



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA - FCE
FARMÁCIA

ALINE VIEIRA DE ORNELAS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE CYP1A1 E ASSOCIAÇÕES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

CEILÂNDIA, DF
2015

ALINE VIEIRA DE ORNELAS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE CYP1A1 E ASSOCIAÇÕES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

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
2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

ALINE VIEIRA DE ORNELAS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DE CYP1A1 E ASSOCIAÇÕES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

Banca Examinadora

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

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(UniCEUB)

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

CEILÂNDIA, DF
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo sopro de vida e, aqui, ofereço a minha vida em Tuas mãos. Obrigada Deus pela benção a mim concedida.

Aos meus queridos pais, Maria de Jesus Vieira Ornelas e José Aparício de Ornelas e Sigefredo de Sousa Santos, meus amados irmãos Arianna e Domingos Vieira dos Santos, pelo estímulo, paciência, incentivo, e por terem me permitido dedicar aos estudos desde o início. Obrigado por tudo.

Ao meu filho, Brenno Ornelas de Mendonça, pelo amor incondicional e carinho. Obrigada pela paciência em suportar minhas ausências durante vários momentos na graduação.

À toda minha família, em especial aos meus cunhados Antônia Marta e Auridimar Junior por terem contribuído para a minha formação ao longo dos últimos anos com tanto incentivo.

Aos meus amigos de curso que trilharam junto comigo essa jornada árdua, que sofreram comigo em cada dificuldade. Obrigada Henrique Rodrigues por acreditar em mim quando nem mesmo eu acreditava, por me incentivar e me dar a força nem eu mesma sabia que possuía. Desejo muita sorte na sua jornada. À minha grande amiga Aline Rodrigues Bezerra pelo apoio incessante. Obrigada por entenderem minhas ausências, minhas chateações. Contem comigo sempre.

Agradeço a cada professor que me transferiu seus conhecimentos e me proporcionou tantas experiências, me transformando, aos poucos, em quem eu sou hoje. Muito obrigada, 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, em especial aos Drs. Luzitano Ferreira e Carlos Barros pelas amostras dos pacientes.

RESUMO

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune de caráter sistêmico que possui manifestações clínicas em diversos órgãos iniciadas pela produção de autoanticorpos contra antígenos nucleares, de superfície celular e proteínas do soro. Fatores genéticos contribuem para a suscetibilidade e prognóstico desta disfunção. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar a distribuição dos Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no gene CYP1A1 (variante CYP1A1*2A -rs4646903; 3801T>C) em pacientes portadores de LES. A genotipagem foi conduzida pelo método PCR-RFLP. A análise dos dados aponta que a frequência do genótipo heterozigoto C/T para CYP1A1 diferiu significativamente entre os portadores de LES e os controles (P = 0,026). Verificou-se a que a distribuição deste genótipo relacionou-se com algumas manifestações clínicas *rash* malar - ACR (74,4%) (P = 0,000; OR = 10.97; IC = 6.13- 19.64); fotossensibilidade (60,5%; P = 0,000; OR = 3.34; IC = 1.98 - 5.65); úlceras orais/ nasais (63,3%) (P = 0,02; OR = 2,08; IC = 1.09 - 3.96) e alterações imunológicas (43,9%; P = 0,030; OR = 0,55; IC = 0,33 – 0,94), sendo que apenas neste último, o heterozigoto parece ser fator protetor contra a característica clínica indesejável. Estes resultados indicam que ambos SNPs descritos estão associados com a susceptibilidade e o prognóstico de LES.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Polimorfismo. CYP1A1. Manifestações clínicas.

ABSTRACT

The Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune systemic disease that has clinical manifestations in various organs initiated by the production of autoantibodies against nuclear antigens, cell surface and whey proteins. Genetic factors contribute to susceptibility and prognosis of this disorder. Therefore, the aim of this study was to identify the distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CYP1A1 gene (CYP1A1 * 2A variant -rs4646903; 3801T> C) in patients with SLE. Genotyping was performed by PCR-RFLP method. Data analysis shows that the frequency of heterozygous genotype C/T for CYP1A1 differ significantly between patients with SLE and controls ($P = 0.026$). It was found that the distribution of this genotype was related to some clinical manifestations malar rash - ACR (74.4%) ($P = 0.000$; OR = 10.97, CI = 6.13- 19.64); photosensitivity (60.5%; $P = 0.000$; OR = 3.34, CI = 1.98 - 5.65); oral / nasal ulcers (63.3%) ($p = 0.02$, OR = 2.08, CI = 1.9 - 3.96) and immunological changes (43.9%; $p = 0.030$; OR = 0.55, CI = 0.33 to 0.94), and only in the latter, the heterozygote appears to be a protective factor against undesirable clinical feature. These results indicate that both described SNPs are associated with SLE susceptibility and prognosis.

Keywords: Systemic lupus erythematosus. Polymorphism. CYP1A1.. Clinical manifestations.

I. SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
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)	13
2.3.1	Aspectos Epidemiológicos do LES.....	16
2.3.2	Fatores de Predisposição.....	18
2.3.2.1	Fatores Genéticos.....	18
2.3.2.2	Fatores Hormonais.....	19
2.3.2.3	Lupus Induzido por Drogas	20
2.3.2.4	Fatores Enzimáticos.....	21
2.4	CYP: A Super Família do Citocromo P450.....	22
2.4.1	Família CYP e o Metabolismo de Xenobióticos	24
2.4.2	CYP e Toxicidade: Inibição e Indução Enzimática como Fator de Toxicidade e Proteção	29
2.4.3	Polimorfismos Genéticos nas Enzimas da Família CYP	31
2.4.4	Polimorfismos de CYP1A1	32
2.5	Polimorfismos de CYP como Fator de Indução ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).....	32
3	METODOLOGIA.....	34
3.1	Participantes da pesquisa.....	34
3.2	Extração de DNA e genotipagem	34
3.3	Análise estatística.....	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1 em LES	37
4.2	Frequência genotípica e manifestações clínicas em pacientes com LES.....	38
5	DISCUSSÃO.....	40

6	CONCLUSÃO.....	42
7	REFERÊNCIAS	43
1	ANEXO I	49
2	Anexo 2.....	50

1 INTRODUÇÃO

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 das 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 ([7,8]. 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: as taxas de prevalência relatada de LES 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)..

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 pode estar relacionada com polimorfismos nos genes das enzimas de metabolização/detoxificação, e conseqüente alteração da atividade das enzimas que participam deste processo. 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 uma marcada característica de respostas inflamatórias (GLESSE, 2011, VINUESA, 2007).

Estudos recentes associam a possível influência dos genes *GST* na predisposição ao LES em indivíduos homozigotos para *GSTM1* nulo e *GSTP1 Ile105Val*. Além disto, o papel dos polimorfismos dos genes *CYP* em desordens autoimunes, também já foi demonstrado. Com isso, fatores genéticos têm papel cada vez mais importante no diagnóstico, tratamento e prognóstico de doenças autoimunes, como o LES (KARLSON et.al, 2007).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi identificar a distribuição dos Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) na região 3' não-codante do gene *CYP1A1* em pacientes portadores de LES, e compará-los com um grupo controle, em uma população brasileira. Também foi investigado se o polimorfismo dos genes está associado com a suscetibilidade à patologia autoimune e suas características clínicas, porque há possibilidade de que esse contribua para o LES.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Patogenia das Doenças Autoimunes

O sistema imune possui em sua capacidade 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 podemos 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 (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 (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).

2.3.2 Fatores de Predisposição

2.3.2.1 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).

2.3.2.2 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 exacerbção 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).

2.3.2.3 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).

2.3.2.4 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).

2.4 CYP: A Super Família do Citocromo P450

O citocromo P450 (CYP) é uma superfamília de enzimas heme-tiolato que desempenha papel central no metabolismo oxidativo, peroxidativo e redutivo de compostos endógenos, incluindo ácidos graxos, esteróides, leucotrienos, prostaglandinas, ácidos biliares e vitaminas lipossolúveis. Muitas dessas enzimas expressas em níveis elevados no retículo endoplasmático dos hepatócitos, são

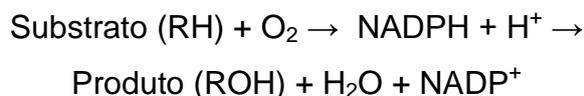
responsáveis pela detoxificação de compostos exógenos, como diversos fármacos, carcinógenos e contaminantes ambientais (NELSON et al, 1996).

As CYPs são, preferencialmente, expressas na área centro lobular do fígado e, devido a tal fato, possuem implicações toxicológicas, uma vez que a área centro lobular constitui uma região muito sensível a danos causados pelo uso de drogas e álcool, substratos dessas enzimas. Esta família existe por 1,5 bilhão de anos e é composta por várias subfamílias, que são classificadas de acordo com a composição e seqüência dos aminoácidos que as compõem, sendo amplamente distribuída entre os procariotos e eucariotos (NELSON et al, 1996 ; ANTONA & SUNDBERG, 2006).

A nomenclatura para o citocromo P450 (CYP) utiliza a designação "CYP" seguido de um número indicando a família de genes (para um gene ser inserido na mesma família, a sua seqüência de aminoácidos deve ser idêntica em mais de 40%), seguido por uma letra que indica a subfamília (mais de 55% da sua seqüência de aminoácidos idêntica) e o número de genes. O mesmo número de gene número significa que os genes têm a mesma função e são altamente conservados (ANTONA & SUNDBERG, 2006; GONZALEZ, 1992).

Desta forma, o nome Cyp 450 é derivado da capacidade que a proteína saturada com monóxido de carbono possui de absorver a luz no comprimento de onda de 450nm (ANTONA & SUNDBERG, 2006).

A reação básica de monooxigenação catalizada pelas CYP é resumida pela seguinte equação (NELSON et al, 1996):



As enzimas do citocromo P450 estão localizadas no retículo endoplasmático liso (SER) de diferentes tipos de células. As principais subfamílias encontradas em animais e seres humanos são CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP3A, e CYP4A (NELSON et al, 1996).

2.4.1 Família CYP e o Metabolismo de Xenobióticos

Refere-se a metabolismo (do grego *metabolismos*, que significa “mudança”, troca) como o conjunto de transformações que as substâncias químicas sofrem no interior dos organismos vivos. O metabolismo das drogas refere-se ao processo metabólico das drogas, sua modificação bioquímica ou degradação, geralmente através de sistemas enzimáticos especializados. O metabolismo das drogas geralmente converte compostos químicos lipofílicos em produtos mais prontamente excretados. Sua taxa é um determinante importante da duração e intensidade da ação farmacológica das drogas (VASQUEZ ,2010; WALSH et al, 2013; ZANGER et al, 2008)

A variabilidade individual na resposta ao medicamento pode ser atribuída a uma consequência de múltiplos fatores tais como: idade, gênero, massa corpórea, funcionamento renal e hepático, terapia concomitante, natureza da doença, etnia, fatores genéticos e ambientais. Estima-se que a genética pode ser a razão de 20 a 95 % da variabilidade na biodisponibilidade da droga e em seus efeitos. O fármaco, uma vez administrado, é absorvido e distribuído até seu sítio de ação, onde interage com enzimas ou receptores sendo metabolizado e depois excretado. Cada um desses processos pode envolver variações genéticas clinicamente significativas tendo a capacidade de influenciar a resposta terapêutica (VASQUEZ ,2010; WALSH et al, 2013; NELSON et al, 1996).

A biotransformação de xenobióticos é dividida em reações de fase 1 e fase 2 e, geralmente ocorre em sequência. O metabolismo de fase 1 consiste, basicamente, na hidrólise, redução, ou oxidação e geralmente resulta na introdução ou perda de um grupo funcional, tal como -OH, -NH₂, -SH, -COOH, ou, produzindo um intermediário quimicamente reativo. A maioria dessas reações é catalisada por oxidases de funções mistas que geralmente são mono-oxigenases do citocromo P450 e acontece no fígado, órgão que excede a capacidade metabólica de todos os outros órgãos devido à maior expressão hepática dessas enzimas (VASQUEZ ,2010).

Por outro lado, o metabolismo de fase 2 consiste principalmente em conjugação com sulfato glicurônico, glutathiona, ou um aminoácido. O metabólitos da reação de fase 2 são facilmente excretados na urina ou bile. Reações de fase 1 reações podem aumentar ou eliminar a atividade biológica do substrato xenobiótico,

enquanto as reações de fase 2 tipicamente inativam a fase 1 e facilitam a eliminação do seu metabolito, transformando substratos lipofílicos em moléculas solúveis em água que podem ser transportados para a circulação ou a bile. Conforme demonstra a figura 1 a seguir (ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001):

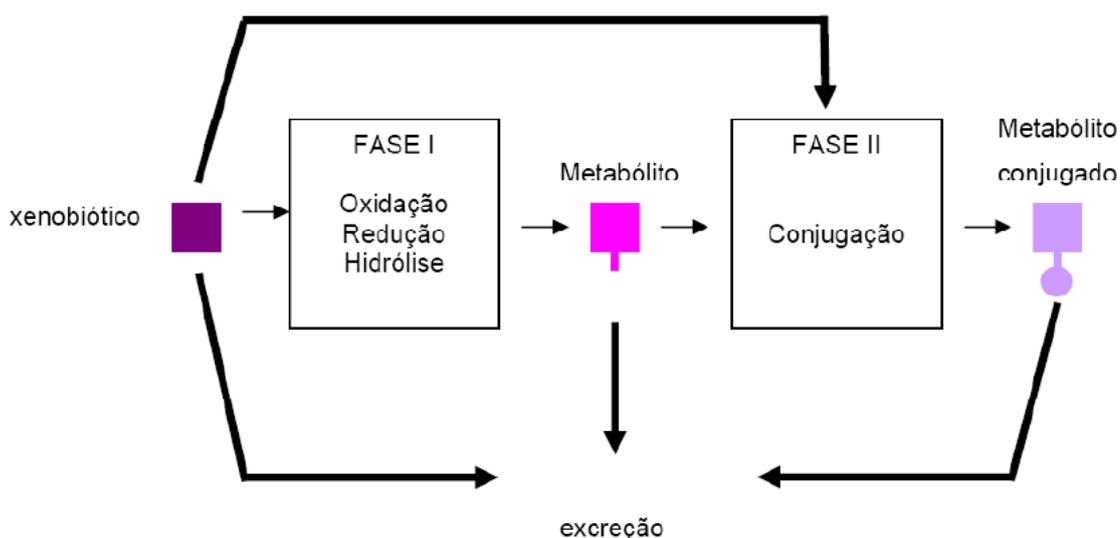


Figura 1. Vias possíveis de biotransformação dos xenobióticos. Enzimas de fase 1 (CYP) promovem a oxidação, redução e hidrólise enquanto enzimas envolvidas na fase 2 (GST e UGT) promovem a conjugação facilitando a excreção. Fonte: GLESSE, 2001.

No geral, as reações que são catalisadas pelas CYPs incluem: hidroxilação de um radical alifático ou carbono aromático; uma ligação dupla por meio de epoxidação; oxidação de um heteroátomo como S ou N ou N-hidroxilação; desalquilação de um heteroátomo como -O-, -S- ou N; transferência de um grupo oxidativo; a clivagem de ésteres e desidrogenação (ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001; GONZALEZ, 1992; NELSON et al, 1996).

Dentre muitas famílias e subfamílias de CYP, as enzimas CypA são normalmente as mais constitutivamente abundante em todas as espécies. Outras famílias de enzimas são mais expressas em tecidos extra-hepáticos. As enzimas Cyp2F, por exemplo, são mais abundantes no pulmão do que no fígado,

particularmente nas células metabolicamente competentes (células epiteliais bronquiais não ciliadas). Desta forma, substâncias tóxicas que são metabolicamente ativadas no pulmão, tais como naftalina ou ipomeanol, demonstram marcadores de toxicidade nessas células ciliadas. A família de enzimas CYP envolvida no metabolismo de xenobióticos está resumida na tabela 2 adiante onde distribuição nos tecidos resume os principais órgãos de expressão constitutiva do P450 em ratos por ordem de maior expressão (ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001).

Na maioria dos casos, estas enzimas são altamente abundantes no fígado e, em outros casos, estão presentes porém em menor quantidade. Alguns órgãos que não estão listados também podem expressar baixos níveis destas enzimas (por exemplo, coração, baço, pâncreas, cérebro). Deve-se notar que uma variedade de CYP são igualmente críticas ou fator limitante de velocidade no metabolismo de compostos endógenos, tais como colesterol, esteróides, vitamina D, ácidos biliares e ácidos graxos (ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001).

A família CYP1A, objeto do presente trabalho, como pode ser notada na tabela 2 adiante, possui uma distribuição tecidual no fígado, rim, pulmão e intestino, órgãos de ampla perfusão e grande capacidade de distribuição em termos farmacocinéticos.

Tabela 1. Famílias citocromo P450 enzima e Função Geral

Família	Distribuição Tecidual	Exemplos de Substratos
CYP1A	Fígado, rim, pulmão, intestino	Hidrocarbonetos Aromáticos
CYP1A2	Fígado, rim, pulmão, intestino, coração	Xantinas (cafeína, teofilina), fenacetina, APAP, ácido araquidônico
CYP1B	Glândula supra-renal, ovário, testículo, fígado	Estradiol
CYP2A	Fígado, testículo, pele, mucosa nasal	Testosterona (rato), cumarina, nitrosaminas, Nicotina
CYP2B	Fígado, pulmão, rim, intestino	bupropiona, 7-benzyloxyresorufin
CYP2C	Fígado, pulmão, rim, coração, intestino	Varfarina, Diclofenaco, ácido araquidônico
CYP2D	Fígado, pulmão, intestino	Debrisoquina, codeína, imipramina
CYP2E	Fígado, pulmão, rim, intestino	Clorzoxazona, APAP, etanol,
CYP2F	Rim, mucosa nasal, fígado	Naftaleno, estireno, 3-metil-indol
CYP2J	Fígado, mucosa nasal, pulmão, rim, intestino, coração	Metabólitos do ácido araquidônico
CYP3A	Fígado, pulmão, intestino	APAP, aflatoxina, eritromicina, lovastatina
CYP4A	Fígado, rim e pulmão	Ácidos graxos (ômega hidroxilação)
CYP4A11	Coração	Metabólitos do ácido araquidônico
CYP4F2	Coração	Metabólitos do ácido araquidônico
CYP4B	Pulmão, Rim e Fígado	Ácidos graxos (ômega hidroxilação), ácido valpróico, aminas aromáticas
CYP7A	Fígado	Metabolismo de ácidos biliares
CYP11A	Córtex Adrenal, ovários, testículos e placenta	Clivagem da cadeia lateral do Colesterol
CYP11B	Córtex Adrenal	11b-hidroxilação de esteroides
CYP17	Testículos, Ovários e Rim	Síntese de Andrógenos
CYP21	Córtex Adrenal	Síntese de Glicocorticóides
CYP24	Rim	Metabolismo de Vitamina D
CYP26	Fígado, cérebro	Metabolismo de Vitamina A

Fonte: ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001. Modificado.

Para a enzima CYP1A2, são conhecidos 3 fenótipos principais. CYP1A2 é uma enzima que pode ser facilmente induzida ou inibida por medicações, fumo, cafeína, etc. A capacidade do metabolismo basal continua relativamente constante entre os diferentes fenótipos na ausência de um indutor. Um dos principais inibidores dessa enzima é a fluvoxamina; os indutores são o alendazol, lansoprazol, omeprazol, primaquina. Esta enzima é importante na metabolização da olanzapina e clozapina (ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001).

As enzimas do citocromo p450 além de desempenharem um papel fundamental no metabolismo oxidativo de substâncias endógenas, tais como esteróides, prostaglandinas, ácidos graxos e leucotrienos, podem, também desempenhar um papel crítico no metabolismo de determinados xenobióticos. Em alguns casos, a presença de alguns membros do citocromo p450 pode resultar em uma maior suscetibilidade a danos causados por estes em células que expressam membros específicos da família CYP, ao invés da bioativação de desintoxicação de xenobióticos. Por exemplo, a presença de CYP 2E1 no hepatócito o torna singularmente suscetível a danos por acetaminofeno, que pode ter seu grupo amina bioativado a uma quinona altamente reativa por esta enzima (GHANEM et al, 2004; BOZINA et al, 2009; CHAUDARY et al, 2009).

2.4.2 CYP e Toxicidade: Inibição e Indução Enzimática como Fator de Toxicidade e Proteção

A capacidade do sistema CYP, bem como as de reações microssomais de fase 2 é aumentada por um processo denominado indução: um processo em que a concentração aumentada de uma droga ou de outro xenobiótico resulta no aumento de atividade de várias enzimas. Trata-se de um fenômeno relativamente comum e, geralmente é observado durante as fases de testes de novas drogas em desenvolvimento (GHANEM et al, 2004; CHAUDARY et al, 2009).

A indução normal representa a normalidade da indução metabólica na presença de um indutor. Genótipos consistentes com a indução normal do fenótipo incluem dois alelos CYP1A2*1A (ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001).

A indução diminuída é representada por um nível de indução menor que o normal na presença de um indutor. Genótipos que determinam o fenótipo de indução diminuída são aqueles que possuem um ou dois alelos CYP1A2*1C (ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001).

Por outro lado, a hiperindução é a indução maior que a normal na presença de um indutor. A indução pode ser de aproximadamente 40% maior nestes pacientes do que naqueles com o fenótipo de indução normal. Genótipos que são associados com o fenótipo “Hiperindução” são aqueles que incluem um ou dois alelos CYP1A2*1F. Pacientes com este fenótipo podem necessitar de um aumento da dose do substrato (medicamento) da CYP1A2 devido a maiores taxas de metabolismo na presença de um indutor (GOSHAL et al, 2013; ANZENBACHER & ANZENBACHEROVA, 2001).

A indução da maior parte das isoformas CYP é mediada por um (ou mais) dos quatro receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição, especificamente o aril receptor de hidrocarboneto (AHR), receptor androstano-constitutivo (CAR), receptor X pregnano (PXR) e receptor peroxissoma alfa ativado (PPAR- α) para o CYP1A, grupos CYP2B, CYP3A, e CYP4A, respectivamente. A indução de CYP2E por compostos tal como etanol difere por ser mediada por estabilização de seu mRNA em vez de via receptor (GHANEM et al, 2004; BOZINA et al, 2009; CHAUDARY et al, 2009)..

A ativação dos receptores, principalmente RCA e PPAR- α podem levar a uma resposta hepática, onde podem ocorrer efeitos em adição à indução microssomal,

tais como hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos e células epiteliais do ducto biliar, inibição de apoptose e aumento do peso do fígado em ratos. Tais efeitos possuem implicações a longo prazo, em termos de associação com o aumento da incidência de tumores após administração crônica de xenobióticos (CHAUDARY et al, 2009).

Além hipertrofia e hiperplasia, uma manifestação adicional adaptativa a mudança hepatocelular é o aumento da expressão e atividade de enzimas de metabolização de xenobióticos. Este aumento é tipicamente seletivo, e frequentemente, envolve as enzimas da fase 1 CYP embora outras enzimas da fase 2 possam também ser induzidas. Além disso, alguns mecanismos de indução de CYP não são normalmente associados a hipertrofia ou hiperplasia (ver Quadro 45.1, abaixo). Estas formas de indução de CYP na ausência de efeitos morfológicos no fígado são tipicamente observados com alguns indutores de CYP1A por compostos tal como o 3-metilcolantreno e omeprazol, e com alguns indutores do CYP3A, tais como dexametasona. O mecanismo pelo qual as drogas podem causar indução da enzima CYP no fígado, bem como hipertrofia e hiperplasia, tem sido atribuída a ativação de receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição (GHANEM et al, 2004; BOZINA et al, 2009; CHAUDARY et al, 2009).

A evidência da hiperplasia e hipertrofia causada por indução enzimática de CYPs é em grande parte baseada na seletiva eliminação de respostas às drogas obtidas em experimentos *knockout* de gene seletivos em camundongos. Cada um destes receptores pode ser diretamente ativado pela ligação do xenobiótico (ou o seu metabolito) para o receptor, embora, como dito anteriormente, alguns ativadores da CAR não se ligam ao receptor, mas em vez disto fosforila o receptor, resultando na translocação nuclear (GHANEM et al, 2004; BOZINA et al, 2009; CHAUDARY et al, 2009).

2.4.3 Polimorfismos Genéticos nas Enzimas da Família CYP

Atualmente, mais de 57 genes P450 humanos ativos e 58 pseudogenes são conhecidos e a maioria dos genes é polimórfica. Um gene é considerado polimórfico quando a frequência de um alelo variante na população normal é de pelo menos 1%. A maioria das enzimas nas famílias de CYP 1 a 3 exibem variabilidade interindividual em atividade catalítica, seja devido a polimorfismos genéticos ou por uma variação dos níveis de expressão (WALSH et al, 2013).

O sequenciamento do genoma humano resultou na identificação de bem mais de 1 milhão de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), dos quais numerosos SNPs foram relatados em genes que codificam enzimas que metabolizam, transportam drogas ou funcionam como alvo das mesmas. Dentre esses genes, pode-se citar os genes codificadores de enzimas do citocromo p450, as CYPs (EL-KADI & ELBEKAI, 2006).

As mutações nos genes CYP podem causar uma deficiência enzimática, em que a expressão da enzima é diminuída, a especificidade entre enzima e substrato é alterada ou há um aumento da expressão da enzima. Com base na composição dos alelos, os indivíduos afetados podem ser divididos em quatro grandes fenótipos: metabolizadores pobres (MPs), tendo dois genes não funcionais, metabolizadores intermediários (IMs) sendo deficientes em um alelo, metabolizadores extensivos (SGA), com duas cópias de genes normais e metabolizadores rápidos (UMS) com três ou mais cópias funcionais do gene ativo (GOSHAL et al , 2013).

Por serem polimórficos, os genes que codificam as CYP levam a variação interindividual na atividade enzimática e por sua vez a suscetibilidade ao câncer. Entre os CYPs estudados que podem ser relacionados ao câncer, CYP1A1 e CYP2E1 foram os mais comumente investigado. As enzimas codificadas pelos genes das CYP2E1, CYP1A1 e CYP1A2 estão envolvidas na ativação de diversas substâncias cancerígenas, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas e heterocíclicos aminas (ZORDOKY & EL-KADI, 2010; (EL-KADI & ELBEKAI, 2006).

Dentre os polimorfismos já descritos, o de inserção com 96pb na Região 50 foi recentemente relatado na regulamentação da região do gene CYP2E1, que induz a um aumento da atividade enzimática. O gene CYP1A1 exibe uma substituição de C para T denominada 3801C (CYP1A1*2) no éxon 7, que cria um sítio de restrição para MspI e resulta em aumento de três vezes na atividade enzimática (GOSHAL et al , 2013).

Por outro lado, o gene CYP1A2 exibe no nucleotídeo 164 uma mutação de transição de A para C transição (CYP1A2* 1F), que está associada à diminuição da atividade enzimática. Os polimorfismos destes genes foram associados a várias doenças, no entanto, há poucos dados sobre a associação do polimorfismo CYP1A1 Msp1 e não existem dados sobre a associação de CYP2E1 (inserção de 96 pb) e CYP1A2 * 1F- 164A para o polimorfismo C com GC (GOSHAL et al , 2013).

2.4.4 Polimorfismos de CYP1A1

Vários polimorfismos genéticos foram relatados no gene CYP1A, incluindo T6235C e T5639C na região flanqueadora 3', A4889G e C4887A no éxon 7. Estudos funcionais vem revelando que estes polimorfismos estão associados ao aumento da atividade de CYP1A1 e / ou capacidade de indução (ZORDOKY & EL-KADI, 2010; SWEN et al 2006).

O polimorfismo mais estudado é o T6235C que é comumente referido como polimorfismo de MspI, associado à regulação de CYP1A1 e transcrição da sua meia-vida, resultando em indução elevada da enzima e em níveis mais elevados de seus os intermediários ativados (ZORDOKY & EL-KADI, 2010).

2.5 Polimorfismos de CYP como Fator de Indução ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O papel dos polimorfismos dos genes *CYP* em desordens autoimunes, como o LES, também já foi demonstrado em vários estudos. Um deles, publicado em 2003, relatou que a frequência do genótipo *CYP1A1 4887C/A* (Thr_Asn), bem como a frequência alélica de *CYP1A1 4887A*, eram significativamente maiores em pacientes com LES do que em controles. Neste mesmo estudo, pacientes lúpicos com *CYP1A1 4887A* apresentaram uma tendência ao aumento da prevalência de envolvimento renal.

Um recente estudo indicou que a variante *CYP1A1 m2* em heterozigose pode levar a alteração funcional da proteína e desempenhar um papel no desenvolvimento do LES, mas afirmou que uma investigação mais aprofundada em termos de análise funcional de *CYP1A1 m2* era necessária para provar esta hipótese (ZHANG *et al.*, 2010).

Em uma análise com indivíduos japoneses, o polimorfismo *CYP1A1 3801C* foi significativamente associado com LES, enquanto que o polimorfismo nulo *GSTM1* não. Quando a ação combinada dos dois locos foi considerada, os indivíduos portadores do alelo *CYP1A1 3801C* e do genótipo nulo tiveram um risco aumentado de LES (HORIUCHI *et al.*, 2009).

O genótipo CC do polimorfismo *CYP1A1 T3801C* foi associado com o aumento da atividade metabólica e é possível que esta variante resulte na formação de ROS, gerando inflamação, bem como a modificação de 50 antígenos que aumentam a antigenicidade. A geração de ROS é também um importante evento *upstream* na sinalização do TNF e na subsequente inflamação, sendo considerada essencial na patogênese do LES (ZHANG *et al.*, 2010; HORIUCHI *et al.*, 2009).

3 METODOLOGIA

3.1 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).

Os pacientes foram recrutados em uma unidade hospitalar do Distrito Federal. Todos os pacientes preencheram o número mínimo de critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR), publicados em 1982 e revisados em 1997, aceitos universalmente para LES. Os critérios ACR estão descritos na Tabela 1.

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).

3.2 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 Invitek (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*) para estudo da distribuição dos SNPs.

A técnica da PCR permite que a região selecionada do genoma para o gene CYP1A1 (variante *CYP1A1*2A*-rs4646903; substituição timidina/citosina no nucleotídeo 3801 ,3801T>C) seja amplificada milhões de vezes. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar o polimorfismos estão descritas a seguir:

forward primer 5'-GGCTGAGCAATCTGACCCTA- 3'
reverse primer 5'-GGCCCCAACTACTCAGAGGCT-3' (Li et al., 2004).

As condições de termociclagem foram 95°C por 5 minutos, 64 °C por 2 min e 75°C por 2 min, seguida por 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 64°C por 60 segundos e 75°C por 60 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi o Termociclador Techne modelo TC-512.

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 739pb.

O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição *MspI* (*New England Biolabs*, Inc. Beverly, MA, USA). O alelo mutante (C) cria um novo sítio de restrição, e o fragmento de 739pb é clivado em dois de 408pb e 362pb; o alelo selvagem (T) não é clivado pela enzima, e, assim, o polimorfismo foi dividido em genótipo de clivagem (C/C), heterozigoto (T/C), e genótipo de não clivagem (T/T). Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0μL da PCR; 2,0μL de tampão 10x NEB2.1 (Biolabs); 1μL de enzima *MspI* (10U/μL), completando com

água Milli-Q para um volume final de 20 μ L por reação. O sistema foi mantido a 37°C por 3 horas.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio na potência de 100W por 30 minutos.

3.3 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).

4 RESULTADOS

4.1 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1 em LES

A frequência genotípica do polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1 nos controles estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P = 0,1506$). A distribuição genotípica deste polimorfismo é estatisticamente diferente em relação aos participantes de LES quando comparados com os indivíduos controles (genótipos TT, TC e CC – 99,125 e 33, respectivamente – contra 66, 47 e 15, respectivamente, $\chi^2 = 6,194$, $P = 0,0452$). Porém, não houve diferença significativa nas frequências alélicas entre pacientes com LES e controles (alelo T, C: 323 e 191 contra 179 e 77, respectivamente, $OR = 0,73$, $\chi^2 = 3,78$ e $P = 0,0519$), o que está representado na Tabela 3.

Tabela 2: Polimorfismo do gene CYP1A1 em pacientes com LES e controles

	Grupo				P	OR	IC (OR)
	Lupus		Controle				
	N	%	N	%			
TT	99	38,5	66	51,6			
CT	125	48,6	47	36,7	0,0452*	N/A	N/A
CC	33	12,8	15	11,7			
Total	257	100,0	128	100,0			
CT	125	48,6	47	36,7	0,026*	1,63	1,05-2,52
CC/TT	132	51,4	81	63,3			
Total	257	100,0	128	100,0			
T	323	62,8	179	69,9			
C	191	37,2	77	30,1	0,0519	0,73	0,53-1,00
Total	514	100,0	256	100,0			

* $P < 0,05$; N/A: não se aplica

4.2 Frequência genotípica e manifestações clínicas em pacientes com LES

Foram analisadas associações heterozigóticas estatisticamente significantes a respeito dos polimorfismos rs4646903 no gene CYP1A1, que estão descritas na Tabela 3. Para o polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1 foram descritas associações com os seguintes sintomas clínicos: *rash* malar - ACR (74,4%) (P = 0,000; OR = 10.97; IC = 6.13- 19.64); fotossensibilidade (60,5%; P = 0,000; OR = 3.34; IC = 1.98 - 5.65); úlceras orais/ nasais (63,3%) (P = 0,02; OR = 2,08; IC = 1.09 - 3.96) e alterações imunológicas (43,9%; P = 0,030; OR = 0,55; IC = 0,33 – 0,94), sendo que apenas neste último, o heterozigoto parece ser fator protetor contra a característica clínica indesejável.

A frequência dos genótipos heterozigotos C/T, do polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1, e os demais genótipos dos pacientes, assim como as respectivas associações com as manifestações clínicas, estão representados na Tabela 4.

Tabela 3: Distribuição da presença das manifestações clínicas em pacientes com LES conforme a frequência genotípicas de *CYP1a1*

	CYP1A1				P	OR	IC (OR)
	CT		CC/TT				
	N	%	N	%			
ARTRITE NÃO EROSIVA – ACR	112	49,6%	114	50,4%	0.42	1.36	0.63- 2.90
RASH MALAR – ACR	99	74,4%	34	25,6%	<.0001*	10.97	6.13- 19.64
FOTOSENSIBILIDADE – ACR	92	60,5%	60	39,5%	<.0001*	3.34	1.98 - 5.65
SEROSITES – ACR	35	40,2%	52	59,8%	0.06*	0,6	0.35 - 1.01
NEFRITES – ACR	57	43,8%	73	56,2%	0.13	0.67	0.41 - 1.10
HEMATOLÓGICO – ACR	104	48,8%	109	51,2%	1.0	1.04	0.54 - 2,0
ÚLCERAS ORAIS/NASAIS – ACR	31	63,3%	18	36,7%	0.02	2.08	1.09 - 3.96
FAN – ACR	123	48,2%	132	51,8%	0.23	0	N/A
ALTERAÇÃO IMUNOLÓGICA – ACR	76	43,9%	97	56,1%	0.030*	0.55	0.33 - 0.94
PSICOSE CONVULSÕES – ACR	17	50,0%	17	50,0%	0.86	1.06	0.51 - 2.19
EDEMA	38	41,8%	53	58,2%	0.11	0.65	0.38 - 1.09
FAN – ALTERADO	124	48,6%	131	51,4%	1.0	N/A	N/A
RNP – ALTERADO	36	51,4%	34	48,6%	0.32	1.34	0.74 - 2.43
ANTI Ds DNA – ALTERADO	58	45,3%	70	54,7%	0.16	0.70	0.42 - 1.15
COMPLEMENTO – ALTERADO	90	46,4%	104	53,6%	0.17	0.67	0.37 - 1.18
ANTICARDIOLIPINA – ALTERADO	8	36,4%	14	63,6%	0.58	0.75	0.28 - 2.04
INIBIDOR LÚPICO – ALTERADO	1	16,7%	5	83,3%	0.41	0.34	0.03 - 3.16

* P<0,05; N/A: não se aplica

5 DISCUSSÃO

As mutações nos genes CYP podem causar uma deficiência enzimática, em que a expressão da enzima é diminuída, a especificidade entre enzima e substrato é alterada ou há um aumento da expressão da enzima.

Desta forma, avaliar fatores genéticos envolvidos no lúpus eritematoso sistêmico tem sido cada vez mais frequente na pesquisa e prática clínica. Nesse trabalho, foi explorada a possibilidade de a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes CYP1A1 (Tabela 2) estar relacionada com manifestações clínicas dos pacientes portadores da doença (Tabela 3).

A primeira etapa do estudo consistiu na análise da frequência de SNP no gene CYP1A1 na população do Distrito Federal. A frequência de genótipos heterozigóticos (C/T) no gene CYP1A1 no nosso trabalho totalizou 48,6% dos participantes envolvidos.

No que diz respeito à associação deste polimorfismo com as características clínicas, houve forte associação entre o genótipo C/T com a presença de *rash* malar - ACR (74,4%) ($P = 0,000$; OR = 10.97; IC = 6.13- 19.64); fotossensibilidade (60,5%; $P = 0,000$; OR = 3.34; IC = 1.98 - 5.65); úlceras orais/ nasais (63,3%) ($P = 0,02$; OR = 2,08; IC = 1.09 - 3.96) e alterações hematológicas (43,9%; $P = 0,030$; OR = 0,55; IC = 0,33 – 0,94) nos participantes deste estudo. Um recente estudo indicou que a variante *CYP1A1 m2* em heterozigose pode levar a alteração funcional da proteína e desempenhar um papel no desenvolvimento do LES (Zhang et al., 2010).

O aumento da frequência de manifestações dermatológicas como o *rash* malar e fotossensibilidade pode ser explicado possivelmente pela localização demográfica da população do Distrito Federal, fortalecida pela grande influência da incidência de luz ultravioleta durante boa parte do ano, acarretando principalmente alterações dermatológicas, como as citadas anteriormente. No estudo feito em 1995, com 685 participantes, em São Paulo, Brasil, sem analisar fatores genéticos, 51% foram diagnosticados com *rash* malar e 47% com fotossensibilidade, sem que os participantes apresentassem úlceras mucosas (Chahade et al., 1995). Mais recentemente, em 2012, um estudo constituído por 888 participantes realizado na cidade de São Paulo, Brasil, um dos maiores sobre a doença e de maior impacto no

país, ainda sem avaliar polimorfismos genéticos, comprovou a frequência de *rash* malar de 83,2%, seguida de fotossensibilidade, 76,9%, e presença de manifestações com úlceras mucosas, 23,2% (Borba et al., 2013).

Em literatura, há diversas descrições de diferentes autores acerca das alterações hematológicas frequentes em LES (sem avaliação do *background* genético). Dentre as mais comuns: anemias (50,0 a 80,0% dos casos); leucopenias (20,0 a 60,0%); neutropenias (aproximadamente 50% dos pacientes); linfopenia (20,0 a 80,0% dos casos); trombocitopenia (8,0 a 32,0%), entre outras (García Tello et al., 2002). Rothfield explica que os pacientes os portadores de LES geralmente apresentam, durante o curso da doença, uma ou mais alterações hematológicas (Rothfield et al., 2006). Todos esses fatores estão relacionados com o prognóstico da doença.

Conforme mencionado anteriormente, no estudo de Horiuchi et al, 2009, houve a demonstração de que o genótipo CC do polimorfismo *CYP1A1* estaria associado com o aumento da atividade metabólica e é possível que esta variante resulte na formação de ROS, gerando inflamação, bem como a modificação de 50 antígenos que aumentam a antigenicidade. Tal estudo, quando comparados com nosso estudo, apresenta grande relação onde há a evidência de que a presença da heterozigose demonstra ser um fator de proteção para a presença de alterações imunológicas nesses pacientes portadores da patologia.

Dentre as demais manifestações clínicas, apesar de a frequência de artrite, serosite, nefrites, distúrbios psicológicos dentre outras manifestações observadas frequentemente em pacientes de LES serem relatadas na literatura, neste estudo verificou-se que os polimorfismos estudados parecem não ter relação de causalidade com tal manifestação clínica conforme tabela 3.

6 CONCLUSÃO

No Brasil, ainda não foram realizados estudos de associação do LES com os polimorfismos de enzimas de metabolização de fase I e II analisados em conjunto, sendo, portanto, interessante determinar essa associação e observar se esta também ocorre em outras populações. A identificação de fatores genéticos implicados na patogênese do LES pode, futuramente, auxiliar no estabelecimento de diagnósticos e prognósticos mais confiáveis. Além disso, polimorfismos no gene CYP podem estar relacionados à terapia utilizada para tratar a doença, podendo contribuir para o sucesso terapêutico ou para o agravamento do quadro clínico destes pacientes.

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença sistêmica, caracterizada por profundas alterações na regulação imune, capaz de acometer diversos tecidos, com acúmulo de imunocomplexos. Desta forma, o presente estudo conseguiu demonstrar a associação do polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1 em LES como fator causal em manifestações clínicas comuns no LES como o rash malar, fotossensibilidade e úlceras em mucosas. Além disso, pode-se demonstrar a presença de heterozigose em LES como fator de proteção para a presença de alterações imunológicas que podem piorar o prognóstico do paciente.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and molecular immunology**. 6a ed. Philadelphia, Saunders Company, 2007.
- ANTONA, C.R.; SUNDBERG, M.I. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. **Oncogene** 2006; 25: 1679–1691
- ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 5-6, p. 737-747, 2001.
- 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.
- BOZINA, N.; BRADAMANTE, V.; LOVRIC, M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drugs response, toxicity and cancer risk. **Arh Hig Rada Toksikol** 2009; 60: 217-242.

- Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. *rev bras reumatol* 48.4 (2008): 196-207.
- CHAUDHARY, K. R.; BATCHU S. N.; SEUBERT, J. M. Cytochrome P450 Enzymes and the Heart. *Life*. 2009; 61(10): 954–960.
- DE MATTOS, P.S.L. **Atividade de doença em pacientes com LES que desenvolvem insuficiência renal terminal: revisão sistemática da literatura**. 2013.
- EL-KADI, A. O. S. ELBEKAI, R. H. Cytochrome P450 enzymes: Central players in cardiovascular health and disease. **Pharmacology & Therapeutics**. Elsevier. 2006; 112: 564–587
- GHANEM, M.M. et al Respirable coal dust particles modify cytochrome P4501A1 (CYP1A1) expression in rat alveolar cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; 31,171–183
- GHOSHAL, U.; TRIPATHI, S.; KUMAR, S.; MITTAL, B.; CHOURASIA, D.; KUMARI, N.; KRISHNANI, N.; GHOSHAL, U.C. Genetic polymorphism of cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2 and CYP2E1 genes modulate susceptibility to gastric cancer in patients with *Helicobacter pylori* infection. **Gastric Cancer** 2013.
- 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.
- GONZALEZ, F.J. Human cytochromes P450: problems and prospects. **Trends Pharmacological Science**, v. 13, p. 346-352, 1992.

- 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.
- GUENGERICH, F.P. Cytochromes P450, drugs, and diseases. **Molecular Interventions**, v. 3, p. 194-204, 2003.
- HORIUCHI, T.; WACHIO M.; KIYIOHARA C.; TSUKAMOTO, H.; TADA, Y.; ASAMI, T.; IDE, S.; KOBACHI, G.; TAKAHASHI, H. Combination of TNF-RII, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and the risk of Japanese SLE: findings from the KYSS study. **Rheumatology (Oxford)**. 2009; 48:1045-1049.
- 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.
- 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.
- LAU, C.S; YIN, G. MOK, M.Y. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. **Lupus.** 2006; 15:715-719.

- MANZI, S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Am J Manag Care.** 2001; 7:S474-479.
- McKINNON, R.A.; NEBERT, D.W. (1994) Possible role of cytochromes P450 in lupus erythematosus and related disorders. **Lupus.** 1994; 3:473-478.
- 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
- NELSON, D.R. et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession number and nomenclatures. **Pharmacogenetics.** v. 6, p. 1-42, 1996.
- 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.
- SCHUETZ, E.G., et al. Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat

liver. I. Evidence that glucocorticoids and pregnenolone 16 alpha-carbonitrile regulate de novo synthesis of a common form of cytochrome P-450 in cultures of adult rat hepatocytes and in the liver in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 1999-2006, 1984.

- 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.
- SWEN, J.J. et al. Pharmacogenetics: from bench to byte. *ClinPharmacolTher.* 2008 May;83(5):781-7. de Leon J et al. Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics.* 2006 Jan-Feb;47(1):75-85.
- 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.
- 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.
- VON SHIEMEDEBERG, S. FRITSCHKE, E.; RONNAU, A.C.; et al.: Polymorphisms of the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1 and NAT-2 in systemic sclerosis and lupus erythematosus. **Adv Exp Med Biol** 1999;455:147-52.
- 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.
- WALSH et al. Xenobiotic Metabolism and Utility in Understanding Drug and Human Cytochrome P450 1A1 Structure. **J. Biol. Chem.** 2013; 288:12932-12943.
- XU, X.; ZHANG, X. A.; WANG, D. W. XU, X.; ZHANG, X. A.; WANG, D. W. The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. **Elsevier**. 2011; 63: 597–609.
- ZANGER, U.M.; TURPENEIN, M.; KLEIN, K. SCHWAB M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Nov;392(6):1093-108. Epub 2008 Aug 10.
- ZHANG, J.; DENG,J.; ZHANG, C.; LU, Y.; LIU, L.; WU,.; SHAO, Y.,; ZHANG, J.; YANG, H.; YU, B. *et al.* Association of GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Chinese population. **Clin Chim Acta.** 2010; 411:878-881.
- ZORDOKY, N. M.; EL-KADI, A. O. S. Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. **Pharmacology & Therapeutics.** Elsevier. 2010; 125: 446–463.

1 ANEXO I



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



PARECER Nº 309/2009

PROCOLO Nº DO PROJETO: 353/09 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO LUPUS ERITEMATOSO 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

2 Anexo 2

Primer3Plus		Primer3Manager	Help		
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code		
WARNING: Numbers in input sequence were deleted.					
< Back					
Pair 1:					
<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1:	Primer_F				
Sequence:	ggctgagcaatctgacccta				
Start: 66	Length: 20 bp	Tm: 60.4 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0		
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1:	Primer_R				
Sequence:	ctgagggtgggagaatctgt				
Start: 783	Length: 20 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 55.0 % ANY: 3.0 SELF: 0.0		
Product Size: 718 bp	Pair Any: 3.0	Pair End: 2.0			
Send to Primer3Manager	Reset Form				
1	gccaagagtg	aagggaaagag	acagcccagg	atactggcac	agaggtagt
51	tcactgcttg	aactaggctg	agcaatctga	ccctatgggt	ctaggacaca
101	gttcctggga	acatcacatt	cctctgccct	tcctgcaggc	aggaacaaac
151	agggtgcct	tctggccttg	taagaccott	attgctgtcc	tggaggggt
201	ggggacttgt	gtctgcgggg	atcagagcgc	acagggagtg	cacatatcca
251	ggcaccagga	ctagggtctg	agtgaggggg	gggtatttca	attacottct
301	attggtctcc	cttctctaca	ctcttcta	aaaatgtcta	tttttaattg
351	ttgtacaaa	caatccttct	attctagcct	goattgagct	tgcattgctg
401	cataagagct	taagaacct	tgatttaatg	taatagggaa	aattctaacc
451	caggtatcca	aaaatgtgta	agaacaacta	cctgagctaa	ataaagatat
501	tgttcagaaa	tcctataggt	ggagattttt	tgaatcataa	atgattcacc
551	actcgtctaa	atactcacc	tgaaccccat	tctgtgttgg	gttttactgt
601	agggaggaag	aagaggaggt	agcagtgaag	aggtgtagcc	gctgcactta
651	agcagtctgt	ttgagggaca	agactctatt	ttttgagaca	gggtcccag
701	gtcatccagg	ctggagtcca	ctggtacct	tttgtttcac	tgtaacctcc
751	acctcctggg	ctcacaagat	tctcccacct	caagcctctga	gtagtgggg
801	ccgcaggcac	acgccaccac	agcttttttt	tttttttttt	tttttttttt
851	tagagatggg	gtttcaccat	gttgcccagg	ctggtctcaa	actcctgagc
901	t				
<input type="checkbox"/> Select all Primers					
Pair 2:					
<input type="checkbox"/> Left Primer 2:	Primer_1_F				
Sequence:	ggctgagcaatctgacccta				
Start: 66	Length: 20 bp	Tm: 60.4 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0		
<input type="checkbox"/> Right Primer 2:	Primer_1_R				