



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

GESLAYNNE DE OLIVEIRA GONÇALVES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE P53 NO CÓDON 72 E
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA BRASILEIRA**

Brasília

2015

GESLAYNNE DE OLIVEIRA GONÇALVES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE P53 NO CÓDON 72 E
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA BRASILEIRA**

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

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

Brasília

2015

GESLAYNNE DE OLIVEIRA GONÇALVES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE P53 NO CÓDON 72 E
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UMA AMOSTRA BRASILEIRA**

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(UniCeub)

Profa. Dra. Vivian Tais Cipriano
(UNIP)

Brasília

2015

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre
me incentivaram a buscar o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o dom da vida, me capacitar todos os dias e me sustentar nas horas mais difíceis, a Ele toda honra, glória e louvor!

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

À professora Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, que aceitou me orientar neste trabalho. Obrigada por compartilhar seu conhecimento, sua paciência, compreensão e amizade comigo. Palavras me faltam para agradecer-te o suficiente!

À minha amiga Keemberly Valcacio, que sempre esteve disposta a me aconselhar nesses 12 anos de amizade. Obrigada por ser a melhor amiga que alguém pode ter em todos os momentos, inclusive naqueles em que pensei em desistir.

Às meus amigos Adriele Johner, Lorena Sousa, Geises Bel Santos, Gleici'Any Duarte e José Vítor Vieira, por serem as melhores companhias durante esses anos de graduação e por estenderem a amizade para além da Universidade. Vocês são maravilhosos!

Aos meus colegas de trabalho da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que desde sempre me incentivaram e auxiliaram, além de me inspirarem diariamente a continuar trabalhando para a saúde pública do nosso Brasil.

A todos que influenciaram de alguma forma a minha chegada até aqui, meu muitíssimo obrigada!

*“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e
o homem que adquire conhecimento.”*

Provérbios 3:13

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune multissistêmica de manifestações diversas e de etiologia multifatorial. A desregulação no mecanismo de apoptose e manutenção do ciclo celular pode estar relacionada à patogênese da doença. O gene p53 é um gene supressor de tumor que codifica uma proteína homônima que atua como fator de inibição da progressão do ciclo celular, promove senescência e/ou induz apoptose. Como o gene p53 está envolvido nessas sinalizações celulares, polimorfismos do gene p53 podem estar associados à susceptibilidade ao LES em determinadas populações. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar a correlação do polimorfismo do gene p53 no códon 72 na ocorrência de LES em uma população brasileira. 385 indivíduos foram recrutados, sendo o grupo caso composto de 257 pacientes portadores de LES e o grupo controle de 128 indivíduos sem descrição de critérios para doenças autoimunes. Foram obtidas amostras de sangue total e as características clínicas dos pacientes com LES extraídas de seus prontuários. Para análise do polimorfismo realizou-se extração de DNA, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) qualitativo e digestão enzimática. Verificou-se que houve diferença estatística na distribuição genotípica do códon 72 do p53 e na frequência alélica de Arg e Pro entre o grupo caso e controle, sendo que o genótipo Arg/Pro teve maior representação e o alelo Pro foi mais frequente no grupo caso. Os indivíduos heterozigotos do grupo caso apresentaram maior ocorrência de febre, perda de peso, fotossensibilidade, entre outros sinais e sintomas. Tais resultados sugerem associação do polimorfismo estudado com a ocorrência de LES na população estudada.

Palavras-chave: p53, polimorfismo, lúpus, Arg72Pro.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease of various multisystem manifestations and multifactorial etiology. Dysregulation in the cell cycle and apoptosis maintenance mechanism may be related to the pathogenesis of the disease. The p53 gene is a tumor suppressor gene that encodes a homonymous protein that acts as inhibition of cell cycle progression factor promotes senescence and/or induces apoptosis. As the p53 gene is involved in these cellular signals, the p53 gene polymorphisms may be associated with susceptibility to SLE in certain populations. The objective of this work is to investigate the correlation of p53 gene codon 72 polymorphism on the occurrence of SLE in a Brazilian population. 385 subjects were recruited, the case group was composed by 257 patients with SLE and the control group of 128 subjects with no description of criteria for autoimmune diseases. Blood samples were obtained and the clinical characteristics of patients with SLE extracted from their medical charts. For the analysis of the polymorphism was carried out DNA extraction, qualitative PCR (Polymerase Chain Reaction) and enzymatic digestion. It was found that there was a statistical difference in genotype distribution of p53 codon 72 and allele frequency of Arg and Pro between the case and control groups, as the Arg/Pro genotype had greater representation and the Pro allele was more frequent in the case group. Heterozygotes individuals in the case group had a higher incidence of fever, weight loss, photosensitivity, among other signs and symptoms. These results suggest an association of the studied polymorphism with the occurrence of SLE in the population studied.

Keywords: p53, polymorphism, lupus, Arg72Pro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Polimorfismo do códon 72 da p53 em pacientes com LES e grupo controle – Distribuição genotípica e alélica.	15
Tabela 2 - Frequências do genótipo Arg/Pro no códon 72 do gene p53 em indivíduos com LES por sinais e sintomas clínicos apresentados.	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C – Citosina

G – Guanina

Arg – Arginina

Pro – Prolina

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

p53 – gene p53

p53 – proteína p53

p53 Arg72Pro – Polimorfismo do gene p53 no códon 72

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

μl - Microlitro

P – p-valor

PCR – Reação em cadeia da polimerase

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

χ^2 – qui-quadrado

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

IC OR – Odds Ratio

OR – Odds Ratio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOSa	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. <i>Participantes da pesquisa</i>	15
4.2. <i>Extração de DNA</i>	15
4.3. <i>PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo</i>	16
4.4. <i>Digestão enzimática</i>	16
4.5. <i>Análise Estatística</i>	17
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO	20
7. CONCLUSÃO	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXOS	30

1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune multissistêmica de manifestações diversas, podendo afetar qualquer órgão ou sistema no corpo (O'NEILL & CERVERA, 2010; DIAS & ISENBERG, 2014). A etiologia do LES é multifatorial, e tem seu desenvolvimento ligado à susceptibilidade genética (CUI et al, 2013) e a fatores ambientais (KAMEN, 2014), sendo mais prevalente em mulheres (DIAS & ISENBERG, 2014) e em populações não brancas (hispânicos, africanos e asiáticos) (GONZÁLES et al, 2014).

A desregulação no mecanismo de apoptose pode estar relacionada à patogênese da doença (GATTO et al, 2013). Uma vez que o gene p53 está envolvido na sinalização intracelular que induz a apoptose (VASEVA & MOLL, 2009), polimorfismos do gene p53 podem estar associados à susceptibilidade ao LES em determinadas populações (LEE et al, 2005; LEE et al, 2012; NABAVI et al, 2014; PIOTROWSKI et al, 2008), mas não em outras (SÁNCHEZ et al., 2006; ONEL et al, 2009).

O gene p53 é um gene supressor de tumor que se localiza no braço curto do cromossomo 17 na posição 17p13.1 e codifica a proteína p53, que atua como um fator de inibição da progressão do ciclo celular, promove senescência ou induz morte celular por apoptose ao ser ativada em situações de stress celular. Essas características fizeram com que o gene p53 fosse conhecido como “guardião do genoma” (FREED-PASTOR & PRIVES, 2012; BRADY & ATTARDI, 2010).

A ocorrência de um *Single nucleotide polymorphism* (SNP) no códon 72 do éxon 4 do gene p53 faz com que se tenha as sequências de três citosinas (CCC) ou de duas citosinas e uma guanina (CGC), codificando para os aminoácidos arginina (Arg) ou prolina (Pro) respectivamente. Essa substituição de um par de bases acarreta mudanças na interação proteína-proteína da p53 com seus alvos, podendo modificar conseqüentemente a atividade da p53 (FREED-PASTOR & PRIVES, 2012). Essa atividade alterada da p53 pode modificar sua eficiência no processo de indução de apoptose e no controle do ciclo celular, favorecendo a reação autoimune a autoantígenos, observada na patogênese do LES (LOWE et al., 2013)

Com essa prerrogativa, faz-se necessária a investigação em diferentes populações da correlação do polimorfismo do gene p53 no códon 72 (p53 Arg72Pro) com a ocorrência de LES.

2. JUSTIFICATIVA

Como o gene p53 está envolvido nas sinalizações celulares que envolvem os mecanismos de controle do ciclo celular, polimorfismos do gene p53 podem estar associados à susceptibilidade ao LES em determinadas populações e não ainda há publicação de estudos do polimorfismo p53 Arg72Pro e sua associação com LES na população brasileira. Uma vez que o LES ainda não tem sua etiologia e patogênese bem estabelecida, estudos que visam estabelecer os fatores envolvidos nesses aspectos da doença são de extrema importância e necessidade para se aprimorar diagnóstico, prognóstico e tratamento do LES.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

O objetivo deste estudo é investigar a associação do polimorfismo do gene p53 no códon 72 (p53 Arg72Pro) com a ocorrência de LES em uma amostra brasileira.

3.2. *Objetivos Específicos*

- a)** Identificar a frequência do polimorfismo do gene p53 no códon 72 (p53 Arg72Pro), éxon 4, posição 17p13.1, em pacientes com LES atendidos por um hospital do Distrito Federal, Brasil;
- b)** Comparar estas frequências gênicas com aquelas observadas em indivíduos não portadores de doenças crônicas, habitantes da mesma região, e promover, desta forma, um estudo de caso-controle;
- c)** Investigar se o polimorfismo Arg72Pro do gene p53 está associado com a susceptibilidade à patologia autoimune LES e suas características clínicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Participantes da pesquisa*

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

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

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

4.2. *Extração de 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 em corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/ μ L.

4.3. PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo

A técnica da PCR permite que uma região selecionada do genoma seja amplificada milhões de vezes.

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

Senso 5`-TCCCCCTTGCCGTCCCAA -3`

Antisenso 5`-CGTGCAAGTCACAGACTT -3`

As condições de termociclagem foram 94°C por 2 minutos (denaturação inicial), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, acompanhada de 60°C por 45 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi termociclador Techne modelo TC-512.

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

O produto desta PCR é um fragmento de 279 pb.

4.4. Digestão enzimática

A digestão enzimática foi realizada com uso de enzimas de restrição (endonucleases de restrição).

O produto da PCR foi digerido com a enzima *Bst*UI (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA). O alelo 1 (G) cria um novo sítio de restrição, e o fragmento de 279 pb é clivado em dois de 160 pb e 119 pb; e o alelo 2 (C) não é clivado pela enzima. Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0 µL da PCR;

2,0µL de tampão 10x NEB4 (Biolabs); 1 µL de enzima *BstUI* (10U/µL), completando com água Milli-Q para um volume final de 20 µL por reação. O sistema foi mantido a 60°C por 2 horas.

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

4.5. Análise Estatística

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

5. RESULTADOS

As frequências genóticas do códon 72 da p53 nos indivíduos sadios estavam em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P = 0,2742$). A distribuição genotípica do códon 72 do p53 diferenciou-se significativamente entre indivíduos com LES e os sadios, sendo que o número de indivíduos com os genótipos Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro foram, respectivamente, de 54, 176 e 27 no grupo com Lúpus (LES) e de 51, 64 e 13 no grupo controle ($\chi^2 = 15,803$; $P = 0,001$).

Também houve diferença significativa na frequência alélica de Arg e Pro, sendo respectivamente de 284 e 230 nos indivíduos com Lúpus e de 166 e 90 no grupo controle ($OR = 2,17$, $\chi^2 = 6,472$; $P = 0,011$). Ao comparar a representação dos alelos, tem-se que o alelo Pro foi mais frequente nos pacientes com Lúpus (44,7%) que no grupo controle (35,2%).

Entre os indivíduos sadios não houve diferença significativa entre o número de indivíduos homocigotos (Arg/Arg e Pro/Pro) e heterocigotos (Arg/Pro), entretanto, entre o grupo com Lúpus, observou-se que mais da metade dos indivíduos (68,5%) eram heterocigotos, enquanto 31,5% eram homocigotos. ($P = 0,000$; $OR = 2,17$) conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Polimorfismo do códon 72 da p53 em pacientes com LES e grupo controle – Distribuição genotípica e alélica.

Genótipo	Grupo				χ^2	OR	IC OR	Valor de P
	Lúpus		Controle (sadios)					
	N	%	N	%				
Arg/Arg	54	21,0%	51	39,8%				
Arg/Pro	176	68,5%	64	50,0%	15,803	N/A	N/A	0,001
Pro/Pro	27	10,5%	13	10,2%				
Total	257	100,0%	128	100,0%				
Arg/Pro	176	68,5%	64	50,0%				
Arg/Arg e Pro/Pro	81	31,5%	64	50,0%	12,432	2,17	1,41-3,36	0,001
Alelo								
Pro	230	44,7	90	35,2				
Arg	284	55,3	166	64,8	6,472	1,49	1,10-2,04	0,011
Total	514	100,0	256	100,0				

Dentre os pacientes com Lúpus, houve associação significativa ($P < 0,05$) na manifestação de alguns sinais e sintomas entre indivíduos heterozigotos (Arg/Pro) e homozigotos (Arg/Arg e Pro/Pro). Entre os indivíduos com genótipo Arg/Pro, nota-se que houve maior frequência de febre (77,9% dos heterozigotos, OR = 3,24), perda de peso (78,4%, OR = 2,96), fotossensibilidade - ACR (75,7%, OR = 2,24), nefrites - ACR (74,6%, OR = 1,79), hematúria (75,9%, OR = 1,84) e artrite (72,0%, OR = 2,71), apresentando inclusive, presença de anticorpos anti-dna (78,9%, OR = 2,70) (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequências do genótipo Arg/Pro no códon 72 do gene p53 em indivíduos com LES por sinais e sintomas clínicos apresentados

	Genótipo				OR	IC OR	Valor de P
	Arg/Pro		outro				
	N	%	N	%			
Febre	127	77,9%	36	22,1%	3,24	1,87-5,61	0,000
Perda de peso	116	78,4%	32	21,6%	2,96	1,72-5,10	0,000
Fotossensibilidade - ACR	115	75,7%	37	24,3%	2,24	1,31-3,83	0,003
Nefrites - ACR	97	74,6%	33	25,4%	1,79	1,05-3,05	0,032
Hematúria	82	75,9%	26	24,1%	1,84	1,06-3,21	0,029
Artrite	157	72,0%	61	28,0%	2,71	1,35-5,42	0,004
Anti-dsDNA - alterado	101	78,9%	27	21,1%	2,70	1,55-4,70	0,002

6. DISCUSSÃO

As distribuições genotípica e alélica da população deste estudo assemelham-se às distribuições da população global do banco de dados de frequência alélica do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI.

O p53 selvagem participa de respostas imunológicas inatas e adaptativas, incluindo processos inflamatórios, sendo capaz de alterar o comportamento celular em resposta a um estressante. Essa relação contribui inclusive para a notadamente reconhecida função do p53 como supressor de tumor, de modo a promover senescência ou apoptose das células defeituosas. A ação do p53 na inflamação pode ser tanto para indução quanto para restrição da resposta inflamatória (LOWE et al, 2013; KAWASHIMA et al, 2013; CHEN et al, 2008; GUDKOV & KOMAROVA, 2010).

Foi demonstrado que o p53 selvagem atua antagonicamente ao NF-kB, um regulador da resposta imune que favorece a inflamação (PAL et al, 2014). Além destes mecanismos, outros fatores, como a ocorrência de mutações e a expressão do gene, podem estar envolvidos na relação do p53 com a patogênese de doenças inflamatórias, como por exemplo, o LES (LOWE et al., 2013; GUDKOV & KOMAROVA, 2010).

O LES é uma doença inflamatória e autoimune, caracterizada pela produção e ação de autoanticorpos (O'NEILL & CERVERA, 2010) levando a diversos efeitos deletérios. Recentemente foi demonstrado que o p53, expresso em células T, desempenha o papel de suprimir a autoimunidade, contribuindo assim, para a manutenção da homeostase imunológica (KAWASHIMA et al, 2013) o que reforça a hipótese sobre alterações no p53 estarem envolvidas na patogênese de doenças autoimunes.

Dentro deste contexto, alguns estudos têm reportado correlação entre polimorfismos do gene p53 e doenças autoimunes (GOODNOW, 2007; SINGH, 2012). Foi demonstrado que o polimorfismo Pro/Arg do gene p53 no códon 72 contribui para o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de Tireoidite de Hashimoto em chineses (CHEN et al, 2008). Entretanto, em recente metanálise, que considerou 4 estudos, não foi encontrada associação de presença de polimorfismo

do gene p53 no códon 72 e ocorrência de artrite reumatoide (RA) em nenhuma das populações (LEE et al., 2012).

Nossos achados sugerem uma associação do polimorfismo Arg72Pro com a ocorrência de LES em uma amostra brasileira. Estes resultados estão de acordo com o primeiro estudo relatado (LEE et al, 2005) e com estudos recentes (LEE et al., 2012) sugerindo que a ocorrência de polimorfismo no gene p53, mais especificamente em seu éxon 4, no códon 72, tem envolvimento na incidência de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).

No presente estudo foi identificada uma maior representação do genótipo Arg/Pro nos indivíduos com LES. Um estudo feito com uma população Iraniana, sendo 77 pacientes com LES e 30 controles, demonstrou que a presença do polimorfismo do gene p53 no códon 72 em sua forma heterozigótica (Pro/Arg) está mais associada à ocorrência de LES do que nas formas homozigotas (Pro/Pro e Arg/Arg) (NABAVI et al, 2014).

O primeiro estudo a ser reportado sobre a associação do polimorfismo do p53 no códon 72 encontrou maior associação da presença do alelo Pro, codificado pela sequência de três citosinas (CCC), e a ocorrência de LES em indivíduos asiáticos (LEE et al., 2005). Em uma recente metanálise (LEE et al., 2012), que considerou 6 estudos, foi demonstrado que a presença de citosina no alelo (CCC, que codifica para prolina) em indivíduos asiáticos, mas não em europeus, estava associada à ocorrência de LES. Estes resultados corroboram com os nossos resultados, pois encontramos a mesma relação entre a presença do alelo Pro e a ocorrência de LES em uma amostra brasileira.

O polimorfismo no códon 72 do gene p53 (Arg/Pro) ocorre em uma região do gene envolvida com a função desempenhada pela p53 na apoptose (PIETSCH et al., 2006). Quando a p53 é ativada, as principais manifestações são indução de apoptose ou impedimento do crescimento celular, devido à ligação da p53 a diversos genes, atuando como fator de transcrição (BRADY & ATTARDI, 2010).

Foi demonstrado que as variantes polimórficas da p53 se comportam de forma diferente, tanto bioquimicamente quanto biologicamente (THOMAS et al, 1999), demonstrando que a variante p33Arg é mais efetiva na indução de apoptose

(DUMONT et al, 2003) e a variante p53Pro tem maior papel no controle do ciclo celular, impedindo sua diferenciação e/ou crescimento. O genótipo Arg72 demonstrou ter maior função na apoptose por aumento de seu trânsito à mitocôndria (PIETSCH et al., 2006; DUMONT et al, 2003). Já o genótipo Pro72 demonstrou induzir maior nível de parada do ciclo celular na fase G1 (PIM et al, 2004). Considerando isso, possivelmente a presença do alelo Pro está ligada a um prejuízo no mecanismo de apoptose, podendo levar à maior ocorrência de LES.

Vários estudos têm demonstrado uma associação de polimorfismos do gene p53 com a ocorrência de câncer (GUDKOV & KOMAROVA, 2010). Um recente estudo sobre polimorfismo do gene de reparo XRCC1 demonstrou que LES e certos tipos de câncer podem apresentar vias similares em suas patogêneses, incluindo defeitos nos mecanismos de reparo celular. De forma geral, o p53 está envolvido com o controle do ciclo celular e do reparo celular, o que pode evidenciar que defeitos no papel do p53 nesses mecanismos podem estar ligados à ocorrência tanto de câncer quanto de LES (LIN et al, 2009).

Um estudo conduzido na Polônia com 155 pacientes com LES e 150 controles identificou que o genótipo Arg/Arg podia estar associado à ocorrência e maior morbidade do LES e, diferentemente dos nossos resultados, o alelo Arg esteve maior representado nos indivíduos com LES em comparação com os indivíduos saudáveis (grupo controle) (PIOTROWSKI et al, 2008).

Já um estudo conduzido na Espanha, possuindo 513 indivíduos com LES e 567 saudáveis (controle), não encontrou diferença estatística entre os dois grupos, tanto para a distribuição genotípica quanto para a alélica. Ao considerar também as características clínicas (sinais e sintomas), como envolvimento renal, fotossensibilidade, envolvimento articular e alterações hematológicas, não foram encontradas diferenças estatísticas entre o grupo com LES e o grupo controle (SÁNCHEZ et al, 2006).

Semelhantemente, um estudo conduzido com indivíduos asiáticos, europeus e afroamericanos não encontrou associação do polimorfismo Arg72Pro do gene p53 com a ocorrência de LES (ONEL et al, 2009).

Recente estudo conduzido no Irã apontou que os sinais e sintomas mais identificados nos pacientes com LES eram de origem renal, imunológica ou hematológica, incluindo também rash malar, artrite e fotossensibilidade (NABAVI et al, 2014). Com exceção de rash malar, nossos resultados indicam uma associação dos mesmos sinais e sintomas nos pacientes com LES, em especial, nos de genótipo Arg/Pro.

Em nosso estudo, encontramos associação entre o genótipo heterozigótico Arg/Pro e a ocorrência de várias manifestações clínicas como febre, perda de peso, fotossensibilidade – ACR, nefrites – ACR, hematuria, artrite e anti-dsDNA alterado. Nabavi et al (2014) encontraram associação estatística apenas entre o genótipo heterozigótico Arg/Pro e diarreia.

Em um estudo conduzido em um modelo animal foi demonstrado que o p53 pode estar associado à progressão da autoimunidade e produção de autoanticorpos (KUAN & COHEN, 2005). Nossos resultados corroboram esse achado, uma vez que o grupo com LES apresentaram presença de autoanticorpos, sobretudo considerando o genótipo Arg/Pro.

Piotrowski et al (2008) demonstraram associação entre a presença do genótipo Arg/Arg e a ocorrência de febre, diferentemente dos nossos resultados que sugerem associação entre o genótipo Arg/Pro.

Investigando o papel das proteínas CD64, p53 e p21 na patogênese de nefrite crônica, Rogovyi et al (2007) encontraram, em um estudo experimental de modelo animal, aumento dos níveis de p53 em tecido renal, que induziu atrofia por meio da ativação de mecanismos de apoptose, levando à perda de função característica da nefrite crônica.

Existem vários relatos sobre fotossensibilidade em pacientes com LES (KUHN & BEISSERT, 2005; LEHMANN & HOMEY, 2009; KUHN et al, 2014), inclusive este é um dos critérios de diagnóstico desta doença (BARBHAIYA & COSTENBADER, 2014). Em um estudo que considerou a associação de risco para LES e polimorfismos do gene de reparo XRCC1 foi observado associação estatística entre o polimorfismo estudado e a manifestação clínica de fotossensibilidade em indivíduos heterozigotos (LIN et al, 2009). O gene p53 também está envolvido com

mecanismos de reparo e devido a isso se pode estabelecer correlação destes resultados com a mesma ocorrência em nosso estudo.

McGregor et al (2002) relataram associação do polimorfismo do p53 Arg72Pro com a susceptibilidade a queimaduras de sol e câncer de pele e Kuhn et al (2006) relataram que células apoptóticas podem se acumular na pele de pacientes com Lúpus eritematoso cutâneo após exposição à radiação ultravioleta (UV).

Latonen & Laiho (2005), em uma revisão sobre as funções da proteína p53 na resposta ao dano celular causado por radiação ultravioleta (UV), demonstraram que a p53 está envolvida nos mecanismos de reparo e/ou morte celular a partir do dano causado pela exposição à radiação UV.

Tais dados sobre a relação entre exposição à radiação UV, p53 e fotossensibilidade corroboram com a hipótese de envolvimento do gene p53 com a ocorrência de fotossensibilidade em pacientes com LES.

No presente estudo encontramos associação estatística entre o polimorfismo do p53 Arg72Pro e a manifestação clínica de artrite. Entretanto, este resultado não condiz com a literatura hoje disponível sobre o tema que reporta que não há associação entre o polimorfismo do p53 Arg72Pro e a ocorrência de artrite reumatoide (LEE et al, 2012. MOODLEY & MODY, 2010).

7. CONCLUSÃO

Considerando os dados apresentados, o resultado deste estudo sugere uma possível associação do polimorfismo do p53 no códon 72 com a ocorrência de LES em uma amostra brasileira. Observou-se que a presença do alelo Pro foi maior em indivíduos que possuíam a doença, sugerindo que carregar esse alelo no códon 72 do gene p53 pode representar maior risco para LES.

Este estudo contribui para a verificação da associação do p53 na patogênese do LES em diferentes populações. Ressalta-se que a população brasileira é altamente miscigenada, de grande variabilidade genética e possui distribuição alélica e genotípica muito parecida com a população mundial, segundo dados do NCBI.

Além de encontrarmos nas distribuições genotípicas uma associação estatística entre o genótipo heterozigoto Arg/Pro e LES, nossos resultados também foram capazes de encontrar associação estatística entre tal genótipo (Arg/Pro) e diversas manifestações clínicas. Observa-se que a ocorrência de fotossensibilidade, presença de autoanticorpos, febre e nefrite seguem o disposto na literatura que demonstra associação do gene p53 e tais sintomas. Entretanto, nossos resultados divergem da literatura ao considerar a associação de polimorfismo p53 Arg72Pro e artrite.

Contudo, destaca-se que sendo o LES uma doença complexa, multifatorial, que pode apresentar variações em sua frequência, manifestação clínica e gravidade nas diferentes etnias e raças (GONZÁLEZ *et al.*, 2014) e que pode ter, atrelados à sua patogênese e desenvolvimento, fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, é interessante e necessário que haja maior investigação em diferentes populações para que se tenha um resultado mais sólido acerca da influência do polimorfismo do gene p53 no códon 72 e a ocorrência, manifestação clínica e gravidade de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBHAIYA, M; COSTENBADER, KH. Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. **Lupus**. 2014. May;23(6):588-95. doi: 10.1177/0961203314530488. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24763542>>.
- BRADY, Colleen A; ATTARDI, Laura D. p53 at a glance. **J Cell Sci**. 2010. Aug 1;123(Pt 15):2527-32. doi: 10.1242/jcs.064501. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20940128>>.
- CHEN RH, CHANG CT, WANG TY, HUANG WL, TSAI CH, TSAI FJ. p53 Codon 72 Proline/Arginine Polymorphism and Autoimmune Thyroid Diseases. **J Clin Lab Anal**. 2008;22(5):321-6. doi: 10.1002/jcla.20249. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** 22:321–326 (2008). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18803266>>.
- CUI, Y; SHENG, Y; ZHANG, X. Genetic susceptibility to SLE: Recent progress from GWAS. **J Autoimmun**. 2013 Mar;41:25-33. doi: 10.1016/j.jaut.2013.01.008. Epub 2013 Feb 6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395425>>.
- DIAS, Sofia Sapeta; ISENBERG, David A. Advances in systemic lupus erythematosus. **Medicine**. 2014. Volume 42, Issue 3, Pages 126–133. Disponível em: <[http://www.medicinejournal.co.uk/article/S1357-3039\(13\)00366-6/abstract](http://www.medicinejournal.co.uk/article/S1357-3039(13)00366-6/abstract)>.
- DUMONT P, LEU JI, DELLA PIETRA AC 3RD, GEORGE DL, MURPHY M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet**. 2003 Mar;33(3):357-65. Epub 2003 Feb 3. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12567188>>.
- FREED-PASTOR, Willian A; PRIVES, Carol. Mutant p 53: one name, many proteins. **Genes Dev**. 2012. Jun 15;26(12):1268-86. doi: 10.1101/gad.190678.112. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713868>>.
- GATTO, Mariele; ZEN, Margherita; GHIRARDELLO, Anna; BETTIO, Silvano; BASSI, Nicola; IACCARINO, Luca; PUNZI, Leonardo; DORIA, Andrea. Emerging critical issues in the pathogenesis of lupus. **Autoimmunity Reviews**. 2013. 12 (2013) 523–536. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000207>>.
- GONZÁLEZ, LA; TOLOZA, SM; ALARCÓN, GS. Impact of Race and Ethnicity in the Course and Outcome of Systemic Lupus Erythematosus. **Rheum Dis Clin North Am**. 2014 Aug;40(3):433-54, vii-viii. doi: 10.1016/j.rdc.2014.04.001. Epub 2014 Jun 7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25034155>>.
- GOODNOW, Christopher C. Multistep Pathogenesis of Autoimmune Disease. **Cell**. 2007. Jul 13;130(1):25-35. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17632054>>.
- GUDKOV, A V. KOMAROVA, E A. Pathologies Associated with the p53 Response. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2010 Jul;2(7):a001180. doi: 10.1101/cshperspect.a001180. Epub 2010 Apr 7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595398>>.

HOCHBERG, MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 1997 Sep;40(9):1725. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9324032>>.

KAMEN, Diane L. Environmental Influences on Systemic Lupus Erythematosus Expression. **Rheumatic Disease Clinics of North America.** 2014; 40(3):401–412. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/263930960_Environmental_Influences_on_Systemic_Lupus_Erythematosus_Expression>.

KAWASHIMA H, TAKATORI H, SUZUKI K, IWATA A, YOKOTA M, SUTO A, MINAMINO T, HIROSE K, NAKAJIMA H. Tumor Suppressor p53 Inhibits Systemic Autoimmune Diseases by Inducing Regulatory T Cells. **J Immunol.** 2013 Oct 1;191(7):3614-23. doi: 10.4049/jimmunol.1300509. Epub 2013 Sep 4. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24006461>>.

KUAN, Anita; COHEN, Philip L. p53 is required for spontaneous autoantibody production in B6/lpr lupus mice. **Eur J Immunol.** 2005 May;35(5):1653-60. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15789337>>.

KUHN, Annegret; BEISSERT, Stefan. Photosensitivity in lupus erythematosus. **Autoimmunity.** 2005; 38(7): 519–529. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16373257>>.

KUHN, Annegret; HERRMANN, Martin; KLEBER, Susanne; BECKMANN-WELLE, Maria, FEHSEL, Karin; MARTIN-VILLALBA, Ana; LEHMANN, Percy; RUZICKA, Thomas; KRAMMER, Peter H.; KOLB-BACHOFEN, Victoria. Accumulation of Apoptotic Cells in the Epidermis of Patients With Cutaneous Lupus Erythematosus After Ultraviolet Irradiation. **ARTHRITIS & RHEUMATISM.** Arthritis Rheum. 2006 Mar;54(3):939-50 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511837>>.

KUHN, Annegret; WENXEL, Jörg, WEYD, Heiko. Photosensitivity, Apoptosis, and Cytokines in the Pathogenesis of Lupus Erythematosus: a Critical Review. **Clinic Rev Allerg Immunol.** 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24420508>>.

LATONEN, Leena; LAIHO, Marikki. Cellular UV damage responses—Functions of tumor suppressor p53. **Biochimica et Biophysica Acta.** 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15921859>>.

LEE, YH; BAE, SC; CHOI, SJ; JI, JD; SONG, GG. Associations between the p53 codon 72 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Lupus.** 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427364>>.

LEE, YH; RHO, YH; CHOI, SJ; JI, JD; SONG, GG. The functional p53 codon 72 polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. **Lupus.** 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302680>>.

LEHMANN, Percy. HOMEY, Bernhard. Clinic and pathophysiology of photosensitivity in lupus erythematosus. **Autoimmun Rev.** 2009 May;8(6):456-61. doi: 10.1016/j.autrev.2008.12.012. Epub 2009 Jan 22. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167524>>.

LIN YJ, WAN L, HUANG CM, CHEN SY, HUANG YC, LAI CH, LIN WY, LIU HP, WU YS, CHEN CM, TSAI YH, TSAI CH, SHEU JJ, TSAI FJ. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and associations with systemic lupus erythematosus risk in the Taiwanese Han Chinese population. **Lupus**. 2009 Dec;18(14):1246-51. doi: 10.1177/0961203309345777. Epub 2009 Oct 30. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880550>>.

LOWE, Julie; SHATZ, Maria; RESNICK, Michael A.; MENENDEZ, Daniel. Modulation of immune responses by the tumor suppressor p53. **BioDiscovery** 2013; 8: 2; DOI: 10.7750/BioDiscovery.2013.8.2. Disponível em: <<http://www.biodiscoveryjournal.co.uk/Article/10.7750/BioDiscovery.2013.8.2#.VXhQ-tL4-M8>>.

MCGREGOR, JM; HARWOOD, CA; BROOKS, L; FISHER, SA; KELLY, DA; O'NIONS, J; YOUNG, AR; SURENTERAN, T.; BREUER, J; MILLARD, TP; LEWIS, CM; LEIGH, IM; STOREY, A; CROOK, T. Relationship Between p53 Codon 72 Polymorphism and Susceptibility to Sunburn and Skin Cancer. **J Invest Dermatol**. 2002 Jul;119(1):84-90. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164929>>.

MOODLEY, Devapregasan; MODY, Girish. Functional analysis of the p53 codon 72 polymorphism in black South Africans with rheumatoid arthritis—a pilot study. **Clinical Rheumatology**. 2010, Volume 29, Issue 10, pp 1099-1105. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532936>>.

NABAVI, Mohammad; GHADERI, Abbas; FATTAHI, Mohammad Javad; DANAIE, N.; ZANGOUIE, R.; FARANOUSH, Mohammad. Association between p53 codon 72 polymorphism and systemic lupus erythematosus. **Reumatologia**. 2014. Disponível em <http://www.researchgate.net/publication/271610383_Association_between_p53_codon_72_polymorphism_and_systemic_lupus_erythematosus>.

NABAVI, Mohammad; GHADERI, Abbas; FATTAHI, Mohammad Javad; DANAIE, N.; ZANGOUIE, R.; FARANOUSH, Mohammad. Codon 72 polymorphism of p53 gene and hematologic manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. **IJBC**. 2014; 6 (2) :63-68. Disponível em: <http://www.ijbc.ir/browse.php?a_code=A-10-1-63&slc_lang=en&sid=1&sw=systemic>.

O'NEILL, Sean; CERVERA, Ricard. Systemic lupus erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. 2010. Volume 24, Issue 6, December 2010, Pages 841–855. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21665130>>.

ONEL, KB; HUO, D; HASTINGS, D; FRYER-BIGGS, J; CROW, MK; ONEL, K. Lack of Association of the TP53 Arg72Pro SNP and the MDM2 SNP309 with systemic lupus erythematosus in Caucasian, African American, and Asian children and adults. **Lupus**. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2801155/>>.

PAL S, BHATTACHARJEE A, ALI A, MANDAL NC, MANDAL S, PAL M. Chronic inflammation and cancer: potential chemoprevention through nuclear factor kappa B and p53 mutual antagonism. **J Inflamm** (Lond). 2014 Aug 9;11:23. doi:

10.1186/1476-9255-11-23. eCollection 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25152696>>.

PIETSCH EC, HUMBEY O, MURPHY ME. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**. 2006 Mar 13;25(11):1602-11.. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550160>>.

PIM D, BANKS L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. **Int J Cancer**. 2004 Jan 10;108(2):196-9. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14639602>>.

PIOTROWSKI, P; LIANERI, M. MOSTOWSKA, M; WUDARSKI, M; CHWALINSKA-SADOWSKA, H; JAGODZINSKI, PP. Contribution of polymorphism in codon 72 of p53 gene to systemic lupus erythematosus in Poland. **Lupus**. 2008. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250140>>.

ROGOVYI, YE; ARKHIPOVA, LG; DIKAL, MV; FILIPOVA, LO; MIL', EN. Role of CD64, P53 and P21 proteins in the pathogenesis of the tubulo-interstitial syndrome in Masugi chronic nephritis. **Bull Exp Biol Med**. 2007 Oct;144(4):511-4. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18642700>>.

SÁNCHEZ E, SABIO JM, CALLEJAS JL, DE RAMÓN E, DE HARO M, JIMÉNEZ-ALONSO J, ORTEGO-CENTENO N, SÁNCHEZ-ROMÁN J, GONZÁLEZ-GAY MA, LÓPEZ-NEVOT MA, GONZÁLEZ-ESCRIBANO MF, MARTÍN J. Study of a functional polymorphism in the p53 gene in systemic lupus erythematosus: lack of replication in a Spanish population. **Lupus**. 2006. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17120592>>.

SINGH, Ram P. WALDRON, Richard T. HAHN, Bevra H. Genes, tolerance and systemic autoimmunity. **Autoimmun Rev**. 2012 Jul;11(9):664-9. doi: 10.1016/j.autrev.2011.11.017. Epub 2011 Nov 30. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155015>>.

TAN EM, COHEN AS, FRIES JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**. 1982 Nov;25(11):1271-7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7138600>>.

THOMAS, Miranda; KALITA, Ann; LABRECQUE, Sylvie; PIM, David; BANKS, Lawrence; MATLASHEWSKI, Greg. Two Polymorphic Variants of Wild-Type p53 Differ Biochemically and Biologically. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, 199. 0270-7306/99/\$04.0010 Feb. 1999, p. 1092–1100. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9891044>>.

VASEVA, Angelina V.; MOLL, Ute M. The mitochondrial p53 pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2009. Volume 1787, Issue 5, May 2009, Pages 414–420. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272808007032>>.

ANEXOS

Aprovação do projeto pelo comitê de ética

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



PARECER Nº 309/2009

PROTÓCOLO 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