381 e 133 nos indivíduos com Lúpus e de 208 e 48 no grupo controle ($P = 0,028$; OR = 0,0661).

Tabela 2 - Polimorfismo do gene MCP-1 em pacientes com LES e grupo controle – Distribuição genotípica e alélica.

MCP1 -2518 A/G	Grupo				P	OR	IC
	Lúpus		Controle				
	N	%	N	%			
AA	136	52,9	84	65,6	0,059	NA	NA
AG	109	42,4	40	31,3			
GG	12	4,7	4	3,1			
Total	257	100,0	128	100,0			
AA	136	52,9	84	65,6	0,018*	0,588	0,379-0,9136
AG+GG	121	47,1	44	34,4			
Total	257	100,0	128	100,0			
A	381	74,1	208	81,3	0,028*	0,0661	0,456-0,9578
G	133	25,9	48	18,8			
Total	514	100,0	256	100,0			

* $P < 0,005$; teste qui-quadrado; NA= não se aplica

6.2 Frequência genotípica e manifestações clínicas em pacientes lúpicos

Outro ponto é verificar se as manifestações clínicas em LES estão associadas a presença do polimorfismo. Na tabela 3, tem-se a descrição das tabelas de contingência deste estudo, omitindo-se a ausência do critério clínico- ACR. Com isto, foi possível observar que três critérios se associavam com a ausência do alelo recessivo G: serosites, nefrites, e hematológico ($P < 0,05$).

Como a frequência do genótipo AA é reduzido nos dois primeiros critérios, em relação aos demais genótipos, é possível considerar que este seja fator protetor para os dois critérios. Um estudo do impacto do polimorfismo MCP1 rs1024611 sobre o critério serosite será apresentado a seguir, bem como as características clínicas que compõe este quadro, que são pleurisia, derrame pleural e pericardite, que serão analisadas em separado.

Tabela 3: Distribuição genotípica do polimorfismo da região codante do gene MCP-1 em indivíduos com LES por sinais e sintomas clínicos apresentados.

Critério - ACR	MCP1 rs1024611				P
	AA		AG+GG		
	Contagem	N % da linha da camada	Contagem	N % da linha da camada	
ARTRITE NÃO EROSIVA - ACR	122	54,00%	104	46,00%	0,356
RASH MALAR - ACR	67	50,40%	66	49,60%	0,398
LESÕES DISCOIDES - ACR	20	51,30%	19	48,70%	0,824
FOTOSENSIBILIDADE - ACR	78	51,30%	74	48,70%	0,536
SEROSITES - ACR	35	40,20%	52	59,80%	0,004*
NEFRITES - ACR	41	31,50%	89	68,50%	<0,001*
HEMATOLÓGICO - ACR	119	55,90%	94	44,10%	0,037*
ÚLCERAS ORAIS/NASAIS - ACR	23	46,90%	26	53,10%	0,351
FAN - ACR	135	52,90%	120	47,10%	0,934
ALTERAÇÃO IMUNOLÓGICA - ACR	86	49,70%	87	50,30%	0,139
PSICOSE CONVULSÕES - ACR	16	47,10%	18	52,90%	0,462

* $P < 0,005$; teste qui-quadrado;

6. 2. 1 Serosite

A partir da análise da distribuição do polimorfismo rs1024611 em pacientes lúpicos com serosite (tabela 4), foi possível notar que dos 87 pacientes que apresentam serosite, 52 possuem o alelo mutado (AG+GG), correspondendo à maioria (59,8%), essa diferença é estatística conforme demonstrado na tabela 5. A tabela 6 mostra que o fato do indivíduo portar o genótipo AA é fator protetor para Serosite (OR < 1,00).

Tabela 4: Análise da distribuição do polimorfismo MCP-1 rs1024611 em pacientes com Serosite

		MCP-1 rs 1024611		TOTAL
		AA	AG+GG	
SEROSITES- ACR	SIM CONTAGEM	35	52	87
	% em SEROSITES – ACR	40,2%	59,8%	100%
	NÃO CONTAGEM	101	69	170
	% em SEROSITES – ACR	59,4%	40,6%	100%
TOTAL	CONTAGEM	136	121	257
	% em SEROSITES – ACR	52,9%	47,1%	100%

Tabela 5: Teste Qui-quadrado

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1lado)
Qui-quadrado de Pearson	8,499 ^a	1	,004		
Correção de continuidade ^b	7,746	1	,005		
Razão de verossimilhança	8,527	1	,003		
Teste exato de Fisher				,004	,003
Associação linear por linear	8,466	1	,004		
N de casos válidos	257				

Tabela 6: Estimativa de risco dos genótipos AA/AG+GG para Serosite

	Valor	Intervalo de Confiança de 95%	
		Inferior	Superior
Razão de chances para SEROSITES-ACR (Sim/Não)	,460	,272	,779
Para grupo MCP1 rs1024611 = AA	,677	,509	,900
Para grupo MCP1 rs1024611 = AG+GG	1,473	1,146	1,892
N de casos válidos	257		

6. 2. 2 Pleurisia

O critério clínico Pleurisia isolado foi encontrado em 57,1% dos pacientes com o alelo mutante (G) contra 42,9% com o genótipo AA (tabela 7), porém essa associação não apresentou diferença estatística como mostra a tabela 8. Para Pleurisia, o genótipo homozigoto dominante não demonstrou ser fator protetor (tabela 9).

Tabela 7: Análise da distribuição do polimorfismo MCP-1 rs1024611 em pacientes com Pleurisia

		MCP-1 rs 1024611		TOTAL	
		AA	AG+GG		
PLEURISIA	SIM	CONTAGEM	21	28	49
		% em PLEURISIA	42,9%	57,1%	100%
	NÃO	CONTAGEM	115	93	208
		% em PLEURISIA	55,3%	44,7%	100%
TOTAL		CONTAGEM	136	121	257
		% em PLEURISIA	52,9%	47,1%	100%

Tabela 8: Teste Qui-quadrado

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1lado)
Qui-quadrado de Pearson	2,460 ^a	1	,117		
Correção de continuidade ^b	1,986	1	,159		
Razão de verossimilhança	2,459	1	,117		
Teste exato de Fisher				,152	,079
Associação linear por linear	2,450	1	,118		
N de casos válidos	257				

Tabela 9: Estimativa de risco dos genótipos AA/AG+GG para Pleurisia

	Valor	Intervalo de Confiança de 95%	
		Inferior	Superior
Razão de chances para PLEURISIA (Sim/Não)	,607	,324	1,137
Para grupo MCP1 rs1024611 = AA	,775	,549	1,095
Para grupo MCP1 rs1024611 = AG+GG	1,278	,960	1,701
N de casos válidos	257		

6. 2. 3 Derrame Pleural

54% dos pacientes lúpicos que apresentaram derrame pleural portavam o alelo mutado e 46% possuíam o genótipo AA, como demonstra a tabela 10, porém a tabela 11 mostra que essa diferença não é estatística. A tabela 12 não mostra fator de proteção do genótipo AA.

Tabela 10: Análise da distribuição do polimorfismo MCP-1 rs1024611 em pacientes com Derrame Pleural

		MCP-1 rs 1024611		TOTAL
		AA	AG+GG	
DERRAME PLEURAL	SIM CONTAGEM % em	29	34	63
	DERRAME PLEURAL	46,0%	54,0%	100%
TOTAL	NÃO CONTAGEM % em	107	87	194
	DERRAME PLEURAL	55,2%	44,8%	100%
CONTAGEM % em		136	121	257
DERRAME PLEURAL		52,9%	47,1%	100%

Tabela 11: Teste Qui-quadrado

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1lado)
Qui-quadrado de Pearson	1,589 ^a	1	,208		
Correção de continuidade ^b	1,244	1	,265		
Razão de verossimilhança	1,587	1	,208		
Teste exato de Fisher				,246	,132
Associação linear por linear	1,582	1	,208		
N de casos válidos	257				

Tabela 12: Estimativa de risco dos genótipos AA/AG+GG para Derrame Pleural

	Valor	Intervalo de Confiança de 95%	
		Inferior	Superior
Razão de chances para DERRAME PLEURAL (Sim/Não)	,694	,392	1,227
Para grupo MCP1 rs1024611 = AA	,835	,621	1,122
Para grupo MCP1 rs1024611 = AG+GG	1,203	,913	1,586
N de casos válidos	257		

6. 2. 4 Pericardite

Dos 36 pacientes que apresentaram pericardite, 61,1% portavam genótipo mutado, contra 38,9% que possuíam o genótipo homozigoto recessivo (tabela 13). Porém, a tabela 14 mostra que não há significância estatística nessa associação. O fato de o indivíduo possuir o genótipo AA não é fator protetor (tabela 15).

Tabela 13: Análise da distribuição do polimorfismo MCP-1 rs1024611 em pacientes com Pericardite

		MCP-1 rs 1024611		TOTAL
		AA	AG+GG	
PERICARDITE	SIM	14	22	36
	CONTAGEM % em PERICARDITE	38,9%	61,1%	100%
TOTAL	NÃO	122	99	221
	CONTAGEM % em PERICARDITE	55,2%	44,8%	100%
		CONTAGEM	121	257
		% em PERICARDITE	47,1%	100%

Tabela 14: Teste Qui-quadrado

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1lado)
Qui-quadrado de Pearson	3,307 ^a	1	,069		
Correção de continuidade ^b	2,685	1	,101		
Razão de verossimilhança	3,315	1	,069		
Teste exato de Fisher				,074	,051
Associação linear por linear	3,294	1	,070		
N de casos válidos	257				

Tabela 15: Estimativa de risco dos genótipos AA/AG+GG para Pericardite

	Valor	Intervalo de Confiança de 95%	
		Inferior	Superior
Razão de chances para PLEURISIA (Sim/Não)	,516	,251	1,062
Para grupo MCP1 rs1024611 = AA	,704	,460	1,079
Para grupo MCP1 rs1024611 = AG+GG	1,364	1,012	1,839
N de casos válidos	257		

7 DISCUSSÃO

As quimiocinas auxiliam na resposta inflamatória, pois são capazes de induzir o recrutamento e ativar populações de leucócitos, induzem, também, a degranulação, além de levar à liberação de mediadores inflamatórios de células efetoras. A Proteína Quimiotática de Monócito-1 (MCP1) é uma quimiocina da família β com propriedades de atrair células mononucleares, principalmente monócitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, linfócitos e outras quimiocinas (Springer, T. A., 1995). Outra ação intracelular do MCP1 é a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B), o qual é um fator de transcrição envolvido na resposta imune e inflamatória (Orth et al., 2002).

Alterações genéticas têm um papel importante no aparecimento de várias doenças humanas. Mutações e polimorfismos são alterações frequentes do gene. As mutações são caracterizadas pela substituição de bases, alterações na organização ou tamanho de sequências, incorporação do DNA extracromossômico e alterações anafásicas ou da citocinese. Os polimorfismos genéticos são variações na sequência do DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. Algumas dessas variações ocorrem em sequências não-codificantes do gene, que na maioria dos casos não apresentam efeitos em sua função, outras ocorrem em sequências codificantes, levando à síntese de proteínas alteradas. Deste modo, em alguns casos, o polimorfismo do gene pode aumentar a susceptibilidade a neoplasias humanas (LIMA et. al. 2006).

As mutações nos genes MCP1 pode intensificar a ação de atração de células inflamatórias para um órgão específico, por isso há a importância deste estudo em pacientes com serosite, a qual é caracterizada pela inflamação das membranas serosas. No LES, quando há a deposição dos imunocomplexos nos tecidos, são ativadas as cascatas do sistema complemento e da coagulação, a infiltração de leucócitos, a liberação de enzimas proteolíticas e de citocinas reguladoras tanto da proliferação glomerular quanto da síntese de matriz extracelular, desencadeando, assim, a resposta inflamatória tecidual (Cameron et al.1999).

De acordo com Rovin et al.(1999) monócitos de indivíduos que possuem o alelo G na posição -2518 produzem mais MCP-1 que os portadores do alelo A na mesma posição. O efeito do alelo G parece ser base dependente, tendo em vista que células de indivíduos homozigotos para G na posição -2518 produzem mais MCP-1 que células de heterozigotos G/A.

Nesse trabalho, foi explorada a possibilidade de a frequência de um polimorfismo do gene MCP1 estar relacionada com manifestações clínicas dos pacientes portadores da doença (Tabela 3). A partir desse resultado, a característica clínica escolhida para estudo foi serosite.

Este estudo demonstrou associação do polimorfismo rs1024611 como fator de predisposição para o Lúpus Eritematoso Sistêmico resultado que coincide com estudos feitos por Tucci et al. (2004) em uma população espanhola e diverge de alguns estudos feitos por Nunez-Roldán et al. (2001) e Liao et al. (2004) os quais não demonstraram associação do polimorfismo do MCP1 com a predisposição ao LES.

Segundo Sato et al.(2002), a Serosite é caracterizada pela presença de pleurisia e/ou pericardite que são encontradas em cerca de 50% dos pacientes durante a evolução do LES. Com base nas tabelas 3 e 4, foi possível notar que a maioria (59,8%) dos pacientes portadores de serosites apresentaram o genótipo mutado (GG+AG) com diferença estatística e a tabela 6 demonstra que o genótipo AA é fator de proteção para o critério clínico Serosite (OR < 1). Por outro lado, as características associadas a serosite, tais como pleurisia/pericardite/derrame pleural, analisadas separadamente não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$), não demonstrando associação entre a mutação do gene MCP1 com tais características clínicas, tal resultado pode estar associada ao tratamento, porém estudos mais específicos devem ser feitos.

8 CONCLUSÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença sistêmica, capaz de acometer diversos tecidos, com deposição tissular de complexos antígeno-anticorpos circulantes o que leva a liberação de mediadores inflamatórios e ao influxo de células inflamatórias. Assim, a ação quimiotática do MCP1 pode exacerbar a resposta inflamatória pela indução de citocinas e expressão de moléculas de adesão nas células humanas.

Por outro lado, o presente estudo conseguiu demonstrar a associação do polimorfismo rs1024611 no gene MCP1 e pode indicar susceptibilidade ao LES, e que, nas associações com os critérios clínicos ACR, a presença de homozigose dominante (AA) em LES como fator de proteção para a Serosite. Em contrapartida, as manifestações clínicas associadas à serosite, tais como pleurisia, pericardite e derrame pleural, não apresentaram associação ao polimorfismo MCP1 -2518 A/G.

9 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and molecular immunology**. 6a ed. Philadelphia, Saunders Company, 2007.

APPEL GB, RADHAKRISHNAN J, D'AGATI VD. Secondary Gomerular Disease. In: Barry M. Brenner. **Brenner & Rector's the Kidney**. 7 th edição. Philadelphia-USA: Saunders; 2004. p. 1382-1397.

BORBA, E. F. ; LATORRE, L. C.; BRENNOL, J.C.T.; KAYSER, C.; SILVA, N. A.; ZIMMERMANN, A. F.; PADUA, P.M.; COSTALLAT, L. T.; BONFÁ, E.; SATO, E. I. Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n.4, p. 196-207, jul/ago, 2008

BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L.;SHOENFELD, Y. GERSHWIN, M.E. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Ver**. 2004;3:423-453.

BORCHERS, A.T.; NAGUWA, S.M. SHOENFELD, Y. GERSHWIN, M.E. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Ver**. 2010; 9:A277-287.

BORGES, M. C. *et al*. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e lúpus eritematoso sistêmico: o que sabemos? **Rev. bras. reumatol**. 2014; 54(6): 459–466.

CAMERON JS. Lupus nephritis. **J Am Soc Nephrol**. 1999; 10:413-24.

Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. **rev bras reumatol** 48.4 (2008): 196-207.

CHAMMAS, Nacy SEGALLA Rosa, and CINTRA, Raquel Barbosa. "Avaliação médico-pericial da capacidade laborativa dos portadores de serosite lúpica." **Saúde, Ética & Justiça** 19.1 (2014): 12-20.

DOBBIE, J. W. "Serositis: comparative analysis of histological findings and pathogenetic mechanisms in nonbacterial serosal inflammation." **Peritoneal dialysis international** 13.4 (1993): 256-269.

GLESSE, N. **Estudo dos polimorfismos dos genes de enzimas de metabolização/detoxificação na susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico**. Diss. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2011.

GONZALES E, ROVIN BH, SEN L, COOKE G, DHANDA R, MUMMIDI S, KULKARNI H, BAMSHAD MJ, TELLES V, ANDERSON SA, WALTER EA, STEPHAN KT, DEUCHER M, MANGANO A, BOLOGNA R, AHUJA SS, DOLAN MJ, AHUJA SK. HIV 1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increase monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002; 99:13795-800.

GOODNOW, C.C.; SPRENT, J.; GROTH, B.F.; VINUESA, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature**, 435:590-7, 2005.

JOCKS T, ZANHER G, FREUDENBERG J, WOLF G, THAISS F, HELMCHEN U, STAHL RAK. Prostaglandin E1 reduces the glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti- thymocyte antibody-induced glomerular injury. **J Am Soc Nephrol**. 1996; 7:897-905.

KANG, T.Y.; EL-SOHEMY,A. COMELIS, M.C.;ENY, K.M, BAE, S.C. Glutathione Stransferase genotype and risk of systemic lupus erythematosus in Koreans. **Lupus** 2005;14:381-4.

KARLSON, E.W.; WATTS, J.; SIGNOROVICH, J.; BONETTI, M.; WRIGHT, E.; COOPER, G.S.; McALINDON, T.E.; COSTENBADER, K.H.; MASSAROTTI, E.M.; FITZGERALD, L.M. Effect of glutathione S-transferase polymorphisms and proximity to hazardous wastesites on time to systemic lupus erythematosus diagnosis: results from the Roxbury lupus project. **Arthritis Rheum.** 2007; 56:244-254.

KLUMB, E. M. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o diagnóstico, manejo e tratamento da nefrite lúpica. **Rev. bras. reumatol.** 2015; 55(1): 1–21.

KOHAN DE. Production of endothelin-1 by rat mesangial cells: regulation by tumor necrosis factor. **J Lab Clin Med.** 1992; 119:477-84.

KOVACIC, P.; JACINTHO, J.D. Systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases from endogenous and exogenous agents: unifying theme of oxidative stress. **Mini Rev Med Chem.** 2003;3:568-75.

KRUGER B, SCHROPPEL B, ASHKAN R, MARDER B, ZULKE C, MURPHY B, KRAMER BK, FISCHEREDER M. A Monocyte Chemoattractant Protein – 1(MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation. **J Am Soc Nephrol.** 2002; 13:2585 – 9.

LAU, C.S; YIN, G. MOK, M.Y. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. **Lupus.** 2006; 15:715-719.

LIMA, JACQUELINE MIRANDA de, et al. "Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal." **Arquivos de Gastroenterologia**(2006).

MANZI, S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Am J Manag Care.** 2001; 7:S474-479.

MATTOS, P.S.L. **Atividade de doença em pacientes com LES que desenvolvem insuficiência renal terminal: revisão sistemática da literatura.** 2013.

MOLOKHIA, M.; McKEIGUE, Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations. **Lupus.** 2006;15:827-32.

MOTTA et. Al. Lúpus Induzido por Drogas: Da Imunologia Básica à Aplicada **Rev Bras Reumatol**, v. 47, n.6, p. 431-437, nov/dez, 2007

MUHLBAUER M, BOSSERHOFF AK, HARTMANN A, THASLER WE, WEISS TS, HERFARTH H, LOCK G, SCHOLMERICH J, HELLERBRAND C. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. **Gastroenterology.** 2003; 125:1085-93.

NAVRATILOVA Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/ chemokine receptors genes and their association with diseases. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.** 2006; 150:191-204.

ORTH SR, VIEDT C, DECHEND R, FEI J, HANSCH GM, KREUZER J. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor – κ B and activating protein – 1. **J Am Soc Nephrol.** 2002; 13:1534-47.

PONS-ESTEL, G.J.; ALRCON, G.S.; SCOFIELD, L.; REINLIB, L.; COOPER G.S. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum.** 2010; 39:257-268

RICH, R.R.; FLEISHER, T.A.; SHEARER, W.T.; KOTZIN, B.L.; SCHROEDER, H.W.Jr. **Clinical Immunology. Principles and Practice.** 2a ed. Mosby, 2001.

RIOUX, J.D.; ABBAS, A.K. Paths to understanding the genetic basis of autoimmunity disease. **Nature**, 435:584-8, 2005.

ROHR, P.VEIT, T.D.; SCHEIBEL, I.; XAVIER, R.M.; BRENOL, J.C.; CHIES, J.A. KVITKO, K. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to Juvenile idiopathic arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. 2008; 26:151-155.

ROLLINS BJ, YOSHIMURA T, LEONARD EJ, POBER JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. **Am J Pathol**. 1990; 136:1229-33.

ROVIN BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. **Biochem Biophys Res Commun**. 1999; 259:344-8.

SATO, Emilia Inoue et al. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Rev Bras Reumatol**, v. 42, n. 6, p. 362-70, 2002.

SICA A, WANG JM, COLOTTA F, DEJANA E, MANTOVANI A, OPPENHEIM JJ, LARSEN CG, ZACHARIAE CO, MATSUSHIMA K. Monocyte chemoattractant and activating factor gene expression induced in endothelial cells by il-1 and tumor necrosis factor. **J Immunol**. 1990; 144:3034-38.

SPRINGER TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu Rev Physiol**. 1995; 57:827-72.

TEBBE, B.; ORFANOS, C.E. Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus. **Lupus**. 1997; 6:96-104..

TIZARD, Ian. *Imunologia veterinária*. Elsevier Brasil, 2014.

TUCCI M, BARNES, EV, SOBEL ES, CROKER BP, SEGAI MS, REEVES WH, RICHARDS HB. Strong association of a functional polymorphism in the

monocyte chemoattractant protein-1 promoter gene with lupus nephritis. **Arthritis Rheum.** 2004; 50:1842-9.

VARANDA et al. **Treatment of coexistent psoriasis and lupus erythematosus.** American Academy of Dermatology, INC. 2014.

VASQUEZ, M. L. M. et al. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO. **Medicamentos na prática clínica**, p. 45, 2010.

VINUESA, C.G.; COOK, M.C. Gender and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, 6(3):366-72, 2007.

VINUESA, C.G.; COOK, M.C. Genetic analysis of systemic autoimmunity. **Novartis Found Symp**, 281:103-20, 2007.

WASTOWSKI, I. J.; CARVALHO, I. F. ;DONADI E. A. "Patogenia das Doenças Auto-imunes.",2009.



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 309/2009

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 353/09 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO LUPUS ERMATOSO SISTÊMICO

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 03/11/2011

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 03 de novembro de 2009.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesedf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE