

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES DE ENZIMAS DE
METABOLIZAÇÃO E DETOXIFICAÇÃO EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS
CRÔNICAS**

Tássia Flores Rech

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
Março de 2013

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Agências financiadoras:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES
- Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – 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)
- Hospital São Lucas da PUCRS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Artur Chies, o Zéca, por ter me recebido tão bem no laboratório e contribuindo muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Elmo, por ser sempre tão prestativo, ele é uma das pessoas mais queridas do PPGBM.

À professora Márcia Margis, pela ajuda na realização do estágio didático. Obrigada pela oportunidade, aprendi muito com ela.

A todo o pessoal do Laboratório de Imunogenética da UFRGS pelo apoio durante todas as etapas do Mestrado.

À Jacque, pela amizade, conversas e auxílios durante estes dois anos. É uma pessoa que quero ter sempre por perto. És un gusto tenerte como amiga! Vamos chismosear?

À Nadine, pelo apoio, carinho e pela parceria dentro e fora do lab. Ela é uma pessoa incrível, amável e inteligente, me sinto muito feliz e sortuda por ter a sua amizade!

À Cíntia, pela amizade que ultrapassou as paredes do lab, risadas sem motivo no D43 (sempre acontecia alguma coisa estranha nesse ônibus), conversas e apoio. Tua amizade é muito importante para mim!

À Camila, pelo seu bom humor dentro e fora do lab, pela amizade e companheirismo durante o Mestrado. Obrigada por me receber no primeiro dia de lab, nunca vou esquecer!

À Juliana, por sempre estar disposta a ajudar, pelas conversas, amizade e por oferecer a sua casa para que eu ficasse quando tinha que estar no Vale às 7h! Ela é muito preciosa!

À Lia, pela amizade, caronas, risadas, conversas “muito maravilhosas” e por odiar açaí que nem eu!

À Bianca, guria muito querida, pela amizade, parceria, momentos de diversão cantando a música do João Aurélio.

Ao Mauricio, pela parceria nas disciplinas, incentivos e animação no lab, me divertia muito com ele.

À Ana, pela pessoa querida que és, pelo incentivo, conversas e por sempre estar disposta a ajudar.

À Francis, pelas conversas divertidas e apoio no lab. Também acho que eles são uns porcos!

À Aline, minha amiga que há 19 anos me apoia em todos os momentos da minha vida, mas não existem palavras para descrever o quanto tu és importante para mim. Poucas pessoas sabem o que é uma verdadeira amizade e o valor dela, eu fico muito feliz em saber que eu estou nesse grupo de pessoas!

Ao Bruno e à Bianca, amigos sempre presentes e queridos! Obrigada por todo o apoio antes e durante o mestrado. Vocês tem um lugar especial em meu coração, obrigada pela amizade!

À Raquel e à Gisa, minhas amigas desde o tempo de faculdade na ULBRA, pelo apoio e todos os momentos de descontração.

As pessoas que estão sempre presentes nos bons e maus momentos, meus pais amados e a minha irmã Sabrina, pelo apoio em todos os momentos, pelo orgulho que sentem de mim, sem eles eu não conseguiria ter chegado até aqui! Amo muito vocês!

Ao meu fiel e inseparável amigo canino Haruk, que sempre me faz companhia e me alegra com sua fofura e gordura!

Ao meu namorado Rafael, pela paciência, amor, dedicação, apoio em todas as decisões e ajuda com a dissertação (mesmo não entendendo muito do que se tratava). Não tenho palavras para dizer tudo o que tu significa para mim. Eu te amo muito!

A todas essas pessoas que de uma forma ou outra me apoiaram e torceram por mim... Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Doença Inflamatória Intestinal: Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa	14
1.1.1 Epidemiologia.....	17
1.1.2 Etiologia.....	18
1.1.2.1 Fatores Imunológicos	18
1.1.2.2 Fatores Genéticos	19
1.1.2.3 Fatores Ambientais	23
1.2 Esclerose Sistêmica.....	25
1.2.1 Epidemiologia.....	28
1.2.2 Etiologia.....	30
1.2.2.1 Fatores Imunológicos	30
1.2.2.2 Fatores Genéticos	32
1.2.2.3 Fatores Ambientais	36
1.3 Genes Codificantes de Enzimas de Metabolização e Detoxificação	38
1.3.1 Genes de Fase I: a Superfamília do Citocromo P450.....	39
1.3.1.1 O gene <i>CYP1A1</i>	40
1.3.1.2 O gene <i>CYP2E1</i>	41
1.3.1.3 Genes de Fase I e susceptibilidade a doenças.....	42
1.3.2 Genes de Fase II: a Família Glutathiona S-transferase.....	44
1.3.2.1 Os genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	45
1.3.2.2 O gene <i>GSTP1</i>	46
1.3.2.3 Genes de Fase II e a susceptibilidade a doenças	47
1.3.3 Genes de Fase I e Fase II: associações com DII e ES	48
2. OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo Geral	55
2.2 Objetivos Específicos	55

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	56
3.1 CYP and GST in Inflammatory Bowel Disease	56
ABSTRACT	57
INTRODUCTION	58
METHODS	59
RESULTS	61
DISCUSSION.....	63
REFERENCES	65
TABLES	69
3.2 CYP and GST in Systemic Sclerosis	72
ABSTRACT	73
INTRODUCTION	74
METHODS	75
RESULTS	78
DISCUSSION.....	79
REFERENCES	82
TABLES	86
4. DISCUSSÃO DA DISSERTAÇÃO.....	90
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACA – (*Anticentromere antibodies*) Anticorpo anti-centrômero
- ACR – (*American College of Reumatology*) Colégio Americano de Reumatologia
- AECAs – (*Anti-endothelial cell antibodies*) Anticorpos anti-células endoteliais
- AhR – (*Aryl hydrocarbon receptor*) Receptor intracelular de hidrocarbonetos de arila
- ANA – (*Anti-nuclear antibodies*) Anticorpo anti-nuclear
- Anti-RNAP III – (*Anti-RNA polymerase III antibodies*) Anticorpo anti-RNA polimerase III
- Anti-topo I – (*Topoisomerase I autoantibodies*) Anticorpo anti-topoisomerase I
- AR – Artrite reumatoide
- ATG16L1 – (*Autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)*)
- CD – células dendríticas
- CPEB4 – (*Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4*) Proteína citoplasmática de ligação ao elemento de poliadenilação, 4
- c-REL – [*Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)*]Oncogene homólogo ao vírus da reticuloendoteliose em aves
- CTGF – (*Connective tissue growth factor*) Fator de crescimento do tecido conjuntivo
- CYP – Citocromo P450
- DAP – (*Death-associated protein*) Proteína associada a apoptose
- DC – Doença de Crohn
- DII – Doença Inflamatória Intestina I
- DNMT3A – [*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha*] DNA (citosina-5) metiltransferase 3 alfa
- DPI – Doença pulmonar intersticial
- DSS – Dextran sulfato de sódio
- DZ – Gêmeos Dizigóticos
- ES – Esclerose sistêmica
- ESs – Sine-esclerodermia
- EScd – Esclerose Sistêmica cutânea difusa
- EScl – Esclerose Sistêmica cutânea limitada
- ET-1 – Endotelina 1
- GATA-3 – (*GATA binding protein 3*) Proteína ligadora GATA-3

GNA12 – [*Guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12*] Proteína G subunidade alfa 12

GRB10 – (*Growth factor receptor-bound protein 10*) Proteína 10 ligada ao fator de crescimento

GST – Glutathione S-transferases

GWAS – (*Genome-wide associations study*) Estudos de Associação do Genoma

HLA – (*Human Leucocyte Antigen*) Antígeno leucocitário humano

IFN - Interferon

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

IRF5 – (*Interferon regulatory factor 5*) Fator regulatório 5 do interferon

IRF8 – (*Interferon regulatory factor 8*) Fator regulatório 8 do interferon

LES – Lúpus eritematoso sistêmico

MAP – *Mycobacterium avium paratuberculosis*

MUC1 – Mucina 1

MZ – Gêmeos Monozigóticos

NDFIP1 – *Nedd4 family interacting protein 1*

NK – Células natural killer

NOD2 – (*Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) Proteína 2 de Domínio de Oligomerização de Nucleotídeos

PDGF – (*Platelet-derived growth factor beta*) Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFR – (*Platelet-derived growth factor beta receptor*) Receptor do fator de crescimento derivado de *plaquetas*

PRDM1 – (*PR domain containing 1, with ZNF domain*) Regulador transcricional de plasmócitos e repressor transcricional do promotor de IFN- β

PSORS1C1 – *Psoriasis susceptibility 1 candidate 1*

PTPN22 – (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) Proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22

RCU – Retocolite Ulcerativa

RHOB – *Ras homolog family member B*

ROS – (*Reactive oxygen species*) Espécies reativas de oxigênio

SMAD3 – (*SMAD family member 3*) Membro 3 da família SMAD

SNP – (*Single nucleotide polymorphism*) Polimorfismo de único nucleotídeo

SOX5 – *SRY (sex determining region Y)-box 5*

STAT3 – (*Signal transducer and activator of transcription 3*) Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

STAT4 – (*Signal transducer and activator of transcription 4*) Transdutor de sinal e ativador da transcrição 4

TGF- β – (*Transforming growth factor beta*) Fator de crescimento transformante beta

THADA – *Thyroid adenoma associated*

TNF- α – (*Tumoral necrosis factor alpha*) Fator de necrose tumoral alfa

TNIP1 – *TNFAIP3 interacting protein 1*

XRE – (*Xenobiotic responsive elements*) Elementos responsivos a xenobióticos

ZMIZ1 – *Zinc finger, MIZ-type containing 1*

RESUMO

A doença inflamatória intestinal (DII) e a esclerose sistêmica (ES) são doenças inflamatórias crônicas de difícil diagnóstico e tratamento. A etiologia da DII e da ES ainda não é completamente compreendida, mas sabe-se que fatores genéticos, imunológicos e ambientais estão envolvidos na sua patogênese. A DII possui dois principais subtipos clínicos: a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), caracterizados pela inflamação do intestino delgado e/ou cólon. Evidências sugerem que o aumento do estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia da DII. A ES é uma doença inflamatória autoimune rara, caracterizada pela fibrose progressiva da pele e de órgãos internos. A hipótese de que o aumento do dano oxidativo pode iniciar o dano vascular e desencadear os eventos patológicos observados na ES vem sendo investigada. Genes e enzimas envolvidos na metabolização (Fase I) e detoxificação (Fase II) de xenobióticos são utilizados como marcadores de susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças que possuem fatores ambientais como fatores de risco. Em uma reação de Fase I, as enzimas do Citocromo P450 (CYP) inserem um átomo de oxigênio em um substrato deixando-o eletrofílico e reativo, criando um sítio para posterior conjugação pelas enzimas de Fase II. As enzimas Glutathione S-transferases (GST) de Fase II catalisam a conjugação da glutathione com uma grande variedade de compostos eletrofílicos, detoxificando substâncias endógenas e exógenas. A atividade catalítica aumentada das enzimas CYP, bem como a falha na detoxificação de metabólitos pelas GST pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi investigar o papel de polimorfismos nos genes que codificam enzimas de metabolização (*CYP1A*2C* e *CYP2E1*5B*) e detoxificação (*GSTT1 nulo*, *GSTM1 nulo* e *GSTP1 Ile105Val*) na susceptibilidade a estas doenças. O grupo de pacientes com DII era constituído por 235 indivíduos e o grupo controle por 241 indivíduos, todos eurodescendentes. Na ES, 122 pacientes (99 eurodescendentes e 23 afrodescendentes) e 329 controles (241 eurodescendentes e 87 afrodescendentes) foram analisados. Os polimorfismos CYP foram genotipados por PCR-RFLP, enquanto que os polimorfismos em *GSTT1* e *GSTM1* foram genotipados por PCR multiplex e PCR-RFLP para *GSTP1*. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre pacientes e controles usando o teste de Qui-Quadrado. A respeito dos resultados das análises em DII, as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos *CYP1A1*2C*,

*CYP2E1*5B* e *GSTP1 Ile105Val*, bem como as frequências genótípicas do polimorfismo de presença/ausência de *GSTM1*, foram similares nos três grupos de pacientes (DII, DC e RCU) quando comparados ao grupo controle ($P>0,05$). Observou-se uma frequência significativamente aumentada do genótipo nulo de *GSTT1* no grupo de pacientes com DII quando comparado ao grupo controle [0,28 vs 0,18; χ^2 com Yates $P=0,02$; OR=1,71 (IC 95% 1,09–2,71)]. Quando separamos o grupo de pacientes em DC ou RCU, esta frequência permaneceu significativamente aumentada somente no grupo de pacientes com RCU comparado ao grupo controle [0,29 vs 0,18; χ^2 com Yates $P=0,035$; OR=1,84 (IC 95% 1,03–3,24)]. Com relação aos resultados das análises na ES, uma frequência significativamente aumentada do genótipo **1A/*1A* ($P=0,03$; 0,74 vs. 0,61) e do alelo **1A* ($P=0,013$; 0,86 vs 0,78; OR=0,57, IC 95% 0,36–0,90) do polimorfismo *CYP1A1*2C* foi observada entre os indivíduos controles eurodescendentes. Em contrapartida, a frequência do alelo **2C* estava significativamente aumentada entre os pacientes de mesma etnia ($P=0,013$; 0,22 vs 0,14; OR=1,75, IC 95% 1,11–2,74). Com relação às frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos *CYP2E1*5B* e *GSTP1 Ile105Val*, e as frequências genótípicas do polimorfismo de presença/ausência de *GSTM1*, nenhuma diferença significativa foi observada quando os grupos de pacientes de ambas as etnias foram comparados aos grupos controle ($P>0,05$). Uma frequência significativamente aumentada do genótipo nulo de *GSTT1* [0,29 vs 0,18; χ^2 com Yates $P=0,035$; OR=1,85 (IC 95% 1,03–3,29)], bem como uma alta frequência da dupla deleção de *GSTT1/GSTM1* [0,19 vs 0,08; χ^2 com Yates $P=0,007$; OR=2,62 (IC 95% 1,25–5,46)], foi observada no grupo de pacientes comparado aos controles (eurodescendentes). Estas associações não se repetiram entre indivíduos afrodescendentes. Concluindo, nossos resultados sugerem que o genótipo nulo de *GSTT1* está associado à susceptibilidade a DII e pode influenciar na definição do curso da doença para a RCU. Além disso, o genótipo nulo de *GSTT1* sozinho ou em combinação com o genótipo nulo de *GSTM1* é um fator genético de susceptibilidade para a ES, enquanto que o genótipo **1A/*1A* ou a presença do alelo **1A* do polimorfismo *CYP1A1*2C* pode exercer um papel protetor contra o desenvolvimento da ES em indivíduos eurodescendentes.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal, Esclerose Sistêmica, Citocromo P450, Glutathione S-transferases, Polimorfismos.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) and systemic sclerosis (SSc) are chronic inflammatory diseases of difficult diagnosis and treatment. The etiology of IBD and SSc is not completely understood but it is known that genetic, immunologic and environmental factors are involved in its pathogenesis. Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two major subtypes of IBD, characterized by inflammation of the small intestine and/or colon. Evidences suggest that the increase of oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of IBD. SSc is a rare autoimmune inflammatory disease of the connective tissue characterized by progressive fibrosis of the skin and internal organs. The hypothesis that the increase of oxidative stress can initiate vascular damage and triggers the pathological events in SSc has been investigated. Genes and enzymes involved in metabolism (Phase I) and detoxification (Phase II) of xenobiotics are used as markers of susceptibility to the development of diseases that have environmental factors as risk factors. In a Phase I reactions, the Cytochrome P450 (CYP) enzymes insert an oxygen atom in a substrate that making it more electrophilic and reactive, and creating a site for subsequent conjugation by Phase II enzymes. Phase II Glutathione S-transferases (GSTs) enzymes catalyze the conjugation of glutathione with a variety of electrophilic compounds, detoxifying endogenous and exogenous substances. A higher catalytic activity of CYP enzymes, as well as the failure in detoxifying of metabolites by GST enzymes may to contribute for the increase of oxidative stress. The aim of this study was investigated the role of polymorphisms in genes coding Phase I enzymes (*CYP1A1**2C and *CYP2E1**5B) and Phase II (*GSTT1 null*, *GSTM1 null* and *GSTP1 Ile105Val*) in susceptibility to these diseases. IBD group was constituted by 235 patients and the control group by 241 individuals, all European-derived. In SSc group, 122 patients (99 European-derived and 23 African-derived) and 329 controls (241 European-derived and 87 African-derived) were analyzed. The CYP polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP, whereas polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* 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. Concerning IBD, allelic and genotypic frequencies of *CYP1A1**2C, *CYP2E1**5B and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms, as well

as genotypic frequencies of *GSTM1* presence/absence polymorphism were similar in all groups patients (IBD, CD, and UC) and controls ($P>0.05$). We observed a significantly increased frequency of *GSTT1* null genotype in IBD group as compared to controls [0.28 vs. 0.18, χ^2 with Yates $P=0.02$, OR=1.71 (95% CI 1.09 – 2.71)]. When patients were classified in CD or UC group, this frequency remained significantly increased only among UC patients [0.29 vs. 0.18, χ^2 with Yates $P=0.035$, OR=1.84 (95% CI 1.03 – 3.24)] as compared to controls. Regarding results in SSc, a frequency significantly increased of **1A/*1A* genotype ($P=0.03$; 0.74 vs. 0.61) and **1A* allele ($P=0.013$; 0.86 vs 0.78; OR=0.57, 95% CI 0.36–0.90) from *CYP1A1*2C* polymorphism was observed among European-derived controls. On the other hand, the frequency of **2C* allele was significantly increased among patients of same ethnic group ($P=0.013$; 0.22 vs 0.14; OR=1.75, 95% CI 1.11–2.74). The allelic and genotypic frequencies of *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms, as well as genotypic frequencies of *GSTM1* presence/absence polymorphism were similar between SSc patients and controls of both ethnic groups ($P>0.05$). We observed a significantly increased frequency of *GSTT1* null genotype [0.29 vs. 0.18, χ^2 with Yates $P=0.035$, OR=1.85 (95% CI 1.03–3.29)], as well as an increased frequency of *GSTT1/GSTM1* double-null in SSc patients as compared to controls [0.19 vs. 0.08; χ^2 with Yates $P=0.007$, OR=2.62 (95% CI 1.25 – 5.46)]. These associations were exclusive to European-derived individuals. In conclusion, our results suggest that the *GSTT1 null* genotype is associated with susceptibility to IBD and may influence in defining the course of the disease for RCU. Furthermore, the *GSTT1 null* genotype alone or combined with *GSTM1 null* genotype is a susceptibility genetic factor to SSc, while the **1A/*1A* genotype or the presence of **1A* allele from *CYP1A1*2C* polymorphism may play a protector role in SSc development in Brazilian European-derived individuals.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, Systemic Sclerosis, Cytochrome P450, Glutathione S-transferases, Polymorphisms.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Inflamatória Intestinal: Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença inflamatória crônica, que afeta o trato gastrointestinal, caracterizada pela inflamação do intestino delgado e/ou cólon, levando aos sintomas de diarreia recorrente, dor abdominal, sangramento retal e perda de peso. Os dois principais subtipos clínicos da DII são a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), ambas com o aparecimento dos sintomas predominantemente na idade adulta, entre os 20 e 40 anos de idade, podendo afetar também crianças e idosos (Xavier & Podolsky, 2007; Cho, 2008; Matricon *et al.*, 2010; Khor *et al.*, 2011).

Embora a DC e a RCU sejam doenças inflamatórias crônicas do intestino, elas possuem características únicas que as diferenciam, como a localização da inflamação no trato gastrointestinal e alterações histológicas na parede intestinal (Matricon *et al.*, 2010). Na DC, a inflamação pode envolver qualquer região do trato gastrointestinal, mas ela é geralmente encontrada no íleo ou na região perianal. Na RCU a inflamação inicia no reto, distribuindo-se de uma forma contínua, podendo afetar a região periapendicular (Khor *et al.*, 2011). Microscopicamente, a inflamação na DC é transmural e descontínua, enquanto que na RCU a inflamação afeta apenas a camada superficial da mucosa intestinal em um padrão contínuo (Matricon *et al.*, 2010). As características histopatológicas da DC incluem a agregação de macrófagos, que frequentemente formam granulomas não caseosos, enquanto que na RCU há a presença de neutrófilos junto à lâmina própria e criptas, onde eles formam micro-abscessos (Xavier & Podolsky, 2007).

A DII é muito incapacitante devido à fadiga associada aos sintomas inflamatórios e à dor crônica sentida pelos pacientes. A DII afeta a qualidade de vida, mas não o tempo de vida: a taxa de mortalidade de pacientes não difere da taxa da população normal (Matricon *et al.*, 2010).

O diagnóstico da DII é realizado com base em achados clínicos, endoscópicos, radiológicos e histológicos, porém não existe um padrão-ouro. O “Consenso da Associação Europeia de Crohn e Colite” (do inglês, *European Crohn’s and Colitis Organisation*), a classificação de Montreal e a classificação descrita por Lennard-Jones (1989) fornecem os critérios mais utilizados para diagnóstico e tratamento da doença

(Stange *et al.*, 2006a; Stange *et al.*, 2008b; Baumgart, 2009). A tabela 1 apresenta as características clínicas, bioquímicas e patológicas utilizadas para o diagnóstico diferencial entre a DC e a RCU (Baumgart & Sandborn, 2007).

Tabela 1: Características clínicas, bioquímicas e patológicas usadas como diferencial no diagnóstico da DC e RCU (Baumgart & Sandborn, 2007).

	Retocolite ulcerativa	Doença de Crohn
Características clínicas		
Hematoquezia	Comum	Rara
Passagem de muco ou pus pelo reto	Comum	Rara
Afeta o intestino delgado	Não, exceto ileíte de refluxo	Sim
Afeta o trato gastrointestinal superior	Não	Sim
Manifestações extra intestinais	Comum	Comum
Obstrução do intestino delgado	Rara	Comum
Obstrução do cólon	Rara	Comum
Fístulas e doença perianal	Não	Comum
Características bioquímicas		
Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos	Comum	Raro
Anticorpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Raro	Comum
Características patológicas		
Inflamação transmural da mucosa	Não	Sim
Anormal arquitetura das criptas	Sim	Incomum
Criptite e abscessos nas criptas	Sim	Sim
Granulomas	Não	Sim
Fissuras ou lesões segmentadas	Rara	Comum

Visto as limitações dos fatores clínicos para definir pacientes em risco de desenvolver complicações da doença e determinar uma resposta efetiva ao tratamento, marcadores sorológicos têm sido explorados como preditores alternativos. Vários anticorpos contra microorganismos e antígenos próprios têm sido extensamente estudados na DC e RCU (Gologan *et al.*, 2012; Vermeire *et al.*, 2012). Por exemplo, anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* estão presentes no soro de 60% dos pacientes com DC e em menos de 5% dos pacientes com RCU e em indivíduos sem DII, podendo ser um método a ser utilizado para a diferenciação entre a DC e a RCU (Gologan *et al.*, 2012). Outros anticorpos, tais como anti-proteína C de *Escherichia coli*, anti-*Pseudomonas fluorescens* e anti-flagelina são encontrados significativamente aumentados no soro de indivíduos com DC, quando comparados com indivíduos portadores de RCU ou com indivíduos sem DII (Dubinsky *et al.*, 2006). Em contraste,

outros marcadores sorológicos, como é o caso de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos são notados por sua associação com RCU, estando presente no soro de 60% dos pacientes com RCU e em 20% dos pacientes com DC e, geralmente, em menos de 5% de indivíduos sem DII (Dubinsky *et al.*, 2006, Vermeire *et al.*, 2012). Embora esses marcadores sorológicos tenham sido investigados como ferramentas de diagnóstico, seu verdadeiro valor clínico pode ser a sua associação com complicações da doença, o que poderia fornecer informações adicionais de prognóstico. Desta forma, mais estudos são necessários para elucidar tais questões (Dubinsky *et al.*, 2006; Gologan *et al.*, 2012; Vermeire *et al.*, 2012).

As terapias atuais utilizadas no tratamento da DC e RCU têm como objetivo principal reduzir a inflamação, mantendo o paciente em estado de remissão, reparar as lesões, melhorar o *status* nutricional e atenuar os efeitos secundários da doença (Oliveira *et al.* 2010; Pithadia & Jain, 2011).

A terapia nutricional, apesar de promover melhora em pacientes com DC, é frequentemente abandonada devido ao seu alto custo, além de ser ineficiente em pacientes com RCU (Neuman & Nanau, 2012). Corticosteroides, aminossalicilatos e agentes imunossupressores são os medicamentos mais utilizados. Outras drogas como metronidazol e diversos antibióticos ajudam em alguns casos, enquanto que a colestiramina, o cromoglicato de sódio e os sais arsenicais e de bismuto fornecem terapias adicionais de eficácia não comprovada (Oliveira *et al.* 2010; Pithadia & Jain, 2011).

A administração de anticorpos monoclonais humanizados tem o potencial de modificar as vias inflamatórias envolvidas na patogênese da DII, tendo como principal alvo a citocina conhecida como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Embora diversas citocinas estejam envolvidas na patogênese da doença, o TNF- α é uma das citocinas mediadoras mais importantes da resposta inflamatória do tipo Th1, característica da DC (Pithadia *et al.*, 2011).

O tratamento cirúrgico segue padrões mais rigorosos, sendo apenas recomendado quando os tratamentos citados anteriormente falham no alívio dos sintomas. A cirurgia consiste em um ótimo método de tratamento para a RCU. Entretanto, na DC a cirurgia é indicada apenas após uma avaliação rigorosa das complicações resultantes da doença, tais como hemorragia, perfuração e obstrução intestinal (Oliveira *et al.*, 2010).

1.1.1 Epidemiologia

As maiores taxas de incidência e prevalência da DII são reportadas no Norte da Europa, Reino Unido e América do Norte. Taxas continuam a aumentar, em baixa incidência, em áreas tais como o Sul da Europa, Ásia e muitos países em desenvolvimento (Lakatos *et al.*, 2004; Lakatos, 2006; Baumgart & Carding, 2007; Matricon *et al.*, 2010).

A prevalência varia conforme a etnia, mas não é observada dominância de gênero. Caucasianos e americanos descendentes de africanos são mais afetados, enquanto que a DII é rara em hispânicos e asiáticos. Judeus Ashkenazi possuem o risco de desenvolver DII duas a quatro vezes maior quando comparados a caucasianos não judeus. Na América do Norte, a taxa de prevalência da DC para indivíduos hispânicos e asiáticos é de, respectivamente, 4,1/100.000 e 5,6/100.000, que são muito menores do que as taxas reportadas para indivíduos brancos e americanos descendentes de africanos (43,6/100.000 e 29,9/100.000, respectivamente). Aproximadamente, 1,4 milhões de americanos e 2,2 milhões de europeus são afetados pela DII (Baumgart & Carding, 2007; Matricon *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Santana cols. (2007), na Bahia, demonstrou que pacientes com DC não brancos tinham diagnóstico mais precoce, além de apresentarem aspectos mais severos da doença, como o envolvimento do trato gastrointestinal superior. O estudo realizado por Oliveira e cols. (2010) em um Hospital Universitário do Estado de Minas Gerais, durante o período de 1998 – 2005 demonstrou que 363 internações hospitalares foram devido a DII, distribuídas em 184 homens e 179 mulheres, não mostrando predominância de sexo.

Na América Central e América do Sul, os dados epidemiológicos sobre a DII são escassos, demonstrando a raridade da doença ou registros não adequados. No Brasil, o único estudo que apresenta taxas de incidência e prevalência foi realizado na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo por Victoria e cols. (2009). Os resultados principais do estudo apontam que a taxa de incidência da DII foi similar às taxas observadas em outros países da América Latina, sendo que a doença foi predominante em mulheres brancas e jovens, residindo na zona urbana. A incidência da RCU foi maior do que da DC, com taxas de 4,48/100.000 e 3,5/100.000, respectivamente. As taxas de prevalência atingiram os valores de 14,81/100.000 para a RCU e 5,65 /100.000 para a DC.

Evidentemente são necessários mais estudos para conhecermos as taxas de incidência e prevalência da DC e RCU em todas as regiões do Brasil, ainda mais considerando-se que estudos epidemiológicos em outros países apontam para um aumento da incidência em países em desenvolvimento.

1.1.2 Etiologia

A etiologia da DII ainda não é totalmente compreendida, no entanto, muitos estudos têm contribuído para a compreensão da patogênese da DII. Atualmente, sabe-se que fatores genéticos e imunológicos de risco, bem como a exposição a certos fatores ambientais, aumentam o risco de desenvolvimento da DII (Xavier & Podolsky, 2007; Cho, 2008; Matricon *et al.*, 2010; Khor *et al.*, 2011; Scharl & Rogler, 2012).

1.1.2.1 Fatores Imunológicos

O desafio chave do sistema imune intestinal é responder a patógenos enquanto coexiste com bactérias comensais e antígenos de alimentos. A inflamação controlada contra antígenos intestinais, a qual é perturbada na DII, parece inicialmente ser dirigida pelas próprias bactérias comensais que residem na microbiota intestinal (Cho, 2008). A falta de uma resposta imune ou a ocorrência de uma resposta limitada e controlada contra a microbiota intestinal e os antígenos de alimentos é geralmente definida como tolerância imunológica (Baumgart & Carding, 2007; Bernardo *et al.*, 2012).

No intestino, as células constituintes da imunidade inata incluem células epiteliais, células fagocitárias, como os macrófagos, os neutrófilos e as células dendríticas (CD), enquanto que os linfócitos T representam a população de células da imunidade adaptativa (Siegmund & Zeitz, 2011; Bernardo *et al.*, 2012).

Na DII, as CD erroneamente reconhecem bactérias comensais como bactérias patogênicas, desencadeando o seu transporte para os linfonodos mesentéricos. Esse processo leva a mudança do estado de tolerância para um estado de ativação, promovendo a diferenciação de células Th0 em células T efetoras (Th1, Th2 e Th17) e a ativação de células natural killer (NK) (Baumgart & Carding, 2007; Cho, 2008).

As respostas imunes Th1, Th2 e Th17 são caracterizadas por diferentes tipos de citocinas secretadas, as quais desencadeiam inflamação local persistente. Na DC, observamos um aumento na produção de citocinas associadas às respostas mediadas pelas células Th1, como a interleucina-12 (IL-12), IL-2, IFN- γ e TNF- α , bem como um

aumento na produção de citocinas Th17, como IL-17 e IL-22. Interessantemente, na RCU a resposta imune é menos polarizada, caracterizada pela produção de células NK e predominância de citocinas Th2. Entretanto, a ausência de IL-4 e a presença de IL-13 e IFN- γ no tecido do cólon de pacientes com RCU, sugere que esta doença também pode ser causada por danos à mucosa intestinal, visto que as células NK podem exercer efeitos citotóxicos diretos em seus alvos e contribuir para o dano tecidual (Baumgart & Carding, 2007; Cho, 2008; Matricon *et al.*, 2010; Siegmund & Zeitz; 2011).

As citocinas são sinalizadores chave do sistema imune intestinal, pois elas são capazes de desencadear várias ações, incluindo a ativação de leucócitos e quimiotaxia, exocitose, produção de metaloproteinases da matriz para a degradação e regular positivamente o metabolismo oxidativo. O balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias na mucosa intestinal é essencial para a homeostase e, como discutido acima, elas podem determinar a natureza da resposta imune, que pode ser diferente na DC e RCU (Figura 1). Devido as suas propriedades, a manipulação de citocinas com o objetivo de reduzir a severidade da doença e manutenção da remissão, tem sido amplamente estudada (Sanchez-Muñoz *et al.*, 2008; Tsianos & Katsanos, 2009; Múzes *et al.*, 2012).

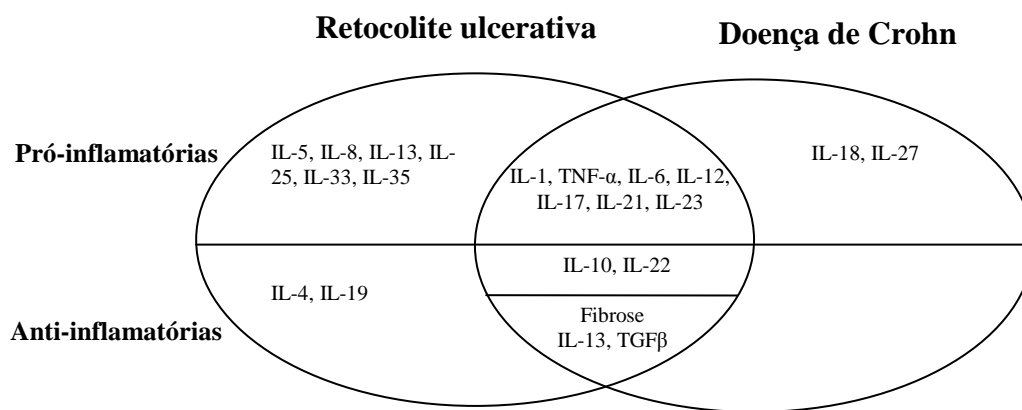


Figura 1: Citocinas relacionadas à patogênese da Doença de Crohn e da Retocolite Ulcerativa (modificada de Múzes *et al.*, 2012).

1.1.2.2 Fatores Genéticos

Muitas observações clínicas sugerem que fatores genéticos contribuem para a susceptibilidade à DII. Estas observações incluem a grande variação na incidência e prevalência da DC e RCU em diferentes etnias, o maior risco de desenvolvimento da doença entre parentes de primeiro grau de indivíduos afetados e a maior taxa de

concordância entre gêmeos monozigóticos (MZ) do que entre gêmeos dizigóticos (DZ). Diversos estudos têm sugerido que os parentes em primeiro grau de uma pessoa afetada têm um risco de quatro a vinte vezes maior de desenvolvimento da DII do que os indivíduos da população normal (Podolsky, 2002, Khor *et al.*, 2011).

O primeiro estudo que estimou as taxas de concordância entre MZ e DZ foi realizado na Suécia por Tysk e cols. (1988), mostrando uma maior taxa de concordância entre MZ do que em DZ, principalmente naqueles com DC. Outros estudos mostraram uma taxa de concordância entre MZ de 38% e 10% para a RCU. Para DZ a taxa de concordância observada é de 7% para DC e de 3% para a RCU (Thompson *et al.*, 1996; Orholm *et al.*, 2000). Estes trabalhos apontam que a contribuição genética é mais forte na DC do que na RCU e a ausência de uma herança mendeliana simples sugere que múltiplos produtos gênicos contribuem para o risco de desenvolvimento da DII (Brant, 2011).

Nos últimos 25 anos, muitos estudos têm sido realizados em busca de genes candidatos para a DC e para a RCU. Apesar de distintas características clínicas, aproximadamente 30% dos loci gênicos relacionados à DII são compartilhados entre a DC e a RCU, indicando que existem vias comuns para ambos os subtipos da doença (Khor *et al.*, 2012). Estudos de associação do genoma (GWAS, do inglês, *Genome-Wide Association Studies*) fornecem uma visão ampla da contribuição genética de vários loci genômicos para doenças humanas e envolve a genotipagem de um grande número de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs, do inglês, *single-nucleotide polymorphisms*) que mostram variação genética em todo o genoma humano (Cho, 2008).

Atualmente, 99 loci gênicos foram confirmados como de risco para a DII, sendo que 28 são compartilhados entre a DC e a RCU, tais como os membros da IL-23 ou fatores de transcrição, como SMAD3, STAT3, ZMIZ1 e c-REL (Figura 2), (Thompson & Lees, 2011). Além disso, cerca de 50% dos loci de susceptibilidade têm sido associados a outras doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (Khor *et al.*, 2011; Scharl & Rogler, 2012).

Uma grande meta-análise realizada por Anderson *et al.*, (2011) envolvendo seis GWAS, compreendendo um total de 6.687 casos e 19.718 controles, todos descendentes de europeus, aumentou de 18 para 47 o número de loci genômicos associados a RCU. Neste estudo, foi estimado que 16% da herdabilidade na RCU pode ser explicada por

estes loci e, além disso, foram identificados novos genes candidatos, que podem ser importantes para a patogênese da doença. Dentre os novos genes candidatos encontrados estão: *IL-1R2*, *IL8RA/B*, *IL-7R*, *DAP* (proteína associada a apoptose), *PRDMI* (regulador transcricional de plasmócitos e repressor transcricional do promotor de IFN- β), *IRF5* (fator regulatório 5 do interferon) e *GNAI2* (proteína G subunidade alfa 12).

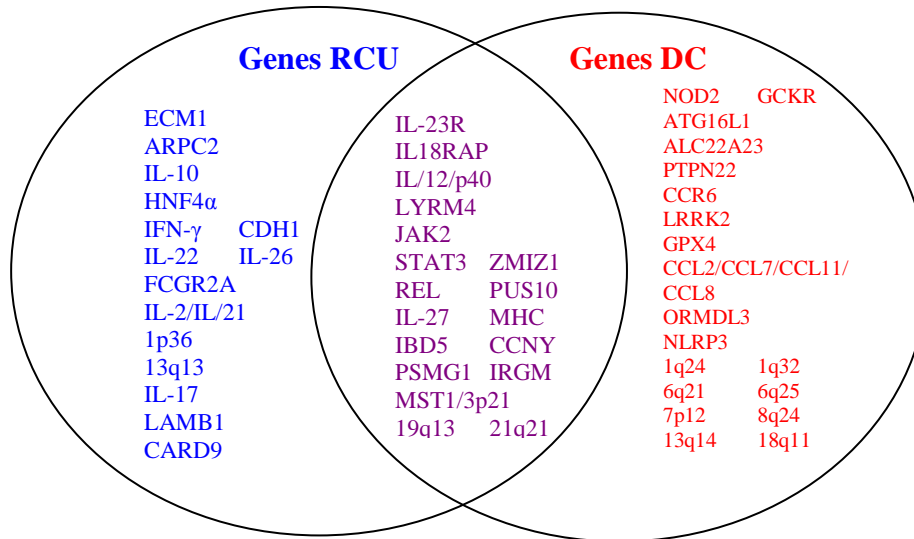


Figura 2: Genes/loci gênicos específicos da RCU (azul), DC (vermelho) ou compartilhados entre elas (roxo) (modificada de Thompson & Lees, 2011).

Outra grande meta-análise, realizada por Franke e cols. (2010), também a partir de seis trabalhos de GWAS, compreendendo 6.333 casos e 15.056 controles, todos descendentes de Europeus, demonstrou associação de 71 loci genômicos à DC. Aproximadamente, 23% da herdabilidade na DC pode ser explicada por estes loci. Assim como na meta-análise realizada para a RCU, novos genes candidatos surgiram, como por exemplo, *MUC1* (codifica o constituinte principal do muco), *DNMT3A* (enzima metil-transferase), *THADA* (proteína com função apoptótica) *NDFIPI* (proteína envolvida na manutenção do Complexo de Golgi) e *CPEB4* (fator regulatório da tradução de proteínas e divisão celular).

Embora estes estudos de GWAS nos mostrem novos campos de estudo, é difícil inferir se estes loci desempenham um papel na patogênese da DC e/ou RCU, visto que estes podem desempenhar papéis específicos em algumas etnias, mas serem totalmente neutros em outras. Por exemplo, o primeiro e mais conhecido loci de susceptibilidade

NOD2 (também conhecido como *CARD15* e *IBD1*), não parece exercer um papel na população da Ásia. Além disso, como discutido acima, estas variantes genéticas de susceptibilidade descobertas até agora explicam apenas 20% a 25% da herdabilidade encontrada (Scharl & Rogler, 2012). Também é válido ressaltar que alguns genes associados à DII estão associados também a outras doenças inflamatórias e autoimunes (Lees *et al.*, 2011) podendo exercer efeitos contrastantes. Por exemplo, a mesma variante alélica (*R620W*) codificada pelo gene *PTPN22*, que codifica uma proteína tirosina fosfatase conhecida por regular negativamente a ativação de células T, é um forte fator de risco para o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo I e artrite reumatoide (AR), mas é um alelo protetor para a DC (Khor *et al.*, 2011).

Em 2001, o gene *NOD2*, localizado no cromossomo 16 foi identificado como o primeiro gene de susceptibilidade à DC. *NOD2* pertence à família dos receptores de reconhecimento de padrões do sistema imune inato, que reconhecem peptidoglicanos bacterianos. Mutações com perda de função em *NOD2* podem resultar em alterações na interação microbiota-hospedeiro através de vários mecanismos, incluindo tolerância alterada à estimulação crônica provocada pelas bactérias comensais, depuração diminuída de agentes patogênicos orais e colonização alterada da superfície da mucosa devido à diminuição da produção de defensinas pelas células epiteliais (Cho, 2008; Khor *et al.*, 2011). No entanto, um estudo realizado por Mahurkar *et al.*, (2011) demonstrou que variantes alélicas no gene *NOD2* e a variante protetora *R381Q* no gene que codifica o receptor da IL-23 não estão associados a DII em indivíduos indianos, apontando que outros genes podem desempenhar funções mais importantes na fisiopatologia da DII nesta população.

A autofagia está envolvida na homeostase intracelular, contribuindo para a degradação e reciclagem de conteúdos citosólicos e organelas, bem como resistência contra infecções e remoção de patógenos intracelulares. O gene *ATG16L1* é essencial para todas as formas de autofagia. Apesar de *ATG16L1* ser expresso em todos os tecidos, defeitos associados aos polimorfismos têm sido descritos apenas junto ao trato gastrointestinal, provavelmente devido a elevada carga microbiana nesse tecido, sendo que a mutação *T300A* foi associada com o aumento do risco para a DC (Khor *et al.*, 2011).

Um fato interessante é o efeito protetor de uma variante alélica incomum de um polimorfismo que muda um aminoácido altamente conservado, Arg381Gln, no gene *IL-*

23R, que apresenta menor frequência em pacientes com DC quando comparados a controles saudáveis. Indivíduos heterozigotos têm aproximadamente três vezes mais proteção contra o desenvolvimento da DC, com um efeito menos pronunciado de proteção contra a RCU (Cho, 2008).

Um estudo brasileiro realizado por Baptista e cols. (2008), variantes polimórficas nos genes *NOD2*, *IL-23R* e *ATG16L1* em pacientes com DC e controles doadores de sangue saudáveis, foram analisadas. Neste estudo, os alelos de risco *R702W* e *3020insC* no gene *NOD2* foram associados a susceptibilidade à DC. Por outro lado, o alelo A do polimorfismo *c.1142G>A* (Arg381Gln) no gene *IL-23R* mostrou forte associação como um fator protetor contra a doença. Nenhuma diferença significativa foi observada para alelos e genótipos do gene *ATG16L1* nesta população.

Outro importante estudo brasileiro foi realizado por Queiroz *et al.*, (2009), em Belo Horizonte, Minas Gerais. Observou-se uma associação positiva entre polimorfismos no receptor da *IL-1* e no *TNF- α* com a RCU, bem como polimorfismos no gene *NOD2* na DC, destacando a importância dos diferentes perfis genéticos associados a DC e RCU em diferentes populações.

Muitas pesquisas já foram realizadas para elucidar as bases genéticas da DII, ficando claro que um conjunto de genes pode estar associado ao desenvolvimento da doença em dada população. Deve-se considerar, também, que alguns destes genes podem influenciar apenas no desenvolvimento da DC ou da RCU, o que poderia explicar, em parte, as características patológicas distintas destes subtipos clínicos.

1.1.2.3 Fatores Ambientais

A ideia de que fatores genéticos e ambientais contribuem para a fisiopatologia da DII é amplamente aceita. De fato, esses fatores podem interagir e modificar uns aos outros, causando modificações epigenéticas e desencadeando vias metabólicas nas quais variantes polimórficas tornam-se importantes. Por outro lado, variantes genéticas podem influenciar na modificação da composição da microbiota intestinal (Scharl & Rogler, 2012).

A baixa incidência da DII na Ásia e na África comparada com a América do Norte e Europa provavelmente reflete fatores genéticos e ambientais distintos. A hipótese da higiene tem sido citada para explicar o aumento da prevalência de várias doenças autoimunes e inflamatórias, as quais poderiam resultar da falta de exposição

inicial a agentes microbianos selecionados devido a mudanças nas condições sanitárias (Cho, 2008; Matricon *et al.*, 2010). O saneamento excessivo poderia limitar a exposição a antígenos ambientais e prejudicar a maturação funcional do sistema imune intestinal e a indução da tolerância imune, a qual finalmente resulta em uma inapropriada resposta imune quando o indivíduo é exposto a esses antígenos mais tarde na vida (Baumgart & Carding, 2007).

Como descrito no tópico 1.1.1, dados epidemiológicos sugerem que há uma maior prevalência e incidência da DII em países da América do Norte e da Europa do que em países da América do Sul, Ásia e África, o que poderia indicar que há uma variação na exposição a fatores ambientais. Por exemplo, a industrialização parece ser um fator ambiental de risco, pois taxas de incidência estão aumentando entre imigrantes de regiões de baixa incidência para regiões de alta incidência (Baumgart & Carding, 2007).

Um importante fator ambiental é o fumo, sendo este discordante entre a DC e a RCU. Na RCU, o fumo parece ser um fator protetor e, após o aparecimento da doença, poderia melhorar o seu curso, diminuindo a necessidade de colectomia (Bastida & Beltrán 2011). Em contraste, o fumo aumenta o risco de desenvolvimento da DC e parece agravar o curso da doença, estando associado à formação de fístulas e estenose, aumentando a necessidade do uso de corticosteroides e acelerando a necessidade de nova cirurgia após indução cirúrgica de remissão da doença (Baumgart & Carding, 2007).

A semelhança da ileíte granulomatosa na DC com a vasculite mediada por paramixovírus e a doença de Johne causada por *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) de gado deram origem a especulação de que a DC pode ser causada por uma infecção. MAP tem sido identificada em tecidos e no sangue de indivíduos com DII, embora existam explicações alternativas para estes achados (Sartor, 2005). MAP viáveis são encontradas no leite humano e no de vaca, não sendo eliminadas de forma confiável por pasteurização e, além disso, estão amplamente distribuídas no ambiente, incluindo na água potável (Greenstein, 2003).

Estudos epidemiológicos sugerem que a apendicectomia poderia estar protegendo contra a RCU, reduzindo o risco de colectomia ou a necessidade de terapia imunossupressora em pacientes que tenham sofrido apendicectomia antes do diagnóstico. O oposto é verdade para a DC, com a apendicectomia sendo associada com

um risco aumentado de desenvolvimento de estenose. Uma explicação plausível para estes achados refere-se à hipótese da higiene e a falha em desenvolver tolerância imunológica após a apendicectomia (Radford-Smith *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2003).

1.2 Esclerose Sistêmica

A esclerose sistêmica (ES), também conhecida como esclerodermia (*skleros*: duro; *derma*: pele), é uma doença inflamatória crônica autoimune rara do tecido conjuntivo, caracterizada pela fibrose progressiva da pele e de órgãos internos, afetando vários sistemas (Agarwal & Reivelle, 2010). Assim como em outras doenças autoimunes, a ES afeta principalmente mulheres, com o aparecimento dos sintomas por volta dos 45 anos, mas pode também afetar homens, crianças e idosos (Katsumoto *et al.*, 2011). A taxa de mulheres para homens varia de 1:1 à 14:1 e tais diferenças têm sido explicadas por fatores genéticos, hormonais e estilo de vida (Nguyen *et al.*, 2011).

Segundo LeRoy *et al.* (1988), dois grupos clínicos são convencionalmente descritos para classificar os pacientes com base na medida do envolvimento cutâneo: ES cutânea limitada (EScl) e ES cutânea difusa (EScd), com as seguintes características:

- **EScl**: Espessamento cutâneo limitado e alterações simétricas dos dedos das porções distais dos braços e pernas, da face e do pescoço. Progressão da doença geralmente ocorre meses ou anos após o aparecimento do Fenômeno de Raynaud. O acometimento visceral é mais tarde e menos grave e desenvolvimento tardio de hipertensão pulmonar arterial. Há associação com anticorpos anti-centrômero (ACA). Prognóstico relativamente bom, com sobrevivência de mais de 70% dos pacientes em 10 anos de doença. A síndrome CREST é um subgrupo dentro da EScl, caracterizada por calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofágica, esclerodactilia e telangiectasia.

- **EScd**: Espessamento da pele envolvendo a face, pescoço, tronco e simetricamente os dedos, as mãos, os braços e as pernas. Início rápido da doença após o aparecimento do Fenômeno de Raynaud, com significativo acometimento visceral: pulmões, coração, trato gastrointestinal e/ou rins. Presença de anticorpos antinucleares (ANA) e ausência de ACA. Curso da doença variável, mas em geral mau prognóstico, com sobrevivência de 40% a 60% dos pacientes em 10 anos, sendo a forma mais grave da doença.

Um terceiro grupo também tem sido proposto, conhecido como sine-esclerodermia (ESs). Os pacientes não têm sinais que evidenciam o espessamento da

pele em nenhum momento do curso da doença e, aparentemente, parecem não ter ES. No entanto, estes pacientes apresentam Fenômeno de Raynaud, hipertensão pulmonar e outras características da ES, bem como ACA, ANA ou anti-topoisomerase I (anti-Topo I) (Hunzelmann *et al.*, 2008). Para o diagnóstico da sES, Poormoghim e cols. (2000) propuseram que os pacientes devem apresentar as seguintes características 1) Fenômeno de Raynaud, 2) ANA, 3) qualquer uma das seguintes características: hipomotilidade esofágica distal, hipomotilidade do intestino delgado, fibrose intersticial pulmonar, hipertensão pulmonar primária (sem fibrose), envolvimento cardíaco típico da ES ou falha renal consistente com a crise renal esclerodérmica, 4) nenhuma outra doença do tecido conjuntivo ou outra doença cuja causa seja o item 1), 2) ou 3).

O fenômeno de Raynaud consiste de espasmos de pequenos vasos sanguíneos das mãos sob exposição ao frio, resultando em branqueamento, cianose e em seguida, rubor. Um episódio do fenômeno de Raynaud pode ser desencadeado por estresse emocional, mas a associação com a exposição ao frio deve estar presente para permitir o diagnóstico (Mayes, 2008).

Devido à heterogeneidade da doença, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR, do inglês, *American College of Rheumatology*) formulou, em 1980, os Critérios Clínicos Preliminares para a Esclerose Sistêmica (Tabela 2). Neste critério preliminar, o indivíduo precisa preencher um critério principal ou dois critérios secundários. Não são avaliadas alterações imunológicas ou vasculares neste critério.

A maior dificuldade de diagnosticar a ES ocorre nos estágios iniciais da doença, antes do desenvolvimento de manifestações cutâneas evidentes. Atualmente, sabemos que a ausência de envolvimento cutâneo não exclui o diagnóstico de ES, pois mudanças imunológicas e capilaroscópicas aparecem, de fato, na fase inicial da doença. A sorologia autoimune exata e a avaliação capilaroscópica de pacientes que apresentam o fenômeno de Raynaud têm identificado muitas pessoas com características de ES que não preenchem os critérios preliminares do ACR. Os critérios do ACR permitem apenas o diagnóstico de ES nos estágios avançados da doença (Sierakowski *et al.*, 2005).

Tabela 2: Critérios Clínicos Preliminares para a Esclerose Sistêmica do Colégio Americano de Reumatologia de 1980

A. Critério Principal

- Esclerodermia proximal: espessamento, enrijecimento e endurecimento simétrico da pele dos dedos das mãos e da pele proximais em relação às articulações metacarpo-falangianas ou metatarso-falangianas. As alterações podem acometer toda a extremidade, face, pescoço e tronco (tórax e abdômen);

B. Critério Secundário

- Esclerodactilia: alterações cutâneas citadas acima, limitadas aos dedos das mãos;
 - Cicatrizes puntiformes ou perda de substância das polpas digitais: áreas atróficas cicatriciais nas polpas digitais ou perda de polpa digital por isquemia;
 - Fibrose pulmonar bi-basilar: padrão reticular bilateral de densidades lineares ou líneo-nodulares, mais pronunciados nas bases dos pulmões em chapa comum de tórax. Pode assumir a aparência de pulmão "em favo de mel". As alterações não podem ser atribuíveis à lesão pulmonar primária;
-

Em 2001, LeRoy & Medsger propuseram um critério para a classificação precoce da ES, sugerindo que as mudanças imunológicas são caracterizadas pela presença de autoanticorpos específicos, bem como mudanças capilaroscópicas, tais como a presença de mega capilares, áreas avasculares e/ou capilares espessos. A identificação destas alterações permite o diagnóstico precoce da doença e avaliação de prognóstico.

Autoanticorpos são comuns em pacientes com ES e, embora o seu papel na patologia da doença seja desconhecido, eles são úteis no que diz respeito à classificação dos pacientes nos grupos citados acima, podendo também fornecer informações sobre diagnóstico e prognóstico (Cepeda & Reivelle, 2004; Koeing *et al.*, 2008).

ANA são detectados no soro de até 95% dos pacientes com ES. As três principais classes de autoanticorpos específicos da ES são: ACA, anti-topo I e anticorpos anti-RNA polimerase III (anti-RNAP III) (Meyer *et al.*, 2007). ACA estão presentes em até 90% dos pacientes com EScl, especialmente naqueles com a síndrome CREST. ACA são raramente encontrados em indivíduos saudáveis ou em pacientes com outras doenças do tecido conjuntivo e estão associados a um alto risco de desenvolver hipertensão pulmonar e tipicamente relacionam-se a um bom prognóstico (Cepeda & Reivelle, 2004; Grassegger *et al.*, 2008; Gabrielli *et al.*, 2009). Anticorpos anti-topo I são observados em 20% dos pacientes EScl e estão associados a um aumento do risco de fibrose pulmonar grave e a mortalidade elevada. Geralmente estão ausentes em indivíduos saudáveis ou com outras doenças autoimunes. Um fato interessante é que

anticorpos anti-topo I e ACA são mutuamente exclusivos e raramente coexistem, ocorrendo em cerca de 0,5% dos pacientes com ES (Cepeda & Reivelle, 2004; Grassegger *et al.*, 2008; Castro & Jimenez, 2010). Anticorpos anti-RNAP III estão presentes em 20% dos pacientes EScd e estão associados a crise renal esclerodérmica, mas raramente estão presentes em pacientes com doença pulmonar significativa (Steen, 2005; Parker *et al.*, 2008).

A ES provavelmente é a mais grave e incapacitante dentre as doenças autoimunes. Atualmente, as opções terapêuticas para a ES são limitadas. Tendo em vista que a ES é uma doença heterogênea com um curso imprevisível, o tratamento deve ser individualizado para cada paciente. Os agentes terapêuticos devem tratar os aspectos inflamatórios, vasculares e fibróticos da doença (Varga, 2008).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (2012), vários medicamentos são utilizados para as diferentes manifestações clínicas da doença. Manifestações cutâneas podem ser tratadas com metotrexato e a ciclofosfamida. A penicilamina auxilia na melhora das manifestações cutâneas da EScd. A sildenafil e a nifedipina, são utilizados no tratamento do fenômeno de Raynaud. Devido à falta de alternativas farmacológicas, a azatioprina é o imunossupressor mais utilizado no tratamento da progressão da fibrose pulmonar na ES. Para o tratamento da crise renal esclerodérmica, os inibidores da enzima conversora de angiotensina são os medicamentos com melhores resultados, sendo o captopril o agente mais utilizado. A metoclopramida é o fármaco utilizado para a melhora da motilidade esofágica e plenitude gástrica, enquanto que o omeprazol ajuda a reduzir o refluxo gastroesofágico.

1.2.1 Epidemiologia

A prevalência de ES varia muito de acordo com os estudos, mas a existência destas grandes diferenças entre algumas regiões pode ser consequência de variações metodológicas (Ranque & Mouthon, 2010), como definição da doença, metodologia de apuração dos casos além de diferenças nas regiões geográficas (Nikpour *et al.*, 2010).

Na Europa, a incidência de ES varia de 0,85 a 11 novos casos/milhão/ano com prevalência de 10,6 a 910 casos/milhão. Taxas similares de incidência e prevalência são reportadas na América do Norte e Oceania. Estudos com diferentes grupos étnicos sugerem taxas de incidência e prevalência de 1,5 a 3,5 vezes mais altas para indivíduos

afro-americanos e descendentes de pessoas do Norte da África e Subsaarianos, comparadas com indivíduos brancos (Piram *et al.*, 2012).

Muitos estudos têm obtido diferentes resultados com relação às taxas de incidência da ES, dependendo do critério que foi utilizado para o diagnóstico. Por exemplo, em um estudo realizado na Espanha, quando o diagnóstico foi baseado apenas nos critérios do ACR, a incidência da doença foi de 12 casos/milhão/ano e quando foi utilizado o critério para o diagnóstico precoce da ES proposto por LeRoy e Medsger (2001), a taxa de incidência foi de 23 casos/milhão/ano (Arias-Nunez *et al.*, 2008) destacando a importância da definição da doença para a obtenção das taxas de frequência.

Surtos geográficos de ES têm sido descritos em vários países, sugerindo o papel de fatores ambientais locais ou fatores genéticos (Ranque & Mouthon, 2010). Um dos *clusters* mais importante foi reportado por Arnett e cols. (1996) em uma tribo nativa americana de Oklahoma, os índios Choctaws. A prevalência muito alta de ES (4690 casos/milhão) foi estimada com base em 14 casos encontrados ao longo do período 1990-1994 nos índios Choctaws não miscigenados. Esta prevalência foi significativamente maior quando comparada à de índios Choctaws miscigenados (310 casos/milhão) e esta última foi maior que a observada para índios Choctaws não nativos de Oklahoma (95 casos/milhão). A forma difusa da doença foi observada em 92% dos pacientes. Nenhuma exposição ambiental específica foi encontrada neste estudo.

Vários estudos nos EUA reportaram que indivíduos negros têm uma maior taxa de incidência específica por idade e apresentam a forma mais grave da doença do que os indivíduos brancos (Ranque & Mouthon, 2010). No estudo realizado por Mayes *et al* (2003), em Detroit nos EUA, a incidência em mulheres negras com ES foi de 31 casos/milhão, enquanto que para mulheres brancas foi de 27 casos/milhão. A forma difusa acometia 60% dos casos de mulheres negras e 27% dos casos de mulheres brancas com ES. Além disso, um estudo realizado por Nietert e cols. (2006) reportou que indivíduos negros tinham o início da doença mais precoce que indivíduos brancos e foram significativamente mais propensos a ter a forma difusa da doença.

O primeiro e único estudo epidemiológico sobre a ES na América Latina foi realizado por Rosa e cols. (2011), em Buenos Aires, na Argentina. A taxa de incidência e prevalência da EScl e da EScd foi de 15,2 e 240 casos por milhão e 6,1 e 57 casos por milhão, respectivamente. As taxas observadas nesse estudo são similares às aquelas

reportadas para populações dos EUA, bem como da Espanha e Austrália, também encontrando mais mulheres afetadas do que homens.

1.2.2 Etiologia

A complexa patogênese da ES sugere que um único fator genético ou ambiental não pode por si só desencadear o aparecimento da doença (Nikpour *et al.*, 2010). Atualmente é aceito que a doença resulta de complexas interações entre um ou mais fatores ambientais e a predisposição genética do indivíduo (Jimenez & Derk, 2004; Varga & Abraham, 2007; Bolster & Silver 2008; Castro & Jimenez, 2010).

1.2.2.1 Fatores Imunológicos

A característica da ES é o acúmulo de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular resultando em fibrose e disfunção tecidual. Este processo pode resultar em fibrose pulmonar, dismotilidade esofágica, má-absorção intestinal ou função cardíaca prejudicada (Katsumoto *et al.*, 2011).

A doença vascular é um componente inicial e importante na ES (Abraham & Varga, 2005). Estudos de microscopia e imuno-histoquímica de biópsias da pele de vários estágios clínicos da doença indicam que as lesões patológicas iniciais na pele resultam de mudanças na função das células endoteliais e na ultraestrutura da microvasculatura. Esse evento é seguido pela infiltração de células inflamatórias e dano endotelial progressivo, incluindo a redução no número de capilares, espessamento das paredes arteriais e fibrose da camada íntima de pequenas artérias (Gu *et al.*, 2008). O dano microvascular pode ser resultado de danos diretos ou indiretos por anticorpos anti-células endoteliais (AECAs, do inglês, *anti-endothelial cell antibodies*), os quais são frequentemente detectados no soro de pacientes com ES. AECAs podem induzir as células epiteliais a expressar moléculas de adesão que alteram a migração de leucócitos e podem levar ao dano de células endoteliais e apoptose (Yamamoto, 2011).

A endotelina-1 (ET-1) é um produto derivado de células endoteliais com propriedades vasoconstritoras, sendo que níveis aumentados de ET-1 podem impedir o relaxamento de vasos sanguíneos. Além disso, a ET-1 promove a síntese de colágeno pelos fibroblastos, fornecendo a ligação entre a vasculopatia e a fibrose. Em pacientes com EScd com fibrose generalizada e naqueles com EScl e doença pulmonar hipertensiva, tem se observado elevados níveis ET-1 solúvel, sugerindo que ela pode ser

um marcador de fibrose e dano vascular, ressaltando a importância da ET-1 na patogênese da ES (Yamamoto, 2011).

Existem evidências do envolvimento do sistema imune inato e adaptativo na patogênese da ES (Abraham & Vargas, 2005). A desregulação autoimune inclui a ativação de linfócitos, que leva a produção de autoanticorpos, liberação anormal de citocinas e quimiocinas e desregulação da imunidade inata (Steen e Medsger, 2007; Katsumoto *et al.*, 2011).

Muitos estudos sugerem que as respostas inflamatórias na ES são predominantemente do tipo Th2, pois foi observado que em tecidos de pacientes com ES sofrendo fibrose os níveis de citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 estavam aumentados. É importante ressaltar que a IL-4 aumenta a produção de colágeno nos fibroblastos e induz a produção de TGF- β (fator de crescimento transformante beta), que por sua vez aumenta a síntese de vários tipos de colágenos, proteoglicanos e fibronectinas (Zuber & Spertini, 2006). Análises de micro arranjos de leucócitos do sangue periférico de pacientes mostraram níveis elevados de GATA-3, um importante fator de transcrição que coordena as repostas Th2 (Katsumoto *et al.*, 2011).

Interessantemente, também foi observado um aumento nos níveis de IL-17 no soro e na pele de pacientes com ES. Esta citocina pode estar relacionada à imunopatogênese da ES induzindo a proliferação de fibroblastos e promovendo a produção de TGF- β e IL-1, que por sua vez também são capazes de induzir a produção de colágeno. Outras moléculas, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês, *platelet-derived growth fator*), moléculas de adesão e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF, do inglês, *connective tissue growth factor*) também são encontradas em níveis aumentados no soro de pacientes em comparação a indivíduos saudáveis (Zuber & Spertini, 2006).

Os linfócitos T, macrófagos e mastócitos estão presentes em um número aumentado ou em um estado ativado na pele danificada de pacientes com ES. Além disso, células B periféricas ativadas são encontradas em um número elevado nos pacientes com ES em comparação a indivíduos saudáveis. As células B contribuem não apenas para a produção de anticorpos, mas também para a ativação e diferenciação de linfócitos T e para a produção de várias citocinas (Yamamoto, 2011).

Recentemente, o receptor do PDGF tem recebido muita atenção, dado os achados sobre os anticorpos anti-RPDGF (receptor do fator de crescimento derivado de

plaquetas) em pacientes com ES, pois esses anticorpos ativam a cascata RAS-ERK-1/-2, que leva a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos fibroblastos. De fato, evidências em relação ao aumento do estresse oxidativo têm sido observadas na ES e muitos estudos têm revelado níveis diminuídos de antioxidantes e níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo no soro de pacientes com ES (Katsumoto *et al.*, 2010).

Um recente modelo animal de ES descrito por Servettaz e cols. (2009) apoia o papel de ROS na patogênese da ES. Neste estudo, injeções subcutâneas de agentes oxidantes, em diferentes doses, correlacionaram-se com os subtipos EScl e ESdl. Injeções subcutâneas do agente oxidante peroxinitrito levaram ao desenvolvimento de fibrose na pele e anticorpos similares aos ACA, que ocorrem no fenótipo EScl. Injeções de um poderoso agente oxidante, o hipoclorito, induziram a fibrose cutânea e pulmonar, bem como anticorpos similares aos anti-topo I observados na EScl. O soro dos camundongos tratados com hipoclorito e o soro de pacientes com EScl contém altos níveis de produtos oxidados que desencadeiam a produção endotelial de H₂O₂ e a proliferação de fibroblastos.

A identificação da injúria inicial que leva ao acúmulo de ROS, bem como o papel de ROS na patogênese da ES vem sendo investigado. ROS e substâncias eletrofílicas e reativas são formadas durante vários processos metabólicos, podendo causar dano endotelial e aumento na ativação de plaquetas, levando a regulação positiva de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias e fibrogênicas, incluindo PDGF e TGF- β (Yamamoto, 2009). Se ROS iniciam o dano vascular que resulta no fenômeno de Raynaud, na perda da tolerância a antígenos específicos e na eventual fibrose tecidual ou se a injúria causada pelo fenômeno de Raynaud leva a geração de ROS e desencadeia estes eventos patológicos é uma pergunta que ainda necessita de mais estudos para ser respondida (Katsumoto *et al.*, 2010; Yamamoto, 2011).

1.2.2.2 Fatores Genéticos

A influência da genética na ES tem sido investigada, embora apenas 1,6% dos pacientes tenha um parente de primeiro grau com ES (risco relativo de 13 a 15) e a taxa de concordância entre MZ seja baixa (Varga, 2008). Em um único estudo publicado por Feghali-Bostwick e cols. (2003), a taxa de concordância foi baixa e não superior em MZ comparando a DZ (4,6% para MZ e DZ). No entanto, a incidência de ANAs foi

positivamente mais alta em MZ do que DZ (90% versus 40%), sugerindo, pelo menos, uma tendência maior para a doença entre MZ.

Embora a ES não seja uma doença herdada do modo mendeliano, o acúmulo de evidências indica um importante papel da genética na susceptibilidade e progressão da doença. A aplicação da genômica funcional, estudos de GWAS e pesquisas com genes candidatos têm identificado associações com a ES. Até o momento, os SNPs implicados em tais associações incluem aqueles em genes codificantes para fatores regulatórios vasomotores, marcadores de células B, quimiocinas e receptores de quimiocinas, citocinas (Varga, 2008), fatores de crescimento e seus receptores, proteínas antioxidantes e proteínas da matriz extracelular. As associações genéticas mais significativas são observadas entre genes HLA (antígeno leucocitário humano) e a presença do perfil de autoanticorpos, que ocorrem muitas vezes em subconjuntos clínicos específicos da ES (Abraham & Varga, 2005).

A associação entre os genótipos de HLA-II e o perfil de autoanticorpos na ES tem sido reportada em muitos estudos. Os haplótipos *DRB1*01-DQB1*0501* são os mais comuns em pacientes com ACA, enquanto que os haplótipos *HLA-DRB1*11-DQB1*0301* têm sido associados com anti-topo I (Romano *et al.*, 2011).

Um grande estudo realizado por Arnett e cols. (2010) com pacientes brancos, negros e hispânicos portadores de ES determinou a relação de alelos HLA classe II com a produção de autoanticorpos específicos. No grupo de pacientes brancos e hispânicos, uma forte associação positiva foi encontrada para os alelos *HLA-DRB1*1104*, *DQA1*0501* e *DQB1*0301*, sendo que estes alelos formam um haplótipo que também foi associado à susceptibilidade para ES, bem como outros alelos *DQB1* (além do **0301* e **0501*) codificando um resíduo não leucina na posição 26 (DQB126*epi). Por outro lado, o haplótipo *HLA-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0202-DRB1*1501* foi negativamente associado à susceptibilidade a ES. Com relação ao grupo de pacientes negros, os alelos *HLA-DRB1*0804*, *DQA1*0501* e *DQB1*0301* foram associados com o maior risco de desenvolver ES.

O primeiro GWAS em ES foi realizado por Zhou e cols. (2009), envolvendo 137 pacientes coreanos e 564 indivíduos controles, sendo reproduzido em indivíduos norte americanos (1107 pacientes e 2747 controles, todos caucasianos). Em pacientes coreanos, as regiões HLA-DPB1 e DPB2 continham os loci mais susceptíveis nesses

indivíduos. Em pacientes caucasianos dos EUA os SNPs de HLA-DPB1 e/ou DPB2 foram fortemente associados com autoanticorpos anti-topo I e ACA.

O GWAS realizado por Radstake e cols. (2010), com uma população caucasiana incluiu um total de 2296 pacientes com ES e 5171 indivíduos controle. Considerando que a ES é uma doença autoimune relativamente rara, a população deste estudo era composta por quatro grupos de pacientes, originários dos EUA, Espanha, Alemanha e Holanda. Os resultados obtidos confirmam o papel dos genes *HLA*, *STAT4* e *IRF5* na predisposição genética à ES, sendo que estes genes também são conhecidos por serem fatores de risco para muitas outras doenças autoimunes. Além disso, um novo loci de susceptibilidade não identificado anteriormente, na região do gene *CD247* (1q22-23; rs2056626), uma substituição intrônica de G→T, foi descoberto. A análise do GWAS foi realizado para verificar quais genes estavam contribuindo para as diferentes manifestações clínicas da doença no grupo com EScl e ESdl, bem como a relação com a presença de ACA e anti-topo I. Os resultados mostraram que polimorfismos nos genes *IRF8* (rs11642873) e *GRB10* (rs12540874) associaram-se com a susceptibilidade a EScl e um polimorfismo no gene *SOX5* (rs11047102) foi associado a positividade para ACA. Na região HLA, os autores observaram combinações alélicas no loci HLA-DQB1 com ACA, no loci HLA-DPA1 com anti-topo I e em *NOTCH4* com ACA e anti-topo I (Gorlova *et al.*, 2011).

Allanore e cols. (2011) realizaram GWAS usando amostras de caso-controle da França, Itália, Alemanha e do Norte da Europa. Os autores identificaram três novos loci de risco para a ES: *PSORS1C1*, *RHOB* e *TNIP1*, além de confirmar a associação com as variantes em *STAT4*, *IRF5* e *CD247*. A figura 3 mostra os genes envolvidos na patogênese da ES e em seus subtipos, bem como a relação com o perfil de autoanticorpos (Martín *et al.*, 2012).

Polimorfismos no gene *STAT4*, que codifica o transdutor de sinal e ativador do fator de transcrição 4 já foram associados à patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (LES) e AR (Broen *et al.*, 2012). O alelo *T* do polimorfismo rs7574865 no gene *STAT4* foi associado com a EScl, mas não com a forma difusa da doença em indivíduos europeus (Rueda *et al.*, 2009). A mesma associação foi encontrada em estudo com uma população de japoneses (Tsuchiya *et al.*, 2009) e em outros dois estudos, um na França (Dieudé *et al.*, 2009a) e o outro nos EUA (Gourh *et al.*, 2009), corroborando o papel dos polimorfismos em *STAT4* na patogênese da ES. O *STAT4* é um importante fator de

transcrição envolvido na regulação do balanço das citocinas Th1/Th2 e é expresso por vários tipos celulares, como monócitos, CD e macrófagos e é positivamente regulado pela IL-12., além de estar relacionado a ativação de fibroblastos e a fibrose (Gourh *et al.*, 2009; Broen *et al.*, 2012).

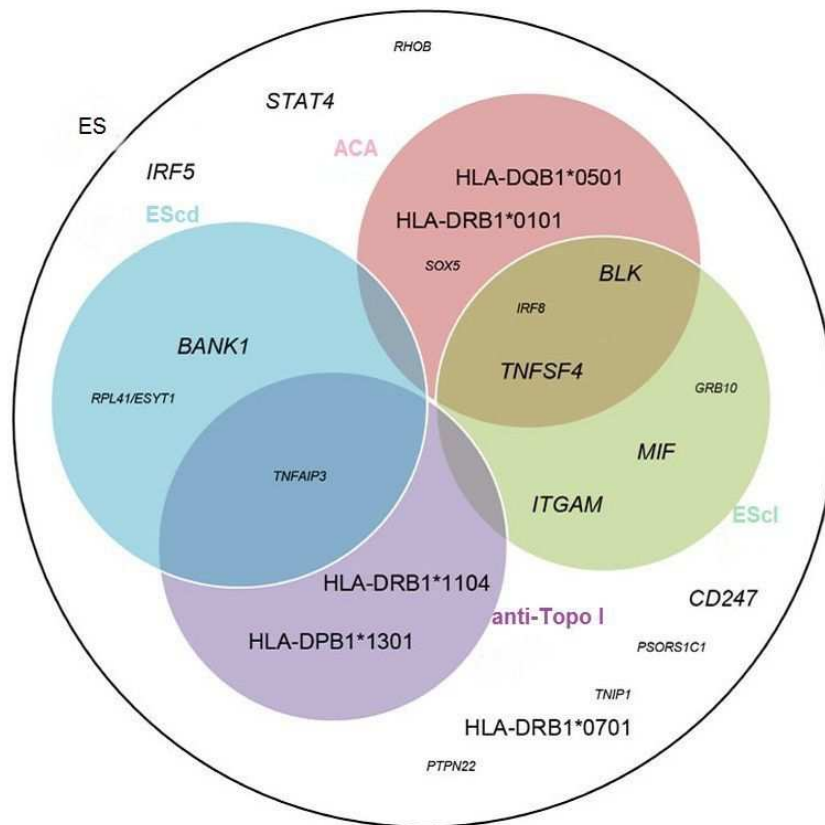


Figura 3: As associações genéticas mais fortes descritas na ES e em seus subtipos clínicos (EScl e ESdl) ou nos mais frequentes perfis de autoanticorpos (ACA ou anti-topo I). A fonte em tamanho maior significa maior associação (modificada de Martín *et al.*, 2012).

O gene *IRF5* (fator regulatório 5 do INF) está relacionado à resposta imune inata e possui variantes polimórficas que podem estar envolvidas na patogênese da ES. O IFN-1 é um importante regulador da resposta imune inata e tem funções pleiotrópicas em praticamente todos os tipos de células somáticas (Martín *et al.*, 2011). O polimorfismo rs2004640 e o haplótipo rs377385-rs2004640-rs10954213 no gene *IRF5* foram associados à forma difusa da ES em um estudo francês e em estudo japonês (Dieudé *et al.*, 2010b; Ito *et al.*, 2009).

O polimorfismo R263Q (G788A; rs33996649) no gene *PTPN22* foi associado como um fator protetor no LES, enquanto que o alelo T do polimorfismo R620W (C1858T; rs2476601) foi associada à susceptibilidade a ES. Interessantemente, este alelo também confere susceptibilidade à AR e ao diabetes mellitus tipo 1, mas é um alelo protetor para a DC (Khor *et al.*, 2010).

Ainda são necessários mais estudos para a compreensão da genética na ES, mas já sabemos que se trata de uma doença poligênica e pleiotrópica, sendo que muitas variantes polimórficas já foram associadas a outras doenças autoimunes, seja como fator de susceptibilidade ou proteção.

1.2.2.3 Fatores ambientais

Com base em surtos da doença e em estudos epidemiológicos, durante muitos anos diversos fatores ambientais foram estudados em relação à ES. Dentre os agentes ambientais estudados estão: exposição à sílica, a solventes, ao cloreto de vinil, ao óleo tóxico, ao triptofano, ao gadolínio, à bleomicina e à pentazocina (Barnes & Mayes, 2012). As associações mais significativas são de estudos com relação à sílica e a solventes orgânicos (Nikpour *et al.*, 2010). Não se sabe através de qual (ais) mecanismo (s) os agentes ambientais poderiam levar ao desenvolvimento de doenças autoimune, mas acredita-se que eles estimulem o sistema imune, causando inflamação e aumento da produção de anticorpos (Oliver & Silman, 2009).

O papel da sílica como um fator de risco para a ES vem sendo estudado há muitos anos, baseado em uma série de casos de ES entre pedreiros e mineradores de ouro (Nikpour *et al.*, 2010). Embora muitos estudos tenham reportado associação entre a ES e a exposição à sílica, ainda não está claro qual o seu papel na patogênese da doença (Farhat *et al.*, 2011). Em uma meta-análise realizada por McCormic e cols. (2010), com base em 16 estudos publicados entre 1949 e 2005, os autores observaram que há um risco aumentado de desenvolvimento da ES em homens expostos à sílica, mas não em mulheres.

Um grande número de estudos caso-controle tem reportado que a exposição ocupacional a solventes em geral está associada a ES em homens e mulheres. Removedores e diluidores de tinta, solventes minerais, etilenotricloro, tricloroetileno, gasolina, hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos halogenados, solventes BTX (contendo benzeno, tolueno ou xileno), têm sido propostos como sendo os solventes de

maior risco, mas o seu papel não é consistente entre os estudos (Ranque *et al.*, 2010). Em um estudo realizado por Nietert e cols. (1998), os autores reportaram que, em homens, a ES desenvolveu-se principalmente após exposição a solventes orgânicos, em particular ao tricloroetileno, mas essa associação não foi observada em mulheres. Em outros dois estudos, a exposição ao tricloroetileno foi relacionada ao desenvolvimento da ES, fasciíte eosinofílica e doenças do tecido conjuntivo semelhantes a ES (Lockey *et al.*, 1987; Diot *et al.*, 2002).

Casos de mulheres com implantes de silicone nos seios que desenvolveram ES começaram a aparecer na literatura médica dos EUA nos anos de 1980. Como consequência da publicação desses casos, muitos estudos de caso-controle e pelo menos quatro estudos retrospectivos de doenças do tecido conjuntivo incluindo a ES e implantes de silicone foram realizados, mas nenhum reportou aumento de risco para o desenvolvimento da ES (Ranque *et al.*, 2010). Em uma meta-análise, não houve evidência de associação entre implantes de silicone e qualquer doença do tecido conjuntivo (Nikpour *et al.*, 2010).

Deve ser enfatizado que estudos com base em exposição ocupacional são difíceis de serem realizados. Por exemplo, a exposição a solventes é frequentemente investigada usando um questionário sobre determinados tipos de exposição, ocupações anteriores ou atividades em horário livre em que os pacientes entraram em contato com os solventes. Essa prática geralmente introduz um viés, pois os pacientes tendem a atribuir a sua doença a algum tipo de exposição anterior. No entanto, a metodologia tem melhorado nos últimos anos, com um agente de saúde ocupacional realizando testes “cegos” e entrevistas estruturadas (Ranque *et al.*, 2010).

Devido à associação do tabagismo com a susceptibilidade a AR, um estudo realizado por Chaudhary e cols. (2011) comparou casos pareados pela idade com indivíduos saudáveis, mas não encontrou o tabagismo como um fator de risco para o desenvolvimento da ES. No entanto, os autores reportaram que o tabagismo pode ser um agravante para a severidade da doença.

A hipótese de que agentes infecciosos podem levar ao desenvolvimento da ES tem sido estudada. Alguns pesquisadores sugerem que a produção de autoanticorpos específicos na ES é o resultado de uma resposta dirigida por antígenos causada por mimetismo molecular. Este conceito propõe que anticorpos contra antígenos próprios são produzidos porque esses antígenos contêm epítomos que compartilham similaridade

estrutural com proteínas bacterianas e virais. Na imunopatogênese da ES, a infecção por herpesvírus, retrovírus e citomegalovírus, entre outras, tem sido sugerida como um possível agente causador (Radic *et al.*, 2010; Katsumoto *et al.*, 2010).

1.3 Genes Codificantes de Enzimas de Metabolização e Detoxificação

Estamos constantemente expostos a um grande número de xenobióticos durante o curso de nossa vida. Nosso corpo é capaz de gerenciar a exposição de xenobióticos através da sua detoxificação por um complexo sistema enzimático, que deve funcionar adequadamente para minimizar o potencial de dano dos xenobióticos (Liska, 1998).

Uma grande variedade de xenobióticos é biotransformada no organismo em compostos que muitas vezes são mais tóxicos do que o composto que o originou ou, ainda, eles são convertidos em metabólitos não tóxicos que podem ser excretados. A susceptibilidade a ação dos xenobióticos pode ser devida a polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas na bioativação/detoxificação de xenobióticos, influenciando na habilidade de remoção de toxinas do corpo e, assim, pode desempenhar um papel na etiologia ou exacerbação de muitas condições crônicas e doenças (Liska, 1998; Autrup, 2000).

A biotransformação de xenobióticos, incluindo drogas, ocorre geralmente em duas fases: a Fase I (oxidação) e a Fase II (conjugação). A figura 4 traz os processos de biotransformação possíveis.

As reações de Fase I incluem a transformação de um composto em um metabólito mais reativo e eletrofílico, geralmente inserindo um grupamento funcional (oxigênio molecular). As principais enzimas de Fase I pertencem à superfamília de heme-enzimas do Citocromo P450 (CYP). As enzimas CYP são responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos e endobióticos e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos de biossíntese (Jancova *et al.*, 2010). As enzimas CYP podem gerar grupos funcionais que posteriormente servem como um sítio para conjugação com as enzimas de Fase II, as glutatona S-transferases (GST). As reações de Fase II são necessárias para a biotransformação de um composto em um produto solúvel em água e, conseqüentemente, passível de excreção (Božina *et al.*, 2009).

1.3.1 Genes de Fase I: a Superfamília do Citocromo P450

CYP é uma superfamília de mono-oxigenases que catalisa predominantemente reações oxidativas. As reações de Fase I do metabolismo de xenobióticos são realizadas pelas enzimas do CYP. Em uma típica reação de Fase I, as enzimas CYP inserem um átomo de oxigênio molecular em um substrato, usando NADH como um cofator, criando um sítio para posterior conjugação pelas enzimas de Fase II (Liska, 1998; Jancova *et al.*, 2010).

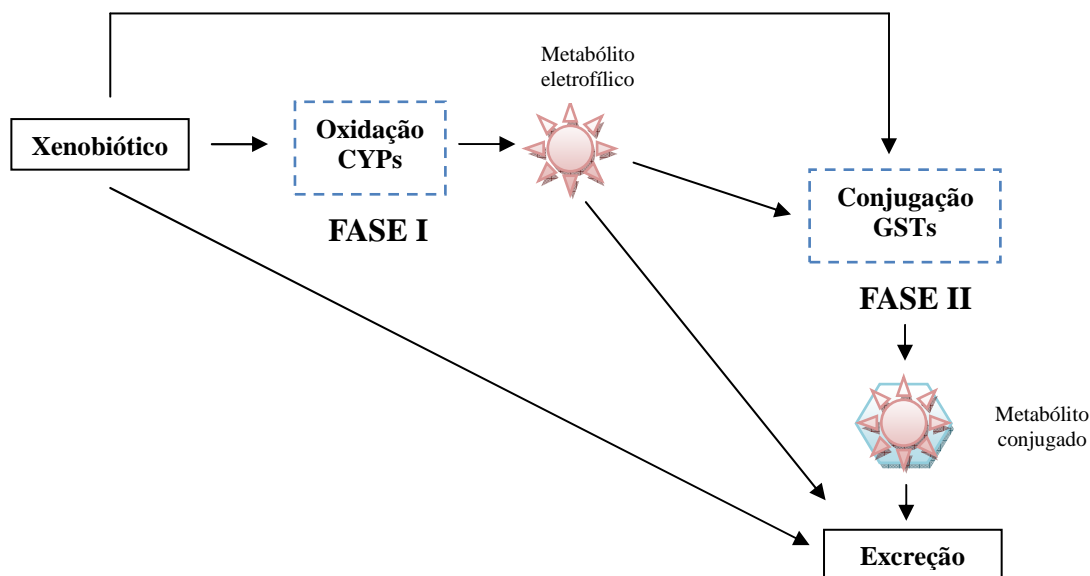


Figura 4: Possíveis vias de biotransformação de xenobióticos (modificada de Guecheva & Henriques, 2003; Wilkinson & Clapper, 1997).

O genoma humano contém pelo menos 50 genes CYP, subdivididos em 10 famílias diferentes. Essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de substâncias endógenas, como os ácidos graxos, esteroides, prostaglandinas, leucotrienos e aminas biogênicas, enquanto que substratos xenobióticos incluem drogas e compostos químicos tóxicos do ambiente. O fígado geralmente expressa alta atividade de enzimas CYP, mas todos os tecidos expressam essas enzimas de uma maneira tecido específica (Autrup, 2000; Božina *et al.*, 2009).

Uma característica importante das enzimas CYP envolvidas na biotransformação de xenobióticos é que elas são induzíveis. A indução é uma importante reação adaptativa contra as toxinas ambientais. A expressão das enzimas CYP pode ser controlada nos níveis de transcrição e tradução do RNAm e em nível pós-traducional (Božina *et al.*, 2009).

O sistema CYP é dividido em três principais grupos. O primeiro inclui as famílias de 5 a 51, que possuem uma alta afinidade por substratos endógenos e são altamente conservadas durante a evolução. O segundo grupo inclui as famílias de 1 a 3, com menor afinidade por estes substratos e menos conservada durante a evolução. O terceiro grupo inclui a família 4, que metaboliza ácidos graxos e substratos relacionados e alguns xenobióticos (Autrup, 2000; Božina *et al.*, 2009).

As famílias 1 a 3 são responsáveis por até 80% da metabolização de drogas clinicamente usadas e desempenham importante papel no metabolismo de xenobióticos (Autrup, 2000; Božina *et al.*, 2009). Muitas das enzimas CYP da família 1 a 3 exibem variabilidade catalítica interindividual e isso pode ser decorrência de polimorfismos genéticos ou de variáveis níveis de expressão (Autrup, 2000).

As enzimas mais importantes no metabolismo de drogas são CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4, considerando que as isoformas mais importantes responsáveis pela biotransformação de químicos e especialmente a ativação metabólica de pré-carcinógenos são CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2E1 e CYP3A4 (Božina *et al.*, 2009).

1.3.1.1 O gene *CYP1A1*

O gene *CYP1A1* está localizado no cromossomo 15q24.1 e contém sete éxons e seis íntrons abrangendo 5.810 pb. (Unsal *et al.*, 2009). A enzima CYP1A1 é expressa em tecidos extra-hepáticos, principalmente em tecidos epiteliais, catalisando o primeiro passo no metabolismo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, levando a formação de moléculas eletrofílicas carcinogênicas, além de catalisar a oxidação de muitos outros xenobióticos, como teofilina, cafeína, 7-etoxiresorufina e de algumas substâncias endógenas, tais como 17 β -estradiol e estrona Além de metabolizar xenobióticos, a enzima CYP1A1 realiza reações de síntese de colesterol, esteroides e outros lipídios (Božina *et al.*, 2009).

O gene *CYP1A1* não é expresso constitutivamente, sendo altamente induzível (Corchero *et al.*, 2001). A ativação da transcrição do gene *CYP1A1* inicia com o agente indutor (xenobiótico a ser metabolizado) ligando-se ao receptor intracelular de hidrocarbonetos de arila (AhR, do inglês, *aryl hydrocarbon receptor*), que transloca-se para o núcleo, dimeriza com o translocador nuclear do AhR e interage com elementos cis-ativadores chamados de elementos responsivos a xenobióticos (XREs, do inglês,

xenobiotic responsive elements), localizados em uma região *upstream* do gene *CYP1A1*. No gene *CYP1A1* humano, a região 5' *upstream* flaqueadora contém, pelo menos, sete XREs nos primeiros 1.300 pb. (Božina *et al.*, 2009; Corchero *et al.*, 2001).

Mais de 11 alelos do gene *CYP1A1* já foram descritos em humanos, dos quais *CYP1A1*2B*, **2C*, **3*, **4*, **5*, **6*, **7*, **8*, **9* e **11* mostram mudança de aminoácidos. Ainda não está totalmente claro se essas mudanças de aminoácidos alteram a atividade catalítica da enzima, mas estudos mostram que algumas variantes podem codificar enzimas mais indutíveis ou com maior atividade catalítica (Božina *et al.*, 2009).

Há diferenças na frequência de variantes polimórficas do gene *CYP1A1* em diferentes etnias. A variante *CYP1A1*2A* (ou polimorfismo *MspI* ou *m1*), que consiste de uma transição de T para C, localiza-se *downstream* do sítio de poliadenilação é mais frequente em japoneses do que em caucasianos. A variante *CYP1A1*3* consiste de uma mudança de T para C na posição 3205 (também chamado de polimorfismo *m3*) e é específica de africanos. A variante *CYP1A1*4* com troca de aminoácido de treonina para asparagina no códon 461 tem sido relacionada a uma grande atividade enzimática e apresenta frequência em caucasianos de cerca de 3% (Božina *et al.*, 2009; San Jose *et al.*, 2010). A variante *CYP1A1*2C*, também conhecida como polimorfismo *m2* ou *Ile462Val*, no éxon 7, é o resultado de uma transição de A para G no nucleotídeo 4889, resultando na troca de aminoácido de Isoleucina (Ile) para Valina (Val) no códon 462. O alelo **Val* mostra quase duas vezes mais atividade catalítica do que o alelo **Ile* (Autrup, 2000). Esta variante é rara em caucasianos, mas é encontrada em cerca de 20% dos japoneses, sendo encontrada principalmente em desequilíbrio de ligação com a variante *CYP1A1*2A* (San Jose *et al.*, 2010).

No Rio Grande do Sul, um estudo realizado por Gaspar e cols. (2004) reportou a frequência de 11% da variante *CYP1A1*2C* em indivíduos eurodescendentes, sendo esta mais alta, porém não estatisticamente significativa, do que a observada em populações europeias. Em indivíduos afrodescendentes, a frequência dessa variante variou de 12% a 15%.

1.3.1.2 O gene *CYP2E1*

O gene *CYP2E1* abrange cerca de 11.000 pb., está localizado no cromossomo 10q24.3-qter e é composto por 9 éxons e 8 íntrons, codificando uma proteína de 493 aminoácidos (Gemma *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2011).

A enzima CYP2E1 é expressa no fígado com altas concentrações na região centrolobular, sendo altamente induzível por álcool. CYP2E1 está envolvida no metabolismo e ativação de muitos compostos de baixo peso molecular, sendo que mais de 70 químicos diferentes são metabolizados por essa enzima, incluindo álcool, cetonas, aldeídos, compostos aromáticos, drogas, nitrosaminas, benzeno, cloreto de vinil e solventes halogenados, como o tricloroetileno (Božina *et al.*, 2009). Durante a reação de metabolização por CYP2E1, há a geração de ROS, que podem causar estresse oxidativo, desencadeando a peroxidação lipídica, inativação de proteínas, aumento da expressão de citocinas, dano ao DNA mitocondrial, levando a morte celular (Gemma *et al.*, 2006).

Polimorfismos funcionais no gene *CYP2E1* exibem variação interindividual na susceptibilidade a várias doenças e diferentes respostas terapêuticas. A frequência das variantes difere consideravelmente entre grupos étnicos (Deka *et al.*, 2010). Dez variantes polimórficas no gene *CYP2E1* já foram relatadas e muitas estão localizadas na região promotora ou em íntrons (Gemma *et al.*, 2006).

Os polimorfismos mais importantes no gene *CYP2E1* estão localizados na região 5' reguladora da transcrição. São eles o polimorfismo com troca de base C→T na posição -1019, onde há a perda do sítio de restrição da enzima *RsaI* e o polimorfismo G→C na posição -1293, sendo que os indivíduos homocigotos para o alelo C apresentam o sítio de restrição para a enzima *PstI*. Esses polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação e esta variante polimórfica é conhecida como *CYP2E1*5B*, estando associada com um aumento de até dez vezes na transcrição do gene (Božina *et al.*, 2009; Deka *et al.*, 2010). A frequência da variante *CYP2E1*5B* varia consideravelmente em diferentes etnias: em populações asiáticas varia de 24% a 30%; em caucasianos de 2% a 3% e em afro-americanos de 0,3% a 7% (Gemma *et al.*, 2006; Deka *et al.*, 2010).

Em estudo realizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, por Kvitko e cols. (2006), os pesquisadores reportaram a frequência de 0,016 da variante *CYP2E1*5B* em uma população de indivíduos saudáveis eurodescendentes, sendo que esta frequência é similar à frequência observada em populações da Europa (Kato *et al.*, 1992).

1.3.1.3 Polimorfismos em *CYP1A1* e *CYP2E1* e a susceptibilidade a doenças

Existem muitos estudos que associam variantes polimórficas nos genes *CYP1A1* e *CYP2E1* com o desenvolvimento de câncer e doenças inflamatórias crônicas e autoimunes.

Polimorfismos no gene *CYP1A1* já foram associados ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como por exemplo, câncer de pulmão em asiáticos e caucasianos (Zhan *et al.*, 2011), câncer de próstata em chineses (Li *et al.*, 2012), leucemia aguda e câncer cervical em chineses (Zhou *et al.*, 2012). Entretanto, alguns estudos mostram resultados contrários, não encontrando associação com câncer de boca (Balaji *et al.*, 2012) e câncer de mama em mulheres da Índia (Kiruthiga *et al.*, 2011).

A associação de polimorfismos no gene *CYP1A1* também tem sido observada em doenças inflamatórias crônicas, como o LES em japoneses (Horiuchi *et al.*, 2009; Kiyohara *et al.*, 2012), mas não em chineses (Zhang *et al.*, 2010). Em um estudo realizado na Alemanha por von Schmiedeberg e cols. (1999), os autores reportaram que o alelo *Val do polimorfismo *Ile426Val* estava associado ao desenvolvimento do LES, mas não foi observada diferença significativa para o polimorfismo *MspI*. Em relação a outras doenças crônicas inflamatórias, um estudo realizado por Inoue e cols. (2012) em pacientes com síndrome de Sjögren demonstrou que há elevada expressão do AhR e, conseqüentemente, elevada expressão da enzima CYP1A1 na saliva de pacientes quando comparado ao grupo controle.

Existem também diversos estudos que associam polimorfismos no gene *CYP2E1* e o risco de desenvolvimento de câncer, incluindo o câncer de fígado em chineses (Tian *et al.*, 2012), neoplasias malignas de diferentes origens celulares e câncer de fígado em indianos (Deka *et al.*, 2010) e câncer de pulmão em japoneses (Uematsu *et al.*, 1991).

Com relação a polimorfismos no gene *CYP2E1* e a susceptibilidade a doenças inflamatórias, o estudo de Liao e cols. (2011) reportou associação do haplótipo rs8192772-rs2480256/TG com a susceptibilidade ao LES. No nosso grupo, um estudo realizado por Glesse N (dados não publicados), reportou uma maior frequência da variante *CYP2E1*5B* em indivíduos afrodescendentes com LES quando comparada a frequência do grupo controle, sendo que indivíduos que possuem essa variante tem um risco aumentado em até três vezes de desenvolver a doença.

Em um estudo realizado na Rússia, Korytina e cols. (2005) demonstraram que a combinação do alelo *2C no gene *CYP1A1* e do alelo *5B no gene *CYP2E1* parece exercer um papel importante na susceptibilidade à doença pulmonar grave e de vias áreas em crianças com bronquite crônica e pneumonia, bem como alta frequência do genótipo nulo de *GSTT1*.

1.3.2 Genes de Fase II: a Família Glutathiona S-transferase

As principais enzimas de detoxificação de Fase II são as Glutathiona S-transferases (GST), presentes em diversos organismos. Por exemplo, existem cerca de 48 genes que codificam GSTs no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, 26 no mosquito *Aedes aegypti* e mais de 70 na planta *Populus trichocarpa* (Josephy, 2010).

Duas famílias distintas de genes codificam as GST em humanos: uma família codifica enzimas que são solúveis e diméricas, enquanto que outra família codifica enzimas associadas à membrana. GST solúveis e de membrana estão amplamente distribuídas por todo o corpo, sendo encontradas no fígado, pâncreas, cérebro, rins, testículos, coração, pulmões, intestino delgado, músculo esquelético, próstata e baço (Jancova *et al.*, 2010).

Cerca de 16 genes codificam enzimas citosólicas solúveis e pelo menos 6 genes codificam enzimas expressas em membranas. As GST solúveis são expressas principalmente no citoplasma, mas também estão presentes no núcleo, mitocôndrias e peroxissomos (Jancova *et al.*, 2010).

Em humanos, oito famílias de genes codificam GST solúveis: Alfa no cromossomo 6, Mu no cromossomo 1, Theta no cromossomo 22, Pi no cromossomo 11, Zeta 1 no cromossomo 4, Sigma no cromossomo 4, Kappa (localização cromossômica desconhecida, mas acredita-se que é expressa na mitocôndria) e Chi (também chamada de Ômega) no cromossomo 10 (Strange *et al.*, 2001).

As enzimas GST são abundantes no trato gastrointestinal, porém, a sua distribuição varia consideravelmente e a sua atividade e expressão é influenciada pela dieta, exposição a drogas e condições clínicas. A expressão de GSTP1 e GSTM1 é mais baixa no cólon do que no intestino delgado, fato que pode explicar a rara incidência de neoplasias no intestino delgado, pois as enzimas catalisam a detoxificação de carcinógenos e compostos eletrofílicos luminiais. Em relação às outras enzimas GST, GSTP1 é a isoforma mais expressa no cólon humano, sendo que GSTM1 também é abundante nos colonócitos. A diminuição da atividade das enzimas GST do cólon proximal ao cólon distal é consistente com a detoxificação diminuída de xenobióticos e aumentado risco de câncer, sendo que o nível de GST no trato gastrointestinal correlaciona-se inversamente com o risco de câncer no cólon (Kaminsk & Zhang, 2003; Circu & Aw, 2011).

Muitos compostos eletrofílicos são formados pela oxidação de xenobióticos catalisados pelas enzimas CYP e outras oxidases, bem como originadas do metabolismo celular normal, como as prostaglandinas e esteroides (Jancova *et al.*, 2010). As enzimas GST catalisam a conjugação da glutatona com uma grande variedade de compostos eletrofílicos, detoxificando substâncias endógenas e exógenas, protegendo o organismo de compostos tóxicos e carcinogênicos e do conseqüente estresse oxidativo derivado da ação destes compostos (Liska, 1998; Autrup, 2000; Jancova *et al.*, 2010; Laborde, 2010). Além disso, as GST podem proteger os tecidos de danos oxidativos devido a produtos secundários do estresse oxidativo (Hayes *et al.*, 2005).

A relação entre polimorfismos nos genes que codificam as GST e o risco de desenvolvimento de doenças tem sido examinada em grande número de situações (Josephy, 2010). Atualmente, tem se dado maior atenção a polimorfismos nos genes da família Mu, Theta e Pi e acredita-se que variantes genéticas contribuem para diferenças interindividuais na resposta a xenobióticos (Autrup, 2000; Jancova *et al.*, 2010).

1.3.2.1 Os genes *GSTT1* e *GSTM1*

Os genes *GSTT1* e *GSTT2* pertencem à família *GSTT* e estão localizados no cromossomo 22 separados por cerca de 50 kb. Estes genes possuem estruturas similares, sendo compostos de cinco éxons com fronteiras éxon/íntron idênticas (Strange *et al.*, 2001). O gene *GSTT1* (22q11.2) possui duas variantes alélicas: uma funcional (*GSTT1*1*) e outra não funcional (*GSTT1*0*), sendo esta última frequentemente referida como alelo nulo. O alelo nulo origina-se da completa deleção do gene, sendo que indivíduos homozigotos para o alelo nulo não expressam a enzima (Mo *et al.*, 2009; Ramalhinho *et al.*, 2011). Essa deleção origina-se de eventos de recombinação homóloga envolvendo duas sequências altamente repetitivas que flanqueiam o gene, resultando na perda de 54 kb que contém todo o gene *GSTT1* (Parl, 2005).

No cromossomo 1p13 localizam-se em tandem 5 genes da classe Mu (5'-*GSTM4*-*GSTM2*-*GSTM1*-*GSTM5*-*GSTM3*-3'). No gene *GSTM1* (1p13.3), os alelos *GSTM1*0*, *GSTM1*A* e *GSTM1*B* são os mais estudados. *GSTM1*A* e *GSTM1*B* diferem em uma base no éxon sete e codificam monômeros que formam enzimas homo e heterodiméricas ativas. Assim como o gene *GSTT1*, *GSTM1* apresenta um alelo nulo (*GSTM1*0*) e indivíduos homozigotos para esse alelo não expressam a enzima (Strange *et al.*, 2001; Ramalhinho *et al.*, 2011). Essa deleção também ocorre devido a eventos de

recombinação homóloga entre sequências que flanqueiam o gene, eliminando 16 kb, os quais contêm todo o gene *GSTM1* (Xu *et al.*, 1998).

Os substratos para as GST são compostos capazes de reagir com o motivo tiol da glutationa. Estes substratos podem servir para a conjugação com mais de uma família de GST, como o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno que é descrito como um substrato universal para as GST, exceto para GSTT1, porém alguns são específicos (Autrup, 2000; Hayes, 2005; Jancova *et al.*, 2010; Josephy, 2010). Moléculas relativamente pequenas, como derivados do cloreto de metileno, dibrometo de etileno ou isopreno, bem como drogas citostáticas, hidrocarbonetos e hidrocarbonetos halogenados são substratos para a enzima GSTT1 (Josephy, 2010). A enzima GSTM1 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 (Autrup, 2000).

A frequência de indivíduos homozigotos para o alelo nulo de *GSTT1* e/ou *GSTM1* exibe grande variação étnica. De 15% a 20% dos caucasianos, 60% dos asiáticos e 24% dos africanos são homozigotos para o alelo nulo de *GSTT1*, enquanto que 49% a 55% dos caucasianos, 27% a 35% dos africanos e 53% dos asiáticos são homozigotos nulos para *GSTM1*. Aproximadamente 8% dos caucasianos e 4% dos africanos são homozigotos nulos para ambos os genes (Autrup, 2000; Tew *et al.*, 2001; White *et al.*, 2008; Economopoulos & Sergeantanis, 2010).

Em um estudo realizado por Kvitko e cols. (2006) com populações de indivíduos afrodescendentes e eurodescendentes saudáveis de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, foi reportada a frequência de homozigotos nulos para *GSTT1* e *GSTM1*. Para indivíduos eurodescendentes, a frequência de homozigotos nulos para *GSTT1* e *GSTM1* foi, respectivamente, de 21,1% e 50%, enquanto que para indivíduos afrodescendentes a frequência foi de 28% e 34%, respectivamente.

1.3.2.2 O gene *GSTP1*

O gene *GSTP1* está localizado no cromossomo 11q13 e é amplamente expresso em tecidos epiteliais. Até o momento, quatro alelos foram identificados, GSTP1*A (Ile¹⁰⁵, Ala¹¹⁴, Ser¹⁸⁵), GSTP1*B (Val¹⁰⁵, Ala¹¹⁴, Ser¹⁸⁵), GSTP1*C (Ile¹⁰⁵, Val¹¹⁴, Ser¹⁸⁵) e GSTP1*D (Ile¹⁰⁵, Ala¹¹⁴) (Autrup, 2000; Mayes, 2005). O alelo *A é o alelo selvagem, enquanto que o alelo *B resulta de uma transição A→G no nucleotídeo 313

do éxon cinco, mudando o aminoácido de Ile para Val, no códon 105. O alelo *C, além de apresentar a mesma transição observada para o alelo *B, inclui uma transição C→T no éxon seis, mudando também o aminoácido de Ile para Val, no códon 114. Por fim, o alelo *D apresenta apenas a transição de C→T no éxon seis, mudando o aminoácido de Ala para Val, no códon 114 (Mayes, 2005).

Apesar de todas essas substituições de base e trocas de aminoácidos, apenas a transição de A→G no éxon cinco (polimorfismo *Ile105Val*) tem sido associada à atividade enzimática alterada. Este resíduo está situado no sítio de ligação com os substratos eletrofílicos e esta variante parece ter atividade específica e afinidade alterada, sendo que a enzima de indivíduos com genótipo *Val/Val* parece ter uma atividade de detoxificação reduzida, quando comparada ao tipo selvagem, dependendo do substrato (Autrup, 2000; Hayes, 2005; Lai *et al.*, 2005; Mo *et al.*, 2009; Ramalhinho *et al.*, 2011).

Assim como para *CYP1A1* e *CYP2E1*, as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos no gene *GSTP1* variam consideravelmente entre as populações. A frequência do alelo *Val em caucasianos, afro-americanos e asiáticos é de, respectivamente, 31%, 54% e 17% (White *et al.*, 2008).

No estudo já citado acima sobre a frequência dos homozigotos nulos de *GSTT1* e *GSTM1* em afrodescendentes e em eurodescendentes de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Kvitko *et al.*, 2006), os autores também reportam as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo *GSTP1 Ile105Val*. Em indivíduos afrodescendentes, a frequência do alelo *Val foi de 0,42, enquanto que para indivíduos eurodescendentes, frequência foi de 0,28.

1.3.2.3 Polimorfismos em *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* e a susceptibilidade a doenças

Existe muito interesse nas possíveis implicações patológicas associadas a polimorfismos nos genes que codificam as enzimas GST, entretanto, muitos estudos descrevem resultados conflitantes. Apesar disso, estudos de caso-controle têm reportado associação dos genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTM1*, bem como o genótipo *Val/Val* de *GSTP1* com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças (Autrup, 2000; Hayes, 2005; Mo *et al.*, 2009; Ramalhinho *et al.*, 2011).

Estudos sugerem associações com o genótipo nulo de *GSTM1* e a susceptibilidade ao câncer de próstata e osteossarcoma em pacientes de São Paulo (Mo *et al.*, 2009; Salinas-Souza *et al.*, 2010); *GSTT1* e *GSTM1* nulos e câncer cólon-retal em caucasianos e nódulos na tireoide em pacientes de Goiânia (Economopoulos & Sergeantanis, 2010; Reis *et al.*, 2010). A combinação de *GSTT1/GSTM1* nulos e o genótipo *Val/Val* de *GSTP1* já foi associado ao câncer de mama em portuguesas, enquanto que o genótipo nulo de *GSTM1* e o genótipo *Val/Val* de *GSTP1* foi associado ao câncer de mama em iranianas (Ramalhinho *et al.*, 2011; Hashemi *et al.*, 2012).

Polimorfismos nos genes que codificam as enzimas GST também já foram associados a doenças autoimunes. Rohr e cols. (2008) reportaram uma associação significativa entre o genótipo nulo de *GSTT1* e o risco de artrite idiopática juvenil em pacientes do Rio Grande do Sul, sendo que esta associação foi ainda mais forte no grupo de pacientes com os subtipos mais graves da doença. No Japão, Kiyohara e cols. (2012) encontraram associação do genótipo nulo de *GSTM1* na susceptibilidade ao LES em fumantes. Entretanto, em um estudo realizado na Inglaterra (Ollier *et al.*, 1996), os autores não encontraram diferenças nas frequências genotípicas de *GSTT1* e *GSTM1* comparando pacientes com LES e controles, mas observaram uma associação do fenótipo de autoanticorpos anti-Ro e anti-La com a alta frequência de indivíduos nulos para *GSTM1* ou *GSTT1* comparados a pacientes com LES com qualquer outro perfil de autoanticorpos.

1.3.3 Genes e enzimas de Fase I e Fase II: associações com DII e ES

Na DII, o dano oxidativo direto à mucosa intestinal e o agravamento da inflamação são dois importantes aspectos decorrentes do estresse oxidativo. A inflamação aumenta a geração de ROS, que por sua vez, podem estar envolvidas na regulação positiva de citocinas inflamatórias, bem como ao aumento de infiltrados de células inflamatórias. Esses eventos podem contribuir para a gênese e/ou progressão da doença (Zhu & Li, 2012).

A falha na detoxificação de compostos eletrofílicos ou a exagerada capacidade de biotransformação de xenobióticos em compostos eletrofílicos leva ao aumento da produção de ROS, podendo causar danos à mucosa intestinal (Roediger, 1997). Ao longo dos anos, estudos têm investigado o papel dos polimorfismos em genes

codificantes do sistema de biotransformação de xenobióticos na susceptibilidade e/ou progressão da DII.

O primeiro estudo que verificou os níveis de expressão de *GSTM1* no sangue de pacientes com RCU e DC foi realizado por Hertervig e cols. (1994). Os autores demonstraram que em pacientes com RCU o nível de expressão da enzima era significativamente menor em indivíduos com aparecimento precoce da doença, frequentemente levando a necessidade de colectomia, mas nenhuma associação foi reportada para a DC. Em 1998, Sido e cols. reportaram baixa expressão de glutathione na mucosa inflamada de pacientes com DII, porém, os autores não fizeram distinção entre as classes de enzima expressas.

Sabe-se que o sistema de enzimas GST é expresso em níveis mais baixos no cólon distal (sigma) do que no cólon transversal. Em um estudo envolvendo indivíduos saudáveis, Hoensch e cols. (2006) reportaram que a expressão de *GSTP1* diminuía significativamente do cólon proximal ao cólon distal. Além disso, os níveis de expressão de *GSTP1* foram mais altos em mulheres mais velhas do que em mulheres mais jovens, enquanto que em homens nenhum efeito significativo foi encontrado em relação à expressão de *GSTP1* e a idade. Nesse estudo, os autores sugerem que as mulheres estão mais protegidas contra danos oxidativos em função da ação das enzimas GST do que os homens, sendo que isso poderia contribuir para a baixa incidência de câncer cólon-retal em mulheres.

Um estudo realizado por Berkhout e cols. (2006) envolveu 18 pacientes com RCU que sofreram anastomose íleo-anal com bolsa ileal, um tratamento cirúrgico recomendado para pacientes que não responderam favoravelmente aos tratamentos convencionais. Essa cirurgia consiste na retirada total do intestino grosso, mantendo-se o esfíncter anal. Faz-se uma bolsa com a parte distal do intestino delgado, que é ligada ao canal anal, permitindo a evacuação através do ânus. Neste trabalho, os autores reportaram uma diminuição nos níveis de *GSTA1* e *A2* na mucosa da bolsa ileal. Os níveis de *GSTP1* foram altos na bolsa, mas em comparação com a síndrome da alça aferente, os níveis de *GSTP1* foram baixos, indicando baixa capacidade de detoxificação na bolsa ileal, podendo contribuir para o desenvolvimento de câncer. Os autores também verificaram a frequência do polimorfismo de presença/ausência de *GSTM1*, mas não encontram diferenças significativas nas frequências genotípicas entre os pacientes e um grupo controle de indivíduos saudáveis.

Em 1995, Duncan e cols. realizaram um estudo envolvendo pacientes com DII, dividindo-os em três grupos: DC, RCU distal (inflamação envolvendo apenas o lado esquerdo do cólon), RCU total e um grupo de indivíduos saudáveis. Os autores reportaram maior frequência do genótipo homozigoto nulo de *GSTT1* no grupo de pacientes com RCU total (35%) do que no grupo com a forma distal da doença (17%) e no grupo controle (18%). Diferenças na capacidade de detoxificação de xenobióticos desconhecidos, que causam danos à mucosa intestinal, podem estar envolvidas na patogênese da DII, bem como influenciar nos diferentes fenótipos da doença.

Existe um modelo de colite induzida em camundongos através da administração de dextran sulfato de sódio (DSS). Em um estudo realizado por Clapper e cols. (1999), camundongos foram submetidos a quatro ciclos de administração de DSS na água para beber, a fim de desenvolver colite nesses animais. Os autores confirmaram o desenvolvimento da colite e verificaram que houve a diminuição dos níveis de GSTT e GSTM no cólon dos animais.

No estudo realizado por de Jong e cols. (2003), envolvendo pacientes caucasianos com DC, a frequência de variantes polimórficas dos genes *CYP1A1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* foram analisadas. Os autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos *m1* e *Ile426Val* do gene *CYP1A1*, ausência/presença de *GSTT1* e *GSTM1* e o polimorfismo *Ile105Val* de *GSTP1* no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle. A análise combinada de indivíduos homozigotos nulos para *GSTT1* e *GSTM1* comparados a indivíduos que possuíam pelo menos um alelo selvagem de *GSTT1* e/ou *GSTM1* também foi realizada, mas não foram encontradas diferenças significativas.

Análises também foram realizadas em uma população indiana por Mittal e cols. (2007). Nesse trabalho, o genótipo nulo de *GSTM1* foi mais frequente em indivíduos com RCU do que em indivíduos controle, considerando que o genótipo nulo de *GSTT1* foi mais frequente em indivíduos com RCU e DC quando comparado ao grupo controle. Os autores também realizaram a análise combinada citada no estudo anterior e observaram maior frequência do genótipo duplo nulo *GSTT1/GSTM1* no grupo de pacientes RCU e DC em comparação com o grupo controle, aumentando ainda mais o risco de desenvolver a doença.

Com a finalidade de entender a interação dos genótipos de *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* e o metabolismo de um fármaco utilizado no tratamento da DII, Stocco e cols.

(2007) realizaram um estudo envolvendo pacientes tratados com azatioprina. A azatioprina é um fármaco amplamente utilizado como agente imunossupressor em várias doenças inflamatórias crônicas, incluindo a DII, sendo capaz de manter a doença em remissão, mas efeitos adversos são observados em cerca 15% a 38% dos pacientes tratados, necessitando assim a interrupção da terapia. A azatioprina é convertida em 6-mercaptopurina através da reação com a glutatona e polimorfismos nos genes que codificam as GST podem alterar o metabolismo dessa droga, levando a aumento do estresse oxidativo e de efeitos adversos. Nesse estudo, os autores observaram menor frequência do genótipo nulo de *GSTM1* nos pacientes que sofreram efeitos adversos, sendo que este genótipo parece exercer um efeito protetor na incidência dos efeitos adversos induzidos pela azatioprina. Além disso, a presença do genótipo nulo de *GSTM1* foi associada a menor probabilidade de desenvolvimento de linfopenia durante o tratamento com azatioprina. Nenhuma associação foi observada para os genótipos de *GSTT1* e *GSTP1*.

Recentemente, Karban e cols. (2011) investigaram a associação dos genótipos de *GSTT1* e *GSTM1* em 606 pacientes israelenses (453 com DC e 153 com RCU) e 528 indivíduos saudáveis, como controles. Os autores observaram uma alta frequência do genótipo nulo de *GSTT1* no grupo de indivíduos controles judeus (23,5%) e árabes muçulmanos (22%), quando comparados a indivíduos controle drusos (7%), mas não encontraram diferenças nas frequências dos genótipos de *GSTM1* entre esses grupos. Comparando o grupo de pacientes com o grupo controle por etnias, os autores encontraram alta frequência do genótipo nulo de *GSTT1* e baixa frequência do genótipo nulo de *GSTM1* em pacientes árabes muçulmanos. Nenhuma diferença foi observada quando os pacientes eram separados em grupo com DC ou RCU. Neste estudo, os autores sugerem que o genótipo nulo de *GSTT1* pode estar associado a DII e, contraditoriamente, o genótipo nulo de *GSTM1* pode conferir proteção contra a doença.

Ye e cols. (2011), na China, realizaram um estudo recrutando 270 pacientes com RCU e 623 indivíduos saudáveis. Os autores observaram maior frequência do genótipo nulo de *GSTM1* e *GSTT1* e o genótipo *Val/Val* de *GSTP1* no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle. Quando os pacientes foram separados de acordo com as características clínicas da doença, a frequência de *GSTT1* nulo e *GSTP1 Val/Val*, mas não *GSTM1* nulo, foi mais alta em pacientes com a forma distal da doença do que a forma total, mas nenhuma variante foi associada à severidade da doença.

O estudo caso-controle mais recente que investigou a associação de polimorfismos nos genes que codificam as enzimas CYP e/ou GST foi conduzido por Buyukgoze e cols. (2012). Os pesquisadores observaram maior frequência dos genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTMI* em pacientes comparados aos controles, evidenciando, assim, em mais um estudo a importância desses polimorfismos na susceptibilidade a DII e seus subtipos.

Existem mais estudos investigando o papel dos polimorfismos nos genes CYP e GST em relação a DII do que em relação a ES. O primeiro estudo caso-controle com o objetivo de investigar a associação desses genes com a ES foi realizado por von Schmiedeberg e cols. (1999). Os autores investigaram o papel dos polimorfismos *m1* e *Ile426Val* no gene *CYP1A1* em pacientes com ES e em indivíduos saudáveis. Nesse estudo, não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos estudados no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle.

O estudo de Tew e cols. (2001) verificou a possível associação dos polimorfismos de presença/ausência dos genes *GSTT1* e *GSTMI* em pacientes caucasianos com ES, com no máximo cinco anos de doença, além de tentar correlacionar genótipos e alelos com diversas características clínicas e bioquímicas da doença. A frequência dos genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTMI* sozinhos ou em combinação não diferiu significativamente quando comparado o grupo de pacientes com o grupo controle. Entretanto, pacientes homocigotos nulos para *GSTMI* foram menos propensos do que aqueles com pelo menos um alelo funcional de *GSTMI* a terem anticorpos anti-RNP, mas esta diferença não foi significativa após a correção para comparações múltiplas. Pacientes homocigotos nulos tanto para *GSTT1* quanto para *GSTMI* tinham uma forte tendência a apresentar autoanticorpos ACA e histórico de doença dermatológica não maligna, mas essa diferença não foi significativa. Os resultados desse trabalho sugerem que as doenças autoimunes são heterogêneas a respeito de fatores genéticos e que as variantes polimórficas de susceptibilidade em genes candidatos não contribuem sozinhas para a doença, mas podem modificar a sua expressão clínica.

Também em 2001, um estudo investigou a associação de polimorfismos no gene *CYP2E1* e a exposição a solventes orgânicos na susceptibilidade a ES em três grupos: pacientes com ES que foram expostos a solventes orgânicos antes de desenvolver a

doença (n=7), pacientes que não foram expostos a solventes orgânicos antes do desenvolvimento da doença (n=71) e um grupo de indivíduos saudáveis não expostos, como controle (n=106). Povey e cols. (2001) observaram que o alelo *CYP2E1**3, localizado na região 5' reguladora, foi encontrado em dois dos sete pacientes que foram expostos, além disso, todos os sete pacientes carregaram o alelo *CYP2C19**EM, localizado no éxon cinco, comparados a 89% dos pacientes com ES sem exposição. Apesar do número de indivíduos expostos ser baixo, os autores sugeriram que estes alelos podem estar envolvidos na susceptibilidade a ES em indivíduos expostos a solventes orgânicos.

O estudo de Tikly e cols. (2004) foi realizado com a participação de pacientes negros, originários da África do Sul. Os autores não observaram diferenças significativas nas frequências dos genótipos nulos de *GSTT1* e *GSTMI* e nem nas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *Ile105Val* de *GSTP1*. Entretanto, os autores encontraram associação do alelo *GSTMI**B, apresentando baixa frequência entre os pacientes, evidenciando um possível papel protetor contra a doença, mas esta associação não foi observada para o alelo *GSTMI**A. Interessantemente, o alelo *GSTMI**A difere do *GSTMI**B em apenas um aminoácido, mas estudos *in vitro* não mostram qualquer diferença funcional nas enzimas, pois ambos codificam enzimas ativas. Alternativamente, a associação descrita pelos autores pode ser resultado do desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo não identificado no gene *GSTMI* ou em algum outro gene relacionado.

Como discutido anteriormente, a fibrose pulmonar é a principal causa de morte entre os pacientes com ES. Shirahama e cols. (2010) realizaram um estudo envolvendo pacientes com ES portadores de doença pulmonar intersticial (DPI) e pacientes com ES sem DPI e analisaram alterações de certas proteínas no lavado bronco-alveolar desses pacientes. Quando os autores compararam o perfil de proteínas no material dos pacientes com DPI e no material de pacientes sem DPI, encontraram um aumento no nível de expressão de três proteínas: α 2-macroglobulin, α 1-antitrypsin e proteína A surfactante pulmonar, bem como a diminuição dos níveis das enzimas α 2-proteínas de choque térmico e GST no grupo de pacientes com DPI. Essas proteínas podem ter um papel na patogênese ou prognóstico da ES envolvendo a doença pulmonar, mas evidentemente são necessários mais estudos para elucidar o papel dessas proteínas na patogênese da doença.

As doenças inflamatórias crônicas, como a DII e a ES, são um problema de saúde e afetam pessoas no mundo todo. A etiologia destas doenças ainda não está totalmente compreendida, mas sabe-se que fatores genéticos, imunológicos e ambientais estão envolvidos na sua patogênese. Não há cura para estas doenças, mas atualmente existem tratamentos que visam melhorar a qualidade de vida dos pacientes e manter a doença em remissão, mas muitos indivíduos não respondem bem aos tratamentos.

A genética tem um papel muito importante nessas doenças. Muitas variantes polimórficas já foram estudadas e parece óbvio que elas possam influenciar a patogênese e/ou progressão dessas doenças em algumas populações, mas não em outras, destacando a importância de estudos genéticos em diversas populações, com o objetivo que realizar a caracterização imunogenética das mesmas, a fim de obter resultados que possam ajudar no melhor entendimento dos mecanismos das doenças e o desenvolvimento de terapias mais efetivas.

Diante destas considerações, estamos propondo a caracterização de variantes polimórficas nos genes de metabolização e detoxificação em pacientes com DII e ES. No Brasil, ainda não foram realizados estudos de associação destes polimorfismos analisados em conjunto na DII e na ES, portanto, é interessante determinar se existe associação em nossa população e comparar a estudos realizados em outras populações. A identificação de fatores genéticos implicados na patogênese destas doenças pode, futuramente, auxiliar no estabelecimento de diagnósticos e prognósticos mais confiáveis e, além disso, podem contribuir para avanços terapêuticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo geral investigar o papel dos polimorfismos dos genes codificantes de enzimas do Citocromo P-450 e da Glutathione S-transferase na susceptibilidade à Doença Inflamatória Intestinal (Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa) e à Esclerose Sistêmica, através da análise da presença e frequência das variantes alélicas destes genes em amostras de pacientes com DC, RCU e ES e em indivíduos controle saudáveis.

2.2 Objetivos Específicos

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

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Artigo em fase de preparação a ser enviado à revista científica *Digestive Diseases and Sciences*

Genetic Polymorphisms in Biotransformation Enzymes in Inflammatory Bowel Disease Patients from Southern Brazil

Msc. Tássia Flores Rech, PhD. Mariana Jobim, PhD. Kátia Kvitko, PhD. Marta Brenner Machado, PhD. José Artur Bogo Chies

T.F. Rech, K. Kvitko, and J.B. Chies: Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves Avenue, 9500. Porto Alegre – Brasil.

M. Jobim: Department of Immunology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos Street, 2350. Porto Alegre – Brazil.

M. B. Machado: Hospital São Lucas PUCRS. Ipiranga Avenue, 6690. Porto Alegre – Brazil.

Corresponding author:

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

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

Bento Gonçalves Avenue – 9500, Campus do Vale. 91501970

Porto Alegre, RS – BRAZIL. PO BOX 15053

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

Acknowledgments: The authors thank the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for the financial support.

Abstract

Background: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two major subtypes of inflammatory bowel disease (IBD). Evidences suggest that the oxidative stress plays an important role in pathophysiology of IBD. The increased capacity in metabolizing xenobiotics and/or the failure in the detoxification of metabolites may cause direct damage to the intestinal mucosa, as well as to be involved in deregulation of inflammatory responses. Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes may alter its catalytic activity and modulate the risk of IBD development.

Aim: This study aimed to investigate the frequency of *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B*, *GSTM1 null*, *GSTT1 null*, and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms in IBD patients and healthy controls.

Methods: A total of 235 IBD patients (132 CD and 103 UC) and 241 healthy controls were analyzed. Molecular identification of *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms was performed by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) assay. The *GSTT1 null* and *GSTM1 null* polymorphisms were analyzed by PCR in multiplex.

Results: Allelic and genotypic frequencies of *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms, and the genotypic frequency of *GSTM1 null* polymorphism, did not differ statistically between patients and controls. However, we observed a higher frequency of *GSTT1 null* homozygous in IBD and UC patients as compared to controls.

Conclusions: This study suggests that the *GSTT1 null* genotype is a susceptibility genetic factor to IBD development and it may be involved in definition of course of disease to UC in European-derived patients from Southern Brazil.

Keywords: Inflammatory bowel disease, Crohn's disease, Ulcerative colitis, Genetic polymorphism, Cytochrome P450, Glutathione S-transferases.

Introduction

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two major subtypes of inflammatory bowel disease (IBD). IBD is characterized by inflammation of colon and/or small intestine, which results in recurrent diarrhea, abdominal pain, rectal bleeding, and weight loss [1, 2]. Although CD and UC are inflammatory chronic diseases affecting the gastrointestinal tract, there are some characteristics that differentiate them: the inflammation in CD is transmural and discontinuous, affecting principally the ileum and perianal region; in UC, the inflammation is located superficially in colon, in a pattern continuous [3, 4]. The etiology of IBD is not completely clarified, but several studies have contributed to understanding of the IBD pathogenesis. Currently, it is known that genetic and environmental factors may trigger immunological alterations and increase the risk of IBD development [2–5].

Enzymes related to biotransformation of xenobiotics are often used as genetic markers of susceptibility to the development and progression of diseases in which the exposition to environmental factors is involved [6]. The biotransformation of xenobiotics can occur in two phases, depending of xenobiotic [7]. The Phase I reactions are performed by Cytochrome P450 (CYP) enzymes, which insert an atom oxygen molecular in a xenobiotic substrate, making it more electrophilic and reactive, as well as creating a site for subsequent conjugation by Phase II enzymes [7, 8]. Phase II reactions are catalyzed by Glutathione S-transferases (GST) through the conjugation of glutathione with a variety of electrophilic compounds, often derived from Phase I, which make these metabolites become more soluble and can be excreted [9, 10].

The *CYP1A1* gene is located at 15q24.1 chromosome and contains seven exons and six introns [11]. The *CYP1A1*2C* polymorphism is characterized by a transition of A to G at nucleotide 4889 in exon 7, that results in an amino acid change of isoleucine (Ile) to valine (Val) at codon 462 (*Ile462Val*). The variant **2C*, that codifies the amino acid Val, shows an almost two-fold higher catalytic enzyme activity than the **1A* variant [8]. It was previously reported that enzymes carrying **2C* allele generate an increase in oxidative stress thus to its higher catalytic activity [12]. The *CYP2E1* gene is located on chromosome 10q24.3-qter and consists of nine exons and eight introns [13]. One of the most important polymorphisms of *CYP2E1* gene, as known as *CYP2E1*5B* (*PstI*), is located in 5' transcription regulatory region at position –1293 [8]. The substitution of G to C results in an increase up to ten-fold in gene transcription, and it

has been associated to an increase in the generation of electrophilic substances and oxidative stress [13–15].

Important substrates of GST enzymes include electrophilic metabolites derived from the catalytic activity of CYP enzymes, as well as numerous by-products of oxidative stress. *GSTT1* gene is located at chromosome 22q11.2, whereas *GSTM1* is codified by a gene located on chromosome 1p13.3 [10]. The deletion of *GSTT1* and *GSTM1* genes is common in human populations, and individuals who are homozygous null to deletion of *GSTT1* and/or *GSTM1* genes do not express the respective enzyme [8, 10, 16]. *GSTP1* gene is located at chromosome 11q13 and it has an important polymorphism on exon 5. A transition A to G at nucleotide +313 results in a change of amino acid of Ile to Val at codon 105 (*Ile105Val*) [16]. This residue is located at the binding site with the electrophilic substrates and the variant **Val* can confers an affinity and specificity altered depending on the xenobiotic [16–18].

The mechanism which initiates the inflammation in IBD remains unknown [3–5]. However, the inflammatory process of intestinal mucosa can be triggered by an imbalance between the generation of oxidative stress and antioxidant enzyme action [19]. Genetic polymorphisms may alter the catalytic activity of Phase I and II enzymes, resulting in disequilibrium between the production of electrophilic substances and the activity of detoxification [8, 15]. The failure in the detoxification of electrophilic compounds and reactive oxygen species (ROS), originated from biotransformation of xenobiotic, and/or the increased capacity in metabolizing xenobiotics may cause direct damage to the intestinal mucosa, as well as to be involved in deregulation of inflammatory responses [20, 21].

The aim of this study was to investigate the frequency of *CYP1A1**2C and *CYP2E1**5B polymorphisms of Cytochrome P450, and *GSTT1 null*, *GSTM1 null*, and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms of Glutathione S-transferases in IBD patients and its clinical subtypes, CD and UC, comparing to healthy controls from Southern Brazil.

Methods

Patients and controls

This study was conducted using convenience samples of patients and healthy controls. A total of 235 patients, from Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Hospital São Lucas PUCRS, both localized in Porto Alegre city, were diagnosed with IBD and

included in this study (125 women and 110 men). One hundred thirty-two patients presented CD (66 women, 66 men) and 103 patients presented UC (59 women, 44 men). The mean age of patients was 43.9 ± 13.2 (mean \pm SD) years. The diagnosis of IBD was based on standard clinical, radiological, and histologic criteria [22] and in accordance with the consensus on IBD published by the European Crohn's and Colitis Organization [23, 24]. Patients with other types of colitis were excluded from this study. The control group was comprised by 241 healthy blood donors (80 women and 161 men). The mean age of controls was 44.09 ± 7.34 years. Blood samples were collected after authorization of the ethical committees of both institutions and an informed consent of individuals.

Patients and controls were classified as European-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 [25, 26].

The total number of individuals genotyped for the polymorphism analyzed is indicated in each table. Due to technical problems, in some cases the sample size was reduced.

CYP1A1 and CYP2E1 Genotyping

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 [27]. DNA samples were stored at -20°C .

Molecular identification of *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* 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 [28]. The amplified product (204 bp) was digested with the enzyme *BsrDI* and in presence of the restriction site, fragments of 149 bp and 55 bp were formed. The genotyping of *CYP2E1*5B* polymorphism was performed according to Kato et al [29]. The presence of restriction site *PstI* yielded two fragments of 290 bp and 120 bp. The genotypes were determined through the visualization on 3% agarose gel.

GSTT1, GSTM1, and GSTP1 Genotyping

The *GSTT1 null* and *GSTM1 null* polymorphisms of Glutathione S-transferase were genotyped using the amplification method by PCR in multiplex, with specific primers [30–32], and PCR-RFLP was performed for *GSTP1 Ile105Val* polymorphism as described previously [6]. An aliquot of amplified product was analyzed by electrophoresis in 3% agarose gel to verify the absence or presence of *GSTT1* (480 bp) and *GSTM1* (215 bp) genes. The amplified fragment of *GSTP1* (176 bp) was used as an internal control in this reaction. After the visualization of the *GSTT1* and *GSTM1* genotypes, an aliquot of this PCR product was digested by the restriction enzyme *BsmI* in order to determine the genotypes of *GSTP1 Ile105Val* polymorphism [31]. The fragments of 91 bp and 85 bp formed after the enzymatic digestion were visualized in 8% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

Allelic and genotypic frequencies were estimated by direct counting. Chi-Square test was performed to compare the genotypic frequencies observed in patients and controls groups with the Hardy–Weinberg expectations, as well as to compare *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* genotypic frequencies between patients and controls. Chi-Square test with Yates' correction was performed to compare the frequency of presence/absence *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms, as well as to compare *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* allelic frequencies between patients and controls. Odds Ratio (OR) estimative with 95% confidence interval (95% CI) was also calculated. All data were analyzed with SPSS software and WinPepi. Significance level was established at $P < 0.05$ (two-tailed). Analyses were performed with all patients grouped under IBD or subdivided as CD and UC patients.

Results

*CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1Ile105Val* genotypic and allelic frequencies, as well as *GSTT1* and *GSTM1* homozygous null genotypes frequencies analyzed in our control group are similar to frequencies reported previously for a healthy population from Porto Alegre with European ancestry [33].

For all groups of patients and controls, *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1Ile105Val* genotypic frequencies were according to expected by Hardy-Weinberg

equilibrium, except the *CYP2E1*5B* frequencies in the group of IBD patients ($P=0.04$). The methodology employed for analysis of presence/absence of polymorphism *GSTT1* and *GSTM1* do not allows distinction between heterozygous and wild-type homozygous genotype, therefore Hardy-Weinberg equilibrium was not applied in these cases.

Data resulting from analysis of *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* polymorphisms are showed in Table 1. The genotypic and allelic frequencies of *CYP1A1*2C* polymorphism did not differ between IBD patients and controls ($P= 0.933$ and $P=1.000$, respectively), as well as was observed to CD ($P= 0.893$ and $P= 0.758$, respectively) and UC patients ($P= 0.866$ and $P= 0.974$, respectively) as compared to controls. Concerning to genotypic frequencies of *CYP2E1*5B* polymorphism, no significant difference was observed between IBD, CD, UC patients and controls ($P= 0.336$, $P= 0.213$ and $P= 0.758$, respectively). Allelic frequencies also did not differ between the three patients groups and controls (IBD $P= 0.430$; CD $P= 0.224$ and UC $P=1.000$).

Concerning to results obtained from analysis of genes encoding phase II enzymes (Table 3), the genotypic frequencies of *GSTP1*Ile105Val* polymorphism did not present any significant difference between patients and controls (IBD $P= 0.536$, CD $P= 0.351$, UC $P= 0.715$), as well as to allelic frequencies (IBD $P= 0.640$, CD $P= 0.283$, UC $P= 0.759$).

Table 4 presents data from analysis performed for the genotypic frequencies of *GSTT1 null* and *GSTM1 null* polymorphism comparing patients and controls. The frequency of *GSTT1* homozygous null in IBD group was significantly higher than the frequency observed in the control group [0.28 vs 0.18; $P=0.02$; OR=1.71 (95% CI 1.09–2.71)]. When the IBD group was subdivided in CD and UC, the statistical significance was observed only regarding to UC patients compared to controls [0.29 vs 0.18; $P=0.035$; OR=1.84 (95% CI 1.03–3.24)]. Although the frequency of *GSTT1* homozygous null was higher in CD patients as compared to controls, it was not statistically significant [0.27 vs 0.18; $p= 0.083$; OR 1.62 (95% CI 0.94–2.76)]. The frequency of the *GSTM1* homozygous null genotype did not differ between any patients group and controls (IBD $P= 0.389$; CD $P=0.286$; UC $P=0.849$). A combined analysis was also performed comparing individuals that are null for both *GSTT1* and *GSTM1* genes. Individual that had at least one functional allele of *GSTT1* or *GSTM1* were classified as other genotypes in our analyses (heterozygous and wild-type homozygous). As results, we observed a high frequency of double-null individuals in IBD, CD and UC

patients groups as compared to controls, but no significant association was observed (P=0.115, P=0.217, P=0.190; respectively).

Discussion

We investigated the role of polymorphisms in genes coding Cytochrome P450 and Glutathione S-transferases enzymes in the susceptibility and clinical progression of IBD in 235 patients and 241 healthy controls European-derived. Evidences suggest that the oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of IBD, resulting in direct oxidative damage to the intestinal mucosa and exacerbation of inflammatory responses [19–21].

Polymorphic variants in CYP and GST genes can encode enzymes with altered or absent catalytic activity and modulate the risk of IBD development [11–12, 14–17]. Researches have been performed with different populations and some results showed controversial. In this study, we observed a higher frequency of the *GSTT1 null* genotype in IBD patients as compared to controls, as demonstrated by a study with a cohort of Arab Muslim [34] and Indians IBD patients [35]. However, when our sample of IBD patients was subdivided under UC or CD groups, the increased frequency of *GSTT1* homozygous null was significant only in UC patients. This result is in agreement with a study performed by Duncan et al [36] with Caucasian UC patients, and by other two studies with UC patients from China [37] and Turkish [38]. Unlike our results, the studies realized in India, China, and Turkey reported association of *GSTM1 null* genotype to UC. This discrepancy in results may be explained by different genetic backgrounds of these populations, whereas the association of *GSTM1 null* genotype was not demonstrated in two studies with CD and UC Caucasian populations of Europe [36, 39].

It is known that stressors, originated from metabolism of xenobiotics, are involved in activation pathway of Nuclear Factor kappa Beta (NF- κ B), an important transcription factor responsible for regulating inflammatory responses [40]. A higher activation of NF- κ B can induce transcription of several genes coding cytokines, including those involved in the pathogenesis of IBD [41]. Based on these considerations, it is plausible to suggest that the accumulation of toxic metabolites not detoxified by *GSTT1* enzyme may to generate direct damage to the intestinal epithelium. Furthermore, these metabolites not detoxified may activate the NF- κ B and

stimulate the transcription of inflammatory mediators involved in the pathogenesis of IBD, as well as specific genes related to UC, thereby contributing to definition of the course of the disease to UC.

Regarding *GSTP1 Ile105Val* polymorphism, in the present study, allelic and genotypic frequencies were similar in the three groups of patients as compared to the controls. This result is in agreement with a previous study reported by de Jong et al [39], which involved CD Caucasian patients. Unlike our results, a Chinese study [37] observed a significant higher frequency of *Val/Val* genotype among UC patients than in the controls, especially those with the distal form of disease. The results reported by this study suggest that the *GSTP1 Ile105Val* polymorphism may play a role in susceptibility to UC in individuals of Chinese ancestry, but not in individuals with European ancestry.

The polymorphisms in Phase I genes were not associated to IBD susceptibility or clinical progression in the present study. *CYP1A*2C* polymorphism showed similar frequencies between three patients groups and controls, and our results are in accordance with a study performed with CD European patients [39]. Therefore, the *CYP1A*2C* polymorphism seems not be associated to susceptibility IBD and the subtypes UC and DC in individuals European or with European ancestry.

This study was the first to investigate the role of *CYP2E1*5B* polymorphism in IBD, but no association was observed. Interestingly, the genotypic frequencies observed in IBD patients were not in agreement with the expected frequencies for Hardy-Weinberg equilibrium. An acceptable explanation for this imbalance may be the possible and relevant role of this polymorphism in a sample of unhealthy individuals [42], whereas the **5B/*5B* mutant genotype was observed with a frequency higher than expected. The *CYP2E1*5B* polymorphism is harbored in 5' transcription regulatory region. It was reported that the transversion G→C increases up to ten-fold in gene transcription, and consequently it results in a higher catalytic activity of enzyme [13–15].

The small sample size is a limitation of the present study. Whereas a convenience sample of 235 IBD patients and 241 healthy controls was studied, the statistic power to identify a significant difference between the groups was up to 66%. Although IBD had higher rates of incidence and prevalence in certain parts of the world [43], in Brazil it is still an uncommon disease [44].

To our knowledge, this is the first study that examined the association of the genetic polymorphisms in biotransformation enzymes of xenobiotics in a sample of IBD Brazilian patients. As conclusion, this study suggests that the *GSTT1 null* genotype is a susceptibility genetic factor to IBD and it may be involved in definition of course of disease to UC in European-derived individuals from Southern Brazil.

Potential conflicts of interest: None.

References

1. Cho, JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:458–466.
2. Matricon J, Barnich N, Ardid D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*. 2010;1:299–309.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448:427–434.
4. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307–317.
5. Scharl M, Rogler G. Inflammatory bowel disease pathogenesis: what is new? *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28:301–309.
6. Rohr P, Veit TD, Scheibel I, et al. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26:151–155.
7. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010;154:103–116.
8. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res*. 2000;464:65–76.
9. Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ*. 2010;17:1373–1380.
10. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51–88.

11. Unsal T, Konac E, Yesilkaya E, et al. Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26:205–216.
12. Sharma R, Ahuja M, Panda NK, et al. 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: 441–448.
13. Liu Y, Meng XW, Zhou LY, et al. Genetic polymorphism and mRNA levels of cytochrome P450IIE1 and glutathione S-transferase P1 in patients with alcoholic liver disease in different nationalities. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009;8:162–167.
14. Deka M, Bose M, Baruah B, et al. Role of CYP2E1 gene polymorphisms association with hepatitis risk in Northeast India. *World J Gastroenterol.* 2010;16:4800–4808.
15. 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;82:254-256.
16. Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld L. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population. *Mol Cell Biochem.* 2011;355:265–271.
17. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001;482:21–26.
18. Mo Z, Gao Y, Cao Y, et al. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate.* 2009;69:662–688.
19. Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012;237:474–480.
20. Roediger B. Human colonocyte detoxification. *Gut.* 1997;41:731–734.
21. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, et al. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13659. doi: 10.4414/smw.2012.13659.
22. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1989;170:2–6.

23. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al. European consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohn's And Colitis*. 2008;2:1–23.
24. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *Gut*. 2006;55:1–15.
25. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18:424–430.
26. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, et al. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:321–325.
27. 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.
28. 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;56:4965–4969.
29. Kato S, Shields PG, Caporaso NE, et al. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res*. 1992;52:6712–6715.
30. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, et al. 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;85:1159–1164.
31. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, et al. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 1997;18:641–644.
32. 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):271–276.
33. Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, et al. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genet Mol Biol*. 2004;27:133–138.

34. Karban A, Krivoy N, Elkin H, et al. Non-Jewish Israeli IBD Patients Have Significantly Higher Glutathione S-Transferase GSTT1-Null Frequency. *Dig Dis Sci*. 2011;56:2081–2087.
35. Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK, et al. Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:920–924.
36. Duncan H, Swan C, Green J, et al. Susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: interactions between glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes. *Clin Chim Acta*. 1995;240:53–61.
37. Ye X, Jiang Y, Wang H, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases are associated with ulcerative colitis in central China. *Cell Biochem Biophys*. 2001;60:323–328.
38. Buyukgoze O, Osmanoglu N, Arslan S, et al. Association of the CYP1A1*2A, GSTT1 null, GSTM1 null, mEPHX*3, and XRCC1-399 genetic polymorphisms with ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis*. 2012;28:593–595.
39. de Jong DJ, van der Logt EM, van Schaik A, et al. Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes in Crohn's disease: association with microsomal epoxide hydrolase. *Gut*. 2003;52:547–551.
40. Rahman A, Fazal F. Blocking NF- κ B: an inflammatory issue. *Proc Am Thorac Soc*. 2011;8:497–503.
41. Biasi F, Leonarduzzi G, Oteiza PI, et al. Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations and Therapeutic Targets. *Antioxid Redox Signal*. 2013;9:1711–1747.
42. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*. 2006;7:781–791.
43. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369:1627–1640.
44. Victoria CR, Sassak LY, Nunes HR. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2009;46:20–25

TABLES

Table 1: Genotypic and allelic frequencies of *CYP1A1*2C* polymorphism in IBD, CD and UC patients as compared to healthy controls

	IBD (n=235)	CD (n=132)	UC (n=103)	Controls (n=238)
<i>CYP1A1*2C</i>	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Genotypes				
<i>*1A*1A</i>	175 (75)	96 (73)	79 (77)	177 (74)
<i>*1A*2C</i>	55 (23)	33 (25)	22 (21)	57 (24)
<i>*2C*2C</i>	5 (2)	3 (2)	2 (2)	4 (2)
Alleles				
<i>*1A</i>	405 (86)	225 (85)	180 (87)	411 (86)
<i>*2C</i>	65 (14)	39 (15)	26 (13)	65 (14)
	IBD (n=223)	CD (n=128)	UC (n=95)	Controls (n=236)
<i>CYP2E1*5B</i>	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Genotypes				
<i>*1A*1A</i>	203 (91)	119 (93)	84 (88)	207 (87.7)
<i>*1A*5B</i>	18 (8.1)	8 (6.2)	10 (11)	28 (11.9)
<i>*5B*5B</i>	2 (0.9)	1 (0.8)	1 (1)	1 (0.4)
Alleles				
<i>*1A</i>	424 (95)	246 (96)	178 (94)	442 (94)
<i>*5B</i>	22 (5)	10 (4)	12 (6)	30 (6)

No significant difference between the groups ($P>0.05$).

Table 2: Genotypic and allelic frequencies of *GSTP1 Ile105Val* polymorphism in IBD, CD and UC patients as compared to healthy controls

	IBD (n=235)	CD (n=132)	UC (n=103)	Controls (n=237)
<i>GSTP1 Ile105Val</i>	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Genotypes				
<i>Ile/Ile</i>	111 (47)	67 (51)	44 (43)	102 (43)
<i>Ile/Val</i>	101 (43)	54 (41)	47 (46)	114 (48)
<i>Val/Val</i>	23 (10)	11 (8)	12 (11)	21 (9)
Alleles				
* <i>Ile</i>	323 (0.69)	188 (0.71)	135 (0.66)	318 (0.67)
* <i>Val</i>	147 (0.31)	76 (0.29)	71 (0.34)	156 (0.33)

No significant difference between the groups ($P>0.05$).

Table 3: Frequencies of *GSTT1 null*, *GSTM1 null* and double-null genotypes in IBD, CD and UC patients as compared to healthy controls

	IBD (n=235)	CD (n=132)	UC (n=103)	Controls (n=241)
	(N, %)	(N, %)	(N, %)	(N, %)
Genotypes				
<i>GSTT1 null</i>	65 (28) ^a	35 (27) ^c	30 (29) ^b	44 (18)
<i>GSTT1 non-null</i>	170 (72)	97 (73)	73 (71)	197 (82)
<i>GSTM1 null</i> ^c	136 (58)	79 (60)	57 (55)	129 (54)
<i>GSTM1 non-null</i>	99 (42)	53 (40)	46 (45)	112 (46)
<i>GSTT1 null + GSTM1 null</i> ^c	31 (13)	17 (13)	14 (14)	20 (8)
Other genotypes	204 (87)	115 (87)	89 (86)	221 (92)

^a IBD vs. controls: χ^2 with Yates P=0.02; OR=1.71 (95% CI 1.09 –2.71)

^b UC vs. controls: χ^2 with Yates P=0.035; OR=1.84 (95% CI 1.03 –3.24)

^c No significant difference between the groups (P>0.05)

3.2 Artigo em fase de preparação a ser enviado à revista científica *Molecular and Cellular Biochemistry*

**GENETIC POLYMORPHISMS OF CYTOCHROME P450 AND
GLUTATHIONE S-TRANSFERASES ENZYMES IN SYSTEMIC SCLEROSIS
PATIENTS**

Tássia Flores Rech, Markus Bredemeier, João Carlos Tavares Xavier, Kátia Kvitko,
José Artur Bogo Chies

T.F. Rech, K. Kvitko, J.B. Chies

Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves
Avenue 9500, Porto Alegre – Brasil

M. Bredemeier, J.C. Xavier

Rheumatology Division, Hospital Conceição, Porto Alegre, Brazil. Francisco Trein
Avenue, 586, Porto Alegre – Brasil

Correspondence to:

José Artur Bogo Chies e-mail: jabchies@terra.com.br

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Instituto de
Biotecnologia. Av. Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43323 - Lab. 212

Agronomia - Porto Alegre, RS – Brasil

Fone 51-3308-6740. Fax 51-3308-7311

CEP 91501-970

Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is a rare chronic autoimmune inflammatory disease, characterized by vascular and immune dysfunction. SSc etiology is not completely understood, but it probably results from interactions between environmental factors and the genetic predisposition of the individual. Evidences suggest that the oxidative stress may cause the initial injury that triggers the pathological events in SSc. Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes may alter the catalytic activity of enzymes and modulate the potential of activation and detoxification of xenobiotics, resulting in an increase of oxidative stress. In the present study, we investigated the frequency of *CYP1A1**2C, *CYP2E1**5B, *GSTM1 null*, *GSTT1 null* and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms in 99 SSc patients and 241 healthy controls. Molecular identification of *CYP1A1**2C, *CYP2E1**5B and *GSTP1 Ile105Val* polymorphisms was performed by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) assay. The *GSTT1 null* and *GSTM1 null* polymorphisms were analyzed by PCR in multiplex. Allelic and genotypic frequencies of *CYP2E1**5B and *GSTP1 Ile105Val* polymorphism, as well as the genotypic frequencies of *GSTM1 null* polymorphism were similar between patients and controls. We observed a significantly higher frequency of *2C/*2C genotype and *2C allele from *CYP1A1**2C polymorphism among patients as compared to controls. Furthermore, a frequency significantly increased was observed regarding *GSTT1* homozygous null genotype and double-null for both *GSTT1* and *GSTM1* genes comparing patients and controls. As conclusions, this study suggests that the presence of *2C allele from *CYP1A1**2C polymorphism and the *GSTT1 null* genotype alone or combined with *GSTM1 null* is a genetic susceptibility factor to SSc.

Keywords: systemic sclerosis, cytochrome P450, glutathione S-transferases, genetic polymorphisms.

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a rare chronic autoimmune inflammatory disease of the connective tissue, characterized by vascular and immune dysfunction that results in progressive fibrosis of the skin and internal organs [1, 2]. SSc etiology is not completely understood, but evidences suggest that the disease results from interactions between environmental factors and the genetic predisposition of the individual [2, 3]. Autoantibodies are a marked feature of autoimmune diseases. Although its role in the pathology of SSc is unknown, they are useful to the classification of patients on the subtypes of disease: diffuse cutaneous SSc (dcSSc), limited cutaneous SSc (lcSSc), and SSc sine scleroderma (ssSSc), beyond provide information about diagnosis and prognosis [4]. Antinuclear antibodies (ANA) are detected in up to 95% of SSc patients. Anti-centromere antibodies (ACA) and anti-topoisomerase I antibodies (anti-Scl-70) are the classic ANA found and are present in up to 90% of patients with lcSSc and in up to 20% dcSSc patients, respectively [4, 5].

Genes and enzymes involved in biotransformation of xenobiotics are often used as markers of susceptibility to the development and/or progression of diseases in which its etiology is related to exposure to environmental factors [6]. The biotransformation of xenobiotics generally occurs in two phases [7]. Phase I reactions are performed by Cytochrome P450 (CYP) enzymes, which insert an atom oxygen molecular in a substrate, creating a site for subsequent conjugation by Phase II enzymes [7, 8]. Phase II reactions are catalyzed by Glutathione S-transferases (GST) through the conjugation of glutathione with a variety of electrophilic metabolites, often derived from Phase I, detoxifying endogenous and exogenous substances [9]. The ability to remove electrophilic substances can be due to genetic polymorphism in gene coding enzymes involved in Phase I and II of biotransformation of xenobiotics [7, 10].

The *CYP2E1* gene is located on chromosome 10q24.3-qter and consists of nine exons and eight introns [11]. One of the most important polymorphisms, as known as *CYP2E1**5*B* (*Pst*I), is characterized by a replacement of G to C at position -1293 in the 5' transcription regulatory region [7]. The variant *5*B* was associated with an increase up to ten-fold in gene transcription [11–13]. The *CYP1A1* gene is located at 15q24.1 chromosome and contains seven exons and six introns [14]. In exon 7, at nucleotide 4889, a transition of A to G results in a variant known as *CYP1A1**2*C*, which presents an amino acid change of isoleucine (Ile) to valine (Val) at codon 462 (*Ile462Val*). The

variant *2C shows an almost two-fold higher catalytic enzyme activity than the *Ile variant [7]. It was previously reported that enzymes carrying *2C allele can generate an increase in oxidative stress thus to its higher catalytic activity [15].

GSTs are important enzymes that detoxify reactive metabolites frequently derived from the catalytic activity of CYP enzymes, as well as numerous by-products from oxidative stress. *GSTT1* gene is located at chromosome 22q11.2, whereas *GSTM1* is codified by a gene located on chromosome 1p13.3 [10]. The deletion of *GSTT1* and *GSTM1* genes is common in human populations, resulting in the absence of enzymes [7, 10, 16]. *GSTP1* is a polymorphic gene located on chromosome 11q13. On exon 5, a transition A to G at nucleotide +313 results in a change of amino acid Ile to Val (*Ile105Val*) [16]. This residue is located at the binding site with the electrophilic compounds and the variant *Val to confer altered affinity and specificity to substrates [16–18].

The oxidative damage may be responsible for both direct tissue injury and the generation of specific autoantigens in SSc [19]. At high concentrations, reactive oxygen species (ROS) react quickly with proteins, lipids, carbohydrates, and nucleic acids, often inducing functional alterations [20]. Indeed, evidences suggest that the oxidative stress may be involved in SSc development since it was observed a decrease in serum levels of antioxidants enzymes and an increase of markers of oxidative damage in SSc patients [21–23].

In the present study, we investigated the frequency of *CYP1A1**2C and *CYP2E1**5B polymorphisms of Cytochrome P450 and *GSTP1 Ile105Val*, *GSTM1 null*, and *GSTT1 null* polymorphisms of Glutathione S-transferases in SSc patients comparing to healthy controls from Southern Brazil, as well as the possible association of these variants with clinical and laboratorial features of the disease.

Methods

Patients and Controls

A total of 99 SSc patients were prospectively evaluated between April 2000 and December 2004. Patients were referred from the rheumatology units of 4 clinical centers in the Porto Alegre city, Rio Grande do Sul, Brazil. The mean age of patients was 49.7 ± 14.9 years. The sample was constituted by patients with longstanding or recently diagnosed disease. All patients met the American College of Rheumatology (ACR)

criteria for SSc [24] or the criteria suggested by LeRoy and Medsger [25] for diagnosis of early forms of SSc. The patients with overlapping syndromes were excluded. However, patients with definite diagnosis of SSc (according to the ACR criteria) who presented secondary inflammatory myopathy or Sjögren's syndrome were not excluded from the analysis.

The control group was comprised of 241 unexposed, uninfected healthy blood donors. The mean age of controls was 44.09 ± 7.34 years. Patients and controls were classified as European-derived according to phenotypic characteristics of individuals (color and hair type and skin color), 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 [26, 27]. This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All patients and controls signed a written informed consent before participating in this study.

Clinical evaluation

Clinical disease characteristics recorded and the procedures used to diagnosis were described by Bredemeier et al [28]. Pulmonary high-resolution computed tomography (HRCT) was performed in most patients. All HRCT scans were assessed for radiologic evidence of interstitial disease (ground-glass opacities, reticular pattern, and honeycombing) by 2 radiologists. Patients also underwent spirometry and carbon monoxide diffusing capacity (DLCO) test. Forced vital capacity (FVC) and DLCO were considered reduced when $< 80\%$ and $< 75\%$ of predicted values, respectively. Patients with honeycombing, reticular pattern, ground-glass opacities, or reduced FVC were considered to have interstitial lung disease (ILD). Doppler echocardiography was used to estimate the pulmonary systolic arterial pressure (PSAP). Patients with PSAP ≥ 40 mm Hg were considered to have pulmonary arterial hypertension (PAH).

CYP1A1 and CYP2E1 Genotyping

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 Numberger [29]. DNA samples were stored at -20°C .

Molecular identification of *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* 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 [30]. The amplified product (204 bp) was digested with the enzyme *BsrDI* and in presence of the restriction site, fragments of 149 bp and 55 bp were formed. The genotyping of *CYP2E1*5B* polymorphism was performed according to Kato et al [31]. The presence of the *PstI* restriction site yielded two fragments of 120 bp and 290 bp. The genotypes of both the polymorphisms were determined through the visualization on 3% agarose gel.

GSTT1, GSTM1, and GSTP1 Genotyping

The *GSTT1 null* and *GSTM1 null* polymorphisms were genotyped using the amplification method by Polymerase Chain Reaction (PCR) in multiplex, with specific primers, and PCR-RFLP for *GSTP1 Ile105Val* polymorphism as described previously by Rohr et al [6]. The primer sequences used were as previously reported [32–34]. An aliquot of amplified product was analyzed by electrophoresis in 3% agarose gel to verify the absence or presence of *GSTT1* (480 bp) and *GSTM1* (215 bp) genes, and the amplified fragment of *GSTP1* (176 bp), which was used as an internal control in this reaction. After this procedure, a second aliquot of the amplified product of *GSTP1* was digested by the restriction enzyme *BsmI* as described by Harries et al [33]. The fragments of 91 bp and 85 bp formed after the enzymatic digestion were visualized in 8% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

Allelic and genotypic frequencies were estimated by direct counting. The genotypic frequencies of polymorphism were compared to Hardy–Weinberg expectations using Chi-Square test. In order to compare the frequency *GSTT1* and *GSTM1 null* polymorphisms, as well as to compare *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* allelic frequencies between patients and controls, Chi-Square test with Yates' correction was performed. *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* genotypic frequencies were compared between patients and controls through Chi-Square test. OR estimative with 95% confidence interval (95% CI) and the adjusted

residuals were also calculated. All data were analyzed with SPSS software and WinPepi. Significance level was established at $P < 0.05$ (two-tailed).

The total number of individuals genotyped is indicated in each table. Due to technical problems, in some cases the sample size was reduced.

Results

*CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* genotypic and allelic frequencies, as well as *GSTT1* and *GSTM1* homozygous null genotypes frequencies analyzed in our control group are similar to frequencies reported previously for a healthy population from Porto Alegre with European ancestry [35].

The observed *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B* and *GSTP1 Ile105Val* genotypic frequencies were according to expected for Hardy-Weinberg equilibrium in both patients and controls groups. The methodology utilized for the analysis of the *GSTT1* and *GSTM1 null* polymorphisms do not allow distinction between wild-type homozygous and heterozygous genotypes, therefore Hardy-Weinberg equilibrium was not applied in this case.

Demographic, clinical and laboratorial data of SSc patients are shown in Table 1. Table 2 presents data from analysis of *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* polymorphisms. Significant differences were observed regarding genotypic and allelic frequencies of *CYP1A1*2C* polymorphism between patients and controls ($P=0.03$ and $P=0.013$, respectively). The analysis of adjusted residuals showed that the frequency of **1A/*1A* genotype was significantly increased among controls as compared to patients (0.74 vs. 0.61; $P=0.019$), as well as the frequency of **1A* allele (0.86 vs 0.78; OR=0.57, 95% CI 0.36–0.90). Concerning genotypic and allelic frequencies of *CYP2E1*5B* polymorphism, no significant difference was observed ($P= 0.210$ and $P=0.233$, respectively).

A similar frequency of alleles and genotypes from *GSTP1 Ile105Val* polymorphism was observed between SSc patients and healthy controls ($P= 0.415$ and $P=0.251$, respectively). Table 4 presents the analysis concerning the influence of *GSTT1 null* and *GSTM1 null* polymorphisms in SSc susceptibility. The frequency of *GSTT1* homozygous null individuals was significantly higher among SSc patients as compared to the control group (0.29 vs 0.18, $P=0.029$; OR=1.83, 95% CI 1.05–3.16). Genotypic frequencies of *GSTM1 null* polymorphism did not differ significantly between patients

and controls ($P=0.157$). A combined analysis was performed comparing individuals null for both *GSTT1* and *GSTM1* genes with individuals that had at least one functional allele of *GSTT1* or *GSTM1*, referred to as “other genotypes” in our analyses. A significant higher frequency of double-null individuals was observed among SSc patients as compared to healthy controls (0.19 vs 0.08, $P=0.007$; OR=2.62, 95% CI 1.25–5.46).

Ultimately, we analyzed the demographic, clinical, and laboratorial data of SSc patients stratified in accordance with the genotypes of CYP and GST polymorphisms analyzed. A significant association was observed concerning the frequency of **1A/*5B* genotype from *CYP2E1*5B* polymorphism and the presence of anti-Scl70 ($P=0.019$), whereas no one patient with this genotype presented positivity to anti-Scl-70. Furthermore, *GSTM1* non-null genotype was observed in 97% of patients with reduced DLCO ($P=0.027$). However after applying Bonferroni correction, the significant P-values were not maintained.

The original sample of SSc patients and healthy controls was constituted of individuals African-derived and European-derived. It is known that the frequency of these polymorphisms in CYP and GST genes differs significantly between distinct ethnic groups [35]. For this reason, all analyses were performed subdividing the control group according to their ethnic origin. However, the sample of SSc patients and healthy controls African-derived was small (23 patients and 87 controls), which it implies in a very low statistical power to analyses. Therefore, we compared the allelic and genotypic frequencies of polymorphisms studied between patients and controls (data not shown), but without analyzing clinical data of patients. As results, we did not find any association of CYP and GST polymorphisms with SSc susceptibility in this sample of African-derived individuals ($P>0.05$).

Discussion

Oxidative stress has been reported as an important factor for the development of SSc, whereas it may contribute to the early pathological manifestations of the disease [21–23]. To investigate the association of polymorphisms in genes coding biotransformation enzymes in susceptibility to SSc, we analyzed 99 SSc patients and 241 healthy controls European-derived.

A frequency significantly higher was observed regarding **IA/*IA* genotype and **IA* allele from *CYP1A1*2C* polymorphism among healthy controls. It was previously reported that **2C* allele increases the catalytic activity of enzyme, in which it results in a higher metabolizing activity, generating large amounts electrophilic metabolites [7]. Furthermore, intermediary compounds can be formed through the activity of metabolizing by CYP enzymes, and these compounds can be more toxic than the original substance metabolized [36, 37]. The only study that investigated the role of *CYP1A1*2C* polymorphism in susceptibility to SSc did not found any association [38]. Thereby, the **IA/*IA* genotype may be a protect factor for SSc susceptibility, since the presence of this genotype is associated to a lower activity of metabolizing of xenobiotics.

Concerning the *CYP2E1*5B* polymorphism, this was the first study that investigated its role in SSc, but no associated was observed. However, a study realized by Povey et al [39] reported that the **3* allele from *CYP2E1*3* polymorphism, also localized at the 5' regulatory region of gene, was observed in two of seven SSc patients that had been exposed to organic solvents before development of the disease. Therefore, other polymorphisms in *CYP2E1* gene may influence the SSc development.

No association was observed regarding *GSTP1 Ile105Val* polymorphism between patients and controls. In contrast, a study performed by Palmer et al [40] observed an increased frequency of both heterozygous and homozygous carriers of the **Val* allele among SSc patients. The **Val* variant appears to confer reduced catalytic activity as compared to **Ile* variant, decreasing its affinity for electrophilic compounds and its ability of detoxification, which potentially results in an accumulation of these compounds [7, 10].

Concerning the *GSTM1 null* polymorphism, no significant difference was observed on our analysis. However, we observed a significantly higher frequency of *GSTT1* homozygous null individuals among SSc patients. The combined analysis also revealed a higher frequency of double-null individuals among patients as compared to controls. Previous studies investigated the role of *GSTT1* and *GSTM1* genes in SSc susceptibility, but no association were observed concerning these polymorphisms [19, 40]. However, in the study performed by Palmer et al, the combination of *GSTT1 null*, *GSTM1 null* and *Val/Val GSTP1* genotypes (GST-) was correlated positively with the

presence of carotid artery disease among SSc patients, but no association was reported concerning GST– frequency in SSc susceptibility.

ROS and electrophilic metabolites can damage the endothelium, as well as up regulate the production of inflammatory and fibrogenic cytokines and adhesion molecules [22]. A hypothesis to explain the results of this study is that individuals who do not express the *GSTT1* enzyme have an increased risk of developing SSc, as compared to individuals with at least one functional allele of *GSTT1*. This risk increases to almost 5 half-fold in presence of *GSTM1 null* genotype. Therefore, the inefficiency in detoxifying by *GSTT1* and *GSTM1* enzymes may contribute for the direct injury to endothelial cells and be involved in the triggers of some of the vascular abnormalities observed in SSc, as well as immunological alterations and fibrosis. On the other hand, the **1A/*1A* genotype from *CYP1A1*2C* polymorphism may to protect from SSc development, due its ability to produce minor amounts of electrophilic metabolites.

To our knowledge, this is the first study that examined the association of the genetic polymorphisms in genes of CYP and GST enzymes in a sample of SSc Brazilian patients. The small sample size is a limitation of the present study, whereas the statistical power to detect significant differences was up 42%. However, we should consider the scarcity of information about this disease and its low frequency in Brazil, highlighting the need for epidemiological studies.

In conclusion, this study suggests that *GSTT1* null genotype alone or combined with *GSTM1* null genotype is a susceptibility genetic factor to SSc, whereas the **1A/*1A* genotype from *CYP1A1*2C* polymorphism may to protect from SSc development in Brazilian European-derived individuals.

Acknowledgments: The authors thank the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for the financial support.

References

1. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK (2011) The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 6:509–537
2. Agarwal SK, Reveille JD (2010) The genetics of scleroderma (systemic sclerosis). *Curr Opin Rheumatol* 22:133–138
3. Assassi S, Junco D, Sutter K et al (2009) Clinical and Genetic Factors Predictive of Mortality in Early Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum* 61:1403–1411
4. Cepeda EJ, Reveille JD (2004) Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Curr Opin Rheumatol* 16:723–732
5. Hamaguchi Y (2010) Autoantibody profiles in systemic sclerosis: Predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol* 37: 42–53
6. Rohr P, Veit TD, Scheibel I et al (2008) GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 26:151–155
7. Autrup H (2000) Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 464:65–76
8. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2010) Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154:103–116
9. Laborde E (2010) Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* 17:1373–1380
10. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51–88
11. Deka M, Bose M, Baruah B et al (2010) Role of CYP2E1 gene polymorphisms association with hepatitis risk in Northeast India. *World J Gastroenterol* 16:4800–4808
12. Liu Y, Meng XW, Zhou LY et al (2009) Genetic polymorphism and mRNA levels of cytochrome P450IIE1 and glutathione S-transferase P1 in patients with alcoholic liver disease in different nationalities. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8:162–167
13. Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M et al (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

14. Unsal T, Konac E, Yesilkaya E et al (2009) Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* 26:205–216
15. Sharma R, Ahuja M, Panda NK et al (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
16. Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA, Breitenfeld L (2011) Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population. *Mol Cell Biochem* 355:265–271
17. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S et al (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482:21–26
18. Mo Z, Gao Y, Cao Y et al (2009) An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate* 69:662–688
19. Tew MB, Reveille JD, Arnett FC et al (2001) Glutathione S-transferase genotypes in systemic sclerosis and their association with clinical manifestations in early disease. *Genes Immun* 2:236–238
20. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr et al (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 142:w13659
21. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G et al (2008) Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. *Semin Immunopathol* 30:329–337
22. Yamamoto T (2011) Autoimmune mechanisms of scleroderma and a role of oxidative stress. *Self/Nonsel* 2:4–10
23. Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK (2011) The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 6:509–537
24. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R et al (1988) Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15:202–205
25. LeRoy EC, Medsger TA Jr (2001) Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 28:1573–1576
26. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T et al (2009) Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 18:424–430

27. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM et al (2006) Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 39:321–325
28. Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG et al (2004) Nailfold capillary microscopy can suggest pulmonary disease activity in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 31:286–94
29. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444
30. Cascorbi I, Brockmoller J, 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
31. Kato S, Shields PG, Caporaso NE et al (1992) Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 52:6712–6715
32. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF et al (1993) 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* 85:1159–1164
33. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D et al (1997) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 18:641–644
34. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR et al (1994) Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 (Pt 1):271–276
35. Gaspar P, Moreira J, Kvitko K et al (2004) CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genet Mol Biol* 27: 133–38
36. Shimada T (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 21:257–76
37. Hussain T, Al-Attas OS, Al-Daghri NM et al (2014) Induction of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, increased oxidative stress and inflammation in the lung and

liver tissues of rats exposed to incense smoke. *Mol Cell Biochem.* doi: 10.1007/s11010-014-1995-5

38. von Schmiedeberg S, Fritsche E, Rönnau AC et al (1999) Polymorphisms of the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1 and NAT-2 in systemic sclerosis and lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 455:147–52
39. Povey A, Guppy MJ, Wood M et al (2001) Cytochrome P2 polymorphisms and susceptibility to scleroderma following exposure to organic solvents. *Arthritis Rheum* 44:662–5
40. Palmer CN, Young V, Ho M et al (2003) Association of common variation in glutathione S-transferase genes with premature development of cardiovascular disease in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 48:854–55

TABLES

Table 1: Demographic, clinical, and laboratorial data of SSc patients

Features	SSc patients (n=99)
Age (years) mean \pm SD	49.7 \pm 14.9
Female sex	87 (88)
Raynaud's phenomenon	99 (100)
Mean disease duration	12.17 \pm 10.44
Subtypes	
dcSSc	25 (25.3)
lcSSc	59 (59.6)
ssSSc	15 (15.1)
Calcinosis	22 (22.2)
Telangiectases	67 (67.7)
ANA \geq 1:80	85 (85.9)
Anti-centromere antibodies	40 (40.4)
Anti-topoisomerase I antibodies	22 (22.2)
Pulmonary fibroses*	52 (52.6)
Reduced FVC*	33 (36.3)
Interstitial lung disease on HRCT*	62 (66)
Pulmonary arterial hypertension*	12 (13.3)
Reduced DLCO*	77 (85.6)

Data are presented as numbers (percentages in parentheses), except as otherwise indicated.

*Data not available for all patients.

dcSSc: diffuse cutaneous SSc; lcSSc: limited cutaneous SSc; ssSSc: sine-scleroderma SSc; ANA: anti-nuclear antibodies; FVC: forced vital capacity; DLCO: carbon monoxide diffusing capacity; HRCT: high resolution computed tomography.

Table 2: Genotypic and allelic frequencies of *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* polymorphisms in Southern Brazilian SSc patients and controls.

	Patients (n=99)	Controls (n=238)
<i>CYP1A1*2C</i>	N (freq.)	N (freq.)
Genotypes ^a		
*1A/*1A	61 (0.61) ^a	177 (0.74)
*1A/*2C	33 (0.33)	57 (0.24)
*2C/*2C	5 (0.05)	4 (0.02)
Alleles ^b		
*1A	155 (0.78) ^b	411 (0.86)
*2C	43 (0.22)	65 (0.14)
	Patients (n=90)	Controls (n=236)
<i>CYP2E1*5B</i>	N (freq.)	N (freq.)
Genotypes ^c		
*1A/*1A	73 (0.81)	207 (0.88)
*1A/*5B	17 (0.19)	28 (0.12)
*5B/*5B	0 (0.00)	1 (0.004)
Alleles ^d		
*1A	163 (0.91)	442 (0.94)
*5B	17 (0.09)	30 (0.06)

^a SSc patients vs. controls: χ^2 P=0.03. Adjusted residuals P=0.019

^b SSc patients vs. controls χ^2 with Yates P=0.013; OR=0.75 (95% CI 0.36–0.90)

^{c, d} No significance difference between groups P>0.05

Table 3: Genotypic and allelic frequencies of *GSTP1 Ile105Val* polymorphism in SSc patients and healthy controls

	Patients (n=99)	Controls (n=237)
<i>GSTP1 Ile105Val</i>	N (freq.)	N (freq.)
Genotypes ^a		
<i>Ile/Ile</i>	35 (0.35)	102 (0.43)
<i>Ile/Val</i>	53 (0.54)	114 (0.48)
<i>Val/Val</i>	11 (0.11)	21 (0.09)
Alleles ^b		
* <i>Ile</i>	123 (0.62)	318 (0.67)
* <i>Val</i>	75 (0.38)	156 (0.33)

^{a,b} No significance difference between groups P>0.05

Table 4: Frequencies of *GSTT1 null*, *GSTM1 null*, and double-null genotypes in SSc patients and healthy controls

	Patients (n=99)	Controls (n=241)
	N (freq.)	N (freq.)
<i>GSTT1</i>		
GSTT1 null	29 (0.29) ^a	44 (0.18)
GSTT1 non-null	70 (0.71)	197 (0.82)
<i>GSTM1</i> ^b		
GSTM1 null	62 (0.63)	129 (0.53)
GSTM1 non-null	37 (0.37)	112 (0.47)
<i>GSTT1 + GSTM1</i>		
GSTT1 + GSTM1 null	19 (0.19) ^c	20 (0.08)
Other genotypes	80 (0.81)	221 (0.92)

^aSSc vs. controls χ^2 with Yates P=0.035; OR=1.85 (95% CI 1.03 –3.29)

^bSSc vs. controls χ^2 with Yates P=0.157

^cSSc vs. controls χ^2 with Yates P=0.007; OR=2.62 (95% CI 1.25 –5.46)

4. DISCUSSÃO DA DISSERTAÇÃO

CYP e GST na DII

A DII possui dois principais subtipos clínicos, a DC e a RCU, definidos assim com base em características clínicas, histológicas, radiológicas e endoscópicas. Como a DC e a RCU possuem características únicas que as diferenciam, isto pode ser consequência de diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos em cada subtipo da doença. Atualmente, está muito bem documentado que interações complexas entre fatores genéticos e ambientais estão envolvidas na sua patogênese (Xavier & Podolsky, 2007; Cho, 2008; Matricon *et al.*, 2010; Khor *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2011; Scharl & Rogler, 2012).

Enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos exercem um papel muito importante protegendo o nosso organismo dos danos decorrentes da exposição a fatores ambientais (Liska, 1998; Autrup, 2000). A susceptibilidade a ação dos xenobióticos pode ser devida a características genéticas individuais, sendo que a falha na detoxificação de compostos eletrofílicos ou a exagerada capacidade de biotransformação de xenobióticos em compostos eletrofílicos leva ao aumento da produção de ROS (Roediger, 1997), podendo desempenhar um papel na etiologia ou exacerbação de doenças. Além disso, evidências sugerem que a produção aumentada de compostos eletrofílicos e ROS pode causar danos direto à mucosa intestinal, levando também a exacerbação de processos inflamatórios. A inflamação aumenta a geração de ROS e estresse oxidativo, que por sua vez podem regular positivamente a expressão de citocinas inflamatórias, levando a um “círculo vicioso” (Zhu & Li, 2012). Estes eventos podem contribuir para a gênese e/ou progressão da doença.

Este trabalho foi o primeiro a investigar o papel de variantes polimórficas nos genes *CYP1A1* e *CYP2E1* (Fase I), e nos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* (Fase II) em indivíduos com DII e indivíduos saudáveis eurodescendentes do Sul do Brasil. Outros estudos já foram realizados com pacientes europeus, chineses, indianos e turcos, sendo que os resultados são controversos.

A frequência do polimorfismo de presença/ausência de *GSTT1* e *GSTM1*, bem como as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos *GSTP1 Ile105Val*, *CYP1A1*2C* e *CYP2E1*5B* no grupo de indivíduos saudáveis do presente estudo estão

de acordo com as frequências previamente reportadas por Kvitko *et al* (2006) para uma população caucasiana saudável de Porto Alegre.

No presente estudo, uma frequência significativamente aumentada do genótipo nulo de *GSTT1* foi observada entre os pacientes com DII quando comparado aos controles, e este resultado está de acordo com os obtidos para uma amostra de pacientes árabes muçulmanos e indianos (Karban *et al.*, 2011; Mittal *et al.*, 2007). No entanto, quando nossa amostra de pacientes foi subdividida em DC e RCU, a frequência de indivíduos homozigotos nulos para *GSTT1* foi estatisticamente significativa apenas entre os pacientes com RCU. Este resultado está de acordo com um estudo realizado por Duncan e cols. (1995) com pacientes caucasianos com RCU. De fato, não foram observadas diferenças significativas na frequência do polimorfismo de presença/ausência de *GSTMI* entre os grupos de pacientes e o grupo controle no presente estudo, em contraponto aos resultados obtidos pelos estudos realizados com indivíduos indianos, chineses e turcos, onde o genótipo nulo de *GSTMI* foi associado à susceptibilidade a RCU. A discordância dos nossos resultados pode ser explicada pelos diferentes *backgrounds* genéticos das populações estudadas, sendo que a associação do genótipo nulo de *GSTMI* não foi observada em outros dois estudos com pacientes caucasianos da Europa com RCU e DC (Duncan *et al.*, 1995; de Jong *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos no presente trabalho, bem como os resultados reportados previamente por outros pesquisadores, sugerem que indivíduos com o genótipo homozigoto nulo de *GSTT1* têm um risco aumentado para o desenvolvimento da DII, sendo que este genótipo pode estar envolvido na definição do curso da doença para a RCU. Uma hipótese para esta associação é que o acúmulo de estressores, como compostos eletrofílicos reativos e ROS, juntamente com outros fatores genéticos de susceptibilidade e a exposição a fatores ambientais, podem causar danos diretos à mucosa do intestino e levar ao desenvolvimento da DII. Interessantemente, já foi reportado que ROS, bem como outros estressores, estão envolvidos na via de ativação do Fator Nuclear kappa Beta, NF-κB (do inglês, *nuclear factor kappa Beta*). NF-κB é um importante fator de transcrição que regula respostas inflamatórias, sendo que a ativação inapropriada de NF-κB já foi associada a muitas doenças inflamatórias e câncer, como por exemplo, aterosclerose, artrite, DII e doença de Alzheimer (Rahman & Fazal, 2011). No epitélio intestinal, NF-κB está envolvido na homeostase imunológica e na modulação da permeabilidade da barreira intestinal. No entanto, a

hiperativação de NF-κB pode induzir a transcrição de vários genes que codificam citocinas envolvidas na patogênese da DII, levando a inflamação crônica e recorrente, considerando que o aumento de ROS nos tecidos poderia explicar parcialmente a ativação crônica de NF-κB na DII (Biasi *et al.*, 2013). Com base neste referencial teórico, é plausível sugerir que acúmulo de compostos eletrofílicos e ROS (derivados de algum xenobiótico não identificado neste estudo) não detoxificados pela enzima GSTT1, poderia causar danos ao epitélio intestinal. Além disso, estes metabólitos podem ativar o fator NF-κB e estimular a transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da DII e genes específicos relacionados à RCU, desta maneira direcionando o curso da doença para a RCU (Figura 5).

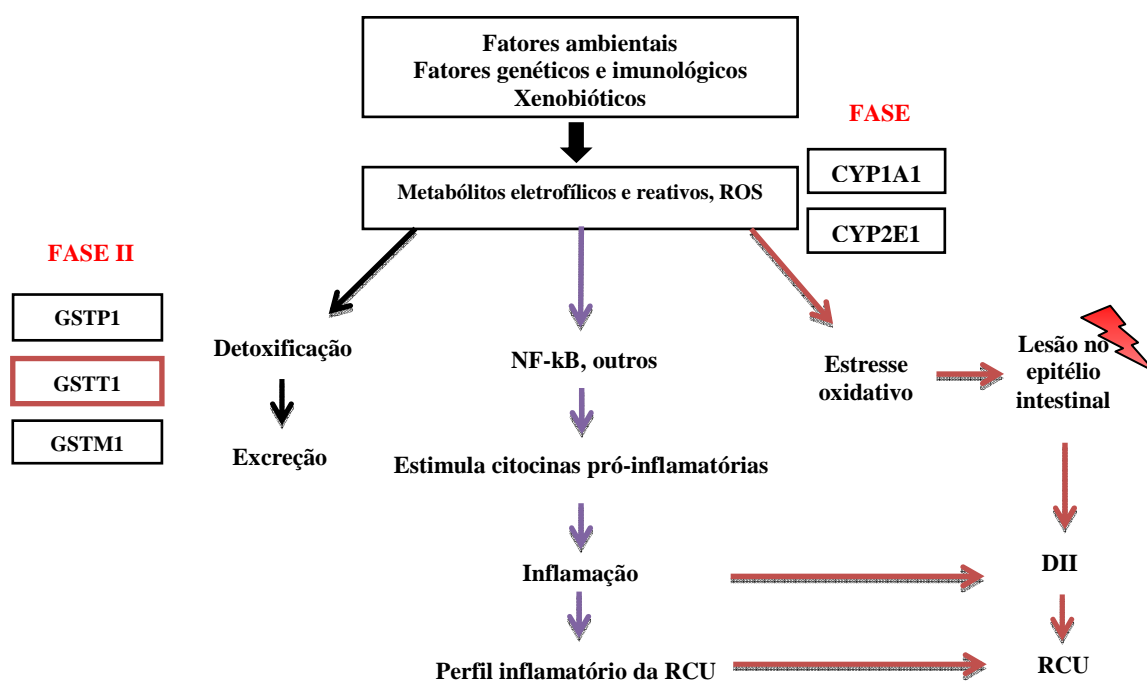


Figura 5: Hipótese de como o acúmulo de compostos eletrofílicos e ROS pode levar ao desenvolvimento da DII, direcionando o curso da doença para a RCU.

A respeito do polimorfismo *GSTP1 Ile105Val*, no presente estudo as frequências alélicas e genótípicas foram similares entre os três grupos de pacientes quando comparados ao grupo controle (Tabela 2 do artigo) e isso foi previamente reportado no estudo de Jong *et al.* Contrariamente ao estudo chinês (Ye *et al.*, 2011), a frequência de indivíduos com o genótipo *Val/Val* de *GSTP1* foi significativamente maior no grupo de

pacientes RCU do que no grupo controle e, além disso, a frequência desse genótipo foi maior em indivíduos sofrendo de RCU distal do que difusa, sugerindo que este polimorfismo desempenha um papel na susceptibilidade à RCU em indivíduos de ascendência chinesa, mas não em indivíduos eurodescendentes, mais uma vez salientando a importância de considerar os diferentes *backgrounds* genéticos das populações.

O estudo de Jong *et al.* foi o primeiro a avaliar o papel do polimorfismo *CYP1A1*2C* na susceptibilidade a DII. Assim como o estudo citado, no presente trabalho, as frequências genótípicas e alélicas (Tabela 1 do artigo) não foram significativamente diferentes quando comparamos os três grupos de pacientes com o grupo controle, sugerindo, até o momento, que este polimorfismo não desempenha um papel na susceptibilidade e/ou progressão da DII.

Este estudo foi o primeiro a investigar o papel do polimorfismo *CYP2E1*5B* na DII. Nossas análises não apontaram para diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas e genótípicas dos três grupos de pacientes quando comparados ao grupo controle (Tabela 1 do artigo). Interessantemente, as frequências genótípicas observadas no grupo de pacientes com DII não estavam de acordo com as frequências esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Uma explicação plausível para este desequilíbrio pode ser o possível e relevante papel deste polimorfismo em uma amostra de indivíduos não saudáveis (Balding, 2006), considerando que o genótipo mutante **5B/*5B* foi observado com uma frequência maior do que a esperada. O polimorfismo *CYP2E1*5B* está localizado na região 5' reguladora da transcrição. Estudos anteriores reportaram que a transversão de G→C aumenta em até dez vezes a transcrição do gene, o que pode resultar em uma alta atividade catalítica da enzima e aumento do estresse oxidativo nas células (Uematsu *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2009; Deka *et al.*, 2010).

O tamanho amostral pequeno é uma limitação do presente estudo, no entanto, apesar de a DII ter altas taxas de incidência e prevalência em certas partes do mundo, no Brasil ela ainda é uma doença pouco comum. Seria interessante correlacionar dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com os genótipos, pois como demonstrado em outros estudos, estas variantes polimórficas podem estar associadas a diferentes características da doença, como gravidade e localização da inflamação.

Em conclusão, o presente estudo sugere que o genótipo nulo de *GSTT1* é um fator genético de susceptibilidade para a DII e pode estar envolvido na definição do curso da doença para a RCU, em indivíduos brasileiros eurodescendentes.

CYP e GST na ES

A ES é uma grave doença autoimune com subtipos clínicos baseados no envolvimento cutâneo: EScl, EScd e ESs (LeRoy *et al.*, 1988; LeRoy & Medsger, 2001; Hunzelmann *et al.*, 2008). Assim como na DII, a etiologia da ES não é totalmente conhecida, mas a sua complexidade sugere que fatores genéticos, ambientais e imunológicos participam da sua patogênese (Varga & Abraham, 2007; Bolster & Silver 2008; Castro & Jimenez, 2010). Diversos estudos têm investigado o papel da genética na predisposição a ES e polimorfismos em genes já foram associados à doença, como por exemplo, nos genes *HLA*, *STAT4*, *IRF5*, *PTPN22*. O estresse oxidativo vem sendo reportado como um fator importante para o desenvolvimento da ES, visto que poderia contribuir para as primeiras manifestações patológicas da doença (Katsumoto *et al.*, 2010; Yamamoto, 2011).

Variantes polimórficas nos genes CYP e GST podem codificar enzimas com atividade catalítica alterada ou ausente e, desta forma, modular o risco de desenvolvimento de diversas doenças (Uematsu *et al.*, 1991; Mo *et al.*, 2001; Strange *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2005; ; Liu *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010; Unsal *et al.*, 2009; Deka *et al.*, 2010; Ramalhinho *et al.*, 2011). Com o objetivo de verificar se existe associação de polimorfismos em genes codificantes de enzimas de biotransformação de xenobióticos na susceptibilidade à ES, foram analisamos 139 pacientes com ES, sendo 99 eurodescendentes e 23 afrodescendentes, bem como 329 indivíduos saudáveis, como controles, sendo 241 eurodescendentes e 87 afrodescendentes.

A amostra original de pacientes com ES e controles saudáveis era constituída de indivíduos afrodescendentes e eurodescendentes. Sabe-se que a frequência dos polimorfismos estudados nos genes CYP e GST difere significativamente entre os grupos étnicos (Gaspar *et al.*, 2004). Por este motivo, todas as análises foram realizadas subdividindo o grupo de pacientes e controles de acordo com a sua origem étnica. No entanto, a amostra de pacientes com ES e controles saudáveis afrodescendentes era muito pequena (23 pacientes e 87 controles), o que implica em um poder estatístico muito baixo para as análises. Portanto, nós comparamos as frequências alélicas e

genotípicas dos polimorfismos estudados entre pacientes e controles (dados não mostrados), mas sem analisar os dados clínicos dos pacientes. Como resultados, não foram observadas qualquer associação dos polimorfismos em CYP e GST com a susceptibilidade a ES nesta amostra de indivíduos afrodescendentes ($P > 0,05$).

A Tabela 1 do artigo apresenta os dados clínicos, demográficos e laboratoriais dos pacientes eurodescendentes com ES.

No presente estudo, uma frequência significativamente aumentada do genótipo **IA/*IA*, bem como do alelo **IA* do polimorfismo *CYP1A1*2C* foi observada entre os indivíduos do grupo controle. Em contrapartida, a frequência do alelo **2C* estava significativamente aumentada entre os pacientes com ES (Tabela 2 do artigo). Foi previamente reportado que o alelo **2C* aumenta a atividade catalítica da enzima, o que resulta em uma alta atividade de metabolização, gerando grandes quantidades de metabólitos eletrofilicos (Autrup, 2000). Além disso, os compostos intermediários formados através da atividade de metabolização das enzimas CYP podem ser mais tóxicos do que a substância original que foi metabolizada (Shimada, 2006; Hussain *et al.*, 2014). O único estudo que investigou o papel do polimorfismo *CYP1A1*2C* na susceptibilidade a ES não encontrou qualquer associação (von Schmiedeberg *et al.*, 1999). Assim, o genótipo **IA/*IA* pode ser um fator genético de proteção contra o desenvolvimento da ES, uma vez que a presença deste genótipo está associada a uma baixa atividade de metabolização de xenobióticos.

Não foram observadas diferenças nas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *CYP2E1*5B* entre pacientes e controles (Tabela 2 do artigo). Este é o primeiro estudo que investigou a possível associação do polimorfismo *CYP2E1*5B* no desenvolvimento da ES. No entanto, em um estudo realizado por Povey e cols. (2001), o alelo **3* do polimorfismo *CYP2E1*3*, também localizado na região 5' reguladora do gene *CYP2E1*, foi observado em dois dos sete pacientes que foram expostos à solventes orgânicos antes do desenvolvimento da doença. Embora não tenhamos observado associação do polimorfismo *CYP2E1*5B* na ES, não se deve excluir a possibilidade de que outros polimorfismos neste gene possam influenciar no desenvolvimento da doença.

Nenhuma associação foi observada com relação ao polimorfismo *GSTP1 Ile105Val* entre pacientes e controles no presente estudo (Tabela 3 do artigo). Em contraste, em um estudo realizado por Palmer e cols. (2003), foi observada uma frequência aumentada de ambos os heterozigotos e os homozigotos para o alelo **Val*

entre pacientes com ES. A variante *Val parece conferir uma atividade catalítica reduzida às enzimas quando comparada a variante *Ile, diminuindo a sua afinidade por compostos eletrofílicos e a sua habilidade de detoxificação, resultando no acúmulo destes compostos (Autrup, 2000 Hayes *et al.*, 2005).

Uma maior frequência de indivíduos homocigotos nulos para *GSTT1* foi observada no grupo de pacientes com ES (Tabela 4 do artigo). Com relação ao polimorfismo *GSTM1* nulo, nenhuma associação foi observada. A análise combinada de homocigotos para ambas as deleções de *GSTT1* e *GSTM1* mostrou uma frequência significativamente aumentada de indivíduos duplo-nulos no grupo de pacientes quando comparado ao grupo controle. O estudo de Tew *et al.* (2001) verificou a possível associação dos polimorfismos de presença/ausência dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes caucasianos com ES, mas este não reportou associação. Entretanto, pacientes homocigotos nulos para *GSTM1* foram menos propensos do que aqueles com pelo menos um alelo funcional de *GSTM1* a terem anticorpos anti-RNP, mas esta diferença não foi significativa após a correção para comparações múltiplas. Pacientes homocigotos nulos tanto para *GSTT1* quanto para *GSTM1* tinham uma forte tendência de possuírem autoanticorpos ACA, mas essa diferença também não foi significativa. Palmer *et al.* (2003) também analisaram os polimorfismos de presença/ausência de *GSTT1* e *GSTM1* na susceptibilidade a ES e reportam frequências genóticas similares entre pacientes e controles. No entanto, a combinação dos genótipos *GSTT1* nulo, *GSTM1* nulo e *GSTP1 Val/Val* (GST-) correlacionou-se positivamente com a doença arterial coronariana na ES, embora a frequência de indivíduos GST- tenha sido similar entre pacientes e controles.

ROS e metabólitos eletrofílicos podem causar dano ao endotélio, bem como aumentar a produção moléculas de adesão e citocinas inflamatórias e fibrogênicas (Yamamoto, 2011). A hipótese para explicar os resultados do presente estudo é que indivíduos que não expressão a enzima GSTT1 tem um risco aumentado para o desenvolvimento da ES quando comparados a indivíduos que possuem pelo menos um alelo funcional de *GSTT1*. Este risco aumenta para quase cinco vezes e meia na presença do genótipo nulo de *GSTM1*. Portanto, a ineficiência na detoxificação de substâncias eletrofílicas e reativas pelas enzimas GSTT1 e GSTM1, poderia levar ao dano direto às células endoteliais e estar envolvida no desencadeamento de algumas anormalidades vasculares observadas na ES, bem como nas alterações imunológicas e

na fibrose. Por outro lado, o genótipo **1A/*1A* do polimorfismo *CYP1A1*2C* poderia proteger do desenvolvimento da ES, devido a sua habilidade em produzir uma menor quantidade de metabólitos eletrofílicos.

Este é o primeiro estudo que examinou o papel dos polimorfismos em genes que codificam enzimas CYP e GST em uma amostra de indivíduos brasileiros com ES. O tamanho amostral reduzido, principalmente no grupo de indivíduos afrodescendentes, é uma limitação do presente estudo, no entanto, devemos considerar que a ES é uma doença rara, inclusive no Brasil, e que carece de estudos epidemiológicos.

Concluindo, o presente estudo sugere que o genótipo nulo de *GSTT1* sozinho ou em combinação com o genótipo nulo de *GSTM1* é um fator genético de susceptibilidade para a ES em indivíduos eurodescendentes. Por outro lado, o genótipo **1A/*1A* ou a presença do alelo **1A* do polimorfismo *CYP1A1*2C* poderia proteger do desenvolvimento da ES.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham DJ and Varga J (2005) Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 28:587-595.

Agarwal SK and Reveille JD (2010) The genetics of scleroderma (systemic sclerosis). *Curr Opin Rheumatol* 22:133-138.

Allarone Y, Saad M, Dieudé P, Avouac J, Distler JH, Amouyel P, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Airo P, Melchers I et al.(2011) Genome-widescan identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis. *PLoS Genet* 7: e1002091.

Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A (2010) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 43:246-252.

Andersson RE, Olaison G, Tysk C and Ekbom A (2003) Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterol* 124:40-46.

Arias-Nuñez MC, Llorca J, Vazquez-Rodriguez TR, Gomez-Acebo I, Miranda-Filloo JA, Martin J, Gonzalez-Juanatey C and Gonzalez-Gay MA (2008) Systemic sclerosis in northwestern Spain: a 19-year epidemiologic study. *Medicine* 87:272-280.

Arnett FC, Gourh P, Shete S, Ahn CW, Honey RE, Agarwal SK, Tan FK, McNearney T, Fischbach M, Fritzler MJ et al.(2010) Major Histocompatibility Complex (MHC) class II alleles, haplotypes, and epitopes which confer susceptibility or protection in the fibrosing autoimmune disease systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis* 69:822-827.

Arnett FC, Howard RF, Tan F, Moulds JM, Bias WB, Durban E, Cameron HD, Paxton G, Hodge TJ, Weathers PE et al.(1996) Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum* 39:1362-1370.

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

Balaji L, Singh KB, Bhaskar LV (2012) CYP1A1 genotypes and haplotypes and risk of oral cancer: A case-control study in South Indians. *Genet Mol Biol* 35:407-412.

Balding DJ (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 7:781-791.

Baptista ML, Amarante H, Picheth G, Sdepanian VL, Peterson N, Babasukumar U, Lima HC and Kugathasan S (2008) CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm Bowel Dis* 14:674-679.

Barnes J and Mayes MD (2012) Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 24:165-170.

Bastida G and Beltrán B (2011) Ulcerative colitis in smokers, non-smokers and ex-smokers. *World J Gastroenterol* 17:2740-2747.

Baumgart DC (2009) The Diagnosis and Treatment of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Dtsch Arztebl Int* 106:123-133.

Baumgart DC and Carding SR (2007) Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369:1627-1640.

Baumgart DC and Sandborn WJ (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369:1641-1657.

Berkhout M, Friederich P, van Krieken JH, Peters WH and Nagengast FM (2006) Low detoxification capacity in the ileal pouch mucosa of patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 12:112-116.

Bernardo D, Sánchez B, Al-Hassi HO, Mann ER, Urdaci MC, Knight SC and Margolles A (2012) Microbiota/host crosstalk biomarkers: regulatory response of human intestinal dendritic cells exposed to *Lactobacillus* extracellular encrypted peptide. *PLoS One* 7:e36262.

Biasi F, Leonarduzzi G, Oteiza PI and Poli G (2013) Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms, Redox Considerations and Therapeutic Targets. *Antioxid Redox Signal* 11.

Bolster MB and Silver RM (2008) Clinical features of systemic sclerosis. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (eds) *Rheumatology*. Mosby Elsevier, Philadelphia, pp 1375-1385.

Božina N, Bradamante V and Lovrić 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.

Brant SR (2011) Update on the Heritability of Inflammatory Bowel Disease: The Importance of Twin Studies. *Inflamm Bowel Dis* 17:1-5.

Broen JCA, Coenen MJH and Radstake TRDJ (2012) Genetics of Systemic Sclerosis: An Update. *Curr Rheumatol Rep* 14:11-21.

Buyukgoze O, Osmanoglu N, Arslan S, Sen A (2012) Association of the CYP1A1*2A, GSTT1 null, GSTM1 null, mEPHX*3, and XRCC1-399 genetic polymorphisms with ulcerative colitis. *Editorial Int J Colorectal Dis*

Castro SV and Jimenez SA (2010) Biomarkers in systemic sclerosis. *Biomarkers Med* 4:133-114.

Cepeda EJ and Reveille JD (2004) Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Curr Opin Rheumatol* 16:723-732.

Chaudhary P, Chen X, Assassi S, Gorlova O, Draeger H, Harper BE, Gonzalez E, McNearney T, Perry M, Arnett FC et al.(2011) Cigarette smoking is not a risk factor for systemic sclerosis. *JT Arthritis Rheum* 63:3098-3102.

Cho, JH (2008) The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 8:458-466.

Circu ML and Aw TY (2011) Redox biology of the intestine. *Free Radic Res* 45:1245-1266.

Clapper ML, Adrian RH, Pfeiffer GR, Kido K, Everley L, Cooper HS and Murthy S (1999) Depletion of colonic detoxication enzyme activity in mice with dextran sulphate sodium-induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 13:389-396.

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.

de Jong DJ, van der Logt EM, van Schaik A, Roelofs HM, Peters WH and Naber TH (2003) Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes in Crohn's disease: association with microsomal epoxide hydrolase. *Gut* 52:547-551.

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.

Dieudé P, Dawidowicz K, Guedj M, Legrain Y, Wipff J, Hachulla E, Diot E, Sibilia J, Mouthon L, Cabane J et al.(2010) Phenotype-haplotype correlation of IRF5 in systemic sclerosis: role of 2 haplotypes in disease severity. *J Rheumatol* 37:987-992.

Dieudé P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Hachulla E, Diot E, Granel B, Sibilia J, Tiev K, Mouthon L et al.(2009) STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 60:2472–2479.

Diot E, Lesire V, Guilmot JL, Metzger MD, Pilore R, Rogier S, Stadler M, Diot P, Lemarie E and Lasfargues G (2002) Systemic sclerosis and occupational risk factors: a case–control study. *Occup Environ Med* 59:545-549.

Dubinsky MC, Taylor K, Targan SR and Rotter JI (2006) Immunogenetic phenotypes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 12:3645-3650.

Duncan H, Swan C, Green J, Jones P, Brannigan K, Alldersea J, Fryer AA and Strange RC (1995) Susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: interactions between glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes. *Clin Chim Acta* 240:53-61.

Economopoulos KP and Sergentanis TN (2010) GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: A comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer* 46:1617-1631.

Farhat SC, Silva CA, Orione MA, Campos LM, Sallum AM and Braga AL (2011) Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmun Rev* 11:14-21.

Feghali-Bostwick C, Medsger TA and Wright TM (2003) Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheumatology*. 48:1956-1963.

Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R et al.(2010) Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42:1118-1125.

Gabrielli A, Avvedimento EV and Krieg T (2009) Scleroderma. *N Engl J Med* 360:1989-2003.

Gaspar P, 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.

Gemma S, Vichi S and Testai E (2006) Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. *Ann Ist Super Sanita* 42:8-16.

Gologan S, Iacob R, Preda C, Vadan R, Cotruta B, Catuneanu AM, Iacob S, Constantinescu I, Gheorghe L, Iobagiu S et al.(2012) Higher titers of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies IgA and IgG are associated with more aggressive phenotypes in Romanian patients with Crohn's disease. *J Gastrointestin Liver Dis* 21:39-44.

Gorlova O, Martin JE, Rueda B, Koeleman BP, Ying J, Teruel M, Diaz-Gallo LM, Broen JC, Vonk MC, Simeon CP et al.(2011) Identification of Novel Genetic Markers Associated with Clinical Phenotypes of Systemic Sclerosis through a Genome-Wide Association Strategy. *PLoS Genet* 7: e1002178.

Gourh P, Agarwal SK, Divecha D, Assassi S, Paz G, Arora-Singh RK, Reveille JD, Shete S, Mayes MD, Arnett FC et al.(2009) Polymorphisms in TBX21 and STAT4 increase the risk of systemic sclerosis: evidence of possible gene-gene interaction and alterations in Th1/Th2 cytokines. *Arthritis Rheum* 60: 3794–3806.

Grassegger A, Pohla-Gubo G, Frauscher M and Hintner H. Autoantibodies in systemic sclerosis (scleroderma): clues for clinical evaluation, prognosis and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr* (2008) 158/1–2: 19–28

Greenstein RJ (2003) Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis* 3:507-514.

Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G and Gershwin ME (2008) The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*38:132–160.

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

Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Fazaeli A, Taheri M, Rezaei H, Mashhadi M, Arbabi F, Kaykhaei MA, Jahantigh M and Bahari G (2012) Association between polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer risk in a sample Iranian population. *Biomark Med* 6:797-803.

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

Hertervig E, Nilsson A and Seidegard J (1994) The expression of glutathione transferase mu in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 29:729-735.

Hoensch H, Peters WH, Roelofs HM and Kirch W (2006) Expression of the glutathione enzyme system of human colon mucosa by localization, gender and age. *Curr Med Res Opin* 6:1075-1083.

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

Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, Moinzadeh P, Müller-Ladner U, Pfeiffer C, Riemekasten G et al.(2008) The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford)* 47:1185-92.

Hussain T, Al-Attas OS, Al-Daghri NM et al (2014) Induction of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, increased oxidative stress and inflammation in the lung and liver tissues of rats exposed to incense smoke. *Mol Cell Biochem*. doi: 10.1007/s11010-014-1995-5.

Inoue H, Mishima K, Yamamoto-Yoshida S, Ushikoshi-Nakayama R, Nakagawa Y, Yamamoto K, Ryo K, Ide F, Saito I (2012) Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of EBV reactivation as a risk factor for Sjögren's syndrome. *J Immunol* 188:4654-4662.

Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Hikami K, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, et al.(2009) Association of a functional polymorphism in the IRF5 region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 60:1845-1850.

Jancova P, Anzenbacher P, and Anzenbacherova E (2010) Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154:103-116.

Jimenez SA and Derk CT (2004) Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Int Med* 140:37-50.

Josephy PD (2010) Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics* 2010:876940.

Kaminsky LS and Zhang QY (2003) The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug Metab Dispos* 31:1520-1525.

Karban A, Krivoy N, Elkin H, Adler L, Chowers Y, Eliakim R and Efrati E (2011) Non-Jewish Israeli IBD patients have significantly higher glutathione S-transferase GSTT1-null frequency. *Dig Dis Sci* 56:2081-2087.

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.

Katsumoto TR, Whitfield ML and Connolly MK (2011) The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 6:509-37.

Khor B, Gardet A and Xavier RJ (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474:307-317.

Kiruthiga PV, Kannan MR, Saraswathi C, Pandian SK, Devi KP (2011) CYP1A1 gene polymorphisms: lack of association with breast cancer susceptibility in the southern region (Madurai) of India. *Asian Pac J Cancer Prev* 12:2133-2138.

Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Takahashi H, Tada Y and Kyushu Sapporo SLE (KYSS) Study Group (2012) Risk modification by CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in the association of cigarette smoking and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Scand J Rheumatol* 41:103-109.

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.

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.

Laborde E (2010) Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* 17:1373-1380.

Lai R, Crevier L and Thabane L (2005) Genetic Polymorphisms of Glutathione S-Transferases and the Risk of Adult Brain Tumors: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1784-1790.

Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G and Lakatos PL (2004) Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol* 10:404-409.

Lakatos PL (2006) Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down? *World J Gastroenterol* 12:6102-6108.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M and Satsangi J (2011) New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 60:1739-1753.

Lennard-Jones JE (1989) Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 170:2-6.

LeRoy EC and Medsger TA Jr (2001) Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 28:1471-1473.

LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, Rowell N, Wollheim F (1988) Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J. Rheumatol* 15:202-205.

Li H, Xiao D, Hu L and He T (2012) Association of CYP1A1 polymorphisms with prostate cancer risk: an updated meta-analysis. *Mol Biol Rep* 39:10273-10284.

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.

Liska DJ (1998) The Detoxification Enzyme Systems. *Altern Med Rev* 3:187-198.

Liu Y, Meng XW, Zhou LY, Zhang PY, Sun X and Zhang P (2009) Genetic polymorphism and mRNA levels of cytochrome P450IIE1 and glutathione S-transferase P1 in patients with alcoholic liver disease in different nationalities. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8:162-167.

Mahurkar S, Banerjee R, Rani VS, Thakur N, Rao GV, Reddy DN and Chandak GR (2011) Common variants in NOD2 and IL23R are not associated with inflammatory bowel disease in Indians. *J Gastroenterol Hepatol* 26:694-699.

Matricon J, Barnich N and Ardid D (2010) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonsel* 1:299-309.

Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ and Schottenfeld D (2003) Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 48:2246-2255.

McCormic ZD, Khuder SS, Aryal BK, Ames AL and Khuder SA (2010) Occupational silica exposure as a risk factor for scleroderma: a meta-analysis. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 83:763-769.

Meyer OC, Fertig N, Lucas M, Somogyi N and Medsger TA Jr (2007) Disease subsets, antinuclear antibody profile, and clinical features in 127 French and 247US adult patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 34:104-109.

Ministério da Saúde do Brasil:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cp_01_esclerose_sistemica_2012_NOVO.pdf (November 16, 2012).

Mittal RD, Manchanda PK, Bid HK and Ghoshal UC (2007) Analysis of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in inflammatory bowel disease: study from northern India. *J Gastroenterol Hepatol* 22:920-924.

Mo Z, Gao Y, Cao Y, Gao F and Jian L (2009) An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review *Prostate* 69:662-688.

Múzes G, Molnár B, Tulassay Z and Sipos F (2012) Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 18:5848-5861.

Neuman MG and Nanau RM (2012) Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res* 160:29-44.

Nguyen C, Bérezné A, Baubet T, Mestre-Stanislas C, Rannou F, Papeard A, Morell-Dubois S, Revel M, Guillevin L, Poiraudau S et al.(2011) Association of gender with clinical expression, quality of life, disability, and depression and anxiety in patients with systemic sclerosis. *PLoS One* 6:e17551.

Nietert PJ, Mitchell HC, Bolster MB, Shaftman SR, Tilley BC and Silver RM (2006) Racial variation in clinical and immunological manifestations of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 33:263-268.

Nietert PJ, Sutherland SE, Silver RM, Pandey JP, Knapp RG, Hoel DG and Dosemeci M (1998) Is occupational organic solvent exposure a risk factor for scleroderma? *Arthritis Rheum* 41:1111-1118.

Nikpour M, Stevens WM, Herrick AL and Proudman SM (2010) Epidemiology of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24: 857-869.

Oliveira FM, Emerick AP and Soares EG (2010) Epidemiology aspects of inflammatory bowel disease in the east region of Minas Gerais State. *Cien Saude Colet* 15: 1031-1037.

Oliver JE and Silman AJ (2009) What epidemiology has told us about risk factors and aetiopathogenesis in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11:223.

Ollier W, Davies E, Snowden N, Alldersea 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.

Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP and Kyvik KO (2000) Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins: results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 35:1075-1081.

Palmer CN, Young V, Ho M, Doney A, 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.

Parker JC, Burlingame RW, Webb TT and Bunn CC (2008) Anti-RNA polymerase III antibodies in patients with systemic sclerosis detected by indirect immunofluorescence and ELISA. *Rheumatology* 47:976-979.

Parl FF (2005) Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 221:123-129.

Piram M, Maldini C and Mahr A (2012) Effect of race/ethnicity on risk, presentation and course of connective tissue diseases and primary systemic vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 24:193-200.

Pithadia AB and Jain S (2011) Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep* 63:629-642.

Podolsky, DK (2002) Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 347:417-429.

Poormoghim H, Lucas M, Fertig N and Medsger TA Jr (2000) Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 43:444-451.

Povey A, Guppy MJ, Wood M, Knight C, Black CM, Silman AJ (2001) Cytochrome P2 polymorphisms and susceptibility to scleroderma following exposure to organic solvents. *Arthritis Rheum* 44:662-665.

Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma) (1988) Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 23:581-590.

Queiroz DM, Oliveira AG, Saraiva IE, Rocha GA, Rocha AM, das Graças Pimenta SM, Guerra JB, Dani R, Ferrari ML, Castro LP (2009) Immune response and gene polymorphism profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 15:353-358.

Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, Green A, Newman B and Florin TH (2002) Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 51:808-813.

Radstake TR, Gorlova O, Rueda B, Martin JE, Alizadeh BZ, Palomino-Morales R, Coenen MJ, Vonk MC, Voskuyl AE, Schuerwegh AJ et al.(2010) Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet* 42:426-429.

Rahman A and Fazal F (2011) Blocking NF- κ B: An Inflammatory Issue. *Proc Am Thorac Soc* 8:497-503.

Ramalhinho AC, Fonseca-Moutinho JA and Breitenfeld L (2011) Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population. *Mol Cell Biochem* 355:265-271.

Ranque B and Mouthon L (2010) Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 9:A311-A318.

Reis AA, Silva DM, Curado MP and da Cruz AD (2010) Involvement of CYP1A1, GST, 72TP53 polymorphisms in the pathogenesis of thyroid nodules. *Genet Mol Res* 9:2222-2229.

Roediger B (1997) Human colonocyte detoxification. *Gut* 41:731-734.

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.

Romano E, Manetti M, Guiducci S, Ceccarelli C, Allanore Y and Matucci-Cerinic M (2011) The genetics of systemic sclerosis: an update. *Clin Exp Rheumatol* 29:S75-S86.

Rosa JE, Soriano ER, Narvaez-Ponce L, del Cid CC, Imamura PM and Catoggio LJ (2011) Incidence and prevalence of systemic sclerosis in a healthcare plan in Buenos Aires. *J Clin Rheumatol* 17:59-63.

Rueda B, Broen J, Simeon C, Hesselstrand R, Diaz B, Suárez H, Ortego-Centeno N, Riemekasten G, Fonollosa V, Vonk MC et al.(2009) The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet* 18:2071-2077.

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-Muñoz F, Dominguez-Lopez A and Yamamoto-Furusho JK (2008) Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14:4280-4288.

Santana GO, Lyra LGC, Santana TCA, Reis LB, Guedes JC, Toralles MB and Lyra AC (2007) Crohn's disease in one mixed-race population in Brazil. *World J Gastroenterol* 13:4489-4492.

Sartor RB (2005) Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* 54:896-898.

Scharl M and Rogler G (2012) Inflammatory bowel disease pathogenesis: what is new? *Curr Opin Gastroenterol* 28:301-309.

Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chéreau C, Vuiblet V, Guillevin L, Mouthon L, Weill B et al.(2009) Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol* 182:5855–5864.

Shimada T (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 21:257–76.

Shirahama R, Miyazaki Y, Okamoto T, Inase N and Yoshizawa Y (2010) Proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid in lung fibrosis associated with systemic sclerosis. *Allergol Int* 59:409-415.

Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C and Dröge W (1998) Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 42:485-492.

Siegmund B and Zeitz M (2011) Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 17:3178-3183.

Sierakowski S, Gińdzieńska-Sieśkiewicz E and Kowal-Bielecka O (2005) The importance of early diagnosis of systemic sclerosis. *Rocz Akad Med Białymst* 50:232-233.

Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF et al.(2006) European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *Gut* 55:1-15.

Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, Feakins R, Fléjou JF, Herfarth H, Hommes DW et al.(2008) European consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohn's And Colitis* 2:1-23.

Steen VD and Medsger TA (2007) Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972–2002. *Ann Rheum Dis* 66:940-944.

Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35:35-42.

Stocco G, Martelossi S, Barabino A, Decorti G, Bartoli F, Montico M, Gotti A and Ventura A (2007) Glutathione-S-transferase genotypes and the adverse effects of azathioprine in young patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 13:57-64.

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

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

Thompson AI and Lees CW (2011) Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17:831-848.

Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE and Wakefield AJ (1996) Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 312:95-96.

Tian Z, Li YL, Zhao L and Zhang CL (2012) CYP2E1 RsaI/PstI Polymorphism and Liver Cancer Risk among East Asians: a Huge Review and Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 13:4915-4921.

Tikly M, Marshall SE, Haldar NA, Gulumian M, Wordsworth P and Welsh KI (2004) Oxygen free radical scavenger enzyme polymorphisms in systemic sclerosis. *Free Radic Biol Med* 36:1403-1407.

Tsianos EV and Katsanos K (2009) Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean? *World J Gastroenterol* 15:521-525.

Tsuchiya N, Kawasaki A, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Hara M and Sato S (2009) Association of STAT4 polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* 68:1375-1376.

Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G and Floderus-Myrhed B (1988) Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29:990-996.

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.

Unsal T, Konac E, Yesilkaya E, Yilmaz A, Bideci A, Onen HI, Cinaz P and Menevse A (2009) Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* 26:205-216.

Varga J (2008) Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 66: 198-202.

Varga J and Abraham D (2007) Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 117:557-567.

Vermeire S, Assche GV and Rutgeerts P (2012) Classification of inflammatory bowel disease: the old and the new. *Curr Opin Gastroenterol* 28:321-326.

Victoria CR, Sassak LY and Nunes HR (2009) Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol* 46:20-25.

von Schmiedeberg S, Fritsche E, Rönnau 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.

White DL, Li D, Nurgalieva Z and El-Serag HE (2008) Genetic variants of glutathione-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGe systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 167:377-389.

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

Xavier RJ and Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448:427-434.

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.

Yamamoto T (2011) Autoimmune mechanisms of scleroderma and a role of oxidative stress. *Self/Nonsense* 2: 4-10.

Ye X, Jiang Y, Wang H, Chen L, Yuan S and Xia B (2011) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases are associated with ulcerative colitis in central China. *Cell Biochem Biophys* 60:323-328.

Zhan P, Wang Q, Qian Q, Wei SZ and Yu L (2011) CYP1A1 MspI and exon7 gene polymorphisms and lung cancer risk: An updated meta-analysis and review. *J Exp Clin Cancer Res* 30:99.

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.

Zhou X, Lee JE, Arnett FC, Xiong M, Park MY, Yoo YK, Shin ES, Reveille JD, Mayes MD, Kim JH et al.(2009) HLA-DPB1 and DPB2 are genetic loci for systemic

sclerosis: a genome-wide association study in Koreans with replication in North Americans. *Arthritis Rheum* 60:3807-3814.

Zhu H and Li YR (2012) Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence *Exp Biol Med* (Maywood)237:474-480.

Zuber JP and Spertini F (2006) Immunological basis of systemic sclerosis. *Rheumatol* 45:23-25.