

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DE ENZIMAS DE
METABOLIZAÇÃO/DETOXIFICAÇÃO NA SUSCEPTIBILIDADE AO
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Nadine Glesse

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre

Julho de 2011

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Agências financiadoras:

- CNPq
- CAPES
- FAPERGS

Instituição de origem:

- Laboratório de Imunogenética

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituições colaboradoras:

- Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Artur Bogo Chies, o Zéca, pelo exemplo de profissional, pela dedicação e paciência em todas as etapas do mestrado, por ter confiado em mim e ter me oferecido a oportunidade de trabalhar com ele, junto ao Laboratório de Imunogenética.

Ao PPGBM, especialmente ao Elmo e a Ellen, pessoas admiráveis e sensacionais, sempre prontos para ajudar, mesmo com muito trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa, pelo suporte financeiro, que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Odirlei e ao pessoal da Reumatologia do HCPA, pelo empenho e colaboração e, o mais importante, pelas amostras fornecidas. Sem eles, a realização deste trabalho não seria possível.

Ao pessoal do Laboratório de Imunogenética, que me acompanha desde o TCC, pelo auxílio, apoio e companheirismo em todos os momentos, seja dentro do laboratório, ou fora dele. É um grupo que eu tenho orgulho de fazer parte!

À Profa. Dra. Kátia Kvitko, pela colaboração e por tornar possível o desenvolvimento do trabalho.

À Paula, pelo grande auxílio nos PCRs, géis de poliacrilamida e principalmente na estatística (ela é fera), pela amizade, por me ajudar a resolver vários problemas e por aguentar minhas reclamações e lamentações. Ela é uma grande amiga e parceira!

À Gabi, que além de uma irmã de coração há muitos anos, foi minha companheira de laboratório e quase faltam palavras para agradecer tudo o que ela significa pra mim. Agradeço pela amizade, pela ajuda no lab, nos trabalhos e seminários, pelas palavras de conforto, mesmo quando eu quase a enlouquecia pelo MSN, pelas conversas, por dividir angústias, medos e alegrias, tanto na vida pessoal quanto profissional. Ela foi e é muito importante na minha vida!

Ao Bruno Paiva, que foi quem me recebeu no laboratório no ano de 2008, durante o TCC, que me ensinou a fazer um PCR, a corar gel com nitrato de prata e que, por muito tempo, me ajudou a solucionar dúvidas e problemas. Agradeço pela amizade dentro e fora do lab, pelos abraços apertados e confortantes, palavras carinhosas, pela parceria, pelos almoços e jantas gostosas que ele

preparou, por garantir a minha diversão durante todo esse tempo e, até mesmo, por pegar no meu pé todos os dias. Eu o considero um amigo muito querido!

À Cíntia, pela amizade, ajuda no lab e fora dele também, parceira de um sushi, de festas e de uma boa conversa, por escutar minhas reclamações com a maior paciência e dar dicas de como resolver tudo, por compartilhar dramas comuns que só a gente entende, mas também muitas alegrias!

Ao querido Mau, que em pouco tempo se tornou um grande amigo, o qual eu admiro muito, não só como pessoa, mas também por encontrar em qualquer coisa um motivo para fazer pesquisa. Agradeço pelas conversas, por me transmitir tranquilidade quando eu estava aflita, pela companhia para tomar um café e comprar trufas da tia, pelas risadas na fila do RU, por compartilhar suas trapalhadas em Porto Alegre, dramas e romances, por me ensinar a ver o lado bom de tudo e por tornar meus dias de trabalho muito mais divertidos. Ele é único e espero sempre poder ter este amigo do meu lado!

À Nayê, pela amizade, pelas longas conversas no T8, pela parceria pra dividir um táxi até as festas, pela companhia nos almoços do RU, e por me aguentar reclamando de contaminações de PCR, sempre com um sorriso no rosto. Adorei tê-la como colega e amiga!

À Francis, à Pietra e ao Bruno pela companhia nas disciplinas, mas em especial à Francis, por toda a ajuda no lab e por dividir momentos difíceis como a preparação do seminário de Princípios de Biologia Molecular! Agradeço a ela por garantir sempre boas risadas, ainda mais quando ela fica brava! Fran, quando eu crescer, quero ser igual a você!

À Pri Vianna, pela ajuda com a citometria de fluxo, pela disposição em ajudar sempre, mesmo super atarefada. Tenho uma grande admiração por ela e, com toda certeza, é um exemplo de profissional e pesquisadora!

Ao Tiago Dalberto, pelas conversas, pelo apoio, por sempre encontrar motivos para comemorar e fazer uma festa, por me passar vários dos seus conhecimentos e vivências de laboratório e também por chamar a atenção quando era preciso.

Ao Pedro, que eu adoro, que nunca nega ajuda a quem precisa, atencioso, querido, além de ter um grande conhecimento! Obrigada por tudo Pedro, até por me incomodar pra passar e servir café pra ti!

À Bel e à Fê Rabaioli, colegas que eu admiro muito, tanto pela competência, quanto pelas pessoas que são.

À Prizinha, ao Gui, à Fezis, à Pati, à Elvira e à Márcia, que passaram pelo lab e que deixaram a maior saudade. Pessoas queridas e divertidas, com quem eu tive o maior prazer de trabalhar e de quem sinto muita falta!

À Mila e à Ju, duas garotas para as quais eu “tiro o chapéu”. Elas são pessoas que a gente quer ter sempre por perto, amigas, queridas, inteligentes e muito competentes.

À Jacque, a nossa peruana, que nos presenteou com a sua chegada ao grupo. Obrigada pela pessoa que és, pela simpatia, carisma, afeto e amizade! Espero tê-la sempre por perto.

Ao Tiago Veit, pela parceria em montar e ministrar o curso de Biologia Molecular e pelas dicas de como solucionar contaminações de PCR.

À Tati, que embora eu tenha passado pouco tempo com ela no lab, agradeço pela ajuda com as alíquotas de DNA e pelas ótimas conversas.

À Camile, bastante tímida e quieta, que fui conhecendo aos poucos e descobri a excelente pessoa que ela é. Obrigada pela companhia no lab!

Ao pessoal da Bioinformática, mas especialmente ao Gustavo, Dinler e Maurício, eles são fera em tudo que fazem. Tenho a maior admiração por eles e agradeço principalmente ao Dinler por me ajudar a solucionar problemas no Mendeley e por ter dado um show de explicação sobre seu trabalho quando fui sua debatedora.

Às minhas queridas amigas de Santa Cruz do Sul, Dany, Rô e Nessa, que mesmo distantes, estiveram e estão sempre presentes, dentro do meu coração! Obrigada pela amizade, pelas tardes de chimas, pelo carinho, apoio em tudo, paciência e por compreender a minha ausência. Elas são essenciais na minha vida e muito do que sou hoje devo a elas!

Ao meu namorado, Augusto, pela força, carinho, dedicação, paciência quando estive ausente e por me apoiar durante todo o mestrado. Ele fez a minha jornada até aqui muito mais feliz!

À Ju Piva, que se tornou uma grande amiga e quem me ensinou muitas coisas. Obrigada pela amizade, pela força, pelas conversas, risadas e almoços divertidos. Obrigada por me lembrar, diversas vezes, que no fim dá tudo certo!

Ao Ismael e à Paulinha, pelas boas risadas, pelas jantas e pela amizade! São duas pessoas incríveis!

À amiga e chará Nadine Lino, que mesmo longe, sempre me incentivou a não desistir e seguir em frente. Obrigada pela sua amizade!

Àqueles que eu mais amo e mais fazem falta no meu dia-a-dia, os meus pais, meu irmão Gustavo, e em especial à minha irmã Carol, minha companheira de apto em Porto, que acompanhou de perto todo o caminho até aqui, que não se importou em ver a casa bagunçada e suja durante os dias que escrevia a dissertação e preparava seminários, enlouquecida. Agradeço pela força, pela companhia entre uma viagem e outra, pela parceira de festas e pelas conversas! Ela é fundamental na minha vida e faz a maior falta nos dias em que está ausente. Minha família é o meu maior tesouro e dedico cada pedacinho deste trabalho e empenho a eles!

A toda a família, meus tios, tias, primos e primas, especialmente à minha madrinha Vera, que foi muito importante pra mim, principalmente no final do mestrado e que sempre me incentivou a continuar e seguir em frente. Obrigada pelas palavras confortantes, pelo carinho e apoio, foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

A todas essas pessoas, que de alguma forma me ajudaram, me incentivaram, vibraram com cada conquista e que fizeram tudo isso valer a pena, **MUITO OBRIGADA!** Nada disso seria possível sem a ajuda de vocês e, por isso, este trabalho é um pouquinho de cada um!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	16
1.2 Manifestações do LES	16
1.3 Epidemiologia.....	19
1.4 Etiologia	23
1.4.1 Sistema Imunológico.....	23
1.4.2 Fatores Ambientais e Ocupacionais	25
1.4.3 Hormônios e Fatores Reprodutivos	28
1.4.4 Bases Genéticas.....	31
1.5 Genes de Enzimas de Metabolização/Detoxificação	36
1.5.1 Genes de Fase I: a Superfamília do Citocromo P450.....	37
1.5.2 Genes de Fase II: a Família Glutathione S-transferase	42
1.5.3 Genes de Enzimas de Metabolização/Detoxificação e LES	47
2. OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo Geral	52
2.2 Objetivos Específicos.....	52
3. ARTIGO CIENTÍFICO	53
ABSTRACT	54
INTRODUCTION.....	55
MATERIALS AND METHODS	59
Study populations	59
Sample Collection.....	60
<i>CYP1A1</i> and <i>CYP2E1</i> Genotyping	60
<i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> and <i>GSTP1</i> Genotyping	61
Statistical analysis	61
RESULTS	63
DISCUSSION.....	66
REFERENCES	73

TABLES	81
4. DISCUSSÃO DA DISSERTAÇÃO.....	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
6. ANEXOS	114
ANEXO 1	114
ANEXO 2	116

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACR – Colégio Americano de Reumatologia
- AIJ – Artrite Idiopática Juvenil
- ANA – Anticorpo Antinuclear
- Anti-La/SSB – Anticorpo contra a ribonucleoproteína La (SSB) associada ao RNA
- Anti-RNP – Anticorpo contra ribonucleoproteína
- Anti-Ro/SSA – Anticorpo contra o antígeno Ro (proteína pequena ligada ao RNA)
- Anti-Scl 70 – Anticorpo anti-DNA topoisomerase I
- Anti-Sm (Smith) – Anticorpo contra uma proteína nuclear ácida
- ATG5 – Proteína de Autofagia 5
- BANK1 – Proteína de Ancoragem de Célula B com Repetições de Anquirina
- BCR – Receptor de Célula B
- BLK – Tirosina-quinase de Linfócitos B
- bp – Pares de bases
- CR3 – Receptor do Complemento do tipo 3
- CTX – Ciclofosfamida
- CYP – Citocromo P450
- DHEA – Dehidroepiandrosterona
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- EBV – Vírus Epstein-Barr
- ECLAM – Consenso Europeu sobre avaliação de atividade do Lúpus
- Fc – Fração Constante (cristalizável)
- FCGR2A – Receptor 2A de baixa afinidade para a região Fc da Imunoglobulina G
- GST – Glutathione S-Transferase
- GWAS – Estudos de Associação do Genoma
- HLA – Antígeno Leucocitário Humano
- HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático
- IFN – Interferon
- Ig – Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- IRAK1 – Quinase 1 Associada ao Receptor de Interleucina 1
- IRF5/7 – Fator Regulatório 5/7 do Interferon

ITGAM – Integrina Alfa M

JNK – Quinase c-Jun N-terminal

KIR – Receptor tipo imunoglobulina de Célula *Natural Killer* (NK)

KIR2DS2 – Receptor de Célula NK com dois domínios de imunoglobulina e cauda citoplasmática curta, 2

KIR2DS5 – Receptor de Célula NK com dois domínios de imunoglobulina e cauda citoplasmática curta, 5

KIR3DS1 – Receptor de Célula NK com três domínios de imunoglobulina e cauda citoplasmática curta, 1

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

MBL – Proteína de Ligação à Manose

MECP2 – Proteína 2 de Ligação ao Metil CpG

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

OR – Razão de chances

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PTPN22 – Proteína Tirosina Fosfatase Não Receptora tipo 22

RFLP – Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição

RNA_m – Ácido Ribonucléico mensageiro

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio

SC – Sistema Complemento

SLAM – Medida da Atividade do Lúpus Sistêmico

SLC11A1 – Proteína Carreadora de Solutos da família 11, membro 1

SLE/LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

SLEDAI – Índice de Atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico

SLICC – Avaliação do Índice de Dano no Lúpus Eritematoso Sistêmico

SNP – Polimorfismo de um único nucleotídeo

STAT4 – Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 4

TCR – Receptor de Célula T

TLR – Receptor Toll-like

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TREX1 – Exonuclease de Reparo 3´- 5´ 1

UBE2L3 – Enzima Conjugadora de Ubiquitina E2 L3

UDP – Uridina 5'-difosfato

UTR – Região não-traduzida

VDRL – Teste Laboratorial de Pesquisa de Doença Venérea

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune que apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas e anormalidades imunológicas, afetando principalmente mulheres. É caracterizado pela perturbação da homeostase imunológica, que envolve a indução e produção de autoanticorpos, bem como pela formação e deposição de complexos imunes, que conduzem a uma intensa resposta inflamatória e dano tecidual. Há evidências de que fatores imunológicos, ambientais, hormonais e genéticos estão implicados na patogênese da doença. Genes e proteínas envolvidas na metabolização/detoxificação de xenobióticos são frequentemente utilizados como marcadores de susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças, cuja etiologia está relacionada à exposição a fatores de risco ambientais. Enzimas do Citocromo P450 (CYP) são as principais responsáveis pela fase I de detoxificação, na qual ativam o xenobiótico, tornando-o mais eletrofílico e, desta forma, mais reativo. As Glutathione S-transferases (GST) são enzimas detoxificantes de fase II e normalmente conjugam a glutathione reduzida com uma variedade de compostos eletrofílicos, como espécies reativas de oxigênio, facilitando a excreção de produtos tóxicos. Polimorfismos nos genes *CYP* e *GST* são capazes de alterar a expressão e a atividade catalítica das enzimas, sendo responsáveis por diferenças interindividuais quanto à capacidade de biotransformação de xenobióticos. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar a influência de três polimorfismos GST (*GSTM1 nulo*, *GSTT1 nulo*, e *GSTP1*Val*) e dois polimorfismos CYP (*CYP1A1*2C* e *CYP2E1*5B*) na predisposição ao LES em uma amostra de 370 pacientes com LES e 329 doadores de sangue saudáveis provenientes da região sul do Brasil. Os polimorfismos *CYP* foram genotipados por PCR-RFLP, enquanto que os polimorfismos GST foram genotipados por PCR multiplex (*GSTM1 nulo*, *GSTT1 nulo*) e PCR-RFLP para *GSTP1*. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre pacientes e controles usando o teste de Qui-Quadrado ou o teste Exato de Fisher. As análises foram realizadas subdividindo os indivíduos de acordo com sua origem étnica. Entre os indivíduos Euro-descendentes, observou-se uma menor frequência de genótipos heterozigotos *GSTP1*Val* em pacientes com LES em

comparação aos controles ($p=0,0047$; OR 0,63 CI 95% 0,43 – 0,93 em relação a *GSTP1*105Ile/Ile* e OR 0,49 CI 95% 0,26 – 0,92 em relação a *GSTP1*Val/Val*). No grupo Afro-descendente, houve tendência a uma maior frequência do alelo *GSTP1*Val* em pacientes quando comparados aos controles ($p=0,061$). O alelo *CYP2E1*5B* foi significativamente mais freqüente nos pacientes do que em controles ($p=0,038$; OR 2,69 CI 95% 1,00 – 8,42). Não foi observada qualquer implicação clínica dos polimorfismos *CYP* e *GST* nos pacientes com LES. Nossos dados sugerem um papel protetor do genótipo heterozigoto *GSTP1*105Ile/Val* em Euro-descendentes e uma possível influência do alelo *CYP2E1*5B* na susceptibilidade ao LES entre Afro-descendentes.

Palavras-chave: Glutathione S-transferase, Citocromo P450, polimorfismo, Lúpus Eritematoso Sistêmico, etnia.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune chronic inflammatory disease that presents a variety of clinical manifestations and immunological abnormalities, particularly affecting women. It is characterized by disruption of immunologic homeostasis, which results in the induction and production of autoantibodies, as well as the formation and deposition of immune complexes, leading to an intense inflammatory response and tissue damage. There is evidence that immunological, environmental, hormonal and genetic factors are involved in the pathogenesis of the disease. Genes and proteins involved in metabolism/detoxification of xenobiotics are often used as markers of susceptibility to the development of diseases whose etiology is related to exposure to environmental risk factors. Cytochrome P450 (CYP) enzymes are primarily responsible for phase I detoxification, in which activate the xenobiotic, making it more electrophilic and thus more reactive. The Glutathione S-transferases (GST) are phase II detoxifying enzymes and usually conjugate reduced glutathione with a variety of electrophilic compounds, such as reactive oxygen species, facilitating the excretion of toxic products. Polymorphisms in the *CYP* and *GST* genes can alter the expression and catalytic activity of enzymes, being responsible for interindividual differences regarding the capacity of xenobiotics biotransformation. The aim of our study was to evaluate the influence of three *GST* polymorphisms (*GSTM1 null*, *GSTT1 null* and *GSTP1*Val*) and two *CYP* polymorphisms (*CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B*) in SLE predisposition in a sample of 370 SLE patients and 329 healthy blood donors, both from southern Brazil. The *CYP* polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP, while the *GST* polymorphisms were genotyped by multiplex PCR and PCR-RFLP for *GSTP1*. Allelic and genotypic frequencies were compared between patients and controls using the Chi-square test or Fisher's exact test. Analyses were performed subdividing the individuals according to their ethnic origin. Among European-derived individuals, it was observed a lower frequency of *GSTP1*Val* heterozygous genotypes in SLE patients compared to controls ($p = 0.0047$; OR 0.63 CI 95% 0.43 - 0.93 in relation to *GSTP1*Ile/Ile*) and (OR 0.49 95% CI 0.26 - 0.92 in relation to *GSTP1*Val/Val*). In African-derived group, there was a trend to a higher frequency of *GSTP1*Val*

allele in patients when compared to controls ($p=0.061$). The *CYP2E1*5B* allele was significantly more frequent in patients than controls ($p=0.038$, OR 2.69 95% CI 1.00 - 8.42). We did not observe any clinical implication of the *CYP* and *GST* polymorphisms in patients with SLE. Our data suggest a protective role of the *GSTP1*105Ile/Val* heterozygous genotype in European-derived and a possible influence of the *CYP2E1*5B* allele in SLE susceptibility among African-derived.

Keywords: Glutathione S-transferase, Cytochrome P450, polymorphism, Systemic Lupus Erythematosus, ethnicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O termo lúpus é derivado da palavra latina que significa lobo e tem sido usado desde a época medieval para descrever uma ulceração eritematosa da face (Hay, 1995). O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune que envolve múltiplos órgãos e sistemas. O LES é caracterizado por uma perturbação da homeostase imunológica, que envolve a indução e produção de autoanticorpos não órgão-específicos, incluindo anti-antígenos nucleares (ANA), anti-DNA dupla fita e antifosfolípidios, bem como pela formação e deposição de complexos imunes, que conduzem a uma intensa resposta inflamatória e dano tecidual (Achour *et al.*, 2010; Cooper *et al.*, 1998; Jonsen *et al.*, 2007; Monticielo *et al.*, 2008).

A natureza sistêmica da doença foi reconhecida pela primeira vez por Kaposi e Hebra (1875), que descreveram lúpus eritematoso discóide concomitante com sintomas como febre, perda de peso, anemia, nódulos subcutâneos, artrite e adenite de glândulas linfáticas e salivares. Eles notaram o potencial para um desfecho fatal, freqüentemente precedido do envolvimento de grandes órgãos com pleuropneumonia, uremia e coma (Hay, 1995).

A doença é difícil de ser diagnosticada; pacientes levam em média quatro anos consultando cerca de três médicos para ter o diagnóstico correto. Parte do problema reside nas manifestações clínicas do LES que apresentam amplo espectro de variabilidade entre os pacientes e no fato de sinais e sintomas evoluírem ao longo do tempo. Além disso, freqüentemente os médicos não consideram lúpus no diagnóstico diferencial (Manzi, 2009).

1.2 Manifestações do LES

As características clínicas do LES são variadas e a evolução costuma ser crônica, com períodos de exacerbação e remissão. A doença pode cursar com artrite, nefrite, vasculite, miosite, quadros neuropsiquiátricos, hiperatividade retículo-endotelial e pneumonite, entre outros. Diante disso, convencionou-se realizar seu diagnóstico através da associação de achados clínicos e laboratoriais, conforme os critérios de classificação propostos pelo *American*

College of Rheumatology (ACR) em 1982, revisados em 1997 (Edworthy *et al.*, 1988; Hochberg, 1997; Tan *et al.*, 1982). Os critérios de diagnóstico encontram-se detalhados no Anexo 1 e o protocolo de avaliação clínica e laboratorial do ambulatório de lúpus eritematoso sistêmico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no Anexo 2.

A classificação diagnóstica do LES é realizada quando quatro ou mais dos onze critérios estiverem presentes, simultânea ou periodicamente, durante qualquer intervalo de observação (Lanna *et al.*, 2008). Embora raro, também é possível haver pacientes com LES que não exibem quatro dos critérios de classificação, principalmente quando apresentam anticorpo específico da doença, como anti-DNA nativo ou anti-Sm, e apenas uma das manifestações clínicas descritas nos anexos anteriores (Borba *et al.*, 2008)

Os critérios do ACR para classificação do LES buscam auxiliar os médicos nos cuidados primários e no estabelecimento de um diagnóstico mais confiável. Entretanto, especialmente levando-se em conta o fato da determinação da presença ou relevância de um critério exigir freqüentemente interpretação, estes critérios são inevitavelmente controversos (Manzi, 2001).

Algumas das principais manifestações do LES incluem envolvimento de pele e mucosas (52%), febre e mal-estar (48%) e artrites e artralguas (44%) (Boey, 1998). Além do típico *rash* (eritema) em forma de borboleta, uma ampla variedade de manifestações cutâneas é possível. Uma característica comum de apresentação do LES é a fotossensibilidade, muito comumente aparecendo em áreas de exposição solar, como testa, bochecha, pescoço, braços e mãos. Lesões discóides, cicatrizes cutâneas, urticária e bolhas são vistas em praticamente todos os pacientes. Úlceras orais, geralmente no palato mole ou duro, são comuns e normalmente indolores. A alopecia no LES pode ter várias formas, algumas vezes junto com erupções cutâneas discóides, mas mais freqüentemente aparecendo como uma perda difusa de cabelos, que é revertida após o surto agudo. Efeitos nas articulações são vistos em mais de 95% dos pacientes. Pericardite e pleurite são típicas manifestações cardíacas e pulmonares, podendo haver acúmulo de fluido e dor. As desordens hematológicas

mais comuns associadas ao LES incluem anemia, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia (Manzi, 2001).

Alguns dos sintomas mais comuns do LES não são específicos da doença. Sintomas como fadiga, mal-estar, febre na ausência de infecção e perda de peso são comuns em diversas condições patológicas crônicas. Sintomas e sinais órgão-específicos também são frequentemente similares àqueles de outras doenças. O envolvimento renal é comum e responsável por grande morbidade e mortalidade associadas à doença (Manzi, 2001). A maioria dos estudos realizados em países em desenvolvimento relatou que o acometimento renal ocorre em pelo menos um terço dos pacientes (Tikly & Navarra, 2008). Efeitos neurológicos podem resultar da hipercoagulação ou, menos frequentemente, de vasculite (Manzi, 2001). A pneumonia também causa morbidade e mortalidade no LES, representando a doença pulmonar mais comum nesta população. A taxa de infecções no LES parece exceder a de outras doenças autoimunes e estados imunocomprometidos e, dada a importância clínica da infecção no LES, investigações avaliaram fatores clínicos e demográficos de risco para infecções, incluindo idade, etnia, nível de escolaridade, plano de saúde, severidade do LES ou duração, presença de leucopenia e uso de terapias imunossupressoras (Kinder *et al.*, 2007). Eventos cardiovasculares têm emergido como a maior causa de morbidade e mortalidade nestes pacientes (Bruce *et al.*, 2003; Cervera *et al.*, 2003; Thorburn & Ward, 2003). Além disso, uma elevada prevalência de outras doenças autoimunes pode ser observada entre pacientes com LES [revisado em (Monticieleo *et al.*, 2008)].

O LES tende a ser mais grave em homens do que em mulheres, e com um pior prognóstico também. Homens apresentam mais manifestações cutâneas, serosite, doença renal, convulsões e neuropatia periférica em relação às mulheres. Portanto, é fundamental considerar a natureza mais severa da doença em homens no diagnóstico e no acompanhamento destes pacientes (Yacoub Wasef, 2004).

A morte nos pacientes pode ser devido à atividade do LES (quando são envolvidos órgãos ou sistemas vitais), complicações decorrentes do tratamento

(especialmente infecções) ou a seqüelas de longo prazo (como doenças cardiovasculares) (Bernatsky *et al.*, 2006).

1.3 Epidemiologia

A verdadeira incidência do LES é difícil de ser estimada devido à complexidade do diagnóstico (Manzi, 2001). Embora seja uma doença de ocorrência mundial, é mais comumente encontrada em alguns países e, dentro de um país, certos grupos étnicos parecem ser mais susceptíveis a desenvolver esta condição do que outros (Lau *et al.*, 2006). 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 (Borchers *et al.*, 2010).

A incidência de LES pode variar num intervalo de 1 a 10 por 100.000 pessoas por ano (Pons-Estel *et al.*, 2010). Já a taxa de prevalência do LES varia de 17 a 48 por 100.000 pessoas na população mundial (Tebbe & Orfanos, 1997). A prevalência é maior nas populações americanas afro-descendentes, afro-caribenhas, nativas norte-americanas, indianas, polinésias e chinesas quando comparada à da população de ascendência européia. Entretanto, a alta ocorrência de LES em determinados grupos, como africanos ocidentais quando comparados com europeus, não parece ser esclarecida pelas diferenças nas freqüências dos alelos em alguns *loci* onde associações com o LES foram encontradas, tais como aqueles na região HLA (Molokhia & McKeigue, 2006).

Nos últimos 50-60 anos houve um aumento de mais de dez vezes na incidência anual de LES nos países ocidentais industrializados. Este fato é possivelmente relacionado à exposição a fatores ambientais, e também devido ao aumento da detecção do LES (Tikly & Navarra, 2008).

Nos Estados Unidos, a prevalência e incidência do LES são maiores entre negros do que entre brancos, com um risco relativo em torno de 3,0 (Cooper *et al.*, 1998). Ainda nos Estados Unidos, estudos apontam que mulheres afro-americanas apresentam maior prevalência de LES quando comparadas a mulheres de outras origens étnicas (Hochberg, 1990; McCarty *et al.*, 1995). Em

um estudo epidemiológico recente, considerando apenas os países europeus, Espanha, Suécia e Islândia foram os que tiveram maior prevalência de LES (Danchenko *et al.*, 2006).

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 (Cooper *et al.*, 1998; Lahita, 1999; Yacoub Wasef, 2004). 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 (Vilar & Sato, 2002). 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 (Achour *et al.*, 2010).

Um estudo brasileiro revelou uma incidência de LES em torno de 8,7 casos por 100.000 pessoas por ano, sendo que para mulheres a incidência era de 14 casos para cada 100.000 pessoas por ano e para homens 2,2 casos para cada 100.000 por ano. A média de idade de novos casos de LES encontrada neste estudo foi de 31,8 anos. A média para mulheres foi de 31,4 anos e, para homens, de 35 anos (Vilar & Sato, 2002).

Dados recentes apontam taxas de prevalência (por 100.000) de 19,3 em sauditas (Al-Arfaj *et al.*, 2002), 60 em chineses de Hong Kong (Mok & Lau, 2003) e 159 em porto-riquenhos (Molina *et al.*, 2007). Em Birmingham, Inglaterra, um estudo encontrou prevalência de 27,7 por 100.000 na população geral e aproximadamente nove vezes maior (206/100.000) em mulheres afro-caribenhas (Johnson *et al.*, 1995).

Em 2001, um estudo investigou a prevalência de LES no oeste da África, onde foi relatada ser muito baixa (Bae *et al.*, 1998). Para testar esta hipótese, comparou-se a prevalência da doença entre migrantes recentes do oeste da África para o Reino Unido com a prevalência em pessoas do oeste da África

descendentes do Caribe. Foi avaliada a prevalência de LES (por 100.000) em mulheres em uma área do Sul de Londres, e a estimativa foi de 177 em afro-caribenhos, 110 em africanos ocidentais e 35 em europeus. Desta forma, a alta prevalência de LES em migrantes do oeste da África, embora não tão alta quanto a da população de origem afro-caribenha, sugere que a doença não é rara no oeste da África, podendo existir uma maior susceptibilidade genética para a ocorrência de LES em pessoas descendentes dessa região quando comparadas a outros grupos (Molokhia *et al.*, 2001).

As taxas de incidência e prevalência de LES na infância 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 [revisado em (Huemer *et al.*, 2001)]. Em Taiwan, a prevalência de LES na infância foi estimada em 6,3/100.000 pessoas (Huang *et al.*, 2004).

O LES foi descrito, na primeira metade do século 20, 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 (Borchers *et al.*, 2004). Em 1950, apenas 50% dos pacientes com lúpus sobreviviam 5 anos após o diagnóstico; agora, graças ao melhor tratamento e diagnóstico precoce, 80% a 90% sobrevivem pelo menos 10 anos (Manzi, 2009).

Há diferenças regionais nas formas e causas de morte no LES. Nos países 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 (Wadee *et al.*, 2007).

Um estudo brasileiro que avaliou a mortalidade devido ao LES em São Paulo de 1985 a 2004 concluiu que os pacientes morrem com idades mais jovens do que aqueles que vivem em países desenvolvidos. Além disso, os pesquisadores apontam que não houve uma redução na taxa de mortalidade nos últimos 20 anos neste estado, o que poderia ser explicado principalmente por

fatores sócio-econômicos, tais como dificuldade para conseguir tratamento médico adequado (Souza *et al.*, 2010).

Um estudo publicado em 2006 mostrou que a taxa de mortalidade global do LES aumentou de 1979 a 1998 ($p < 0,001$), sendo este aumento proporcionalmente maior entre afro-americanos, que têm um risco de mortalidade 2 a 3 vezes maior do que euro-descendentes. Fatores biológicos que modificam o risco de incidência ou morte por LES, como a etnicidade, em oposição aos fatores sócio-econômicos e de acesso a cuidados de saúde, podem ser responsáveis por esse fenômeno (Krishnan & Hubert, 2006).

Diferenças étnicas nas características clínicas do LES também têm sido notadas. A doença é geralmente menos severa em pacientes de ancestralidade européia do que em africanos, asiáticos, hispânicos, mestiços e várias populações indígenas (Borchers *et al.*, 2010). O LES se desenvolve em uma idade mais precoce em afro-descendentes, com uma diferença média de idade de início de 5-10 anos. Comparados a pacientes euro-descendentes, afro-descendentes 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 aderência a medicamentos (Cooper *et al.*, 1998).

Além disso, 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. 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 (Pons-Estel *et al.*, 2010).

Variações semelhantes também são observadas quanto à atividade da doença e acúmulo de dano nos órgãos. 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 (Borchers *et al.*, 2010).

1.4 Etiologia

A etiologia do LES permanece ainda desconhecida, porém há evidências de que fatores imunológicos, ambientais, hormonais e genéticos possam estar implicados na patogênese da doença (Achour *et al.*, 2010; Borchers *et al.*, 2010; Crispin *et al.*, 2010). O LES pode assim ser visto como um processo multi-determinante envolvendo um ou mais estímulos ambientais, que agem sobre indivíduos com susceptibilidade genética provavelmente em conjunto a alguns fatores de risco (Cooper *et al.*, 1998).

1.4.1 Sistema Imunológico

O sistema imune está intimamente envolvido na patofisiologia do LES. O Sistema Complemento (SC) envolve tanto o sistema imune inato quanto adaptativo e tem um papel importante na patogênese do LES (Truedsson *et al.*, 2007). O SC é composto por mais de 20 diferentes proteínas e tem papel central na resposta inflamatória, sendo importante para a destruição de microorganismos através da opsonização, ativação leucocitária e lise de células-alvo. Particularmente interessante no contexto do LES é o fato do SC ser responsável pela remoção de complexos imunes, e sua ativação ser muito importante nos mecanismos de lesões teciduais e disfunções orgânicas.

O SC pode ser ativado por três diferentes vias: a via clássica, a via alternativa e a via da lectina. A via clássica é ativada por complexos imunes, envolvendo os componentes C1, C2 e C4. Ela é iniciada por IgM e IgG, ligadas a antígenos que acionam a ativação de pró-enzimas, conduzindo à clivagem de C2 e C4 e, eventualmente, à clivagem de C3. A via alternativa depende da deposição de C3b na superfície de microorganismos, dos fatores B e D e da properdina (P)

desenvolvem eritemas transitórios em associação com infecções piogênicas (Botto & Walport, 1993).

Assim, acredita-se que deficiências do complemento podem predispor ao LES devido a alterações nos mecanismos de remoção das células apoptóticas, induzindo, dessa forma, defeitos na tolerância imunológica e auto-imunização (Garred *et al.*, 2001).

É possível que a imunidade deficiente nos pacientes com LES conduza a um desequilíbrio da autotolerância. Várias alterações já foram descritas no sistema imunológico de pacientes com LES: a) frequência reduzida de células T citotóxicas e T supressoras, e geração prejudicada de células T policlonais com atividade citolítica; b) defeitos na tolerância de células B, sinalização anormal de receptores de células B e hiperatividade global de células B com elevada produção de gamaglobulina policlonal; c) anormalidade da sinalização antígeno-receptor manifestada pelo aumento da resposta de cálcio e hiperfosforilação de vários substratos de proteínas citosólicas, e baixa atividade do fator nuclear kapa beta; d) elevação dos níveis circulatórios de interferon alfa e gama, interleucinas 1-beta, 6, 4, 8 e 10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e quimioatração de citocinas; e) defeitos na fagocitose com aumentos dos níveis de circulação de células apoptóticas; e f) receptores toll-like (TLR) 7 e 9 anormais, sinalizando um aumento da expressão de TLR-9 nas células B do sangue periférico e células plasmáticas (Monticelo *et al.*, 2008; Pugh-Bernard & Cambier, 2006; Tsokos *et al.*, 2000).

1.4.2 Fatores Ambientais e Ocupacionais

Relativamente, pouco se sabe sobre exposições ocupacionais e ambientais em relação ao risco de desenvolver LES, no entanto, a contribuição do ambiente é inquestionável, devido à concordância clínica em gêmeos monozigóticos ser limitada a menos da metade dos pares de irmãos (Cooper *et al.*, 1998; Crispin *et al.*, 2010).

Já foi descrito que metais pesados, como o mercúrio, podem induzir doenças renais auto-imunes ou síndromes como o LES, mas as evidências provenientes de estudos em seres humanos são limitadas. Em contrapartida, há

vários estudos epidemiológicos envolvendo pó da sílica em relação ao LES e outras doenças autoimunes (Brown *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 1998). A exposição à sílica pode aumentar a geração de material apoptótico, que é uma importante fonte de autoantígenos (Parks & Cooper, 2005). Uma avaliação do risco de LES associado com a exposição ocupacional ao pó da sílica e a solventes orgânicos foi realizada em uma população urbana de Boston e encontrou significativa associação entre a exposição à sílica por mais de um ano e a ocorrência de LES (OR 4,3; IC 95% 1,7-11,2). Por outro lado, uma associação entre a exposição a solventes orgânicos e o LES não foi encontrada nesta região (Finckh *et al.*, 2006).

A geração de autoanticorpos e doenças autoimunes, como o lúpus, tem sido associada com o uso de certas drogas em humanos. Pacientes com LES relataram aumento de reações alérgicas a medicamentos, particularmente com relação a antibióticos. A alergia a medicações foi associada com um risco 3,1 vezes maior de desenvolver LES. Estudos iniciais sugeriram que a procainamida e a hidralazina se associam com maior risco de desenvolver LES, enquanto a quinidina se associa com um risco moderado. A injeção no timo de procainamida-hidroxilamina, um metabólito reativo da procainamida, resulta na indução de autotolerância, aparecimento de linfócitos T reativos à cromatina e produção de anticorpos contra a cromatina (Kretz-Rommel & Rubin, 2000).

Recentemente, o lúpus induzido por drogas foi associado com o uso de novos moduladores biológicos, tais como os inibidores de TNF- α e interferons. Além disso, os mecanismos responsáveis pelo seu desenvolvimento podem variar dependendo da droga ou, até mesmo, do paciente. O lúpus induzido por drogas é caracterizado pelo surgimento de manifestações clínicas após exposição a essas drogas ou outras menos frequentes, sendo que após a suspensão das mesmas, há completo desaparecimento das alterações clínicas e laboratoriais (Chang & Gershwin, 2011; Cooper *et al.*, 2002b).

O papel de aminas aromáticas e hidrazinas, encontradas em alguns solventes, corantes capilares e fumo do tabaco têm recebido atenção por causa da similaridade estrutural destes componentes com a de certas medicações associadas com LES induzido por drogas (Cooper *et al.*, 1998). Uma meta-análise apresentou evidências de que o fumo aumenta a susceptibilidade ao LES

(Costenbader *et al.*, 2004). A exposição à fumaça do tabaco pode alterar proteínas endógenas, incluindo o DNA. Quando espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas a partir do metabolismo dos constituintes do fumo do tabaco, causam modificações no DNA, são formados adutos de DNA. O DNA modificado torna-se, portanto, mais imunogênico. Foi demonstrado que pacientes com LES apresentam níveis mais elevados de adutos no DNA do que indivíduos controle, e estes adutos são encontrados em altos níveis nos complexos imunes. Possivelmente, o DNA danificado em fumantes conduz à formação de autoanticorpos contra o DNA dupla fita, podendo ter um papel no desenvolvimento do LES (Freemer *et al.*, 2006).

A luz solar é o mais evidente fator ambiental que pode exacerbar a doença. Queratinócitos de pacientes com LES apresentaram aumentada citotoxicidade quando irradiados com luz ultravioleta, que pode estimulá-los a expressar antígenos nucleares em sua superfície e aumentar a secreção de citocinas que estimulariam linfócitos B a produzir anticorpos autorreativos (Casciola-Rosen *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1998; Furukawa *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1990).

O vírus Epstein-Barr (EBV) também tem sido identificado como um possível fator no desenvolvimento do LES. Este vírus pode residir em células B ou interagir com esses linfócitos. Gross *et al.* relataram uma alta freqüência de células B infectadas com EBV em pacientes lúpicos comparados com controles, sendo as células infectadas predominantemente linfócitos B de memória (Gross *et al.*, 2005). No entanto, o paradoxo é que, embora 90% da população adulta esteja infectada com o vírus EBV, a prevalência de LES permanece baixa, o que acentua o caráter multifatorial da doença (D'Cruz *et al.*, 2007). Além disso, a presença de infecções com o parvovírus humano B19, citomegalovírus, herpes zoster e herpes simples também mostraram associação com o risco de desenvolvimento do LES. Estudos relataram um aumento dos níveis de anticorpos contra retrovírus endógenos no soro de pacientes lúpicos e têm-se encontrado uma importante correlação entre estes anticorpos e autoanticorpos específicos e determinadas características clínicas da doença (Cooper *et al.*, 1998; Crispin *et al.*, 2010; Perl *et al.*, 1995). O mimetismo molecular é um dos possíveis mecanismos que pode ser utilizado para explicar essas associações.

Algumas proteínas virais são semelhantes a autoantígenos e, portanto, podem desencadear reatividade cruzada com antígenos próprios. Apesar do grande número de estudos sobre o tema, ainda não há uma prova conclusiva que apóie diretamente a vinculação de LES à infecção por retrovírus endógenos ou exógenos em humanos (Cooper *et al.*, 1998; Crispin *et al.*, 2010).

Outras infecções não virais, como tripanossomíase e micobacterioses podem induzir a produção de anticorpos anti-DNA e sintomas semelhantes ao LES (Steinberg, 1995; Via & Handwerger, 1993).

Uma recente avaliação do efeito do material particulado do ambiente sobre os aspectos clínicos do LES em pacientes de Montreal sugeriu que variações de curto-prazo nos níveis de poluição do ar podem influenciar a atividade da doença, podendo desencadear inflamação e autoimunidade (Bernatsky *et al.*, 2011).

Fatores dietéticos também têm sido relacionados ao LES. Estudos com murinos indicaram que antioxidantes e ácidos graxos $\omega 3$ podem ser protetores contra o LES, mas que a elevada ingestão de gordura pode acelerar o processo da doença (Cooper *et al.*, 1998; Weimann & Weiser, 1992).

1.4.3 Hormônios e Fatores Reprodutivos

Os hormônios têm função imunorregulatória e alterações em suas concentrações podem ter um papel na patogênese do LES, influenciando na incidência e no curso clínico da doença. A dicotomia sexual na incidência do LES e propriedades imunorregulatórias dos hormônios sexuais sugerem que há relação causal ou modulatória entre o LES e a atividade dos hormônios estradiol, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), progesterona ou prolactina (McMurray & May, 2003). O papel dos estrogênios endógenos e andrógenos no desenvolvimento do LES é sugerido pela marcada predominância de pacientes mulheres com LES (mais de 85%) e por estudos experimentais em camundongos, demonstrando exacerbação da doença por estrogênios e a melhoria mediada por androgênios. Diferenças entre pacientes do sexo masculino e feminino em relação a andrógenos e estrógenos, entretanto, não explicam completamente a distribuição de LES e de outras doenças autoimunes por idade e sexo e não podem explicar diferenças nos riscos em cada sexo (Cooper *et al.*, 1998). O

estrogênio estimula timócitos, linfócitos TCD8+ e TCD4+, linfócitos B, macrófagos, a liberação de citocinas e a expressão de moléculas do HLA, tanto de classe I quanto de classe II e moléculas de adesão endotelial (Cutolo *et al.*, 1995). Já os androgênios tendem a ser imunossupressores (Lahita, 1990). O desequilíbrio entre níveis de estrogênio e androgênio parece então influenciar a resposta imune (Cooper *et al.*, 2002a).

Estudos realizados com modelos murinos demonstraram que o estrogênio ou a prolactina podem levar a um fenótipo autoimune, com um aumento da maturidade de células B autorreativas de alta afinidade, que podem competir com células B autorreativas de baixa afinidade. Também foi observado que a prolactina acelera o desenvolvimento da doença em camundongos propensos ao lúpus (Cohen-Solal *et al.*, 2008; Crispin *et al.*, 2010). Níveis elevados de prolactina em crianças pré-púberes (6-13 anos) com LES correlacionaram-se com a atividade da doença e com manifestações no sistema nervoso central (El-Garf *et al.*, 1996).

A maior incidência de LES é freqüentemente vista em idades pré-menopausa (20-50 anos), embora alguns estudos (Hopkinson *et al.*, 1993; Jonsson *et al.*, 1990) tenham encontrado maiores taxas em mulheres com mais de 50 anos. Ciclos menstruais e idade precoce de menarca podem estar associados com o risco de desenvolvimento da doença por aumentarem a exposição ao estrogênio (Cooper *et al.*, 1998). Outra análise da influência dos hormônios no LES relatou que a menopausa ocorreu mais cedo em mulheres com subsequente desenvolvimento de LES em comparação as controle ($p < 0,001$), sugerindo que o início antecipado da menopausa natural, ao invés de diminuir o risco de LES, em função do menor tempo de exposição ao estrogênio, pode ser um marcador de susceptibilidade à doença. Houve ainda uma pequena associação entre LES e o uso atual ou a duração do uso da terapia de reposição hormonal ou de contraceptivos orais, e nenhuma associação com o uso prévio de medicamentos para a fertilidade (Cooper *et al.*, 2002a).

Sanchez-Guerrero *et al.* relataram um aumento do risco de LES associado com o uso de reposição terapêutica de estrogênio. Esta análise foi baseada em um estudo de coorte prospectivo com mulheres, onde o risco de LES foi ligeiramente superior entre aquelas que em alguma vez fizeram uso de

contraceptivos orais, mas não foi observada relação entre o tempo de uso do contraceptivo e o risco de LES. (Cooper *et al.*, 1998; Sanchez-Guerrero *et al.*, 1997; Sanchez-Guerrero *et al.*, 1995). Um estudo realizado em 2005, que também avaliou o efeito de contraceptivos orais na atividade do LES, relatou que estes não aumentam o risco de deflagrar a doença em mulheres com LES, cuja doença encontra-se estabilizada (Petri *et al.*, 2005).

A gravidez, em geral, agrava o LES, mas isso não é devido ao aumento dos hormônios estradiol ou progesterona. Na verdade, os níveis desses hormônios são mais baixos no segundo e terceiro trimestres em pacientes com LES em comparação com mulheres saudáveis grávidas. Essas variações hormonais podem resultar em uma menor ativação da resposta imune humoral, provavelmente relacionada a uma mudança no balanço estrógeno/andrógeno, o que poderia explicar a diminuição da atividade da doença observada durante o terceiro trimestre da gestação em pacientes (Doria *et al.*, 2002). Um estudo de caso-controle não encontrou associação entre o risco de desenvolver LES e a gravidez, e sugeriu que mulheres no período de lactação apresentariam menor risco de desenvolver LES (Cooper *et al.*, 2002a). Além disso, conforme descrito, mulheres grávidas com LES apresentam níveis séricos de prolactina mais elevados em comparação a mulheres grávidas saudáveis (Jara-Quezada *et al.*, 1991).

Um estudo que analisou os níveis de diferentes hormônios em homens com LES mostrou um número significativo deles apresentando níveis mais elevados de hormônio estradiol e níveis mais baixos de testosterona, em comparação a homens saudáveis, sugerindo também o papel do estrogênio no desenvolvimento do LES (Sequeira *et al.*, 1993).

O hormônio Dehidroepiandrosterona (DHEA), um andrógeno fraco, apresenta-se em níveis diminuídos em pacientes com doenças inflamatórias, como o lúpus, e estes níveis parecem correlacionar-se inversamente com a atividade da doença. Portanto, o tratamento com DHEA poderia conferir alguns benefícios clínicos aos pacientes (Sawalha & Kovats, 2008). Mas, os efeitos deste hormônio sobre a atividade do LES permanecem controversos (Crosbie *et al.*, 2007).

Recentemente, também foi proposto que os cromossomos sexuais podem influenciar a expressão do LES. Estudos com camundongos machos e fêmeas gonadectomizados, que foram geneticamente modificados para expressar XX, XO (fêmea), XY ou XXY (macho), indicaram que a presença de dois cromossomos X aumenta a severidade da doença (Crispin *et al.*, 2010; Smith-Bouvier *et al.*, 2008).

1.4.4 Bases Genéticas

Várias linhas de evidência sugerem que fatores genéticos desempenham um papel importante no desenvolvimento do LES. A taxa de concordância de 24-58% em gêmeos monozigóticos comparada a 2-5% em gêmeos dizigóticos indica uma relevante contribuição genética na susceptibilidade ao LES. Quase 10% dos familiares de pacientes com LES têm a doença. Uma análise recente mostrou que 27% de 195 crianças nascidas de mães com LES apresentaram positividade para anticorpos ANA sem que mostrassem sintomatologia clínica (Arnett *et al.*, 1984; Borchers *et al.*, 2010; Monticeli *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, houve um aumento relevante no entendimento da genética do LES, e isso se acelerou ainda mais com a publicação de estudos de associação que englobam todo o genoma (GWAS), pois levou a identificação de novos genes candidatos por meio de estudos de mapeamento fino (Rhodes & Vyse, 2008).

Existe um consenso geral de que a susceptibilidade genética ao LES é determinada por uma combinação de variantes alélicas que são relativamente comuns na população geral e que, individualmente, trazem apenas modestas contribuições ao risco global de desenvolver a doença (Borchers *et al.*, 2010). A base genética do LES é, no entanto, muito complexa e é difícil prever quantos genes contribuem para a sua predisposição. Estima-se que mais de 100 genes estejam envolvidos na ocorrência do LES (Horiuchi *et al.*, 2009). Durante os últimos anos, vários estudos têm identificado potenciais marcadores genéticos associados à doença e que envolvem muitas vias, processos e tipos diferentes de células (Deng & Tsao, 2010; Fraser *et al.*, 2003; Jakab *et al.*, 2007).

A importância dos genes do sistema imune no desenvolvimento do LES destaca-se pela frequência aumentada de certos haplótipos HLA, tais como os

envolvendo *DR2* e *DR3* em pacientes lúpicos (Huang *et al.*, 2003). O haplótipo *HLA DR3-DQ2-C4AQ0* do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é o fator genético mais fortemente associado ao LES em caucasianos até o momento (Jonsen *et al.*, 2004). Um estudo mostrou um aumento significativo na frequência dos haplótipos *HLA-DRB1*0301*, *DQA1*0501* e *DQB1*0201* em pacientes quando comparados a controles saudáveis (Granados *et al.*, 2006). Corroborando estes achados, GWAS apontaram as regiões contendo os alelos *HLA-DRB1* e *HLA-DQA1* como importantes fatores de susceptibilidade para o desenvolvimento do LES em europeus e chineses e o alelo *HLA-DQB1* em europeus (Rhodes & Vyse, 2008).

O locus do gene do fator de necrose tumoral (TNF)- α está situado dentro da região MHC, no cromossomo 6p. O polimorfismo *TNF- α -308A* está localizado na região promotora do gene e está associado com o aumento da produção de TNF- α . Este polimorfismo encontra-se em forte desequilíbrio de ligação com o haplótipo *HLA B8, DR3*, que confere um risco 2 a 3 vezes maior de desenvolver LES. No entanto, o polimorfismo *TNF- α -308A* também parece ter um efeito independente no LES. Werth *et al.*, demonstraram uma maior susceptibilidade a lesões cutâneas fotossensíveis em pacientes com LES apresentando este polimorfismo (Ahmad & Bruce, 2001; Rood *et al.*, 2000; Sullivan, 2000; Werth *et al.*, 2000) .

Os receptores Fc de imunoglobulina G parecem também ser importantes na patogênese do lúpus. Moléculas contendo o aminoácido R (arginina) ao invés de H (histidina) na posição 131 do receptor Fc γ IIa (rFc γ IIa) apresentam capacidade diminuída de ligar IgG₂. Do mesmo modo, a substituição de um aminoácido na posição 158 (fenilalanina [F] ao invés de valina [V]) no rFc γ RIIIa reduz a capacidade de ligação de IgG₁, IgG₃ e IgG₄ ao receptor. Essas variantes podem resultar em um *clearance* subótimo de complexos imunes da circulação, o que pode contribuir para a patogênese das manifestações mediadas por imuno-complexos (Jonsen *et al.*, 2004). Um estudo apontou o grupo de genes da interleucina 1 como candidatos associados à doença (Jakab *et al.*, 2007). Além disso, achados indicam associação entre um polimorfismo no íntron 2 do gene do antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) e o LES (Jonsen *et al.*, 2004).

Deficiências hereditárias, completas e parciais, de diversos componentes do sistema complemento (SC), tais como as que envolvem C1q, C1r, C1s, C4 e C2, e alelos nulos de *C4A* (*C4AQ0*), foram descritos como fatores de predisposição ao LES (Huang *et al.*, 2003; Saevarsdottir *et al.*, 2006). O *clearance* defeituoso do material apoptótico poderia ser uma consequência destas deficiências, determinando exposição prolongada de autoantígenos ao sistema imune e a geração de anticorpos contra eles (Monticielo *et al.*, 2008).

Além do MHC, recentes estudos apontam que genes não-HLA também têm papel no desenvolvimento da doença. Há evidências de que quimiocinas e citocinas contribuem para o desenvolvimento inflamatório e a progressão de doenças autoimunes, como o LES (Sanchez *et al.*, 2006). Investigações têm dado atenção à superexpressão do Interferon do tipo I nos pacientes. Um grande estudo sugeriu um haplótipo do fator regulatório 5 do Interferon (*IRF5*), que conduz à expressão aumentada de múltiplas isoformas de *IRF5*, como importante fator de risco para a doença (D'Cruz *et al.*, 2007). Outros genes envolvidos na produção de interferon e no reconhecimento de ácidos nucléicos já relacionados à doença são o *STAT4* (Abelson *et al.*, 2009), o gene da osteopontina (Kariuki *et al.*, 2009), *IRAK1* (Jacob *et al.*, 2009), *TREX1* (Namjou *et al.*, 2011) e *TLR8* (Armstrong *et al.*, 2009).

Um recente estudo, realizado na região Norte do Brasil, também relatou associação entre a predisposição ao LES e a deleção GTGT na região 3'UTR do gene *SLC11A1*, presença do perfil *KIR2DS2 +/KIR2DS5 +/KIR3DS1 +* e aumento do número de genes *KIR* estimulatórios (Pedroza *et al.*, 2011).

Ainda outros genes candidatos para a associação com o LES incluem os genes *BLK*, *BANK1* e *LYN*, os quais desempenham um papel crítico no controle da ativação das células B após a sinalização através do receptor de célula B (BCR). Já o gene *ITGAM* foi identificado em GWAS de europeus, mas não em populações chinesas. Esse gene codifica a integrina α_M que juntamente com a integrina β_2 , forma um receptor de superfície celular, conhecido como receptor de complemento tipo 3 (CR3) ou Mac-1. A molécula variante poderia influenciar o tráfico de leucócitos e também a absorção de células apoptóticas ou complexos

imunes mediada por CR3. [revisado em (Borchers *et al.*, 2010; Rhodes & Vyse, 2008)].

A associação do gene *PTPN22* com o LES também já foi proposta em muitos estudos. *PTPN22* codifica uma proteína tirosina fosfatase conhecida por regular negativamente a ativação de células T. Polimorfismos nesse gene foram recentemente associados com a susceptibilidade a diversas doenças autoimunes, como o lúpus (Chung & Criswell, 2007; Criswell, 2008; Kaufman *et al.*, 2006). Em um estudo atual, realizado na Grécia, verificou-se que o alelo T do SNP *C1858T* do gene *PTPN22* foi mais comum em pacientes com LES do que em indivíduos controle ($p=0,017$) (Eliopoulos *et al.*, 2011). A substituição de uma arginina por um triptofano leva a um ganho de função e a variante desse gene codifica uma fosfatase mais ativa. Vang e colaboradores mostraram que a proteína resultante desta variação é um potente inibidor da sinalização de TCR. No entanto, ainda não está claro como este ganho de função conduz à autoimunidade (Chung & Criswell, 2007; Vang *et al.*, 2005).

Além destes, o gene da Proteína de Ligação à Manose (MBL), que é estruturalmente similar a C1q, tem emergido como um candidato à susceptibilidade ao LES devido ao papel da MBL na imunidade inata e a possível associação entre a sua deficiência e doenças auto-imunes (Glesse *et al.* dados não publicados; Monticielo *et al.*, 2010; Sandrin-Garcia *et al.*, 2011).

Os genes da família Glutathione S-transferase (GST) e da superfamília do citocromo P450 (CYP), envolvidos na detoxificação e metabolização de agentes tóxicos, bem como genes relacionados com a atividade anormal de proteínas quinases, fosfatases, e moléculas de sinalização intracelular também podem estar envolvidos na predisposição ao LES (Horiuchi *et al.*, 2009; Monticielo *et al.*, 2008).

As associações relatadas para os genes de receptores de Imunoglobulina G *FCGR2A* e *FCGR3B*, bem como para o gene *ITGAM* (junto com a deficiência de C1q) sugerem que a resposta inicial do sistema imune inato para o reconhecimento de autoantígenos é um passo crítico na patogênese do LES. *FCGR3B* é expresso somente em neutrófilos, e *FCGR2A* e *ITGAM* são expressos em células apresentadoras de antígenos. É possível que variantes desses genes conduzam a uma ligação não tão eficiente dos fragmentos autoantigênicos aos

receptores, prejudicando assim a captura e o *clearance* de imunocomplexos. Efeitos podem surgir a partir de uma modificação mais sutil na sinalização intracelular e, posteriormente, da resposta celular (como a produção de IFN tipo 1) a ligantes destes receptores. Variantes dos genes *IRF5*, *STAT4* e possivelmente de *IRF7* podem resultar em uma resposta hiperativa e pró-inflamatória a sinais precoces, gerando uma desregulação da resposta tanto do sistema imune inato quanto adaptativo a sinais iniciais de citocinas (Rhodes & Vyse, 2008).

Uma falha na depuração adequada das células apoptóticas também já foi apontada como um possível mecanismo patogênico chave no LES. Muitos dos genes candidatos para a predisposição à doença desempenham um papel fundamental na apoptose e no ciclo celular. A autofagia, quando excessiva, pode desencadear apoptose e este processo é controlado por genes que atuam em um sistema de conjugação tipo-ubiquitina. O gene *ATG5* pode agir como um interruptor, determinando se a autofagia progredirá para a apoptose e, portanto, foi identificado como um candidato para associação à predisposição à doença (Rhodes & Vyse, 2008).

Alguns dos genes com possíveis contribuições para o LES parecem desempenhar um papel na regulação da expressão gênica ou estar envolvidos na expressão de proteínas. *MECP2* codifica uma proteína envolvida na metilação do DNA e está localizado no cromossomo X, o que é de grande interesse, uma vez que o LES é uma doença que acomete predominantemente mulheres. Metilação é um importante mecanismo de regulação da expressão gênica e a metilação anormal do DNA de células T já foi implicada na patogênese do lúpus (Rhodes & Vyse, 2008; Sawalha *et al.*, 2008). Além disso, o gene da enzima conjugadora de ubiquitina *UBE2L3* também já foi sugerido como um gene candidato e tem papel na maturação de fatores de transcrição e também na regulação da resposta pró-inflamatória de receptor Toll-like (TLR) (Budarf *et al.*, 2011; Rhodes & Vyse, 2008).

Conseqüências funcionais da presença das variantes citadas envolvem desordem do sistema imune, incluindo defeitos na ativação e diferenciação funcional de células B, células T, células dendríticas e outras células do sistema

imune; degradação de proteínas, transporte anormal de peptídeos através das membranas celulares, defeitos nas vias do complemento, disfunção reticulo-endotelial, produção anormal de imunoglobulinas, células apoptóticas e liberação de hormônios (Crispin *et al.*, 2010; Garrett-Sinha *et al.*, 2008; Monticielo *et al.*, 2008).

1.5 Genes de Enzimas de Metabolização/Detoxificação

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. (Rohr *et al.*, 2008).

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 (Wilkinson & Clapper, 1997).

Uma grande proporção de substâncias químicas conhecidas é biotransformada no organismo, podendo dar origem a compostos mais tóxicos do que o composto original que serão convertidos em metabólitos não-tóxicos, podendo ser excretados do corpo (Autrup, 2000).

A maior parte dos processos de biotransformação ocorre em duas fases, dependendo do substrato em que ele estiver atuando. As enzimas de fase I, ou enzimas de ativação, representadas pela superfamília do citocromo P450, ativam o xenobiótico, tornando-o mais eletrofílico e desta forma mais reativo, normalmente com a introdução de um grupamento funcional. Já as enzimas de fase II, ou de detoxificação, como a superfamília glutathione S-transferase, normalmente atuam com a conjugação dos metabólitos com um substrato endógeno, por enzimas transferases. O resultado deste processo é a transformação dos metabólitos em substâncias hidrofílicas, e assim, passíveis de excreção (Guecheva & Henriques, 2003; Wilkinson & Clapper, 1997).

toxinas ambientais. A expressão das CYP pode ser controlada nos níveis de transcrição e tradução do RNAm e em nível pós-traducional (Bozina *et al.*, 2009).

As enzimas CYP estão variavelmente distribuídas em diferentes tecidos. A maioria pode ser encontrada na membrana do retículo endoplasmático em células do fígado, embora estas enzimas sejam também encontradas em quase todos os tecidos e órgãos (intestino, pulmão, rins, cérebro, linfócitos e placenta). Os substratos fisiológicos incluem esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos, aminas biogênicas, e os substratos xenobióticos incluem diversas substâncias químicas tóxicas. As enzimas CYP catalisam predominantemente reações oxidativas, inserindo um átomo de oxigênio em um substrato, ou seja, uma reação de ativação (ou fase I) (Bozina *et al.*, 2009).

As principais isoformas responsáveis pela biotransformação de químicos e, especialmente, pela ativação metabólica de pré-carcinógenos são CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1 e CYP3A4. Já as enzimas mais importantes para a metabolização de drogas são CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 (Bozina *et al.*, 2009).

Polimorfismos nos genes CYP causam diferenças interindividuais na ativação e inativação de agentes anticancerígenos e cancerígenos (Rodriguez-Antona *et al.*, 2010). Diferenças interétnicas nas freqüências das variantes gênicas polimórficas são também importantes e já foram relatadas (Bosch *et al.*, 2006; Bozina *et al.*, 2009; Gaspar *et al.*, 2002).

1.5.1.1 Gene *CYP1A1*

O gene *CYP1A1* está localizado no cromossomo 15q24.1 e contém sete éxons e seis íntrons abrangendo 5810 pb. (Corchero *et al.*, 2001). A enzima CYP1A1 é expressa principalmente em órgãos extrahepáticos, especialmente nos tecidos epiteliais. É capaz de catalisar o primeiro passo no metabolismo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), podendo levar a formação de moléculas eletrofílicas carcinogênicas. Além disso, CYP1A1 catalisa a oxidação de muitos xenobióticos, como 7-etoxiresorufina, teofilina, cafeína, e de substâncias endógenas, tais como 17 β -estradiol e estrona (Bozina *et al.*, 2009).

Os polimorfismos do gene *CYP1A1* afetam tanto a regulação quanto a estrutura do gene. Mais de 11 alelos do gene *CYP1A1* já foram identificados (Oscarson & Ingelman-Sundberg, 2002), dos quais *CYP1A1*2B*, **2C*, **3*, **4*, **5*, **6*, **7*, **8*, **9*, **11* mostram mudanças de aminoácidos. No entanto, não está claro se estas mudanças alteram a atividade catalítica na oxidação de xenobióticos, incluindo HPAs (Bozina *et al.*, 2009). Uma série de variantes alélicas *CYP1A1* tem sido associada com maior indutibilidade e/ou atividade da enzima (San Jose *et al.*, 2010). A primeira variante alélica identificada foi *CYP1A1*2A*, localizada na região não codificante 3' (também conhecida como *MspI*, polimorfismo *m1*, T3801C ou T6235C) e é encontrada em 5% dos Caucasianos (Garte *et al.*, 2001). *CYP1A1*2C* (*Ile462Val*, polimorfismo *m2* ou A4889G) é rara em Caucasianos e é mais detectada em desequilíbrio de ligação com *CYP1A1*2A*. A combinação das duas variantes é denominada *CYP1A1*2B* (San Jose *et al.*, 2010). A variante Val mostra uma atividade catalítica quase 2 vezes maior do que a variante Ile (Autrup, 2000). *CYP1A1*3*, consistindo de uma troca de base T3205C (*m3* ou T5639C), também parece conferir atividade enzimática reforçada, embora seja extremamente rara em Caucasianos (ver Figura 3). Já a variante *CYP1A1*4*, uma mudança de aminoácido Thr461Asn (*m4* ou C4887A), que ocorre no éxon 7, é detectada em Caucasianos com uma freqüência de cerca de 3% e também tem sido relacionada a maior eficiência catalítica da enzima (Cascorbi *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 2009; San Jose *et al.*, 2010). A maior atividade catalítica de *CYP1A1* conduz a um aumento da geração de estresse oxidativo nas células (Sharma *et al.*, 2010).

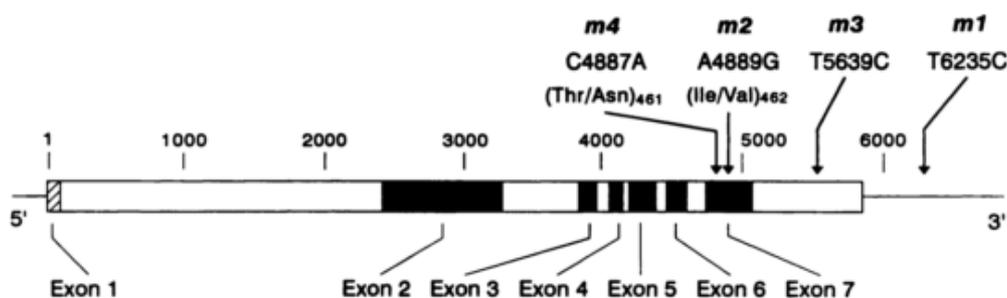


Figura 3: Localização dos polimorfismos do gene *CYP1A1* humano [modificado de (Cascorbi *et al.*, 1996)].

Há evidência de diferenças nas freqüências dos polimorfismos de *CYP1A1* relacionadas à etnia. As variantes alélicas *CYP1A1*2A* e *CYP1A1*2C* são mais freqüentes em Asiáticos (Japoneses) do que em Caucásios. O alelo *CYP1A1*3* é específico de negros Africanos e não tem sido encontrado em populações Asiáticas ou Euro-descendentes. Este polimorfismo foi associado ao aumento de risco de adenocarcinoma em Afro-americanos (Bozina *et al.*, 2009; Inoue *et al.*, 2000; Taioli *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2006).

1.5.1.2 Gene *CYP2E1*

O gene *CYP2E1* está localizado no cromossomo 10q24.3-qter e contém nove éxons (Umeno *et al.*, 1988). A enzima *CYP2E1* é considerada uma enzima chave na ativação metabólica de uma grande variedade de substâncias tóxicas, incluindo nitrosaminas, benzeno, cloreto de vinila e solventes halogenados, como o tricloroetileno. *CYP2E1* é expressa no fígado, com a maior concentração na região centrolobular, sendo também uma das enzimas que metabolizam o etanol em acetaldeído, e sua expressão é induzida pela ingestão de álcool (Bozina *et al.*, 2009; Neafsey *et al.*, 2009). A atividade de *CYP2E1* é acompanhada pela geração de uma quantidade significativa de uma forma ativa de oxigênio, que prejudica as membranas celulares e macromoléculas e conduz à formação de adutos de DNA (Deka *et al.*, 2010).

Existe uma grande variação interindividual quanto à expressão dessa enzima, e parte dessa variação pode ser explicada por polimorfismos no gene *CYP2E1* (Autrup, 2000). Vários polimorfismos já foram descritos ao longo do gene. O polimorfismo *CYP2E1*5B*, localizado na região 5' regulatória com substituição C → T na posição -1053 e perda do sítio de restrição *RsaI*, é um dos mais importantes polimorfismos identificados. O genótipo homocigoto *c2/c2* está associado com um aumento de dez vezes na taxa de transcrição do gene *CYP2E1*. Esse polimorfismo ocorre em desequilíbrio de ligação com a substituição -1293 (G → C, *PstI*) em algumas populações, mas não em outras. Onde é detectado o desequilíbrio completo, são descritos os haplótipos *CYP2E1*1A* e *CYP2E1*5B*, que geralmente são denominados de alelos (Deka *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 1992; Uematsu *et al.*, 1991). Polimorfismos funcionais neste

gene exibem variações interindividuais na susceptibilidade a várias doenças e diferenças na resposta à terapêutica. As frequências das variantes desses genes diferem consideravelmente entre diferentes grupos étnicos. A frequência do alelo *c2* é de 24% a 30% para populações asiáticas, 2% a 3% para caucasianos, 0,3% a 7% para afro-americanos, 15% para americanos de ascendência mexicana e 18% para taiwaneses [revisado em (Deka *et al.*, 2010)].

O polimorfismo *PstI* na região flanqueadora 5' do gene pode afetar a transcrição e já foi associado à susceptibilidade ao câncer de pulmão em fumantes (Autrup, 2000).

1.5.1.3 Polimorfismos CYP e a Susceptibilidade a Doenças

Uma grande variedade de estudos tem mostrado que polimorfismos genéticos de enzimas CYP são importantes fatores de susceptibilidade individual para diversas doenças (Wu *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010).

Polimorfismos no gene *CYP1A1* foram associados com diversos tipos de câncer, incluindo câncer de mama (Dialyna *et al.*, 2001), de cólon (Ye & Parry, 2002), de colo do útero (Kim *et al.*, 2000), de esôfago (Sreeja *et al.*, 2005) e de pulmão (Chen *et al.*, 2006). O genótipo *Val/Val* do polimorfismo *CYP1A1*2C* está fortemente relacionado com a incidência de câncer de pulmão entre os Japoneses, enquanto estudos em Euro-descendentes mostraram resultados controversos. A presença de pelo menos um alelo variante *MspI CYP1* já foi associado com um aumento do risco de carcinoma de células escamosas do pulmão, enquanto nenhuma associação foi encontrada para o polimorfismo no éxon 7 (Le Marchand *et al.*, 1998). Recentemente, foi relatada influência de *CYP1A1* na síndrome dos ovários policísticos em adolescentes do sexo feminino da Turquia, indicando que alelos variantes do gene podem afetar o metabolismo e o transporte de estrógenos (Akgul *et al.*, 2010).

O polimorfismo *CYP2E1* RFLP também foi associado com câncer de pulmão em um estudo caso-controle japonês (Uematsu *et al.*, 1991). Além disso, polimorfismos no gene *CYP2E1* estão associados a neoplasias malignas de diferentes origens celulares, incluindo no fígado (Deka *et al.*, 2010).

Um estudo publicado em 2005 indicou que polimorfismos do gene *CYP1A1* e *CYP2E1* provavelmente desempenham um papel importante na susceptibilidade a doença pulmonar severa e de vias aéreas em crianças com bronquite crônica e pneumonia (Korytina *et al.*, 2005). Outra análise mostrou que polimorfismos no gene *CYP2E1* podem ter associação com um aumento do risco de doenças do fígado no Nordeste da Índia (Deka *et al.*, 2010).

Estudos também têm investigado a associação entre LES e os polimorfismos de enzimas de biotransformação. Já foi relatado que o genótipo *CYP1A1*1A/*2C* pode conduzir a mudança estrutural da proteína e ter um papel no desenvolvimento do LES em chineses (Zhang *et al.*, 2010).

1.5.2 Genes de Fase II: a Família Glutathione S-transferase

As Glutathione S-transferases (GSTs) correspondem a uma família de supergenes que codificam enzimas diméricas encontradas em células de uma ampla variedade de seres vivos (Holley *et al.*, 2007). As GSTs estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas de bactérias a mamíferos. Dentre as Glutathione S-transferases de mamíferos, cerca de 95% são predominantemente enzimas de fração citosólica e 5% pertencem à fração microsomal (retículo endoplasmático) e mitocondrial (Rodrigues, 2003).

Tradicionalmente as GSTs são consideradas enzimas detoxificantes de fase II que protegem as células contra metabólitos endógenos e exógenos através da conjugação da glutathione reduzida com diferentes compostos eletrofílicos. Essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, incluindo carcinógenos ambientais, ROS e agentes terapêuticos (Hayes *et al.*, 2005; Holley *et al.*, 2007; Strange *et al.*, 2001). Além da detoxificação eletrofílica de xenobióticos, essas transferases inativam aldeídos alfa e beta-insaturados, quinonas, epóxidos e hidroperóxidos formados como metabólitos secundários durante o estresse oxidativo. As GSTs estão intimamente envolvidas na biossíntese de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona e progesterona, assim como na degradação da tirosina (Hayes *et al.*, 2005). A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutathione com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a

excreção (Torres *et al.*, 2004). Embora a grande maioria dos conjugados de glutathione represente produtos de detoxificação, existem muitos exemplos onde a atividade das enzimas GSTs não resulta na detoxificação, mas na ativação (Autrup, 2000).

Existem várias isoformas de enzimas GSTs, com padrões de expressão característicos em vários tecidos e diferenças na especificidade por substratos (Dusinska *et al.*, 2001). Duas distintas famílias de supergenes codificam proteínas com atividade glutathione S-transferase. Pelo menos 16 genes codificam proteínas expressas na fração citosólica dos tecidos e pelo menos 6 genes são expressos nas membranas. Em humanos, oito famílias de genes codificam as GSTs solúveis: *Alpha* no cromossomo 6, *Mu* no cromossomo 1, *Theta* no cromossomo 22, *Pi* no cromossomo 11, *Zeta* no cromossomo 14, *Sigma* no cromossomo 4, *Kappa* no cromossomo 7 e *Chi* (também chamado *Omega*) no cromossomo 10 (Gene home - NCBI, 2011; Strange *et al.*, 2001).

Polimorfismos têm sido descritos em muitos genes nestas famílias, embora, até o momento, mais atenção tenha sido dada aos polimorfismos das famílias *Mu*, *Theta* e *Pi* (Strange *et al.*, 2001).

1.5.2.1 Genes *GSTM1* e *GSTT1*

Cinco classes de genes *Mu* estão situados em tandem (5´-*GSTM4*-*GSTM2*-*GSTM1*-*GSTM5*-*GSTM3*-3´) em um agrupamento de 20 kb no cromossomo 1p13.3 (Strange *et al.*, 2001). O gene *GSTM1* codifica uma isoenzima (*GSTM1*-1) relevante na desativação de intermediários carcinogênicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Bolt & Thier, 2006). A enzima *GSTM1* é altamente expressa no fígado e é conhecida por detoxificar óxidos de areno, incluindo a forma carcinogênica final do benzo(*a*)pireno, benzo(*a*)pireno diol-epóxido, além de desempenhar um papel na detoxificação da forma carcinogênica final da aflatoxina B1, 7,8-epóxido de aflatoxina B1, por conjugação com a glutathione (Autrup, 2000).

Diferenças interindividuais em *GSTM1* são devidas à deleção do gene (o genótipo nulo) ou a variação alélica, e indivíduos com o genótipo nulo (homozigoto *GSTM1**0) não expressam a proteína (Autrup, 2000). A deleção

ocorre devido a um evento de recombinação entre duas seqüências homólogas localizadas acima (*upstream*) e abaixo (*downstream*) de *GSTM1* (Xu *et al.*, 1998). *GSTM1*A* e *GSTM1*B* diferem em uma base no éxon 7 e codificam monômeros que formam enzimas homo e hetero-diméricas ativas (Strange *et al.*, 2001). As conseqüências dos genótipos resultantes das combinações dos alelos *GSTM1*0*, *GSTM1*A* e *GSTM1*B* têm sido intensamente investigadas (Bolt & Thier, 2006).

O gene *GSTT1* está localizado no cromossomo 22q11.23 e codifica a enzima GSTT1-1, que é altamente conservada durante a evolução e desempenha um importante papel na biotransformação de fase II de uma série de medicamentos e produtos químicos industriais como, por exemplo, drogas citostáticas, hidrocarbonetos e hidrocarbonetos halogenados (Bolt & Thier, 2006). Nesse gene também foi descrito um alelo de deleção, *GSTT1 nulo*, que resulta em ausência completa da atividade enzimática (Pemble *et al.*, 1994; Sprenger *et al.*, 2000). A deleção ocorre pós-recombinação entre duas seqüências homólogas localizadas *upstream* e *downstream* do gene *GSTT1* (Sprenger *et al.*, 2000).

Deleções ou os chamados alelos “nulos” para estas duas isoformas, *GSTM1* e *GSTT1*, ocorrem com freqüência em populações normais, apesar das freqüências destas deleções variarem com a etnia (Tew *et al.*, 2001b). O genótipo nulo *GSTM1* é encontrado em cerca de 50% dos europeus, japoneses e americanos brancos, mas em apenas um quarto de afro-americanos. A freqüência genotípica de *GSTM1 nulo* em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus do Rio Grande do Sul foi de 50% (Gaspar *et al.*, 2004) e de 34% em uma amostra de afro-descendentes (Kvitko *et al.*, 2006). Um estudo, realizado no Rio de Janeiro, obteve a freqüência de genótipo *GSTM1 nulo* de 49% em euro-descendentes e 34% em afro-descendentes (Rossini *et al.*, 2002).

O genótipo nulo *GSTT1* é relativamente comum na Ásia e incomum em outras populações, incluindo europeus (Dusinska *et al.*, 2001). A freqüência do genótipo *nulo GSTT1* encontrada em uma amostra de brasileiros descendentes de europeus do Rio Grande do Sul foi de 21,1% (Gaspar *et al.*, 2004) e de 28% em afro-descendentes (Kvitko *et al.*, 2006). No Rio de Janeiro, 25% de euro-descendentes e 26% de afro-descendentes apresentaram o genótipo nulo para este gene (Rossini *et al.*, 2002). Estudos de populações saudáveis têm

demonstrado que a freqüência de homozigotos para os alelos nulos *M1* e *T1* em euro-descendentes é de 49-55% e 15-19%, respectivamente, com aproximadamente 8% de brancos sendo homozigotos para ambos os alelos nulos. Populações saudáveis de afro-americanos têm mostrado freqüências de homozigotos para os alelos nulos *M1* e *T1* de 27-35% e 24%, respectivamente, com 4% dos indivíduos homozigotos para ambos genótipos nulos. Interessantemente, genótipos nulos para uma ou mais enzimas GSTs, especialmente *GSTM1*, são mais comuns em japoneses com Síndrome de Sjögren e em caucasianos com LES, com fenótipo de auto-anticorpos anti-Ro positivo/anti-La negativo (Tew *et al.*, 2001b).

1.5.2.2 Gene *GSTP1*

O gene *GSTP1*, localizado no cromossomo 11q13, codifica a isoenzima P1, que está envolvida no metabolismo de compostos halogenados de baixo peso molecular e epóxidos reativos. *GSTP1* é expressa em todos os tecidos, mas principalmente no esôfago (Jain *et al.*, 2006). Quatro alelos *GSTP1* foram identificados, sendo estes denominados *GSTP1*A* (Ile¹⁰⁵-Ala¹¹⁴), que é o alelo selvagem, *GSTP1*B*, *GSTP1*C* e *GSTP1*D*. A variante *GSTP1*B* apresenta uma transição A→G no nucleotídeo +313 do éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val). O *GSTP1*C* é caracterizado por duas transições de nucleotídeos, sendo a primeira, a mesma observada em *GSTP1*B*, e a segunda, uma transição C→T no nucleotídeo +341 do éxon 6, resultando na mudança de GCG (Ala) para GTG (Val) no códon 114 (Dusinska *et al.*, 2001; Holley *et al.*, 2007; Strange *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2009). Já a variante *GSTP1*D* (Ile¹⁰⁵-Val¹¹⁴) apresenta apenas a segunda transição observada em *GSTP1*C*, determinando a troca de alanina para valina no códon 114 (Watson *et al.*, 1998).

O códon 105 compreende parte do sítio ativo da enzima *GSTP1* para a ligação de substratos eletrofílicos reativos; portanto, a substituição do aminoácido na posição 105 pode afetar a atividade catalítica substrato-específica e a estabilidade térmica da enzima (Johansson *et al.*, 1998). Enzimas com Val¹⁰⁵ têm uma eficiência sete vezes maior para diol epóxidos do que as enzimas com Ile¹⁰⁵. Em contrapartida, as enzimas com Val¹⁰⁵ são três vezes menos eficazes

utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (Strange *et al.*, 2000). Já a presença da valina na posição 114 parece ter pouco impacto sobre a atividade enzimática (Watson *et al.*, 1998).

Recentemente, a expressão de *GSTP1* também tem sido implicada na regulação da proliferação celular e apoptose, através da interação direta com a quinase c-Jun N-terminal (JNK). Sugere-se que o alelo *GSTP1*A* reduz a proliferação celular e protege contra a apoptose através de um mecanismo independente de JNK. Em contraste, *GSTP1*C* não influencia a proliferação celular, mas protege as células da apoptose através de mecanismos mediados por JNK (Holley *et al.*, 2007).

1.5.2.3 Polimorfismos GST e a Susceptibilidade a Doenças

Uma vez que muitos genes GST são polimórficos, tem havido grande interesse em determinar se certas variantes alélicas alteradas estão associadas ao risco (ou resultado) de uma variedade de doenças (Strange *et al.*, 2001). O dano oxidativo, decorrente da ausência ou baixa atividade das enzimas GSTs, pode ser responsável por danos teciduais e pela produção de autoantígenos em doenças como esclerodermia e esclerose sistêmica (Tew *et al.*, 2001b).

A hipótese de que a combinação dos polimorfismos das GSTs das classes *Mu*, *Pi* e *Theta* contribui para doenças que apresentam um componente ambiental foi examinado por muitos pesquisadores (Hayes *et al.*, 2005). Vários estudos têm revelado associação entre os genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* e um risco aumentado de câncer de pele, pulmão, estômago, bexiga, próstata e colorretal (Gao *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003), incluindo tumores de cabeça e pescoço, altamente associados ao tabaco (Cheng *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2008). A falta da enzima M1 pode resultar em deficiente detoxificação da fumaça carcinogênica do tabaco, levando a um ligeiro aumento do risco de câncer de pulmão (Dusinska *et al.*, 2001). Hall *et al.* estudaram 71 crianças com leucemia linfoblástica aguda e constataram que o genótipo *GSTM1 nulo* foi associado a uma maior chance de remissão da doença, possivelmente devido a uma menor eficácia do metabolismo a produtos químicos na indução ou terapia contínua (Hall *et al.*, 1994). Outro estudo encontrou associação entre a combinação de *GSTM1*

e *GSTT1* nulos e uma piora na sobrevida em 148 mulheres com câncer ovariano epitelial (Howells *et al.*, 1998).

Estudos ainda apontam que, além de influenciarem a susceptibilidade à carcinogênese, polimorfismos de *GSTP1* são modificadores da resposta à quimioterapia em pacientes com câncer colorretal metastático (Stoehlmacher *et al.*, 2002) e aqueles com mieloma múltiplo (Dasgupta *et al.*, 2003). Também influenciam o risco de desenvolvimento de leucemia mielóide aguda em função da terapêutica utilizada para tratar pacientes com câncer de mama, linfoma não-Hodgkin, câncer de ovário e doença de Hodgkin (Hayes *et al.*, 2005). Segundo Menegon *et al.*, a enzima GSTP1, que é expressa na barreira hematoencefálica, pode influenciar a resposta a neurotoxinas e explicar a susceptibilidade de alguns indivíduos aos efeitos da doença de Parkinson, induzida por exposição a pesticidas (Menegon *et al.*, 1998).

Além disso, dados recentes indicam que polimorfismos nos genes das classes *Mu*, *Pi* e *Theta* aumentam a susceptibilidade a doenças inflamatórias, como a asma e alergias, aterosclerose, artrite reumatóide e esclerose sistêmica (Gilliland *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Romieu *et al.*, 2004). Associações também têm sido descritas entre genes GSTs e pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (Fraser *et al.*, 2003; Tew *et al.*, 2001b). Alelos nulos de *T1* foram encontrados correlacionando-se com danos medidos através de radiografias em pacientes com artrite reumatóide, quando combinados com outros marcadores de susceptibilidade a dano oxidativo (Mattey *et al.*, 2000).

Rohr *et al.* encontraram uma significativa associação entre o genótipo nulo *GSTT1* e o risco de artrite idiopática juvenil (AIJ). Esta associação foi mais forte no grupo de pacientes com os subtipos mais graves da doença, indicando que este gene pode estar envolvido na susceptibilidade e no prognóstico da AIJ (Rohr *et al.*, 2008).

1.5.3 Genes de Enzimas de Metabolização/Detoxificação e LES

Sabe-se que fatores ambientais têm importante papel no desenvolvimento do LES, embora sua contribuição para uma doença complexa como esta ainda

não esteja completamente compreendida (Molokhia & McKeigue, 2006). A exposição a solventes orgânicos, petróleo e subprodutos relacionados, por exemplo, pode desempenhar um papel na susceptibilidade ao LES. Um solvente orgânico volátil, o tricloroetileno, tem sido associado com a presença de anticorpos antinucleares. Experiências em camundongos propensos ao LES mostraram aceleração da doença e um aumento da prevalência de anticorpos antinucleares e anti-DNA (específicos para o diagnóstico de LES) em camundongos expostos ao tricloroetileno (Karlson *et al.*, 2007).

Somando-se a isto, cada um dos polimorfismos *GST* relatados, tanto *GSTM1* e *GSTT1* nulos quanto o polimorfismo de nucleotídeo único *GSTP1 Val105*, pode reduzir a conjugação da glutathiona, um dos mecanismos de defesa do corpo que reduz a reatividade e citotoxicidade dos metabólitos reativos e confere proteção contra o estresse oxidativo e alterações imunogênicas nas proteínas celulares, DNA e RNA. Assim, variantes nestes genes podem ser avaliadas em uma hipótese de risco para o LES (Karlson *et al.*, 2007).

Achados apóiam que o estresse oxidativo gerado por agentes endógenos ou exógenos é um fator importante na autoimunidade (Kovacic & Jacintho, 2003), e que as ROS são uma marcada característica de respostas inflamatórias (Rohr *et al.*, 2008). 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 (Tew *et al.*, 2001a).

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 homocigotos para *GSTM1* nulo e *GSTP1 Ile105Val* em combinação foram associados ao aparecimento precoce do LES (Karlson *et al.*, 2007).

Os genes *GSTs* também catalisam a detoxificação de compostos reativos de oxigênio que podem ser gerados por radiação ultravioleta na luz solar. Euro-descendentes com genótipo *GSTM1* nulo homocigoto, que tiveram exposição

ocupacional ao sol por um longo tempo, apresentaram um risco três vezes maior de LES do que controles (Fraser *et al.*, 2003).

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. (Kang *et al.*, 2005). 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 (Fraser *et al.*, 2003).

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 (McKinnon & Nebert, 1994). Um estudo 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 estudo, pacientes lúpicos com *CYP1A1 4887A* apresentaram uma tendência ao aumento da prevalência de envolvimento renal. No entanto, não foi observada diferença significativa na frequência de *CYP1A1 4889G* (*CYP1A1*2C*) entre pacientes com LES e controles (Yen *et al.*, 2003), diferentemente de outro estudo, que encontrou aumento significativo na frequência alélica de *CYP1A1 4889G* em pacientes com LES quando comparados aos controles (von Schmiedeberg *et al.*, 1999). 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 loci foi considerada, os indivíduos portadores do alelo *CYP1A1 3801C* e do genótipo nulo tiveram um risco aumentado de LES. 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

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 (Horiuchi *et al.*, 2009).

Muitos progressos já foram feitos visando o aumento da sobrevida no LES. A terapia utilizada há alguns anos consistia de uma longa lista de itens, incluindo transfusões repetidas, injeções intravenosas de vacinas contra *Streptococcus*, vitamina B concentrada, dentre outros. Claramente, a terapêutica tem mudado de maneira drástica. A introdução de corticosteróides, agentes imunossupressores, novos agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, medicamentos que reduzem os níveis de colesterol, além de diálise crônica, transplante renal e o tratamento mais eficiente de condições de comorbidade, como hipertensão e hiperlipidemia, desempenharam um importante papel para ampliar a sobrevivência dos pacientes (Borchers *et al.*, 2004).

No entanto, por ser uma doença com manifestações clínicas e laboratoriais bastante heterogêneas, infelizmente, a maioria dos trabalhos que avalia a eficácia dos diferentes esquemas terapêuticos não são randomizados e controlados e não contemplam grande casuística. As manifestações, assim como a gravidade da doença podem variar em diferentes grupos populacionais, razão pela qual se deve avaliar com cuidado os estudos realizados em grupos populacionais distintos (Sato *et al.*, 2002).

A Ciclofosfamida (CTX) é um agente alquilante amplamente utilizado como um agente imunossupressor no tratamento de várias doenças auto-imunes, incluindo LES e artrite reumatóide. Os metabólitos citotóxicos da CTX são principalmente detoxificados por múltiplas enzimas Glutathione S-transferases. Em vista disso, um estudo demonstrou que pacientes lúpicos com genótipos *GSTP1* com mutação no códon 105 [*GSTP1**-105Ile/Val (heterozigoto) e *GSTP1**-105 Val/Val (homozigoto)] têm um risco aumentado de mielotoxicidade quando tratados com terapia pulsada de alta dose de CTX, especialmente em pacientes com idade inferior a 30 anos ou em pacientes tratados com uma dose total superior a 1,0 grama. Similarmente, pacientes com estes genótipos também tiveram maior risco de toxicidade gastrointestinal quando tratados com um regime

pulsado de CTX de alta dose inicial. Pesquisadores concluíram que tais variações aumentaram significativamente os riscos de efeitos colaterais a curto prazo desta terapia em pacientes lúpicos e que, devido à falta de substratos seletivos para a enzima GST estudada, a detecção a tempo deste polimorfismo pode ajudar na otimização da terapia pulsada com alta dose de CTX (Zhong *et al.*, 2006).

Diante dessas considerações, juntamente com a variabilidade étnica na frequência das variantes de genes que codificam enzimas de biotransformação e na prevalência e incidência do LES, o envolvimento de fatores genéticos e ambientais não completamente definidos, a escassez de informações sobre a influência dos polimorfismos dos genes *GST* e *CYP* no LES e a importância do sistema imune no seu desenvolvimento, estamos propondo a caracterização imunogenética de indivíduos com LES. O LES é um problema de saúde que afeta pessoas no mundo todo e muitas questões sobre a doença ainda permanecem sem resposta. 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 nos genes *GST* e *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.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo geral investigar o papel dos polimorfismos das enzimas Glutaciona S-transferases e das enzimas do Citocromo P450 na susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico, através da análise da presença e frequência das variantes alélicas destes genes em amostras de pacientes com LES e indivíduos controle.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os polimorfismos de presença/ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o polimorfismo *Ile105Val* no gene *GSTP1* da Glutaciona S-transferase em pacientes com LES e controles.
- Analisar os polimorfismos *Ile462Val* (*CYP1A1*2C*) no gene *CYP1A1* e *CYP2E1*5B* no gene *CYP2E1* do Sistema Citocromo P450 em pacientes com LES e controles.
- Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos entre pacientes e controles.
- Comparar as frequências das variantes polimórficas estudadas com as diferentes manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes, buscando possíveis associações.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo em fase de preparação a ser enviado à revista científica Lupus.

GENETIC POLYMORPHISMS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES AND CYTOCHROME P450 ENZYMES AS SUSCEPTIBILITY FACTORS TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS IN SOUTHERN BRAZILIAN PATIENTS

Nadine Glesse¹, Paula Rohr¹, Odirlei André Monticielo^{2,3}, João Carlos Tavares
Brenol², Ricardo Machado Xavier², Kátia Kvitko¹, José Artur Bogo Chies¹.

¹ Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³ Department of Internal Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Santa Maria, Brazil.

Corresponding author:

Dr. José Artur Bogo Chies. Email Adress: jabchies@terra.com.br

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Laboratory of Immunogenetics. Institute of Biosciences, Department of Genetics.

Av. Bento Gonçalves – 9500, Campus do Vale. 91501970

Porto Alegre, RS – BRAZIL. PO BOX 15053

Phone: +55 51 3308 6740; Fax: +55 51 3308 7311

ABSTRACT

This study investigates the role of Cytochrome P450 (CYP) and Glutathione S-transferase (GST) genes in susceptibility and clinical expression of Systemic Lupus Erythematosus (SLE), through the analysis of *GSTM1 null*, *GSTT1 null*, *GSTP1*Val*, *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* polymorphisms in 370 SLE patients and 329 healthy blood donors from southern Brazil. CYP variants were genotyped using PCR-RFLP, while for the polymorphisms of GST, multiplex PCR was used to analyze the genotypes of *GSTT1* and *GSTM1*, and PCR-RFLP to analyze the genotypes of *GSTP1*. Allelic and genotypic frequencies were compared between patients and controls by Chi-square or Fisher's exact tests. All analyzes were performed grouping the individuals according to their ethnic origin. Among European-derived individuals, a lower frequency of *GSTP1*Val* heterozygous genotypes was found in SLE patients when compared to controls. ($p=0.0047$). The *CYP2E1*5B* allele frequency was significantly higher in SLE patients when compared to controls ($p=0.038$). We did not observe any clinical implication of the *CYP* and *GST* polymorphisms in patients with SLE. Our data suggest a protective role of the *GSTP1*105Ile/Val* heterozygous genotype against the SLE in European-derived and a possible influence of the *CYP2E1*5B* allele in SLE susceptibility among African-derived individuals.

Keywords: Glutathione S-transferase, Cytochrome P450, polymorphism, Systemic Lupus Erythematosus, ethnicity.

INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune chronic inflammatory disease that exhibits a wide spectrum of clinical manifestations and the involvement of multiple organs, including kidneys, joints, nervous system and hematopoietic organs (1, 2). It is characterized by the appearance of a variety of autoantibodies, such as antinuclear, anti-double stranded DNA and antiphospholipid antibodies, that leads a subsequent immune complexes deposition, culminating in chronic inflammation and tissue damage (3, 4). The disease occurs in all populations, but the prevalence and severity of SLE varies across the world (5). In general, SLE is far less common in europeans and their descendants when compared to all other ethnicities (6). The etiology of SLE is probably multifactorial, with involvement of genetic, hormonal, immunological and environmental factors (3, 7). SLE affects primarily women, in a ratio of about 9:1, especially when comparing individuals in reproductive age. This fact can be attributed to hormonal factors, especially to the effects of the estrogen hormone (8, 9). Multiple abnormalities of both the innate and adaptive immune systems have been described in SLE and environmental exposures to sunlight, organic solvents and infections for example, have been related to development or exacerbation of the disease (1, 3). Several studies have identified potential genetic markers associated with SLE that participate of many pathways, processes and different types of cells (10-12).

Genes and proteins involved in metabolization/detoxification of xenobiotics are commonly used as markers of susceptibility to the development of diseases in which the etiology is related to exposure to environmental factors. Since SLE has

possibly an environmental contribution and the impaired metabolic activity may aggravate the course of disease, genes coding for enzymes responsible for activation (phase I reactions) or deactivation (phase II reactions) of xenobiotics have emerged as potential targets in studies with SLE (13). The activation enzymes, represented by the Cytochrome P450 (CYP) superfamily, activate the xenobiotic, making it more electrophilic and thus more reactive, usually with the introduction of a functional grouping. The detoxification enzymes, such as Glutathione S-transferase (GST) superfamily, usually conjugate metabolites with an endogenous substrate. As a result, the metabolites are transformed in hydrophilic substances that can be excreted (14, 15). Interindividual differences regarding the biotransformation capacity of the endogenous and exogenous substances may be related to polymorphisms in genes of metabolization/detoxification enzymes, because it can lead to change of the enzymes activity involved in this process (14).

The *CYP1A1* gene is located on chromosome 15q24.1 and polymorphisms in this gene have been associated with increased inducibility and/or activity of enzyme. Among them, the variant *CYP1A1*2C* occurs due to the A→G transition at nucleotide 4889 in exon 7 (Ile462Val) and it shows an almost two-fold higher catalytic enzyme activity than the *Ile* variant (16-18). It has been reported that the higher catalytic activity of *CYP1A1* leads to an increased generation of oxidative stress in cells (19). The *CYP2E1* gene is located on chromosome 10q24.3-qter (20). Several polymorphisms have been described throughout this gene. The *CYP2E1*5B* variant, located in the 5' regulatory, with replacement at position -

1293 (G→C *Pst*I) may affect the gene transcription and it is one of the most important polymorphisms identified (17, 21-23).

The *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* genes are involved in the detoxification of a broad range of toxic substances (24, 25). *GSTM1* gene is located on chromosome 1p13.3. Interindividual differences regarding the enzyme activity are due to the gene deletion or allelic variation, and individuals with the *GSTM1 null* do not express the protein (17, 25). The *GSTT1* gene is located on chromosome 22q11.23 and it has also been described the deletion of this gene, *GSTT1 null*, resulting in complete absence of enzyme activity (26). The *GSTP1* gene, located on chromosome 11q13, displays a polymorphism at codon 105 resulting from an A→G transition at nucleotide +313 (*Ile105Val*), producing an enzyme with both substrate affinity and thermal stability altered (24, 27, 28).

Since many *GST* and *CYP* genes are polymorphic, there has been great interest in determining whether certain allelic variants are associated with the risk (or outcome) of a variety of diseases, such as SLE (25, 29-31). Metabolism of environmental factors or xenobiotics is regulated by a balance of a number of steps that involve the production and detoxification of reactive oxygen species (ROS). ROS bind covalently to DNA, leading to somatic mutation or disruption of cell cycle. The toxic substances are metabolized to generate ROS by *CYP* enzymes. On the other hand, *GSTs* play a critical role in detoxification. Therefore, *CYP* variants that impair this process contribute to the increased generation of ROS and the lack or low *GSTs* activity lead to the decreased detoxification of these compounds. The combination these effects will result in the increased level of ROS (32), considered an important factor in autoimmunity (33), and a marked

characteristic of inflammatory responses (13). It is believed that ROS increase immunogenicity of DNA, LDL and IgG, generating ligands for which autoantibodies show higher avidity (34). Evidences suggest that oxidative damage may contribute to the pathogenesis of SLE in a number of ways, including promotion of apoptosis and consequent exposure of intracellular antigens to the immune system, modification the properties of antibody linked to DNA and cell membrane damage (35).

Considering the crucial role of biotransformation enzymes in activation and detoxification of several metabolites, the possible genetic and environmental contributions to the SLE and the fact that in Brazil there are no studies linking SLE and polymorphisms of phase I and II enzymes analyzed together, the objectives of this work were investigated the frequency of *GSTM1 null*, *GSTT1 null* and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms of Glutathione S-transferases, and the frequency of *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* polymorphisms of Cytochrome P450 in SLE patients and healthy controls from southern Brazil, seeking possible correlations among these variants and clinical and laboratory expression of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Study populations

A total of 370 samples from SLE patients, 92.4% women and 7.6% men, followed at the Division of Rheumatology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) were obtained. The mean age of patients was 42.2 ± 14.3 years and the mean age of disease diagnostic was 32.7 ± 13.6 years. The control group was comprised of 329 unexposed, uninfected healthy blood donors, being 30% women and 70% men, with ages ranging from 20 to 62 years, from the urban population of Porto Alegre, the capital of the southernmost state of Brazil. Patients and controls were classified as European or African-derived according to phenotypic characteristics of individuals, as judged by the researcher at the time of blood collection, and data about the ethnicity of parents/grandparents reported by the participants. The issue concerning skin color-based classification criteria that is used in Brazil is well documented and has been already assessed by our group in previous studies (36, 37).

Information regarding demographic, clinical and laboratory features of SLE patients were collected from data contained in medical records filled in the Medical Archive Service and Health Information. The clinical and laboratory features evaluated were: presence or absence of malar rash, discoid rash, photosensitivity, oral or nasal ulcers, serositis, arthritis, nephritis, neurological manifestations (psychosis and convulsions), hematologic events (hemolytic anemia, leukopenia, lymphopenia and thrombocytopenia), positive antinuclear antibodies (ANAs) (titer $>1:100$) and other auto-antibodies (anti-double-stranded DNA, anti-Sm, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP, anti-Scl 70, anticardiolipin, lupus anticoagulant

and false positive VDRL). The definition of each variable followed the description from the classification criteria for SLE according to American College of Rheumatology (38). Furthermore, patients were evaluated for the presence of Sjögren's Syndrome and Secondary Antiphospholipid Syndrome, according to the classification criteria proposed for both diseases (39, 40). SLICC damage index (41) and SLEDAI disease activity index (42) were also performed for each patient. All patients and controls participating in this study gave their written informed consent. This study was approved by the Ethics Committee of HCPA.

Sample Collection

The DNA used for molecular techniques was obtained from 5 mL peripheral blood samples collected with EDTA and purified through the salting-out method as described by Lahiri e Nurnberger (43). DNA samples were stored at -20°C.

***CYP1A1* and *CYP2E1* Genotyping**

Molecular identification of Cytochrome P450 polymorphisms was performed by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) assay. The *CYP1A1**2C polymorphism was genotyped using the primers and PCR conditions previously described by Cascorbi *et al.* (18). The amplified fragments (204 bp) were visualized on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The amplified product was digested with *BsrDI* restriction enzyme, and the fragments of 149 bp and 55 bp generated were visualized in 3% agarose gel. The genotyping of *CYP2E1**5B polymorphism was performed according to Kato *et al.* (22). The amplified fragments (410 bp) were checked in 1% agarose gel and an

aliquot of the amplified product was then subjected to the *PstI* restriction enzyme. Genotypes were determined through the visualization of the fragments of 290 bp and 120 bp visualized on 3% agarose gel.

***GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* Genotyping**

The *GSTM1* and *GSTT1* genes polymorphisms of Glutathione S-transferase were genotyped using the amplification method by Polymerase Chain Reaction (PCR) in multiplex, with specific primers and PCR-RFLP for *GSTP1* gene as described by Rohr *et al.* (13). The primer sequences used were as previously reported (44-46). An aliquot of amplified product was analyzed by electrophoresis in 3% agarose gel to verify the absence or presence of *GSTT1* (480 pb) and *GSTM1* (215 pb) genes, and the product of *GSTP1* (176 pb) was used as a internal control in this reaction. A second aliquot of the amplified product of *GSTP1* was digested by the restriction enzyme *BsmI* as described by Harries *et al.* (45). The fragments of 91 bp and 85 bp formed after the enzymatic digestion were visualized in 8% polyacrylamide gel stained with silver nitrate.

Statistical analysis

Allelic and genotypic frequencies were estimated by direct counting. The genotypic frequencies of cases and controls were compared to Hardy–Weinberg expectations using Chi-Square tests. *CYP* and *GST* allelic frequencies were compared between patients and controls using the Chi-square test or Fisher's exact test, if appropriate. The adjusted residuals and OR estimative were also calculated. Correlations between clinical and laboratory variables of patients and

the frequencies of polymorphisms were also made through the Chi-square test (or Fisher's exact test) for qualitative variables and Kruskal-Wallis test for quantitative variables, using Bonferroni correction to the level of statistical significance. All data were analyzed with SPSS software version 15.0 and WinPepi 10.0. Significance level was established at $p < 0.05$ (two-tailed).

RESULTS

Published data report that the LES incidence and the polymorphic variants of *GST* and *CYP* genes frequencies show a high variability in different ethnic populations (47-49). For this reason, all analyses were performed subdividing the individuals according to their ethnic origin. Our study included 370 patients diagnosed with SLE, of which 282 (76%) were classified as European-derived and 88 (24%) as African-derived, and 329 controls, being 241(73%) classified as European-derived and 88 (27%) as African-derived. Due to the lack of clinical and/or laboratory data from medical records of some patients, a difference between the total number of individuals sampled and the number of individuals analyzed may be observed in some cases.

Table 1 shows the frequencies of *GSTT1 null* and *GSTM1 null* genotypes, which did not differ significantly between SLE patients and controls in both European-derived ($p=0.724$ and $p=0.173$, respectively) and African-derived ($p=0.557$ and $p=0.239$, respectively) groups. We also performed a combined analysis, comparing the individuals that had double deletion of both *GSTT1* and *GSTM1* with the rest of the population, and no significant difference was found in European-derived ($p=0.501$) as well as in African-derived ($p=1.000$).

The allelic and genotypic frequencies of *GSTP1*Ile105Val* polymorphism were compared between patients and controls (Table 2) and the analysis results showed a statistically significant difference in genotypic frequencies among European-derived. Interestingly, a lower frequency of heterozygous for the variant *GSTP1*Ile105Val* was observed among European-derived SLE patients when compared to their controls (0.36 and 0.48 respectively; $p=0.0047$). The overall

odds ratio (OR) for heterozygous in relation to wild-type and mutant homozygous was 0.63 (95% CI 0.43 – 0.93, $p=0.044$) and 0.49 (95% CI 0.26 – 0.92, $p=0.051$), respectively. The genotypic frequencies of *GSTP1*Ile105Val* variant in European-derived SLE patients were not in Hardy–Weinberg equilibrium, which can be explained by the possible and relevant effect of this polymorphism in a sample of non-healthy individuals. For all other groups of cases and controls, genotypic distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium. The African-derived group did not present any statistically significant difference for *GSTP1*Ile105Val* polymorphism. The allele frequencies were similar between patients and controls in both groups. However, it is important to emphasize that there was a higher frequency of *Val*105* variant in African-derived SLE patients (0.40) in relation to matched controls (0.30), but without significant difference ($p=0.061$).

Data resulting from analysis of *CYP* genes polymorphisms, *CYP1A1* and *CYP2E1*, are presented in Tables 4 and 5, respectively. Concerning the *CYP1A1*2C* variant, the allele and genotypic frequencies observed in SLE patients were compared to frequencies of healthy individuals previously reported (48, 50). Similar allele and genotypic frequencies for this variant were found in patients and controls of both ethnic groups (Table 4). Analysis performed for the *CYP2E1*5B* polymorphism (Table 5) showed an allele frequency of 0.11 in African-derived SLE patients against 0.05 in healthy individuals ($p=0.038$; OR 2.69, 95% CI 1.00 – 8.42), while allele frequencies between European-derived patients and controls were very similar each other. The frequencies of *CYP2E1*1A/*1A*, **1A/*5B* and **5B/*5B* genotypes were not significantly different between patients and controls in different ethnic groups.

We also investigated the clinical and laboratory differences between patients with SLE according to the *GST* and *CYP* polymorphisms studied (data not shown). The results of these tests indicated a higher frequency of anti-Ro antibodies in European-derived patients with *GSTT1 null* genotype ($p=0.031$) and a higher prevalence of secondary antiphospholipid syndrome in African-derived patients with *GSTT1* gene deletion ($p=0.013$). Interestingly, the frequency of *GSTM1 null* was lower than the *GSTM1 non-null* in African-derived SLE patients presenting nephritis ($p=0.012$) and higher in those with IgG and IGM anticardiolipin antibodies ($p=0.022$). In European-derived group, heterozygous for *GSTP1*Ile105Val* showed a higher prevalence of false-positive VDRL compared to wild-type and mutant homozygous ($p=0.047$), as well as a higher serositis frequency in homozygous and heterozygous for *CYP1A1*2C* in relation to wild-type homozygous individuals ($p=0.047$). However, after applying Bonferroni correction, the significant P-values were not maintained.

DISCUSSION

In this study, we investigated the possible influence of Glutathione S-transferases and Cytochrome P450 genes polymorphisms in the development and clinical progression of SLE in a Southern Brazilian population. GST and CYP enzymes are responsible for the activation and detoxification of many xenobiotics and endobiotics and their involvement in defence against oxidative stress suggests that polymorphisms that affect the activity of these enzymes, may be significant determinants of individual risk for several diseases, in which the etiology is related to exposure to environmental factors (17, 30, 51). Considering that SLE is a multifactorial disease, with possible combined genetic and environmental contributions, studies have evaluated polymorphisms of the metabolic enzyme genes in the context of SLE (30, 31, 52, 53), although there are conflicting reports regarding the association of *GST* and *CYP* genes with LES (11, 31, 32, 53). The inconsistent results may be due to ethnic diversity of the populations studied or interaction between different environmental and genetic factors.

It has been reported that the frequencies of *CYP* and *GST* polymorphisms vary in different ethnic groups (22, 47, 54) as well as the prevalence and incidence of SLE (6, 55). Therefore, our analyses were performed grouping cases and controls according to their ethnic origin. Although the individuals classified as European-derived or African-derived can present a certain degree of admixture, a recent study published by Santos *et al.* assessed individual interethnic admixture using a 48-insertion-deletion Ancestry-Informative Marker panel and validated our classification criteria. The authors identified a very high level of European

contribution (94%) and fewer Native American (5%) and African (1%) genes in a sample of 81 European-derived individuals from southern Brazil (56). Therefore, the subgrouping of our SLE patients and controls seems to reflect the actual ethnic/genetic background of this human population.

The analysis of *GSTT1 null* and *GSTM1 null* polymorphisms showed similar frequencies between SLE patients and controls in both ethnicities. Unlike our results, one study found a significant difference for the *GSTM1 null* genotype between SLE patients and controls in a Chinese population, suggesting an association between *GSTM1* deletion and the risk of SLE ($p=0.003$, OR 1.66 [95% CI 1.19-2.32]). With respect to the *GSTT1 null* genotype and the double deletion of both *GSTT1* and *GSTM1*, no association was observed (31). Nevertheless, Kang *et al.* investigated Korean SLE patients and suggested that genetic polymorphisms *GSTM1* and *GSTT1* do not influence the risk of SLE, supporting our findings (53). Our data are also in agreement with the results from another previous study, where the authors observed no association between *GSTM1* deletion and SLE (32).

Analyzing the *GSTP1*Ile105Val* variant in European-derived, we found similar allele frequencies between SLE patients and controls, but a genotypic frequency of 0.36 of heterozygous *Ile/Val* in SLE patients compared to 0.48 in matched-controls ($p=0.0047$) was observed. Heterozygous for this variant had an OR of 0.63 (CI 95% 0.43 – 0.93, $p=0.044$) in relation to wild-type homozygous and 0.49 (CI 95% 0.26 – 0.92 $p=0.051$) compared to mutant homozygous, suggesting an interesting protective role of genotype *Ile/Val* against the SLE. A possible explanation for this result is that individuals with heterozygous genotype would

have a good metabolization of a larger amount of substrates than individuals with mutant or wild-type homozygous genotypes. Depending of homozygous genotype, the detoxification might be effective for certain substances but not for others. Data from literature reported that the codon 105 comprises part of the active site of the GSTP1 enzyme for linking reactive electrophilic substrates, then the substitution of amino acid at position 105 may affect the substrate-specific catalytic activity and thermal stability of the enzyme (27). Moreover, analysis pointed that enzymes with Ile105 and Val105 differ significantly in their catalytic activity according to the substrate on which the enzymes act (57) and it has been shown that enzymes with Val105 have a 7-fold higher efficiency for the PAH diol epoxides than the enzymes with Ile105. In contrast, enzymes with Val105 are 3-fold less effective using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (58). Taken together, these reports provide the basis for our hypothesis. The African-derived group showed no significant difference in allelic and genotypic frequencies between patients and controls. However, it is worth noting that there was a higher frequency of *GSTP1*Val105* allele in SLE patients of this group as compared to their controls, although not statistically significant (0.40 vs. 0.30, $p=0.061$). The research with Korean individuals also assessed the *GSTP1*Ile105Val* polymorphism in susceptibility to SLE and, contrary to our findings, no association was observed in this population (53). It is also interesting to cite a study conducted in London that identified a possible protective role of *GSTP1*Val* allele against polymorphic light eruption, a feature significantly increased in patients with Lupus Erythematosus (59).

With respect to *CYP1A1* gene analysis, the allele and genotypic frequencies of *CYP1A1*2C* variant in both European-derived and African-derived

SLE patients were not different of the frequencies observed in matched-controls. Other studies have also suggested the role of *CYP1A1* polymorphisms in the context of SLE. In Taiwan, *CYP1A1* polymorphisms, in combination with manganese superoxide dismutase gene polymorphisms, were also evaluated in the pathogenesis of SLE, and no significant difference was found in frequencies of this polymorphism between patients and healthy individuals, corroborating our findings (30). However, this is different than the results of two previously published studies. Investigations from von Schmiedeberg *et al.* showed a significant increase ($p < 0.05$) of the mutant *Val* allele (OR = 2.59) in Germans with SLE when compared to controls, indicating that the enhanced formation of reactive metabolites, resulting from a higher basal and inducible enzyme activity, could alter self-proteins presented to the immune system, stimulating autoreactive T cells which induce autoimmunity (60). The authors of Chinese study, beyond the *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms, also examined the influence of *CYP1A1* in susceptibility to SLE and, in this analysis, significant difference was observed when comparing the genotype frequencies between SLE patients and controls, with higher frequency of *CYP1A1*2C* mutant genotype in SLE patients ($p = 0.013$). However, no statistical difference was obtained when comparing the allele frequencies ($p = 0.444$) (31). Yen *et al* suggested that the discrepancy observed among these results may be due to different genetic backgrounds in the different ethnics (30). Furthermore, it is important to take into account that the Chinese population has over 30 provinces and 1/5 of the world's total population (31). Thus, the extrapolation of these results to other populations should be considered with caution.

Genotypic and allele frequencies of *CYP2E1* were analyzed and no significant difference in the frequencies between European-derived SLE patients and controls was obtained. In African-derived, similar genotype frequencies between patients and controls were also observed, however, a frequency of 0.11 for allele *CYP2E1*5B* was observed in patients against 0.05 in matched-controls ($p=0.038$), indicating a possible association of *CYP2E1*5B* allele with SLE. Individuals carrying this allele present about 3-fold higher chance to develop the disease than individuals carrying the wild-type allele [OR 2.69 (CI 95% 1.00 – 8.42)]. This significant association may be due to influence of *CYP2E1*5B* allelic variant in the increase of *CYP2E1* gene transcription. In addition to the *CYP2E1* ability to metabolize a wide variety of low molecular weight compounds, it is also an effective generator of ROS (52), which cause damage in cell membranes and macromolecules and leads to formation of DNA adducts (21). The involvement of ROS in the pathogenesis of SLE has been described by many authors (30, 32, 61, 62). A study revealed that there was an increased production of superoxide by neutrophils in the serum from patients with SLE and oxygen intermediates produced by immune complex-activated neutrophils play an important role in vasculitis, nephritis and other tissue damage (30, 62). Furthermore, ROS may modify DNA molecules and increase the immunogenicity of damaged DNA, inducing the formation of pathological anti-DNA antibodies (30). Among the wide substrate spectrum of *CYP2E1*, trichloroethylene (TCE) has been implicated in autoimmune disorders in both humans and animal models. TCE is an organic solvent that is primarily used as a degreasing agent for metals. Griffin *et al.* showed that treatment with TCE promoted expansion of the percentage of CD4⁺ T

cells, with a reduction in the secretion of IL-4 and increased secretion of IFN- γ in autoimmune prone MRL $+/+$ mice. They also reported that after the mice were treated with diallyl sulfide, a specific inhibitor of CYP2E1, the proliferative capacity of T cells was inhibited and the reduction in IL-4 levels was reversed (63), showing that the metabolism of TCE by CYP2E1 is required for immunomodulation. Therefore, it is possible that higher expression of CYP2E1 contributes to the SLE development through the production of more ROS during the compounds metabolization with the production of toxic intermediates as, for example, the metabolites of TCE (52).

Besides the relevance of *GST* and *CYP* polymorphisms in the onset of SLE, their role in clinical progression of disease has also attracted the attention of researchers. Kang *et al.* reported association of the *GSTM1* null genotype with a lower frequency of hematological disorders, and a higher frequency of SSA(+)/SSB(-) autoantibody profile. Compared to SLE patients with the *GSTT1* non-null genotype, those with the *GSTT1* null had a lower frequency of discoid rash and nephritis, suggesting that deletion of *GSTT1* or *GSTM1* may influence the manifestation of SLE but not the risk of SLE (53). So far, we have found no significant influence of the polymorphisms studied in clinical and laboratory features of SLE patients. The study with Taiwanese individuals is consistent with ours, where associations between the *CYP1A1*2C* polymorphisms and clinical manifestations of SLE were not observed (30).

Available studies about the influence of biometabolism genetic polymorphisms in SLE are scarce and have limitations since generally they only include some of the metabolizing enzymes genes. This is the first Southern

Brazilian study that provides evidence for an association between polymorphic variants of genes related to oxidative metabolism and SLE risk. In conclusion, our results indicate a possible protective role of *GSTP1*1le105Val* heterozygous genotype in susceptibility of SLE in European-derived and an involvement the *CYP2E1*5B* allele in the pathogenesis of SLE in African-derived. We did not observe any clinical implication of *GST* and *CYP* variants in SLE patients. Although there are indications of the importance of enzymes *GST* and *CYP* in the autoimmune process, how this exactly happens is still unclear and our findings do not exclude the possibility that the combination of other biometabolism genes somehow contribute to SLE development. This shows the need for additional analysis encompassing more genes presumably involved, as well as populations of different ethnic origins.

REFERENCES

1. Crispin JC, Liossis SN, Kis-Toth K, et al.: Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 2010;16:47-57.
2. Manson JJ, Rahman A: Systemic lupus erythematosus. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:6.
3. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS: Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41:1714-24.
4. Monticelo OA, Chies JA, Mucenic T, et al.: Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2010;19:280-7.
5. Tikly M, Navarra SV: Lupus in the developing world--is it any different? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22:643-55.
6. Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME: The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2010;9:A277-87.
7. Rhodes B, Vyse TJ: The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1603-11.
8. Sekigawa I, Fujishiro M, Yamaguchi A, et al.: A new hypothesis of the possible mechanisms of gender differences in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:419-23.
9. Lahita RG: The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11:352-6.

10. Deng Y, Tsao BP: Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:683-92.
11. Fraser PA, Ding WZ, Mohseni M, et al.: Glutathione S-transferase M null homozygosity and risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene-environment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol* 2003;30:276-82.
12. Jakab L, Laki J, Sallai K, et al.: Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene. *Clin Immunol* 2007;125:230-6.
13. Rohr P, Veit TD, Scheibel I, et al.: GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:151-5.
14. Wilkinson Jt, Clapper ML: Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:192-200.
15. Guecheva TN, Henriques JAP: Metabolismo de Xenobióticos: Citocromo P450. *Genética Toxicológica* 2003:225-247.
16. San Jose C, Cabanillas A, Benitez J, Carrillo JA, Jimenez M, Gervasini G: CYP1A1 gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study. *BMC Cancer* 2010;10:463.
17. Autrup H: Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000;464:65-76.
18. Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I: A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 1996;56:4965-9.

19. Sharma R, Ahuja M, Panda NK, Khullar M: Combined effect of smoking and polymorphisms in tobacco carcinogen-metabolizing enzymes CYP1A1 and GSTM1 on the head and neck cancer risk in North Indians. *DNA Cell Biol* 2010;29:441-8.
20. Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ: Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 1988;27:9006-13.
21. Deka M, Bose M, Baruah B, et al.: Role of CYP2E1 gene polymorphisms association with hepatitis risk in Northeast India. *World J Gastroenterol* 2010;16:4800-8.
22. Kato S, Shields PG, Caporaso NE, et al.: Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 1992;52:6712-5.
23. Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M, et al.: Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:254-6.
24. Buchard A, Sanchez JJ, Dalhoff K, Morling N: Multiplex PCR detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 gene variants: simultaneously detecting GSTM1 and GSTT1 gene copy number and the allelic status of the GSTP1 Ile105Val genetic variant. *J Mol Diagn* 2007;9:612-7.
25. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA: Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001;482:21-6.

26. Bolt HM, Thier R: Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab* 2006;7:613-28.
27. Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Mannervik B: Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J Mol Biol* 1998;278:687-98.
28. Strange RC, Jones PW, Fryer AA: Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 2000;112-113:357-63.
29. Wu MS, Chen CJ, Lin MT, et al.: Genetic polymorphisms of cytochrome p450 2E1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to gastric carcinoma in Taiwan. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:338-43.
30. Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, et al.: Cytochrome P450 and manganese superoxide dismutase genes polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2003;90:19-24.
31. Zhang J, Deng J, Zhang C, et al.: Association of GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Chinese population. *Clin Chim Acta* 2010;411:878-81.
32. Horiuchi T, Washio M, Kiyohara C, et al.: Combination of TNF-RII, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and the risk of Japanese SLE: findings from the KYSS study. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:1045-9.
33. Kovacic P, Jacintho JD: 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.

34. Griffiths HR: Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease? *Autoimmun Rev* 2008;7:544-9.
35. Tew MB, Ahn CW, Friedman AW, et al.: Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. VIII. Lack of association of glutathione S-transferase null alleles with disease manifestations. *Arthritis Rheum* 2001;44:981-3.
36. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, et al.: Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18:424-30.
37. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JA: Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:321-5.
38. Hochberg MC: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
39. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al.: Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-8.
40. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al.: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306.
41. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, et al.: The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:363-9.

42. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH: Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
43. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr.: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
44. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW: Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1159-64.
45. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR: Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18:641-4.
46. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, et al.: Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300 (Pt 1):271-6.
47. Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, et al.: Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 2002;1:233-40.
48. Gaspar PA, Kvitko K, Papadopolis LG, Hutz MH, Weimer TA: High frequency of CYP1A1*2C allele in Brazilian populations. *Hum Biol* 2002;74:235-42.

49. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS: Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39:257-68.
50. Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T: CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology* 2004;27:133-138.
51. Dusinska M, Ficek A, Horska A, et al.: Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat Res* 2001;482:47-55.
52. Liao LH, Zhang H, Lai MP, Chen SL, Wu M, Shen N: Single-nucleotide polymorphisms and haplotype of CYP2E1 gene associated with systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R11.
53. Kang TY, El-Sohemy A, Comelis MC, Eny KM, Bae SC: Glutathione S-transferase genotype and risk of systemic lupus erythematosus in Koreans. *Lupus* 2005;14:381-4.
54. Inoue K, Asao T, Shimada T: Ethnic-related differences in the frequency distribution of genetic polymorphisms in the CYP1A1 and CYP1B1 genes in Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* 2000;30:285-95.
55. Molokhia M, McKeigue P: Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations. *Lupus* 2006;15:827-32.
56. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, et al.: Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-

insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010;31:184-90.

57. Sundberg K, Seidel A, Mannervik B, Jernstrom B: Detoxication of carcinogenic fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferase P1-1 variants and glutathione. *FEBS Lett* 1998;438:206-10.

58. Harris MJ, Coggan M, Langton L, Wilson SR, Board PG: Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics* 1998;8:27-31.

59. Millard TP, Fryer AA, McGregor JM: A protective effect of glutathione-S-transferase GSTP1*Val(105) against polymorphic light eruption. *J Invest Dermatol* 2008;128:1901-5.

60. von Schmiedeberg S, Fritsche E, Ronnau AC, 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.

61. Waszczykowska E, Robak E, Wozniacka A, Narbutt J, Torzecka JD, Sysa-Jedrzejowska A: Estimation of SLE activity based on the serum level of chosen cytokines and superoxide radical generation. *Mediators Inflamm* 1999;8:93-100.

62. Shingu M, Oribe M, Todoroki T, et al.: Serum factors from patients with systemic lupus erythematosus enhancing superoxide generation by normal neutrophils. *J Invest Dermatol* 1983;81:212-5.

63. Griffin JM, Gilbert KM, Pumford NR: Inhibition of CYP2E1 reverses CD4+ T-cell alterations in trichloroethylene-treated MRL+/+ mice. *Toxicol Sci* 2000;54:384-9.

TABLES

Table 1: Frequencies of *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes in southern Brazilian SLE patients and controls, according to ethnicity.

Genotypes	European-derived		African-derived	
	Patients n=282	Controls n=241	Patients n=87	Controls n=87
<i>GSTT1</i> null	56 [0.20]	44 [0.18]	14 [0.16]	18 [0.21]
<i>GSTT1</i> non-null	226 [0.80]	197 [0.82]	73 [0.84]	69 [0.79]
	χ^2 with Yates p=0.724		χ^2 with Yates p=0.557	
	OR 1.11 (CI 95% 0.70 – 1.77)		OR 0.74 (CI 95% 0.31 – 1.7)	

Genotypes	European-derived		African-derived	
	Patients n=282	Controls n=241	Patients n=87	Controls n=88
<i>GSTM1</i> null	133 [0.47]	129 [0.54]	33 [0.38]	25 [0.28]
<i>GSTM1</i> non-null	149 [0.53]	112 [0.47]	54 [0.62]	63 [0.72]
	χ^2 with Yates p=0.173		χ^2 with Yates p=0.239	
	OR 0.77 (CI 95% 0.54 – 1.11)		OR 1.54 (CI 95% 0.78 – 3.06)	

Genotypes	European-derived		African-derived	
	Patients n=282	Controls n=241	Patients n=87	Controls n=87
<i>GSTT1</i> null and <i>GSTM1</i> null	18 [0.06]	20 [0.08]	5 [0.06]	4 [0.05]
Other genotypes	264 [0.94]	221 [0.92]	82 [0.94]	83 [0.95]
	χ^2 with Yates p=0.501		χ^2 with Yates p=1.000	
	OR 0.75 (CI 95% 0.37 – 1.54)		OR 1.27 (CI 95% 0.26 – 6.60)	

Absolut frequency and [relative frequency] are shown for genotypes.

Table 2: Genotypic and allelic frequencies of *GSTP1*Ille105Val* in southern Brazilian SLE patients and controls, according to ethnicity.

Genotypes	European-derived		African-derived	
	Patients n=282	Controls n=237	Patients n=87	Controls n=88
<i>GSTP1</i>				
¹ <i>Ille/Ille</i>	143 [0.51]	102 [0.43]	33 [0.38]	46 [0.52]
² <i>Ille/Val</i>	101 [0.36]*	114 [0.48]*	38 [0.44]	31 [0.35]
³ <i>Val/Val</i>	38 [0.13]	21 [0.09]	16 [0.18]	11 [0.13]
	χ^2 p=0.013		χ^2 p=0.154	

* Adjusted residual, χ^2 p=0.0047

^{2,1} OR 0.63 (CI 95% 0.43 – 0.93) p=0.044 ^{2,1} OR 1.71 (CI 95% 0.85 – 3.45) p=0.317

^{2,3} OR 0.49 (CI 95% 0.26 – 0.92) p=0.051 ^{3,1} OR 2.03 (CI 95% 0.76 – 5.48) p=0.347

Alleles	European-derived		African-derived	
	Patients 2n=564	Controls 2n=474	Patients 2n=174	Controls 2n=176
<i>GSTP1*Val</i>	0.31	0.33	0.40	0.30
<i>GSTP1*Ille</i>	0.69	0.67	0.60	0.70
	χ^2 with Yates p=0.646		χ^2 with Yates p=0.061	
	OR 0.93 (CI 95% 0.71 – 1.22)		OR 1.56 (CI 95% 0.98 – 2.49)	

Absolut frequency and [relative frequency] are shown for genotypes.

Table 3: Genotypic and allelic frequencies of *CYP1A1*2C* in southern Brazilian SLE patients and controls, according to ethnicity.

Genotypes	European-derived		African-derived	
	Patients n=202	Controls ^a n=90	Patients n=57	Controls ^b n=137
<i>CYP1A1 (Ile/Val)</i>				
*1A/*1A	154 [0.76]	73 [0.81]	38 [0.67]	98 [0.72]
*1A/*2C	41 [0.20]	14 [0.16]	18 [0.31]	36 [0.26]
*2C/*2C	7 [0.04]	3 [0.03]	1 [0.02]	3 [0.02]
	Fisher p=0.609		Fisher p=0.784	
Alleles	European-derived		African-derived	
	Patients 2n=404	Controls ^a 2n=180	Patients 2n=114	Controls ^b 2n=274
<i>CYP1A1*2C</i>	0.14	0.11	0.18	0.15
<i>CYP1A1*1A</i>	0.86	0.89	0.82	0.85
	Fisher p=0.426		Fisher p=0.648	
	OR 1.26 (CI 95% 0.72 – 2.30)		OR 1.18 (CI 95% 0.62 – 2.17)	

^a Data from Gaspar *et al.*, 2004 (50).

^b Data from Gaspar *et al.*, 2002 (48).

Absolut frequency and [relative frequency] are shown for genotypes.

Table 4: Genotypic and allelic frequencies of *CYP2E1*5B* in southern Brazilian SLE patients and controls, according to ethnicity.

Genotypes	European-derived		African-derived	
	Patients n=276	Controls n=236	Patients n=88	Controls n=66
<i>CYP2E1</i>				
<i>*1A/*1A</i>	240 [0.87]	207 [0.88]	70 [0.80]	60 [0.91]
<i>*1A/*5B</i>	35 [0.13]	28 [0.12]	16 [0.18]	6 [0.09]
<i>*5B/*5B</i>	1 [0.004]	1 [0.004]	2 [0.02]	0 [0.00]
	Fisher p=0.895		Fisher p=0.110	
Alleles	European-derived		African-derived	
	Patients 2n=552	Controls 2n=472	Patients 2n=176	Controls 2n=132
<i>CYP2E1*5B</i>	0.07	0.06	0.11	0.05
<i>CYP2E1*1A</i>	0.93	0.94	0.89	0.95
	Fisher p=0.899		Fisher p=0.038	
	OR 1.06 (CI 95% 0.62 – 1.81)		OR 2.69 (CI 95% 1.00 – 8.42)	

Absolut frequency and [relative frequency] are shown for genotypes.

4. DISCUSSÃO DA DISSERTAÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é considerado, clinicamente e sorologicamente, a mais diversa das doenças autoimunes, pois pode afetar qualquer órgão do corpo e os pacientes exibem uma ampla variedade de manifestações clínicas e laboratoriais. Embora previamente considerada uma doença rara, na verdade o LES parece ser relativamente comum, provavelmente devido ao desenvolvimento de vários testes imunológicos e à introdução, desde 1982, de critérios de classificação mais sensíveis, permitindo que um maior número de casos seja detectado nos dias de hoje (Jimenez *et al.*, 2003). No entanto, a verdadeira causa do LES permanece desconhecida e diversos trabalhos buscam identificar os possíveis fatores envolvidos na ocorrência e progressão do LES. Diversos genes já foram relacionados com predisposição ao LES, tais como genes *HLA-DR2* e *HLA-DR3*, o alelo nulo *C4A*, genes de receptores Fcγ, gene *MBL2*, dentre muitos outros (Kelly *et al.*, 2002; Rhodes & Vyse, 2008). A exposição a fatores ambientais é também considerado um importante fator de risco para o LES (Cooper *et al.*, 1998), e levando-se em conta que a variabilidade genética pode afetar a expressão e atividade de enzimas de metabolização, responsáveis pela proteção do organismo contra substâncias tóxicas do ambiente, decidimos investigar o papel dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, bem como *CYP1A1* e *CYP2E1* na susceptibilidade ao LES. Esses genes são considerados relevantes no controle da produção e detoxificação de ROS e, portanto, um desbalanço entre esses passos pode conduzir a alterações imunogênicas nas proteínas celulares, DNA, RNA e, conseqüentemente, predispor a uma doença autoimune, como o LES (Horiuchi *et al.*, 2009; Karlson *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2003). As ROS se ligam covalentemente ao DNA, conduzindo a mutação somática ou ao rompimento do ciclo celular, além de gerar ligantes para os quais os autoanticorpos mostram maior afeição (Griffiths, 2008; Horiuchi *et al.*, 2009). Estudos já foram realizados na tentativa de esclarecer a influência dos genes *GST* e *CYP* na susceptibilidade ao LES, embora a maioria dos resultados é divergente e a associação genes x doença não foi claramente demonstrada até o momento (Fraser *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2011; Yen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Esse fato não é surpreendente, uma

vez que os estudos foram realizados com diferentes populações, as quais mostram variabilidade nas frequências dos polimorfismos genéticos em questão, bem como na incidência e prevalência do LES (Borchers *et al.*, 2010; Inoue *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 1992; Pons-Estel *et al.*, 2010; Rossini *et al.*, 2002).

No nosso trabalho, analisamos os polimorfismos dos genes *GST* e *CYP*, acima citados, em uma amostra de pacientes diagnosticados com LES e em controles, sendo ambos os grupos provenientes do sul do Brasil. As análises mostraram frequências semelhantes dos genótipos *GSTT1* nulo e *GSTM1* nulo, individuais e em conjunto, entre pacientes e controles nos dois grupos étnicos (Tabela 1 do artigo). Um estudo realizado com Japoneses avaliou os polimorfismos *TNF-RII*, *CYP1A1* e *GSTM1* no risco de LES e, assim como o nosso, não observou associação entre o genótipo nulo *GSTM1* e a doença. Mas, quando combinado com os polimorfismos *CYP1A1 3801C* e *TNF-RII 196M*, uma associação significativa com o LES foi encontrada (Horiuchi *et al.*, 2009). Nossos achados também concordam com uma análise realizada numa população Coreana de 330 pacientes com LES e 270 controles, onde nenhuma associação dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* no risco de LES foi observada (Kang *et al.*, 2005). Entretanto, contrariamente ao que relatamos, Zhang *et al.* sugeriram uma associação entre *GSTM1* e LES em chineses, o que não foi visto para *GSTT1*, nem mesmo para a análise combinando a deleção de ambos os genes. A divergência quanto a estes achados pode ser devido às diferentes subpopulações avaliadas em cada estudo, e quanto à população chinesa, não podemos deixar de lembrar da grande diversidade étnica que existe na China, além de ser uma população extremamente numerosa (Zhang *et al.*, 2010). Outro estudo encontrou algumas evidências de que o LES ocorre em uma idade mais precoce em mulheres que apresentam, em combinação, ausência de *GSTM1*, sítios de ligação a substratos de *GSTP1* alterados e que vivem próximo a depósitos de resíduos perigosos (Karlson *et al.*, 2007).

Diferentemente dos achados de Kang *et al.*, nossos resultados mostraram uma menor frequência do genótipo heterozigoto *GSTP1*Ile105Val* nos pacientes euro-descendentes quando comparados aos seus controles, indicando um possível papel protetor deste genótipo contra o desenvolvimento de LES (Tabela

2 do artigo). Visto que a atividade da enzima GSTP1, além de ser modulada por polimorfismos no gene, depende também do substrato no qual ela está atuando, uma hipótese para a associação encontrada é que indivíduos com genótipo heterozigoto para a variante *GSTP1*Val105* apresentariam uma boa metabolização de uma maior gama de substratos do que indivíduos com os demais genótipos. Por exemplo, o genótipo homozigoto selvagem poderia ser efetivo na detoxificação de uma determinada substância, ao passo que o genótipo homozigoto mutante não, e vice-versa. Se esta hipótese for verdadeira, indivíduos heterozigotos se beneficiariam com o espectro mais amplo da enzima, uma vez que diminuiriam a reatividade e citotoxicidade de uma maior quantidade de metabólitos, protegendo o organismo contra a autoimunidade. Dados da literatura relataram que a substituição do aminoácido na posição 105 pode afetar a atividade catalítica substrato-específica e a estabilidade térmica da enzima e que, por exemplo, enzimas com Val¹⁰⁵ têm uma eficiência 7 vezes maior para diol epóxidos de HPAs e 3 vezes menor para 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno do que enzimas com Ile¹⁰⁵. A modelagem computacional da estrutura cristalina revelou que a substituição Ile105Val causa mudanças significativas nas cadeias laterais de vários resíduos de aminoácidos do sítio ativo, possivelmente permitindo que resíduos volumosos se encaixem melhor no espaço ladeado por Ile105, enquanto que outros menos volumosos podem se adaptar melhor no espaço ladeado por Val105 (Ali-Osman *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1998). Juntos, esses relatos tornam plausíveis as explicações para os nossos achados. No grupo de Afro-descendentes, vale ressaltar que o alelo *GSTP1*Val105* foi mais freqüente em pacientes do que nos controles, porém sem significância estatística ($p=0,061$), tendendo a uma certa influência no desenvolvimento do LES em indivíduos deste grupo. Em um trabalho realizado em Singapura, investigou-se a relação entre os genótipos GST e os efeitos colaterais da terapia pulsada com CTX (um substrato de GSTP1) em pacientes com LES e foi visto que heterozigotos *GSTP1*105Ile/Val* e homozigotos *GSTP1*105Val/Val* apresentaram um risco aumentado de mielotoxicidade e toxicidade gastrointestinal, sugerindo que o polimorfismo do códon 105 conduz a uma redução da atividade enzimática para CTX e seus metabólitos e, posteriormente, o acúmulo destes metabólitos no

organismo resultaria em efeitos colaterais adversos da terapia com CTX nestes pacientes. Já os genótipos *GSTM1* e *GSTT1 nulos* não alteraram significativamente os riscos de efeitos colaterais a curto prazo (Zhong *et al.*, 2006). Allan *et al.* relataram que indivíduos com o polimorfismo *GSTP1*Val* tiveram um risco significativamente aumentado de desenvolver leucemia mielóide aguda secundariamente à quimioterapia (Allan *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos prévios descreveram que pacientes com genótipos *GSTM1 nulo*, *GSTP1*105Ile/Val* ou *GSTP1*105Val/Val* tiveram uma redução no risco de progressão do câncer ovariano em comparação a pacientes com genótipo *GSTM1 não-nulo* ou *GSTP1 selvagem* (Beeghly *et al.*, 2006), e que indivíduos homocigotos mutante para a variante *GSTP1*Val* tiveram melhor prognóstico para o câncer de mama avançado do que pacientes com genótipo *GSTP1 selvagem* (Sweeney *et al.*, 2000), indicando que o polimorfismo *GSTP1*105Val* também pode resultar em aumento da eficácia da quimioterapia com CTX (Zhong *et al.*, 2006).

Com respeito aos genes *CYP*, nossas análises não mostraram diferenças na comparação das frequências do polimorfismo *CYP1A1*2C* entre pacientes e controles, tanto em Euro-descendentes quanto em Afro-descendentes (Tabela 3 do artigo), do mesmo modo que o estudo realizado por Yen *et al.*, que também não mostrou associação da variante com a ocorrência de doença, nem mesmo com as manifestações clínicas dos pacientes com LES de Taiwan (Yen *et al.*, 2003). Por outro lado, von Schmiedeberg *et al.* revelaram um aumento significativo na frequência do alelo *CYP1A1*2C* em pacientes lúpicos da Alemanha quando comparados aos controles, sugerindo que esta variante, relacionada a maior indutibilidade e/ou atividade da enzima CYP1A1, aumenta a formação de metabólitos reativos, os quais poderiam alterar proteínas próprias apresentadas ao sistema imune e dessa forma, estimular células T autorreativas a induzir autoimunidade (von Schmiedeberg *et al.*, 1999). O estudo de Zhang *et al.*, encontrou diferença significativa na frequência genotípica, mas não alélica de *CYP1A1*2C* e relata que o genótipo heterocigoto para a variante em questão podem conduzir a mudança funcional da proteína e ter um papel no desenvolvimento do LES (Zhang *et al.*, 2010). Provavelmente, a discrepância

entre os nossos resultados e os dos demais estudos é devido à heterogeneidade genética das diferentes populações étnicas estudadas, não excluindo também a possibilidade de diferentes fatores ambientais estarem atuando nestes indivíduos.

Outro resultado importante no nosso estudo foi a maior frequência do alelo *CYP2E1*5B* observada em pacientes lúpicos Afro-descendentes em comparação aos controles, apontando a possível contribuição desse alelo no desencadeamento do LES (Tabela 4 do artigo). Como uma enzima de fase I, *CYP2E1* tem a capacidade de catalizar xenobióticos e sua atividade é acompanhada pela geração de uma quantidade significativa de uma forma ativa de oxigênio, que danifica membranas celulares e macromoléculas, e conduz a formação de adutos no DNA. O genótipo homozigoto está associado com um aumento da transcrição do gene *CYP2E1* em cerca de dez vezes (Deka *et al.*, 2010). Portanto, maior expressão da enzima conduz a maior produção de ROS. O DNA danificado por esses intermediários é capaz de induzir resposta imune, levando a produção de anticorpos anti-DNA, modificação de antígenos que leva a um aumento da antigenicidade e inflamação, eventos característicos de uma condição autoimune (Griffiths, 2008; Yen *et al.*, 2003). Já foi relatado que a produção de superóxido por neutrófilos presentes no soro de pacientes está relacionada ao aparecimento de vasculite, nefrite e outros danos teciduais (Shingu *et al.*, 1983). Diversos estudos relatam a influência de ROS e estresse oxidativo no desenvolvimento de LES (Horiuchi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2003). Até o momento, apenas um único estudo avaliou a associação entre o gene *CYP2E1* e o LES, no entanto, o polimorfismo *CYP2E1*5B* (rs3813867) não foi considerado nesta abordagem. Nos achados deste trabalho, o SNP rs2480256 foi significativamente associado com o LES e, quando combinado com o SNP rs8192772, o haplótipo “rs8192772-rs2480256/TA” mostrou-se mais frequente em pacientes com LES e “TG” mais frequente em controles, indicando que *CYP2E1* pode contribuir para a susceptibilidade ao LES na população de Chineses Han (Liao *et al.*, 2011).

No grupo de pacientes com LES, foram realizadas comparações entre os dados clínicos e laboratoriais e as frequências dos diferentes polimorfismos estudados. Nenhuma diferença significativa foi encontrada após a correção de

Bonferroni para comparações múltiplas. Contrariamente aos nossos achados, polimorfismos *GST* já foram associados com as manifestações clínicas do LES. Em coreanos, viu-se que o genótipo *GSTM1 nulo* foi associado com uma menor frequência de desordens hematólogicas e uma frequência aumentada de perfil de autoanticorpos SSA(+) e SSB(-). Além disso, frequências mais baixas de eritema discóide e nefrite foram observadas em pacientes com genótipo *GSTT1 nulo*. Nos EUA, Fraser *et al.* conduziram um estudo caso-controle que mostrou uma maior prevalência de autoanticorpos Ro entre Euro-descendentes com o genótipo *GSTM1 nulo*. Os autores também observaram que houve um maior risco de desenvolvimento de LES associado com 24 ou mais meses de exposição ocupacional ao sol em indivíduos Euro-descendentes com o genótipo *GSTM1 nulo*, concluindo que a deleção do gene pode alterar o efeito da exposição solar no risco de LES nesse grupo étnico (Fraser *et al.*, 2003). Ollier *et al.* observaram que o genótipo *GSTM1 nulo* ou *GSTT1 nulo* foram mais frequentes em Euro-descendentes com LES apresentando autoanticorpos anti-Ro (+)/anti-La (-) (Ollier *et al.*, 1996). Os resultados do estudo de Tew *et al.* sustentam a hipótese de que doenças autoimunes são heterogêneas no que diz respeito a fatores de susceptibilidade genética e que alguns genes, embora não contribuindo com alguma probabilidade de desenvolver uma determinada doença, podem modificar sua expressão clínica (Tew *et al.*, 2001b). No entanto, corroborando os nossos achados, o estudo de Taiwan não demonstrou associação do polimorfismo *CYP1A1*2C* com diversas manifestações clínicas, como envolvimento renal, rash malar, lúpus discóide, fotossensibilidade, úlcera oronasofaríngea, serosite, positividade de anticorpos anti-DNA, dentre outros (Yen *et al.*, 2003).

A importância do nosso estudo está no fato de que ele é a primeira evidência do envolvimento dos genes de enzimas do metabolismo oxidativo no risco de LES numa população Brasileira. A maioria dos trabalhos sobre o assunto é limitado, pois não avalia genes de enzimas de metabolização de fase I e II em combinação. Nossos resultados mostraram discrepância quanto às frequências dos polimorfismos de acordo com a etnia, o que evidencia a necessidade de se considerar a heterogeneidade genética das diferentes populações. Em vista disso, deve-se ter cuidado ao extrapolar dados de um estudo para os demais grupos.

Em conclusão, nosso trabalho sugere a participação do genótipo heterozigoto *GSTP1*11a105Val* como um fator de proteção contra o desenvolvimento de LES em Euro-descendentes e, por outro lado, do alelo *CYP2E1*5B* como possível fator de risco para o LES em Afro-descendentes. A ausência de associação dos demais polimorfismos estudados na susceptibilidade ao LES não exclui a possibilidade de estes exercerem alguma influência na doença, visto que a combinação destes e de outros genes do metabolismo também pode contribuir de alguma forma para o LES.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelson AK, Delgado-Vega AM, Kozyrev SV, Sanchez E, Velazquez-Cruz R, Eriksson N, Wojcik J, Linga Reddy MV, Lima G, D'Alfonso S *et al.* (2009) STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Ann Rheum Dis* 68:1746-1753.

Achour A, Mankai A, Thabet Y, Sakly W, Braham F, Kechrid C, Bahri F, Bouajina E, Chouchene S, Haddad O *et al.* (2010) Systemic lupus erythematosus in the elderly. *Rheumatol Int.*

Ahmad YA and Bruce IN (2001) Genetic epidemiology: systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res* 3:331-336.

Akgul S, Derman O, Alikasifoglu M and Aktas D (2010) CYP1A1 polymorphism in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 112:8-10.

Al-Arfaj AS, Al-Balla SR, Al-Dalaan AN, Al-Saleh SS, Bahabri SA, Mousa MM and Sekeit MA (2002) Prevalence of systemic lupus erythematosus in central Saudi Arabia. *Saudi Med J* 23:87-89.

Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX and Buolamwini J (1997) Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 272:10004-10012.

Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, Roddam PL, Roman E, Cartwright RA and Morgan GJ (2001) Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11592-11597.

Armstrong DL, Reiff A, Myones BL, Quismorio FP, Jr., Klein-Gitelman M, McCurdy D, Wagner-Weiner L, Silverman E, Ojwang JO, Kaufman KM *et al.* (2009) Identification of new SLE-associated genes with a two-step Bayesian study design. *Genes Immun* 10:446-456.

Arnett FC, Reveille JD, Wilson RW, Provost TT and Bias WB (1984) Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis. *Semin Arthritis Rheum* 14:24-35.

Autrup H (2000) Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 464:65-76.

Beeghly A, Katsaros D, Chen H, Fracchioli S, Zhang Y, Massobrio M, Risch H, Jones B and Yu H (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival. *Gynecol Oncol* 100:330-337.

Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, Urowitz M, Fortin PR, Petri M, Barr S *et al.* (2006) Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:2550-2557.

Bernatsky S, Fournier M, Pineau CA, Clarke AE, Vinet E and Smargiassi A (2011) Associations between ambient fine particulate levels and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Environ Health Perspect* 119:45-49.

Boey ML (1998) Systemic lupus erythematosus in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 27:35-41.

Bolt HM and Thier R (2006) Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab* 7:613-628.

Borba EF, Latorre LC, Brenol JC, Kayser C, da Silva NA, Zimmermann AF, de Pádua PM, Costallat LT, Bonfá E and Sato EI (2008) Consensus of Systemic Lupus Erythematosus. *Rev Bras Reumatol* 48:196-207.

Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y and Gershwin ME (2004) Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 3:423-453.

Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y and Gershwin ME (2010) The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 9:A277-287.

Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH and Schellens JH (2006) Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clin Pharmacokinet* 45:253-285.

Botto M and Walport MJ (1993) Hereditary deficiency of C3 in animals and humans. *Int Rev Immunol* 10:37-50.

Bozina N, Bradamante V and Lovric M (2009) Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol* 60:217-242.

Brown JM, Archer AJ, Pfau JC and Holian A (2003) Silica accelerated systemic autoimmune disease in lupus-prone New Zealand mixed mice. *Clin Exp Immunol* 131:415-421.

Bruce IN, Urowitz MB, Gladman DD, Ibanez D and Steiner G (2003) Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus: the Toronto Risk Factor Study. *Arthritis Rheum* 48:3159-3167.

Budarf ML, Goyette P, Boucher G, Lian J, Graham RR, Claudio JO, Hudson T, Gladman D, Clarke AE, Pope JE *et al.* (2011) A targeted association study in systemic lupus erythematosus identifies multiple susceptibility alleles. *Genes Immun* 12:51-58.

Casciola-Rosen LA, Anhalt G and Rosen A (1994) Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 179:1317-1330.

Cascorbi I, Brockmoller J and Roots I (1996) A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 56:4965-4969.

Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Mejia JC, Aydintug AO, Chwalinska-Sadowska H, de Ramon E *et al.* (2003) Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 82:299-308.

Chang C and Gershwin ME (2011) Drug-induced lupus erythematosus: incidence, management and prevention. *Drug Saf* 34:357-374.

Chen Y, Bai Y, Yuan J, Chen W, Sun J, Wang H, Liang H, Guo L, Yang X, Tan H *et al.* (2006) Association of polymorphisms in AhR, CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 genes with levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes among coke-oven workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1703-1707.

Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR and Wei Q (1999) Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 84:220-224.

Chung SA and Criswell LA (2007) PTPN22: its role in SLE and autoimmunity. *Autoimmunity* 40:582-590.

Cohen-Solal JF, Jeganathan V, Hill L, Kawabata D, Rodriguez-Pinto D, Grimaldi C and Diamond B (2008) Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:528-532.

Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW and Gilkeson GS (2002a) Hormonal and reproductive risk factors for development of systemic lupus erythematosus: results of a population-based, case-control study. *Arthritis Rheum* 46:1830-1839.

Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW and Gilkeson GS (2002b) Risk factors for development of systemic lupus erythematosus: allergies, infections, and family history. *J Clin Epidemiol* 55:982-989.

Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG and Gilkeson GS (1998) Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:1714-1724.

Corchero J, Pimprale S, Kimura S and Gonzalez FJ (2001) Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics* 11:1-6.

Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, Lockman S, Nobles-Knight D, Petri M and Karlson EW (2004) Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 50:849-857.

Crispin JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT and Tsokos GC (2010) Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 16:47-57.

Criswell LA (2008) The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 66:176-183.

Crosbie D, Black C, McIntyre L, Royle PL and Thomas S (2007) Dehydroepiandrosterone for systemic lupus erythematosus. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005114.

Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S and Masi AT (1995) Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 13:217-226.

D'Cruz DP, Khamashta MA and Hughes GR (2007) Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 369:587-596.

Danchenko N, Satia JA and Anthony MS (2006) Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 15:308-318.

Dasgupta RK, Adamson PJ, Davies FE, Rollinson S, Roddam PL, Ashcroft AJ, Dring AM, Fenton JA, Child JA, Allan JM *et al.* (2003) Polymorphic variation in GSTP1 modulates outcome following therapy for multiple myeloma. *Blood* 102:2345-2350.

Deka M, Bose M, Baruah B, Bose PD, Medhi S, Bose S, Saikia A and Kar P (2010) Role of CYP2E1 gene polymorphisms association with hepatitis risk in Northeast India. *World J Gastroenterol* 16:4800-4808.

Deng Y and Tsao BP (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 6:683-692.

Dialyna IA, Arvanitis DA and Spandidos DA (2001) Genetic polymorphisms and transcriptional pattern analysis of CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 genes in breast cancer. *Int J Mol Med* 8:79-87.

Dommett RM, Klein N and Turner MW (2006) Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 68:193-209.

Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, Zampieri S, Vescovi F, Sulli A, Giusti M, Piccoli A, Grella P and Gambari PF (2002) Steroid hormones and disease activity during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 47:202-209.

Dusinska M, Ficek A, Horska A, Raslova K, Petrovska H, Vallova B, Drlickova M, Wood SG, Stupakova A, Gasparovic J *et al.* (2001) Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat Res* 482:47-55.

Edworthy SM, Zatarain E, McShane DJ and Bloch DA (1988) Analysis of the 1982 ARA lupus criteria data set by recursive partitioning methodology: new insights into the relative merit of individual criteria. *J Rheumatol* 15:1493-1498.

El-Garf A, Salah S, Shaarawy M, Zaki S and Anwer S (1996) Prolactin hormone in juvenile systemic lupus erythematosus: a possible relationship to disease activity and CNS manifestations. *J Rheumatol* 23:374-377.

Eliopoulos E, Zervou M, Andreou A, Dimopoulou K, Cosmidis N, Voloudakis G, Mysirlaki H, Vazgiourakis V, Sidiropoulos P, Niewold T *et al.* (2011) Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetically homogeneous population of Crete. *Lupus* 20:501-506.

Finckh A, Cooper GS, Chibnik LB, Costenbader KH, Watts J, Pankey H, Fraser PA and Karlson EW (2006) Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis Rheum* 54:3648-3654.

Fraser PA, Ding WZ, Mohseni M, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, Gilkeson GS and Cooper GS (2003) Glutathione S-transferase M null homozygosity and risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene-environment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol* 30:276-282.

Freemer MM, King TE, Jr. and Criswell LA (2006) Association of smoking with dsDNA autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65:581-584.

Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Takatsuka H, Fujii Y and Takeshita H (2009) Cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 polymorphisms in Ovambos and Mongolians. *Leg Med (Tokyo)* 11 Suppl 1:S408-410.

Furukawa F, Itoh T, Wakita H, Yagi H, Tokura Y, Norris DA and Takigawa M (1999) Keratinocytes from patients with lupus erythematosus show enhanced cytotoxicity to ultraviolet radiation and to antibody-mediated cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 118:164-170.

Gao CM, Takezaki T, Wu JZ, Li ZY, Liu YT, Li SP, Ding JH, Su P, Hu X, Xu TL *et al.* (2002) Glutathione-S-transferases M1 (GSTM1) and GSTT1 genotype, smoking, consumption of alcohol and tea and risk of esophageal and stomach cancers: a case-control study of a high-incidence area in Jiangsu Province, China. *Cancer Lett* 188:95-102.

Garred P, Voss A, Madsen HO and Junker P (2001) Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun* 2:442-450.

Garrett-Sinha LA, John S and Gaffen SL (2008) IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 20:519-525.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P *et al.* (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1239-1248.

Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT and Weimer TA (2002) Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 119:249-256.

Gaspar PA, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A and Weimer T (2004) CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TP53 polymorphisms: Do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and molecular Biology* 27:133-138.

Gene home - NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (July 25, 2011).

Gilliland FD, Li YF, Saxon A and Diaz-Sanchez D (2004) Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet* 363:119-125.

Glesse N, Monticielo OA, Mattevi VS, Brenol JCT, Xavier RM, da Silva GK, dos Santos BP, Rucatti GG and Chies JAB Association of the mannose-binding lectin 2 gene polymorphic variants with susceptibility and clinical progression in systemic lupus erythematosus.

Granados J, Zuniga J, Acuna-Alonzo V, Rosetti F and Vargas-Alarcon G (2006) [Influence of alleles and haplotypes of the main histocompatibility complex on the susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Mexican population]. *Gac Med Mex* 142:195-199.

Griffiths HR (2008) Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease? *Autoimmun Rev* 7:544-549.

Gross AJ, Hochberg D, Rand WM and Thorley-Lawson DA (2005) EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. *J Immunol* 174:6599-6607.

Guecheva TN and Henriques JAP (2003) Metabolismo de Xenobióticos: Citocromo P450. *Genética Toxicológica*:225-247.

Hall AG, Autzen P, Cattan AR, Malcolm AJ, Cole M, Kernahan J and Reid MM (1994) Expression of mu class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 54:5251-5254.

Harris MJ, Coggan M, Langton L, Wilson SR and Board PG (1998) Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics* 8:27-31.

Hay EM (1995) Systemic lupus erythematosus. *Baillieres Clin Rheumatol* 9:437-470.

Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.

Hochberg MC (1990) Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 16:617-639.

Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725.

Holley SL, Fryer AA, Haycock JW, Grubb SE, Strange RC and Hoban PR (2007) Differential effects of glutathione S-transferase pi (GSTP1) haplotypes on cell proliferation and apoptosis. *Carcinogenesis* 28:2268-2273.

Hong JY and Yang CS (1997) Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4:759-762.

Hopkinson ND, Doherty M and Powell RJ (1993) The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Nottingham, UK, 1989-1990. *Br J Rheumatol* 32:110-115.

Horiuchi T, Washio M, Kiyohara C, Tsukamoto H, Tada Y, Asami T, Ide S, Kobashi G and Takahashi H (2009) Combination of TNF-RII, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and the risk of Japanese SLE: findings from the KYSS study. *Rheumatology (Oxford)* 48:1045-1049.

Howells RE, Redman CW, Dhar KK, Sarhanis P, Musgrove C, Jones PW, Aldersea J, Fryer AA, Hoban PR and Strange RC (1998) Association of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes with clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 4:2439-2445.

Huang JL, Yao TC and See LC (2004) Prevalence of pediatric systemic lupus erythematosus and juvenile chronic arthritis in a Chinese population: a nation-wide prospective population-based study in Taiwan. *Clin Exp Rheumatol* 22:776-780.

Huang YF, Wang W, Han JY, Wu XW, Zhang ST, Liu CJ, Hu QG, Xiong P, Hamvas RM, Wood N *et al.* (2003) Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Immunogenet* 30:121-124.

Huemer C, Huemer M, Dorner T, Falger J, Schacherl H, Bernecker M, Artacker G and Pilz I (2001) Incidence of pediatric rheumatic diseases in a regional population in Austria. *J Rheumatol* 28:2116-2119.

Inoue K, Asao T and Shimada T (2000) Ethnic-related differences in the frequency distribution of genetic polymorphisms in the CYP1A1 and CYP1B1 genes in Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* 30:285-295.

Jacob CO, Zhu J, Armstrong DL, Yan M, Han J, Zhou XJ, Thomas JA, Reiff A, Myones BL, Ojwang JO *et al.* (2009) Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6256-6261.

Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A, Pant MC, Baiq MQ and Mittal B (2006) GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. *Cancer Lett* 242:60-67.

Jakab L, Laki J, Sallai K, Temesszentandras G, Pozsonyi T, Kalabay L, Varga L, Gombos T, Blasko B, Biro A *et al.* (2007) Association between early

onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene. *Clin Immunol* 125:230-236.

Jara-Quezada L, Graef A and Lavalle C (1991) Prolactin and gonadal hormones during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 18:349-353.

Jimenez S, Cervera R, Font J and Ingelmo M (2003) The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 25:3-12.

Johansson AS, Stenberg G, Widersten M and Mannervik B (1998) Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J Mol Biol* 278:687-698.

Johnson AE, Gordon C, Palmer RG and Bacon PA (1995) The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 38:551-558.

Jonsen A, Bengtsson AA, Sturfelt G and Truedsson L (2004) Analysis of HLA DR, HLA DQ, C4A, FcγRIIIa, FcγRIIIb, MBL, and IL-1Ra allelic variants in Caucasian systemic lupus erythematosus patients suggests an effect of the combined FcγRIIIa R/R and IL-1Ra 2/2 genotypes on disease susceptibility. *Arthritis Res Ther* 6:R557-562.

Jonsen A, Gullstrand B, Guner N, Bengtsson AA, Nived O, Truedsson L and Sturfelt G (2007) Genetically determined mannan-binding lectin deficiency is of minor importance in determining susceptibility to severe infections and vascular organ damage in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 16:245-253.

Jonsson H, Nived O, Sturfelt G and Silman A (1990) Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a defined population using multiple sources of retrieval. *Br J Rheumatol* 29:185-188.

Kang TY, El-Soheby A, Comelis MC, Eny KM and Bae SC (2005) Glutathione S-transferase genotype and risk of systemic lupus erythematosus in Koreans. *Lupus* 14:381-384.

Kariuki SN, Moore JG, Kirou KA, Crow MK, Utset TO and Niewold TB (2009) Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-

alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 10:487-494.

Karlson EW, Watts J, Signorovitch J, Bonetti M, Wright E, Cooper GS, McAlindon TE, Costenbader KH, Massarotti EM, Fitzgerald LM *et al.* (2007) Effect of glutathione S-transferase polymorphisms and proximity to hazardous waste sites on time to systemic lupus erythematosus diagnosis: results from the Roxbury lupus project. *Arthritis Rheum* 56:244-254.

Kato I, Cichon M, Yee CL, Land S and Korczak JF (2009) African American-preponderant single nucleotide polymorphisms (SNPs) and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol* 33:24-30.

Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A and Harris CC (1992) Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 52:6712-6715.

Kaufman KM, Kelly JA, Herring BJ, Adler AJ, Glenn SB, Namjou B, Frank SG, Dawson SL, Bruner GR, James JA *et al.* (2006) Evaluation of the genetic association of the PTPN22 R620W polymorphism in familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:2533-2540.

Kelly JA, Moser KL and Harley JB (2002) The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 3 Suppl 1:S71-85.

Kim JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn YW, Min HK, Lee JM and Namkoong SE (2000) Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma. *Cancer* 88:2082-2091.

Kinder BW, Freemer MM, King TE, Jr., Lum RF, Nititham J, Taylor K, Edberg JC, Bridges SL, Jr. and Criswell LA (2007) Clinical and genetic risk factors for pneumonia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56:2679-2686.

Korytina GF, Yanbaeva DG, Babenkova LI, Etkina EI and Victorova TV (2005) Genetic polymorphisms in the cytochromes P-450 (1A1, 2E1), microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genes, and their relationship with chronic bronchitis and relapsing pneumonia in children. *J Mol Med* 83:700-710.

Kovacic P and Jacintho JD (2003) Systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases from endogenous and exogenous agents: unifying theme of oxidative stress. *Mini Rev Med Chem* 3:568-575.

Kretz-Rommel A and Rubin RL (2000) Disruption of positive selection of thymocytes causes autoimmunity. *Nat Med* 6:298-305.

Krishnan E and Hubert HB (2006) Ethnicity and mortality from systemic lupus erythematosus in the US. *Ann Rheum Dis* 65:1500-1505.

Kvitko K, Gaspar PA, Torres MR and Mara HH (2006) CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and molecular Biology* 29:613-616.

Lahita RG (1990) Sex hormones and the immune system--Part 1. Human data. *Baillieres Clin Rheumatol* 4:1-12.

Lahita RG (1999) The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 11:352-356.

Lanna CC, Ferreira GA and Telles RW (2008) Lúpus Eritematoso Sistêmico. In: Carvalho MA, Lanna CC, Bértolo MB (Ed.) *Reumatologia: diagnóstico e tratamento*. Guanabara Koogan:364-385.

Lau CS, Yin G and Mok MY (2006) Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus* 15:715-719.

Le Marchand L, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR and Lau AF (1998) Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res* 58:4858-4863.

Lehmann P, Holzle E, Kind P, Goerz G and Plewig G (1990) Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 22:181-187.

Liao LH, Zhang H, Lai MP, Chen SL, Wu M and Shen N (2011) Single-nucleotide polymorphisms and haplotype of CYP2E1 gene associated with systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Arthritis Res Ther* 13:R11.

Manzi S (2001) Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Am J Manag Care* 7:S474-479.

Manzi S (2009) Lupus update: perspective and clinical pearls. *Cleve Clin J Med* 76:137-142.

Mattey DL, Hassell AB, Dawes PT, Jones PW, Yengi L, Aldersea J, Strange RC and Fryer AA (2000) Influence of polymorphism in the manganese superoxide dismutase locus on disease outcome in rheumatoid arthritis: evidence for interaction with glutathione S-transferase genes. *Arthritis Rheum* 43:859-864.

McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE and Kwok CK (1995) Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 38:1260-1270.

McKinnon RA and Nebert DW (1994) Possible role of cytochromes P450 in lupus erythematosus and related disorders. *Lupus* 3:473-478.

McMurray RW and May W (2003) Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 48:2100-2110.

Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD and Le Couteur DG (1998) Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet* 352:1344-1346.

Mok CC and Lau CS (2003) Lupus in Hong Kong Chinese. *Lupus* 12:717-722.

Molina MJ, Mayor AM, Franco AE, Morell CA, Lopez MA and Vila LM (2007) Prevalence of systemic lupus erythematosus and associated comorbidities in Puerto Rico. *J Clin Rheumatol* 13:202-204.

Molokhia M and McKeigue P (2006) Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations. *Lupus* 15:827-832.

Molokhia M, McKeigue PM, Cuadrado M and Hughes G (2001) Systemic lupus erythematosus in migrants from west Africa compared with Afro-Caribbean people in the UK. *Lancet* 357:1414-1415.

Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, Rucatti GG, Junior JM, da Silva GK, Glesse N, dos Santos BP, Brenol JC and Xavier RM (2010) Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19:280-287.

Monticielo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC and Chies JA (2008) The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 27:413-419.

Namjou B, Kothari PH, Kelly JA, Glenn SB, Ojwang JO, Adler A, Alarcon-Riquelme ME, Gallant CJ, Boackle SA, Criswell LA *et al.* (2011) Evaluation of the TREX1 gene in a large multi-ancestral lupus cohort. *Genes Immun* 12:270-279.

Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ and Sonawane B (2009) Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 12:362-388.

Ollier W, Davies E, Snowden N, Aldersea J, Fryer A, Jones P and Strange R (1996) Association of homozygosity for glutathione-S-transferase GSTM1 null alleles with the Ro+/La- autoantibody profile in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39:1763-1764.

Oscarson M and Ingelman-Sundberg M (2002) CYPalleles: a web page for nomenclature of human cytochrome P450 alleles. *Drug Metab Pharmacokinet* 17:491-495.

Palmer CN, Young V, Ho M, Doney A and Belch JJ (2003) Association of common variation in glutathione S-transferase genes with premature development of cardiovascular disease in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 48:854-855.

Park JH, El-Sohehy A, Cornelis MC, Kim HA, Kim SY and Bae SC (2004) Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 gene polymorphisms and carotid atherosclerosis in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 24:157-163.

Parks CG and Cooper GS (2005) Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 38:497-506.

Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP *et al.* (2011) Systemic lupus erythematosus: association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. *Lupus* 20:265-273.

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B and Taylor JB (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 (Pt 1):271-276.

Perl A, Colombo E, Dai H, Agarwal R, Mark KA, Banki K, Poiesz BJ, Phillips PE, Hoch SO, Reveille JD *et al.* (1995) Antibody reactivity to the HRES-1 endogenous retroviral element identifies a subset of patients with systemic lupus erythematosus and overlap syndromes. Correlation with antinuclear antibodies and HLA class II alleles. *Arthritis Rheum* 38:1660-1671.

Petri M, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, Sammaritano LR, Lockshin M, Merrill JT, Belmont HM, Askanase AD *et al.* (2005) Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 353:2550-2558.

Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L and Cooper GS (2010) Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 39:257-268.

Pugh-Bernard AE and Cambier JC (2006) B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 18:451-455.

Rhodes B and Vyse TJ (2008) The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford)* 47:1603-1611.

Rodrigues LC (2003) Estudo das Glutation S-Transferases Hepáticas Solúveis do

Peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu). Tese Doutorado, Pós-

Graduação em Biologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ, Rio de Janeiro, RJ.

Rodriguez-Antona C, Gomez A, Karlgren M, Sim SC and Ingelman-Sundberg M (2010) Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment. *Hum Genet* 127:1-17.

Rohr P, Veit TD, Scheibel I, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA and Kvitko K (2008) GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 26:151-155.

Romieu I, Sienna-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Moreno-Macias H, Reyes-Ruiz NI, Estela del Rio-Navarro B, Hernandez-Avila M and London SJ (2004) Genetic polymorphism of GSTM1 and antioxidant supplementation influence lung function in relation to ozone exposure in asthmatic children in Mexico City. *Thorax* 59:8-10.

Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, Verduyn W, Westendorp RG, de Vries RR, Breedveld FC *et al.* (2000) TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43:129-134.

Roos A, Daha MR, van Pelt J and Berger SP (2007) Mannose-binding lectin and the kidney. *Nephrol Dial Transplant* 22:3370-3377.

Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM, Macedo JM, Medina R, Neto JF, Gallo CV and Pinto LF (2002) Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 1:233-240.

Saevarsdottir S, Kristjansdottir H, Grondal G, Vikingsdottir T, Steinsson K and Valdimarsson H (2006) Mannan-binding lectin and complement C4A in Icelandic multicase families with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65:1462-1467.

San Jose C, Cabanillas A, Benitez J, Carrillo JA, Jimenez M and Gervasini G (2010) CYP1A1 gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study. *BMC Cancer* 10:463.

Sanchez-Guerrero J, Karlson EW, Liang MH, Hunter DJ, Speizer FE and Colditz GA (1997) Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:804-808.

Sanchez-Guerrero J, Liang MH, Karlson EW, Hunter DJ and Colditz GA (1995) Postmenopausal estrogen therapy and the risk for developing systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 122:430-433.

Sanchez E, Sabio JM, Callejas JL, de Ramon E, Garcia-Portales R, Garcia-Hernandez FJ, Jimenez-Alonso J, Gonzalez-Escribano MF, Martin J and Koeleman BP (2006) Association study of genetic variants of pro-inflammatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet* 7:48.

Sandrin-Garcia P, Brandao LA, Coelho AV, Guimaraes RL, Pancoto JA, Segat L, Donadi EA, de Lima-Filho JL and Crovella S (2011) Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. *Hum Immunol* 72:516-521.

Sato EL, Bonfá ED, Costallat LT, da Silva NA, Brenol JC, Santiago MB, Szajubok JC, Rachid AF, Barros RT and Vasconcelos M (2002) Brazilian Consensus for the treatment of systemic erythematosus lupus. *Rev. bras. reumatol* 42:362-370.

Sawalha AH and Kovats S (2008) Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 10:286-291.

Sawalha AH, Webb R, Han S, Kelly JA, Kaufman KM, Kimberly RP, Alarcon-Riquelme ME, James JA, Vyse TJ, Gilkeson GS *et al.* (2008) Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 3:e1727.

Sequeira JF, Keser G, Greenstein B, Wheeler MJ, Duarte PC, Khamashta MA and Hughes GR (1993) Systemic lupus erythematosus: sex hormones in male patients. *Lupus* 2:315-317.

Sharma R, Ahuja M, Panda NK and Khullar M (2010) Combined effect of smoking and polymorphisms in tobacco carcinogen-metabolizing enzymes CYP1A1 and GSTM1 on the head and neck cancer risk in North Indians. *DNA Cell Biol* 29:441-448.

Shingu M, Oribe M, Todoroki T, Tatsukawa K, Tomo-oka K, Yasuda M and Nobunaga M (1983) Serum factors from patients with systemic lupus erythematosus enhancing superoxide generation by normal neutrophils. *J Invest Dermatol* 81:212-215.

Singh M, Shah PP, Singh AP, Ruwali M, Mathur N, Pant MC and Parmar D (2008) Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res* 638:184-194.

Smith-Bouvier DL, Divekar AA, Sasidhar M, Du S, Tiwari-Woodruff SK, King JK, Arnold AP, Singh RR and Voskuhl RR (2008) A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J Exp Med* 205:1099-1108.

Souza DC, Santo AH and Sato EI (2010) Trends in systemic lupus erythematosus mortality rates in the state of Sao Paulo, Brazil from 1985 to 2004. *Clin Exp Rheumatol* 28:519-524.

Sprenger R, Schlagenhauer R, Kerb R, Bruhn C, Brockmoller J, Roots I and Brinkmann U (2000) Characterization of the glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogenetics* 10:557-565.

Sreeja L, Syamala V, Hariharan S, Madhavan J, Devan SC and Ankathil R (2005) Possible risk modification by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms in lung cancer susceptibility in a South Indian population. *J Hum Genet* 50:618-627.

Steinberg AD (1995) Insights into the basis of systemic lupus. *J Autoimmun* 8:771-775.

Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC and Lenz HJ (2002) Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 94:936-942.

Strange RC, Jones PW and Fryer AA (2000) Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 112-113:357-363.

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S and Fryer AA (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482:21-26.

Sullivan KE (2000) Genetics of systemic lupus erythematosus. Clinical implications. *Rheum Dis Clin North Am* 26:229-256, v-vi.

Sweeney C, McClure GY, Fares MY, Stone A, Coles BF, Thompson PA, Korourian S, Hutchins LF, Kadlubar FF and Ambrosone CB (2000) Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Res* 60:5621-5624.

Taioli E, Crofts F, Trachman J, Demopoulos R, Toniolo P and Garte SJ (1995) A specific African-American CYP1A1 polymorphism is associated with adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 55:472-473.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N and Winchester RJ (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277.

Tan XL, Moslehi R, Han W and Spivack SD (2009) Haplotype-tagging single nucleotide polymorphisms in the GSTP1 gene promoter and susceptibility to lung cancer. *Cancer Detect Prev*.

Tebbe B and Orfanos CE (1997) Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus. *Lupus* 6:96-104.

Tew MB, Ahn CW, Friedman AW, Reveille JD, Tan FK, Alarcon GS, Bastian HM, Fessler BJ, McGwin G, Jr. and Lisse JR (2001a) Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. VIII. Lack of association of glutathione S-transferase null alleles with disease manifestations. *Arthritis Rheum* 44:981-983.

Tew MB, Reveille JD, Arnett FC, Friedman AW, McNearney T, Fischbach M, Ahn C and Tan FK (2001b) Glutathione S-transferase genotypes in systemic sclerosis and their association with clinical manifestations in early disease. *Genes Immun* 2:236-238.

Thorburn CM and Ward MM (2003) Hospitalizations for coronary artery disease among patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48:2519-2523.

Tikly M and Navarra SV (2008) Lupus in the developing world--is it any different? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22:643-655.

Torres MCL, Soares NFF and Maia JF (2004) Parâmetros cinéticos da Glutathione S-transferase e sua ativação por extratos vegetais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24:243-248.

Truedsson L, Bengtsson AA and Sturfelt G (2007) Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40:560-566.

Tsokos GC, Wong HK, Enyedy EJ and Nambiar MP (2000) Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 12:355-363.

Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M, Abe T, Sagami I, Ohmachi T, Wakui A, Kanamaru R and Watanabe M (1991) Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 82:254-256.

Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV and Gonzalez FJ (1988) Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* 27:9006-9013.

Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F *et al.* (2005) Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 37:1317-1319.

Via CS and Handwerger BS (1993) B-cell and T-cell function in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 5:570-574.

Vilar MJ and Sato EI (2002) Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 11:528-532.

von Schmiedeberg S, Fritsche E, Ronnau AC, Specker C, Golka K, Richter-Hintz D, Schuppe HC, Lehmann P, Ruzicka T, Esser C *et al.* (1999) Polymorphisms of the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1 and NAT-2 in systemic sclerosis and lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 455:147-152.

Wadee S, Tikly M and Hopley M (2007) Causes and predictors of death in South Africans with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 46:1487-1491.

Wang G, Cai P, Ansari GA and Khan MF (2007) Oxidative and nitrosative stress in trichloroethene-mediated autoimmune response. *Toxicology* 229:186-193.

Wang Y, Spitz MR, Schabath MB, Ali-Osman F, Mata H and Wu X (2003) Association between glutathione S-transferase p1 polymorphisms and lung cancer risk in Caucasians: a case-control study. *Lung Cancer* 40:25-32.

Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE and Bell DA (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19:275-280.

Weimann BJ and Weiser H (1992) Effects of antioxidant vitamins C, E, and beta-carotene on immune functions in MRL/lpr mice and rats. *Ann N Y Acad Sci* 669:390-392.

Werth VP, Zhang W, Dortzbach K and Sullivan K (2000) Association of a promoter polymorphism of tumor necrosis factor-alpha with subacute cutaneous

lupus erythematosus and distinct photoregulation of transcription. *J Invest Dermatol* 115:726-730.

Wilkinson Jt and Clapper ML (1997) Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216:192-200.

Wu MS, Chen CJ, Lin MT, Wang HP, Shun CT, Sheu JC and Lin JT (2002) Genetic polymorphisms of cytochrome p450 2E1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to gastric carcinoma in Taiwan. *Int J Colorectal Dis* 17:338-343.

Xu S, Wang Y, Roe B and Pearson WR (1998) Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem* 273:3517-3527.

Yacoub Wasef SZ (2004) Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gend Med* 1:12-17.

Ye Z and Parry JM (2002) Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to colon cancer. *Teratog Carcinog Mutagen* 22:385-392.

Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, Hu CJ and Liu HW (2003) Cytochrome P450 and manganese superoxide dismutase genes polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 90:19-24.

Zhang J, Deng J, Zhang C, Lu Y, Liu L, Wu Q, Shao Y, Zhang J, Yang H, Yu B *et al.* (2010) Association of GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Chinese population. *Clin Chim Acta* 411:878-881.

Zhong S, Huang M, Yang X, Liang L, Wang Y, Romkes M, Duan W, Chan E and Zhou SF (2006) Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Clin Pharmacol* 62:457-472.

Zhu K, Hunter S, Payne-Wilks K, Sutcliffe C, Bentley C, Roland CL and Williams SM (2006) Potential differences in breast cancer risk factors based on CYP1A1 MspI and African-American-specific genotypes. *Ethn Dis* 16:207-215.

Zimmermann-Nielsen E, Gronbaek H, Dahlerup JF, Baatrup G and Thorlacius-Ussing O (2005) Complement activation capacity in plasma before and

during high-dose prednisolone treatment and tapering in exacerbations of Crohn's disease and ulcerative colitis. BMC Gastroenterol 5:31.

6. ANEXOS

ANEXO 1

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (Hochberg, 1997):

1. Rash malar

Eritema fixo, plano ou elevado, nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial

2. Rash Discóide

Placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrização atrófica nas lesões antigas

3. Fotossensibilidade

Rash cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico

4. Úlcera oral

Ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente não dolorosa, observada pelo médico

5. Artrite

Artrite não – erosiva, envolvendo 2 ou mais articulações periféricas caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame

6. Serosite

(a) pleurite – história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural

ou

(b) pericardite – documentada por ECG ou atrito ou evidência de derrame pericárdico

7. Alteração renal

(a) proteinúria persistente > 0,5 g por dia ou > 3 + se não quantificada

ou

(b) cilindros celulares: podem ser hematológico, granular, tubular ou misto

8. Alteração neurológica

(a) convulsão – na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrolíticos)

Ou

(b) psicose - na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrolíticos)

9. Alteração hematológica

(a) anemia hemolítica – com reticulocitose

Ou

(b) leucopenia - < 4000/mm³ total em 2 ou mais ocasiões

Ou

(c) linfopenia - < 1500/mm³ em 2 ou mais ocasiões

Ou

(d) trombocitopenia - < 100 000/mm³ na ausência de drogas causadoras

10. Alteração imunológica

(a) anti-DNA – anticorpo ao DNA nativo em títulos anormais

Ou

(b) Anti-Sm – presença do anticorpo ao antígeno nuclear Sm

Ou

(c) Achados positivos de anticorpos antifosfolípeos baseados em (1) concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM, (2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando teste-padrão ou (3) VDRL falso positivo por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs

11. Anticorpo antinuclear (Tebbe & Orfanos)

Título anormal do FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de drogas sabidamente associadas ao lúpus induzido por drogas

Para fins de classificação de doença, o (a) paciente deve apresentar ao menos 4 dos 11 critérios.

ANEXO 2

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DO AMBULATÓRIO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

IDENTIFICAÇÃO:

n° _____

Nome: _____ Registro: _____ Sexo: F M
Raça: Branco Não branco
Data de nascimento: ___/___/___
Profissão: _____ Estado civil: _____
Naturalidade/Procedência: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ CEP: _____ - ____
Telefones: _____

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ___/___/___

DATA DO DIAGNÓSTICO: ___/___/___

MANIFESTAÇÕES INICIAIS NO DIAGNÓSTICO: _____

INÍCIO DO ACOMPANHAMENTO NO HCPA: ___/___/___

ÓBITO: S N DATA: ___/___/___

CAUSA: _____

CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO PARA LES (ACR 1997)

- Rash malar
- Rash discóide
- Fotossensibilidade
- Úlceras orais/nasais
- Artrite)
- Serosite: Pleurite Pericardite
- Doença renal: Classe: _____ (data: ___/___/___) sem biópsia
Índice de atividade ___/___ Índice de cronicidade: ___/___
- Doença neurológica: Psicose
 Convulsão
- Hematológico: Anemia hemolítica
 Leucopenia / linfopenia
 Plaquetopenia
- FAN: Titulação: _____ Padrão: _____
- Imunológico: anti DNA anti Sm
 aCL: IgG: _____ IgM: _____ AL VDRL

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS

- Hipertensão Diabetes Obesidade (IMC: ___) Dislipidemia
- SAAF
- Síndrome de Sjögren
- Eventos tromboembólicos (AVC, IAM, TVP, outros: _____)
- História obstétrica: G: ___/P: ___/C: ___/A: ___ obs.: _____
- Tabagismo Ex-tabagismo Etilismo
- Outras doenças autoimunes associadas: _____
- ENA _____
- Lupus band test: _____

TRATAMENTO REALIZADO

- | | | |
|---|---|---|
| <input type="checkbox"/> Corticoterapia | <input type="checkbox"/> Pulsoterapia | <input type="checkbox"/> Ciclofosfamida |
| <input type="checkbox"/> Azatioprina | <input type="checkbox"/> Cloroquina / Hidroxicloroquina | <input type="checkbox"/> Metotrexate |
| <input type="checkbox"/> Micofenolato mofetil | <input type="checkbox"/> Dapsona | <input type="checkbox"/> Ciclosporina |
| <input type="checkbox"/> Rituximabe | <input type="checkbox"/> AAS | <input type="checkbox"/> Anticoagulante |
| <input type="checkbox"/> ACO/TRH | <input type="checkbox"/> CaCo3/D3 | <input type="checkbox"/> Bisfosfonados |
| <input type="checkbox"/> Estatina | <input type="checkbox"/> Danazol | <input type="checkbox"/> Anti-hipertensivos |