

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA  
METABOLIZAÇÃO/DETOXIFICAÇÃO EM LÚPUS  
ERITEMATOSO**

MARCO AURÉLIO ALMEIDA DE OLIVEIRA

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

MARCO AURÉLIO ALMEIDA DE OLIVEIRA

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA  
METABOLIZAÇÃO/DETOXIFICAÇÃO EM LÚPUS  
ERITEMATOSO**

Projeto de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Emersom Silva Lima

MANAUS

2016

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48p Oliveira, Marco Aurélio Almeida de  
Polimorfismos genéticos envolvidos na  
metabolização/detoxificação em lúpus eritematoso sistêmico /  
Marco Aurélio Almeida de Oliveira . 2016  
82 f.: il.; 31 cm.

Orientador: José Pereira de Moura Neto  
Coorientador: Emerson Silva Lima  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. glutationa s-transferase. 2. superóxido dismutase. 3. catalase.  
4. estresse oxidativo. 5. lúpus. I. Moura Neto, José Pereira de. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, o meu porto seguro, minha família.

*Aos meus pais, Caubi Iram Ataíde de Oliveira e Cleone Barros de Almeida por todo o amor e dedicação na construção da minha educação.*

*A minha esposa Amanda Oliveira Araújo, razão da minha vida e companheira de todos os momentos.*

*Aos meus irmãos Maiara e Marcelo Almeida de Oliveira, apoiadores e torcedores incondicionais.*

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.*

**Isaac Newton**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer é um ato de reconhecimento e humildade perante aqueles que participaram da caminhada deste projeto, que não é apenas um projeto científico, mas também de vida, por todas as experiências adquiridas nesta jornada.

Primeiramente agradeço à minha esposa Amanda Oliveira Araújo, por toda paciência, compreensão e motivação para seguir em frente, sempre com a palavra certa nas horas difíceis e com o abraço amoroso nos momentos de felicidade.

Ao meu Mestre, amigo e orientador Dr. José Pereira de Moura Neto. Não há palavras e nem gestos suficientes que possam agradecer toda paciência, humildade, força e determinação que foi dispendida nesta jornada, obrigado por todos os ensinamentos que hoje levo com felicidade no coração.

Aos meus companheiros de jornada, Thiago Bacha, Mikaela Pontes e Janaína Santana, pela união e colaboração.

Ao Prof. Doutor Emerson Silva Lima, por ter sido a primeira pessoa a colaborar para minha busca acadêmica e enxergar em mim um futuro colaborador da ciência, obrigado pela oportunidade de entrar neste projeto.

A Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas pela concretização deste sonho.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1. Local de coleta de pacientes.....	34
Figura 2. Organograma do estudo .....	35

## **LISTA DE QUADROS E TABELAS**

Quadro 1. Incidência e Prevalência do LES em diferentes países .....	17
Quadro 2. Manifestações clínicas comuns no LES.....	18
Quadro 3. Classificação da nefrite lúpica de acordo com OMS .....	20
Quadro 4. Critérios de diagnóstico segundo ACR e revisados em 1997 .....	23
Quadro 5. Primers para amplificação dos genes submetidos a PCR multiplex.....	38

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>μL</b>	Microlitro
<b>4-HNE</b>	4-hidroxononenal
<b>ACR</b>	American College of Rheumatology
<b>ANA</b>	Anticorpo Antinuclear
<b>Anti-dsDNA</b>	Anticorpo contra DNA dupla hélice
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetraacético
<b>eNOS</b>	Óxido Nítrico Endotelial Sintase
<b>FAN</b>	Fator Antinuclear
<b>GPx</b>	Glutathiona Peroxidase
<b>GST</b>	Glutathiona S-Transferase
<b>LAEBM</b>	Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular
<b>LES</b>	Lúpus Eritematoso Sistêmico
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>NL</b>	Nefrite Lúpica
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOSs</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ânion peróxido
<b>OH</b>	Hidroxila
<b>Pb</b>	Pares de Bases
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>SLAM</b>	Medida da Atividade do Lúpus Sistêmico
<b>SLEDAI</b>	Índice de Atividade da Doença no Lúpus Eritematoso Sistêmico
<b>SLICC</b>	Grupo de Colaborações Clínicas no Lúpus Sistêmico
<b>SNP</b>	Polimorfismo de único nucleotídeo
<b>SOD</b>	Superóxido desmutase
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas



## RESUMO

**Introdução.** O desenvolvimento das manifestações clínicas em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico (LES) pode envolver o desequilíbrio de óxido-redução pelo intenso estresse oxidativo a nível celular. No entanto, poucos estudos demonstram a participação genética do metabolismo oxidativo no desenvolvimento dos sintomas no LES. **Objetivo.** O objetivo deste estudo foi correlacionar os polimorfismos nos genes das enzimas glutathione s-transferase M1, T1 e P1 (Ile05Val/442-16C>T), Superóxido Dismutase (Ala16Val) e Catalase (C-262T) com o LES. **Metodologia.** Foram selecionadas apenas mulheres, sendo 151 pacientes diagnosticadas com LES atendidas no serviço de reumatologia do Ambulatório Araújo Lima da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e 139 controles, não fumantes, sem sintomas de inflamações, doenças e ou fatores que alterem seu o estado de estresse oxidativo. **Resultados.** Os níveis de tióis estão diminuídos em pacientes com LES ( $p < 0.001$ ) enquanto os níveis de MDA foram significativamente maiores ( $p < 0.001$ ). Pacientes portadores da dupla deleção  $M1^{null}/T1^{null}$  apresentaram frequência 6 vezes maior que os controles ( $p < 0.001$ , OR 6.03, IC 2.8-13.2). Pacientes apresentaram menor frequência do alelo selvagem Ala/Ala da SOD2 em relação aos controles (13.8% vs 25.5%). Significâncias estatísticas foram observadas na associação entre a dupla deleção  $T1^{null}/M1^{null}$  e portadores mutantes dos SNP's P1 Ile105Val ( $p = 0.003$ , OR 0.14, CI 0.03-0.56), P1 ( $p = 0.008$ , OR 0.08, CI 0.01-0.70) e SOD Ala16Val ( $p = 0.003$ , OR 0.14, CI 0.03-0.53). O mesmo é observado entre os SNP's Ile105Val e 442-16C>T associados aos genótipos mutantes da SOD Ala16Val ( $p = 0.038$ , OR 0.28, CI 0.08-0.91) e ( $p = 0.024$ , OR 0.36, CI 0.15-0.87) respectivamente. **Conclusão** A dupla deleção  $M1^{null}/T1^{null}$  pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo no LES devido a deficiência na detoxificação metabólica de xenobióticos. Os polimorfismos da GSTP1 e CAT independentes parecem não influenciar no aumento do estresse oxidativo nestes pacientes e nas manifestações clínicas do LES. Indivíduos com LES portadores do alelo mutante da SOD podem apresentar maior estresse oxidativo devido a alteração estrutural da proteína e diminuição da produção de  $H_2O_2$ . A associação de genes pode estar envolvida na patogênese da doença através da combinação de mecanismos que elevem o estresse oxidativo.

**Palavras-Chave:** glutathione s-transferase; superóxido dismutase; catalase; estresse oxidativo

## ABSTRACT

**Introduction.** The development of clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) may involve an imbalance of redox by intense oxidative stress at cellular level. However, few studies have demonstrated the genetic role of oxidative metabolism in the development of symptoms in SLE. **Objective.** The aim of this investigation was to correlate the polymorphisms in genes of the enzymes glutathione S-transferase M1, T1 and P1 (Ile05Val /442-16C>T), superoxide dismutase (Ala16Val) and catalase (C-262T) with SLE. **Methodology.** Only women were recruited, 151 patients diagnosed with SLE treated at rheumatology service in Araujo Lima outpatient clinics, School of Medicine, Universidade Federal do Amazonas (UFAM) and 139 controls, no smoking, no symptoms of inflammation, without any disease and/or factors that change their oxidative stress state. **Results.** Thiol levels are decreased in SLE patients ( $p < 0.001$ ), while MDA levels were significantly higher ( $p < 0.001$ ). Patients with double null deletion  $T1^{null}/M1^{null}$  had a frequency six times higher than the controls ( $p < 0.001$ , OR 3.6, CI 2.8-13.2). Patients had a lower frequency of SOD2 wild allele Ala/Ala compared to controls (13.8% vs 25.5%). Statistical significances were observed on the association between the double deletion  $T1^{null}/M1^{null}$  and mutants of the Ile105Val ( $p = 0.003$ , OR 0.14, CI 0.03- 0.56), 442-16C>T ( $p=0.008$ , OR 0.08, CI 0.01-0.70) and Ala16Val ( $p= 0.003$ , OR 0.14, CI 0.03-0.53). The same was observed between Ile105Val and 442-16C>T associated with mutant Ala16Val genotypes ( $p=0.038$ , OR 0.28, CI 0.08-0.91) and ( $p=0.024$ , OR 0.36, CI 0.15-0.87) respectively. **Conclusion.** The double null deletion  $T1^{null}/M1^{null}$  may contribute to the increased of the oxidative stress in SLE due to deficiency in xenobiotics detoxification. Isolated P1 and CAT polymorphisms do not seem to influence the increased oxidative stress in these patients, neither SLE clinical manifestations. Individuals with SLE carriers of the mutant SOD Val allele may have greater oxidative stress due to structural change in the protein and decreased  $H_2O_2$  production. The combination of polymorphic genes may be involved in the pathogenesis of the disease through a combination of mechanisms that increase oxidative stress.

**Keywords:** Glutathione s-transferase; superoxide dismutase; catalase; oxidative stress.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.2. HISTÓRICO DO LÚPUS.....	14
1.1. ASPECTOS GERAIS DO LÚPUS.....	15
1.3. EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.4. ASPECTOS CLÍNICOS.....	18
1.5. DIAGNÓSTICO.....	21
1.6. IMUNOPATOGÊNESE.....	24
1.7. FATORES GENÉTICOS.....	25
1.8. ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
1.9. MUTAÇÕES E SUAS IMPLICAÇÕES NO LES.....	29
2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3. METODOLOGIA.....	33
3.1. TIPO DE ESTUDO.....	33
3.2. POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA.....	33
3.3. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	35
3.4. INFORMAÇÕES ÉTICAS E FINANCIAMENTO.....	36
3.5. AMOSTRAS.....	37
3.6. ENSAIOS MOLECULARES.....	37
3.6.1. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	37
3.6.2. GENOTIPAGEM.....	37
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4.1. DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	40
4.2. ANÁLISE DE VARIÁVEIS QUALITATIVAS OU CATEGÓRICAS.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. ARTIGO.....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

## INTRODUÇÃO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de natureza auto-imune, caracterizada pela presença de autoanticorpos (ROTHFIELD; SONTHEIMER; BERNSTEIN, 2006). A etiologia da doença ainda não é completamente esclarecida, e seu desenvolvimento se deve principalmente a alterações imunológicas, predisposição genética, fatores ambientais e a efeitos adversos a alguns medicamentos (MOSER et al., 2009).

A doença afeta aproximadamente nove mulheres para cada homem (FUJII et al., 2015). Embora possa ocorrer em qualquer idade, é mais freqüente entre os 20 e 45 anos, com incidência elevada próxima aos 30, principalmente em mulheres na fase reprodutiva. Apesar da ocorrência em todas as raças, é mais freqüente em afrodescendentes (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

A incidência varia de acordo com a população estudada, porém vários fatores, como ser afrodescendente e o baixo nível sócio-econômico, têm sido apontados como indicadores de pior prognóstico (MAIDHOF; HILAS, 2012). Entretanto, a sobrevida de pacientes com LES vem aumentando nas últimas décadas. Esta melhora tem sido atribuída a diversos fatores como: diagnóstico precoce da doença, melhor controle das manifestações clínicas, introdução de novos antibióticos, uso de corticosteróides e de drogas imunossupressoras (GILL et al., 2003).

Pacientes portadores de LES de ambos os gêneros apresentam sintomas semelhantes e característicos como: fadiga, perda de peso ou febre na ausência de infecção (ZIEMER; MILKOVA; KUNZ, 2014). A pele é o órgão mais afetado em aproximadamente

75% dos pacientes, principalmente na forma de erupção em borboleta, erupção cutânea, foto sensibilidade, lesão da mucosa e alopecia (KUNZ, 2013).

Devido o LES ser uma doença inflamatória crônica que normalmente afeta múltiplos órgãos, diversos mecanismos podem ser responsáveis pelos períodos de exacerbação e remissão das manifestações clínicas. Dentre estes, a própria inflamação e o estresse oxidativo, que possivelmente agem sinergicamente culminando em lesão renal (PERL, 2013).

O dano renal ocorrido em portadores de LES é provocado pela produção e deposição de imunocomplexos nos glomérulos, principalmente formados por IgG, IgM e IgA, ocasionando inflamação, podendo evoluir para insuficiência renal crônica e morte (ROVIN; PARIKH, 2014).

O desenvolvimento dos sintomas em pacientes com LES podem envolver o desequilíbrio de óxido-redução causado por estresse oxidativo (SEGAL et al., 2012). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) promove um desequilíbrio de oxidação-redução, danificando macromoléculas, incluindo o ácido desoxirribonucléico (DNA), o que pode modular a expressão e produção de moléculas inflamatórias, levando ao aumento e/ou causa dos processos inflamatórios (AVALOS et al., 2007).

A relação entre as mutações de genes que codificam enzimas antioxidantes e doenças associadas com o estresse oxidativo podem ser úteis na identificação da doença, assim como a suscetibilidade ao desenvolvimento dos sintomas mais graves (CRAWFORD et al., 2012).

Baseado no exposto, este trabalho teve a proposta de estudar as vias envolvidas na evolução do lúpus, abordando polimorfismos em genes de enzimas importantes do sistema redox na tentativa de demonstrar possíveis biomarcadores para a gravidade desta doença.

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.2. HISTÓRICO DO LÚPUS

A palavra lúpus significa lobo em latim, e assim foi chamada devido às lesões que se assemelhavam a mordida do animal. O uso mais antigo do termo na literatura inglesa leva ao século X d.C., na biografia de São Martin, escrito em 963 a.C. No entanto Hipócrates é considerado o primeiro a descrever as ulcerações cutâneas da doença (MALLAVARAPU; GRIMSLEY, 2007).

No início do século XIX, os pesquisadores Robert Wilan e William Bateman publicaram o Manual de Doenças da Pele, onde o termo lúpus foi utilizado para descrever características ulcerativas na face. Em 1847 foi utilizado o termo lúpus eritematoso por Cazenave e Schedel, classificando a doença em Lúpus eritematoso, tuberculoso, ulcerativo e hipertrófico. O termo "erupção borboleta", para descrever o lúpus, foi introduzido pela primeira vez por Ferdinand Von Hebra (1816-1880) (SCOFIELD; OATES, 2009).

Apesar de Cazenave em seu trabalho *Leçons sur Le maladies de La peau* ter descrito a doença de forma geral, nenhum médico ou pesquisador tinha até então identificado os aspectos sistêmicos da doença. Em 1872 o dermatologista Moritz Kaposi Kohn de forma inequívoca, descreveu duas formas diferentes de lúpus eritematoso: o primeiro, discóide, localizada na pele, e o segundo, o que foi qualificado como "*lupus eritematosus disseminatus et aggregatus*", com características sistêmicas geral e visceral, incluindo febre, perda de peso, anemia, nódulos subcutâneos, artrite, linfadenopatia e comprometimento do sistema nervoso central (RAMPUDDA; MARSON; PASERO, 2009).

Porém, apenas em 1903 a doença foi propriamente referida como sistêmica. O pesquisador William Osler descreveu 20 mulheres jovens com erupções na pele e dor no peito resultante da inflamação do revestimento do pulmão (pleurisia) ou do coração (pericardite). Esses pacientes também apresentavam doença renal, infarto, e acometimento do cérebro, onde 18 morreram dentro de dois anos a partir da apresentação dos sintomas (ASKANASE; SHUM; MITNICK, 2012).

### **1.1. ASPECTOS GERAIS DO LÚPUS**

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune. É o principal representante das colagenoses, caracterizado pela formação de imunocomplexos e produção de autoanticorpos contra antígenos nucleares, citoplasmáticos e de membrana celular (GALINDO; VEIGA, 2010) (VARGAS; ROMANO, 2009). A formação destes complexos acarreta desordens multissistêmicas, com sinais e sintomas específicos dependendo do órgão afetado, caracterizado por períodos de exacerbação e remissão. (ZIEMER; MILKOVA; KUNZ, 2014).

Existem quatro principais tipos de lúpus: neonatal, discóide, droga-induzida e sistêmico, este último sendo o responsável pela maioria dos casos (MAIDHOF; HILAS, 2012). A doença afeta ambos os sexos, porém predominantemente indivíduos do sexo feminino em idade reprodutiva, com aproximadamente nove mulheres afetadas para cada homem (BORCHERS et al., 2010). No entanto 15 a 20% dos casos podem ocorrer na infância, e geralmente apresentam formas clínicas mais agressivas do que em adultos. (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

Apesar da etiologia ainda não estar completamente definida, fatores genéticos, ambientais, endócrinos e metabólicos têm sido estudados para melhor esclarecimento da doença. As manifestações em pacientes com LES sugerem que a natureza da doença seja fundamentalmente um desequilíbrio no sistema imune, apesar da evidência hormonal pelo fato de ser mais frequente em mulheres (DUTRA; OLIVEIRA, 2009).

O objetivo do tratamento do LES é análogo a outras doenças inflamatórias, que consiste na supressão da inflamação e prevenção de lesões nos órgãos. A intensidade da terapia depende da severidade da doença e o órgão envolvido (REYNOLDS; IAN N BRUCE, 2013).

### **1.3. EPIDEMIOLOGIA**

Estudos mostram diferentes dados quanto à incidência e prevalência do LES ao redor do mundo, as taxas variam conforme a população estudada (quadro 1). Os números variam de 1,0 (Dinamarca) a 8,7 (Brasil) novos casos por 100.000 indivíduos/ano (BORCHERS et al., 2010). No Brasil, a taxa de incidência encontrada foi a maior observada dentre outros estudos (VILAR; RODRIGUES; SATO, 2003). Quanto à taxa de prevalência os dados variam entre 28,3 na Dinamarca para um valor estimado de 78,5 nos Estados Unidos (BORCHERS et al., 2010).

Apesar de acometer todas as classes sociais e étnicas, estudos mostram maior incidência em afro-americanos e afro-caribenhos em relação a caucasianos (25,8 versus 4,3 por 100.000 indivíduos). Apesar das diferenças étnicas serem consideradas de cunho genético, existem debates quanto à influência sócio-econômica no acometimento renal, que também é aumentado nestes grupos (PONS-ESTEL et al., 2010).



País do Estudo	Período de Estudo	Idade	Incidência em ambos os sexos	Incidência, Mulheres	Incidência, Homens	Prevalência entre ambos os sexos	Prevalência entre Mulheres	Prevalência entre Homens
EUA	1991-2001	-	5.1	8.2	1.9	78.5	131.5	24.8
Canadá	1994-2003	-	2.8-3.0	-	-	44.7	-	-
Reino Unido	1990-1999	-	4.7	7.9	1.3	-	-	-
Dinamarca	1995-2003	-	1.0	-	-	28.3	-	-
Noruega	1996-2006	≥ 16	3.0	5.1	0.9	64.1	108.6	20.0
Brasil	2000	≥ 15	8.7	14.1	2.2	-	-	-

**Quadro 1.** Incidência e Prevalência do LES em diferentes países **Fonte:** Adaptado de BORCHERS et al., 2010

Em relação à região amazônica, apenas um estudo realizado na cidade de Belém do Pará demonstrou frequência de LES, e estas eram maiores em mulheres jovens, pardas, procedentes da região metropolitana, sendo a positividade do fator antinuclear (FAN), a presença de distúrbios hematológicos e renais, os critérios mais frequentes, com mortalidade de 15,3% (CONDE et al., 2009).

Devido às diferentes metodologias adotadas por cada estudo os dados epidemiológicos devem ser interpretados com cuidado. As limitações para o diagnóstico e notificação em vários países podem contribuir para informações errôneas, dificultando o melhor entendimento sobre a distribuição da doença (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

## 1.4. ASPECTOS CLÍNICOS

Pacientes com LES podem apresentar diferentes sintomas dependendo do órgão acometido e do grau de exacerbação dos sintomas (quadro 2). Sintomas envolvendo a pele, tecido musculoesquelético e alterações hematológicas são comuns à maioria dos pacientes, no entanto alguns podem apresentar manifestações renais e neuropsiquiátricas (GILL et al., 2003).

<b>ÓRGÃO OU SISTEMA AFETADO</b>	<b>SINAIS E SINTOMAS</b>
<b>Gerais</b>	Fadiga, febre (na ausência de infecção) e perda de peso
<b>Pele</b>	Erupção em borboleta, fotossensibilidade, lesões em membranas mucosas, alopecia, púrpura urticária e vasculite.
<b>Musculoesquelético</b>	Artrite, artralgia e miosite
<b>Renal</b>	Hematúria, proteinúria, cilindros e síndrome nefrótica
<b>Hematológico</b>	Anemia, trombocitopenia e leucopenia
<b>Reticuloendotelial</b>	linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia
<b>Neuropsiquiátrico</b>	Psicose, convulsões, neuropatia craniana e neuropatia periférica
<b>Gastrointestinal</b>	Náusea, vômitos e dores abdominais
<b>Cardíaco</b>	Pericardite, endocardite e miocardite

**Quadro 2.** Manifestações clínicas comuns no LES. **Fonte:** Adaptado de GILL et al., 2003

Qualquer sintoma é considerado possível em pacientes com LES, pois podem ocorrer diferentes manifestações durante o curso da doença. Enquanto alguns não desenvolvem sintomas renais e neurológicos, outros apresentam glomerulonefrite e psicose. No entanto,

durante o desenvolvimento da doença, os pacientes culminam nas mesmas manifestações clínicas (AGMON-LEVIN et al., 2012).

A apresentação inicial dos sintomas (perda de peso, fadiga e febre) mimetiza infecções virais, o que pode levar a confusão no diagnóstico inicial destes pacientes (KIRIAKIDOU, 2013). Em um estudo realizado na cidade de Manaus, foi constatado o comprometimento osteoarticular e lesões cutaneomucosas como as manifestações clínicas mais frequentes nos pacientes. Outro dado importante demonstrado foi que 20% dos pacientes que foram submetidos à biópsia renal, 44% apresentaram lesão histológica do tipo IV (SANTOS et al., 2010).

A nefrite lúpica (NL) é uma das manifestações mais severas no LES, consideravelmente associadas à morbidade e mortalidade. A NL é classificada segundo o grau de proliferação da lesão glomerular (quadro 3), de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (BORCHERS et al., 2012)

Em geral, 74% dos pacientes com lúpus irão desenvolver nefrite clinicamente relevante em algum momento no curso da doença (LI; FANG; LI, 2013). As alterações histológicas encontradas em amostras de biópsias de rins em pacientes com NL são variadas, que vão desde o envolvimento mesangial leve, através de formas de proliferação da glomerulonefrite e culmina no estágio de fibrose, incluindo lesão endotelial, proliferação endocapilar e NL membranosa caracterizada por lesão de podócitos e lesão da parede capilar não proliferativa (BORCHERS et al., 2012).

<b>Classe</b>	<b>Grau de Proliferação</b>	<b>Aspectos de proliferação</b>
<b>Classe I</b>	Mesangial mínima	Histologia normal com depósitos mesangiais.
<b>Classe II</b>	Proliferação mesangial	mesangiais; hiper celularidade mesangial com a expansão da matriz mesangial. Endocapilar Focal ± proliferação extracapilar com depósitos imunes subendoteliais focais e expansão mesangial leve.
<b>Classe III</b>	Nefrite focal	Endocapilar Focal ± proliferação extracapilar com depósitos imunes subendoteliais focais e expansão mesangial leve.
<b>Classe IV</b>	Nefrite difusa	Difusa ± proliferação extracapilar endocapilar com depósitos imunes subendoteliais difusas e alterações mesangiais.
<b>Classe V</b>	Nefrite membranosa	Espessamento das membranas basais com depósitos imunes subepiteliais difusos; podem ocorrer com a Classe III ou IV lesões chamadas de nefrite membranosa e proliferativa mista.
<b>Classe VI</b>	Nefrite esclerosada	Esclerose global de quase todos os capilares glomerulares

**Quadro 3.** Classificação da nefrite lúpica de acordo com OMS **Fonte:** adaptado de (ZUBAIR; FRIERI, 2013)

As Biópsias ainda são consideradas como a melhor ferramenta analítica para o diagnóstico da NL, porém o procedimento é invasivo e muitas vezes impraticável. Atualmente existem alguns marcadores laboratoriais para NL que incluem anticorpos contra DNA dupla hélice (anti-dsDNA), clearance de creatinina, creatinina, proteinúria, e níveis de participantes do sistema complemento. No entanto, estes biomarcadores possuem baixa sensibilidade e dificuldade em diferenciar entre os níveis das lesões e atividade renal (ZUBAIR; FRIERI, 2013).

Diferentes instrumentos foram criados e validados para determinar a atividade da doença. O primeiro a ser desenvolvido foi *Systemic Lupus Activity Measures* (SLAM) seguido pelo *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI), este último mais

utilizado na maioria dos estudos. O SLEDAI é composto por 24 variáveis clínicas e laboratoriais com diferentes *scores* que variam de 0 (sem atividade da doença) a 105 (LES grave) (GRIFFITHS; MOSCA; GORDON, 2005)

O índice é utilizado com sucesso e tem sido classificado como uma valiosa ferramenta em termos de pesquisa. SLEDAI também foi demonstrado ser sensível a alterações na atividade da doença em relação ao tempo. Em 2002, uma versão revisada e validada, SLEDAI 2000 (2K), foi proposta para determinação de *scores* para os sintomas de alopecia, úlceras da membrana mucosa, erupção cutânea, e proteinúria (TOUMA; UROWITZ; GLADMAN, 2010).

Uma modificação do SLEDAI foi criada para avaliar o nível de estrogênio durante o curso da doença chamado *Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment* (SELENA-SLEDAI) (ROMERO-DIAZ; ISENBERG; RAMSEY-GOLDMAN, 2011). Pesquisadores mexicanos a fim de diminuir os custos dos testes laboratoriais desenvolveram uma modificação chamada de MEX-SLEDAI (URIBE et al., 2004).

## 1.5. DIAGNÓSTICO

A apresentação clínica do LES é variável, o que dificulta o diagnóstico na avaliação inicial deste paciente. Não há critérios isolados para formalização, apesar de algumas alterações serem altamente sugestivas (FREIRE; SOUTO; CICONELLI, 2011).

O diagnóstico do LES é baseado em critérios clínicos e laboratoriais. Foram criados diversos protocolos e critérios de classificação tanto para unificação do diagnóstico quanto para pesquisa (PETRI et al., 2012). Os critérios mais utilizados foram desenvolvidos pelo

*American College of Rheumatology* (ACR) criado em 1982 e revisados em 1997 (SATO et al., 2002). A confirmação da doença requer a presença de quatro ou mais dos onze critérios definidos, em série ou simultaneamente, durante todo o período de observação (O'NEILL; CERVERA, 2010).

<b>Nº</b>	<b>Crítérios</b>	<b>Manifestações</b>
1	Erupção malar	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo a poupar sulcos nasolabiais.
2	Erupção discóide	Erupções eritematosas, placas elevadas com escamação ceratótica aderente e tamponamento folicular; cicatrizes atróficas possivelmente em lesões mais antigas.
3	Fotossensibilidade	Erupção cutânea como resultado da reação incomum à luz solar.
4	Úlceras orais	Ulcecação oral ou nasofaríngea, geralmente indolor.
5	Artrite	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por inchaço, sensibilidade ou efusão.
6	Serosite	Pleurite; história de dor pleurítica; evidência de derrame pleural; pericardite documentada por eletrocardiograma ou evidência de derrame pericárdico.
7	Doença renal	Proteinúria persistente, > 500 mg por 24 horas ( 0,5 g por dia) ou > 3+ se a quantificação for executada ou evidências celulares (hemácias, hemoglobina, grânulos, ou cilindros celulares mistos)
8	Distúrbios neurológicos	Convulsões; psicose ocorrida na ausência de substâncias indutoras ou perturbação metabólica conhecida (por exemplo, uremia, cetoacidose, desequilíbrio eletrolítico).
9	Disordens hematológicas	Anemia hemolítica com reticulocitose,; leucopenia < 4.000 por mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões; linfopenia < 1.500 por mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões, ou trombocitopenia < 100 x 10 <sup>3</sup> por mm <sup>3</sup> na ausência de drogas trombocitopênicas.

10	Desordens Imunológicas	Anticorpo ao antígeno de cadeia dupla de DNA (anti- dsDNA) no título anormal, ou a presença de anticorpos para o antígeno nuclear Sm (anti-Sm), ou resultado positivo de anticorpo antifosfolípideo baseado em um nível sérico anormal de anticorpos anticardiolipina IgG ou IgM; resultado positivo do teste para o lúpus anticoagulante usando um método padrão, ou um teste sorológico falso-positivo para sífilis confirmada por FTA-ABS negativo.
11	Anticorpos antinucleares (ANAs)	Detecção de titulação anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou ensaio equivalente, em qualquer momento, e na ausência de medicamentos conhecidos por estarem associados com lúpus induzido por drogas.

**Quadro 4.** Critérios de diagnóstico segundo ACR e revisados em 1997 **Fonte:** adaptado de O'NEILL; CERVERA, 2010

Os critérios da ACR foram revisados novamente em 2012 por grupos de pesquisas e divisões de reumatologia de vários países, chamado *The Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) (PETRI et al., 2012).

O consenso é baseado na identificação de critérios clínicos e imunológicos e identificou dezessete critérios que requerem: preenchimento de pelo menos quatro, onde pelo menos um deve ser clínico e outro imunológico; nefrite lúpica como critério clínico isolado na presença de ANA ou anticorpos anti-dsDNA. O novo protocolo se mostrou mais sensível em relação aos critérios da ACR (97% contra 83%,  $p < 0.0001$ ), porém menos específico (84% contra 96%,  $p < 0.0001$ ) (PETRI et al., 2012).

No Brasil, segundo a portaria nº 100 de 7 de fevereiro de 2013, que aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico, utiliza-se para formalização do diagnóstico os critérios da ACR revisados em 1997 (BRASIL, 2013).

## 1.6. IMUNOPATOGÊNESE

O sistema imunológico é desenvolvido para proteção contra patógenos e auxiliar a cura de tecidos lesados. Em doenças autoimunes estes mecanismos que regulam o reconhecimento de antígenos e evitam a formação de autoanticorpos encontram-se desequilibrados, ocasionando perda no controle da inflamação e ativação imunológica sem a presença de infecção (WAHREN-HERLENIUS; DÖRNER, 2013).

A formação de imunocomplexos e a deposição de autoanticorpos são os principais responsáveis pelas diversas manifestações clínicas do LES.

A apoptose é reconhecida como parte fundamental da maturação e homeostase do sistema imune. É durante a formação do sistema de apoptose de linfócitos auto-reativos que se observa o desenvolvimento da tolerância a estas células. Devido à apoptose o tamanho do linfóides periféricos e compartimentos mielóides é limitada. Linfócitos ativados são eliminados através da apoptose após uma resposta imune e a morte celular é iniciada através da ligação de receptores específicos na superfície das células (BIJL; LIMBURG; KALLENBERG, 2001).

Os antígenos que causam estimulação de linfócitos B (linf-B) e T (linf-T) em pacientes com LES podem ser atribuídos devido eliminação inadequada de células apoptóticas. Durante este processo, pedaços de material celular se formam na superfície das células em processo de morte, e antígenos que normalmente não estariam na superfície passam a estar expostos (MAIDHOF; HILAS, 2012).

O desenvolvimento da doença inicia quando um linf-T é apresentado a uma célula apresentadora de antígenos (APC). O receptor do linf-T se liga a porção APC de um



complexo principal de histocompatibilidade (MHC), o que leva a liberação de citosinas, inflamação e estimulação de linf-B. O dano tecidual é causado por esta estimulação devido a produção de autoanticorpos IgG (MAIDHOF; HILAS, 2012).

Estudos mostram os diversos papéis das vias sinalização dos linf-T e B na patogênese da doença, Assim como o envolvimento de neutrófilos e células dendríticas (BOSCH, 2011) (FU; DESHMUKH; GASKIN, 2011). Modelos murinos demonstraram ser indispensáveis para a compreensão da função imunológica e molecular da autoimunidade sistêmica do lúpus. Porém, está se tornando cada vez mais claro que a autoimunidade local, em órgãos-alvo e as respostas produzidas nestes órgãos são igualmente importantes na patogênese da doença (PATHAK; MOHAN, 2011).

A maioria dos anticorpos identificados no LES tem como alvo o componente nuclear das células, conhecidos como ANAs (*antinuclear antibodies*). A identificação dos ANAs tem sido essencial para o diagnóstico da doença. Vários anticorpos antinucleares têm sido descritos em associação ao LES. porém o anti-dsDNA se apresenta na maioria dos pacientes, relacionado aos acometimentos renais e cutâneos (MOK, 2003).

## **1.7. FATORES GENÉTICOS**

Assim como encontrado em diversas doenças autoimunes, a patogênese multifatorial do LES é baseada em fatores genéticos, ambientais e anormalidades tanto no sistema imunológico inato quanto adaptativo. Estes fatores contribuem para indução, manutenção e progressão da doença (GUALTIEROTTI et al., 2010)

A predisposição genética influencia o desenvolvimento do LES através de diversas vias (Crispín et al., 2010). Estudos em animais com deleção do gene *C1qa* do sistema complemento, demonstraram a presença de glomerulonefrite com imunodepósitos e células apoptóticas no glomérulo, sugerindo a associação da desordem autoimune com o funcionamento inadequado na depuração de células apoptóticas (HERRMANN; VOLL; KALDEN, 2000)

A deleção de um componente do sistema complemento é um caso raro de deficiência em um único gene com predisposição ao LES. A maioria dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados com LES são abrangidos em regiões não-codificadoras do DNA em genes relacionados à resposta imune (TSOKOS, 2011). Comumente a doença resulta de efeitos em um maior número. Genes candidatos associados ao LES tem aumentando significativamente com as análises no genoma humano e constata-se a atuação em diferentes mecanismos associados à predisposição, podendo estar envolvidos na produção de ácidos nucleicos e interferon (*IRF5*, *STAT4*, *IRAK1*, *TREX1* e *TLR8*) e nas vias de sinalização de linfócitos T e B (*PTPN22*, *TNFSF4*, *PDCD1*, *BANK1*, *BLK* e *LYN*), porém também estão relacionados a outras doenças crônicas como a artrite reumatóide (*STAT4*) e diabetes (*PTPN22*) (CRISPÍN et al., 2010).

Estudos recentes de replicação em larga escala confirmaram algumas dessas associações e identificaram *TNIP1*, *PRDM1*, *JAZF1*, *UHRF1BP1* e *IL10* como loci de risco para LES. Embora estes resultados sejam promissores, os loci identificados até agora podem ser responsáveis por apenas 15% da hereditariedade do LES. Um número de cópias alteradas de alguns genes, tais como *C4*, *FCGR3B*, e *TLR7*, foram associadas à expressão da doença (TSOKOS, 2011).

## 1.8. ESTRESSE OXIDATIVO

A natureza inflamatória da doença implica que a existência de um estado de estresse oxidativo possa contribuir para disfunção imunológica. Oxidantes podem danificar moléculas biológicas como DNA, RNA, proteínas e antioxidantes (ZHANG et al., 2010).

A geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e/ou radicais hidroxila (OH), Tem o potencial de desencadear danos a lípideos, proteínas e ácidos nucleicos (MCCORD, 2000). Sistemas de defesa antioxidante mantém a produção de ROS em controle (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002). Alterações neste equilíbrio resultante de elevados níveis de ROS e/ou diminuição dos níveis de antioxidantes podem elevar o estresse oxidativo (PÉREZ et al., 2012). A peroxidação lipídica, leva à formação de aldeídos altamente reativos, tais como o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonal (4-HNE), que podem ligar-se covalentemente a proteínas e, assim, causar modificações estruturais e afetar funções biológicas. Aumentos de estresse oxidativo e formação de proteínas modificadas por MDA e 4-HNE estão associados com LES e outras doenças autoimunes (WANG et al., 2010).

A catalase (CAT) é uma importante enzima antioxidante endógena que reduz o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, limitando assim os efeitos deletérios das ROS. A proteína é expressa em todos tipos de tecidos, porém ocorre principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Nos hepatócitos a enzima é encontrada predominantemente nos peroxisomos, enquanto nos eritrócitos se encontra no citosol (KHODAYARI et al., 2013). Sabe-se que o peróxido de hidrogênio tem um importante papel fisiológico e patofisiológico no organismo humano (KODYDKOVÁ et al., 2014). Assim, esta enzima têm sido considerada um

importante regulador, onde a diminuição de sua atividade pode levar ao estresse oxidativo contribuindo para o desenvolvimento do LES (D'SOUZA et al., 2008) (SHAH et al., 2010).

A superóxido dismutase (SOD) compõe o sistema de defesa enzimática contra radicais livres. Com base na sua distribuição nos tecidos e as diferenças nos seus co-fatores, foram identificados 4 isoformas da SOD. SOD2 contendo manganês que está localizado na matriz das mitocôndrias de todos os aeróbios; SOD ferroso é localizado principalmente no citosol de procariotos; Cobre (Cu/Zn) SOD1 é encontrada no citoplasma de praticamente todas as células eucarióticas; SOD3 está presente em mamíferos em fluidos extracelulares ou está associada à membrana. Qualquer fator que possa comprometer a atividade das enzimas SOD, catalase ou peroxidases podem acionar mecanismos de danos peroxidativos. (KURIEN; SCOFIELD, 2003) (CRAWFORD et al., 2012).

As glutathione S-transferases (GST) representam uma importante família na metabolização de drogas que catalisam a conjugação de uma grande variedade de compostos endógenos e exógeno. Como resultado, as GSTs diminuem a reatividade de substratos eletrofílicos em macromoléculas celulares (ZHONG et al., 2006).

Estudos recentes demonstraram que os níveis do estado antioxidante se encontraram diminuídos em pacientes com LES, principalmente em estados graves da doença (SOUZA, 2012).

## 1.9. MUTAÇÕES E SUAS IMPLICAÇÕES NO LES

A pesquisa genética fornece uma nova visão quando aplicado à fisiopatologia de doenças complexas. Genes que possam determinar a susceptibilidade de doenças podem ser identificados por estudos genéticos, fornecendo novos *insights* sobre a patogênese de doenças. (TANIGUCHI et al., 2014)

Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) são substituição/troca, de uma única base nitrogenada, ocorrendo variação na sequência de DNA somente em uma base adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G) na sequência do genoma. Ocorrem geralmente de erros da DNA polimerase durante a duplicação/replicação do DNA durante a divisão celular (FEERO; GUTTMACHER; COLLINS, 2010).

Os SNPs podem constituir em até 90% de todas as variações genômicas humanas, ocorrendo em média, entre uma vez a cada 300 bases, o que significa que existam cerca de 10 milhões de SNPs no genoma humano. Além de poder acarretar mudanças morfológicas, essas variações na sequência do DNA podem influenciar a resposta dos organismos a doenças, bactérias, vírus, produtos químicos, e fármacos (SACHIDANANDAM et al., 2001) (FAREED; AFZAL, 2013).

Além disso, os SNPs podem atuar como marcadores biológicos, ajudando pesquisadores a localizarem genes que estão associados a determinadas doenças. Quando um SNP ocorre dentro de um gene ou em sua região promotora, este pode desempenhar papel direto na doença por afetar a função do gene (GRIFFIN; SMITH, 2000) (DEN DUNNEN; ANTONARAKIS, 2000).

A Catalase é localizada no cromossomo 11p13, muitos estudos têm como objetivo relacionar a substituição na posição C-262T do gene da CAT com doenças, estudos já demonstraram que a atividade da catalase é geneticamente determinada e está associada a polimorfismos (DUTKIEWICZ et al., 2009). Este SNP é encontrado dentro da região promotora e a mutação reside na sequência do 5' não traduzida, o que aumenta sua expressão, e se correlaciona com níveis de catalase no sangue. CAT está presente em todas as células aeróbicas. No entanto, os níveis mais elevados da enzima são encontrados no fígado, nos rins e eritrócitos (CRAWFORD et al., 2012). Em pacientes lúpicos estudos com o objetivo de associar o SNP à susceptibilidade ao LES não demonstraram correlações positivas, no entanto não foi verificado a participação dos SNP em diferentes estágios da doença (D'SOUZA et al., 2008; GHALY; GHATTAS; LABIB, 2012)

As Glutationas S-transferase (GST) são uma superfamília de enzimas de fase II que atuam na detoxificação catalisando a conjugação de compostos hidrofóbicos e eletrofílicos à glutatona reduzida (YE; SONG, 2005). A GSTM1 é localizada no cromossomo 1p13.3 e está envolvida na detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos e agentes mutagênicos. A GSTT1 é localizada no cromossomo 22, é envolvida principalmente na catalisação de halometanos em hemácias. Os dois genes possuem variantes homozigotos nulos ( $GSTM1^{null}$  e  $GSTT1^{null}$ ) achados em todas populações, resultando na ausência de atividade enzimática nos portadores destas mutações (PARK et al., 2004; ROSSINI; RAPOZO; AMORIM, 2002). Diferentes estudos demonstram resultados contraditórios entre a correlação dos polimorfismos e pacientes com LES, sugerindo que outros fatores além da determinação genética possam influenciar a ocorrência da doença.

A GSTP1 possui diversos sítios polimórficos, no entanto, funcionalmente, a transição A>G no éxon 5 resulta na mudança do aminoácido isoleucina (Ile) para valina (Val)

(Ile105Val), resultando em uma proteína com instabilidade térmica e com atividade específica. (SPURDLE et al., 2001). Em nosso trabalho com intuito de determinar a influência de haplótipos na ocorrência do LES, estudamos o polimorfismo 442-16C>T da GSTP1 com intuito de verificar a influencia de haplótipos com sinais e sintomas da doença, ainda não descrito na literatura.

A superóxido dismutase (SOD) compõe o sistema primário de defesa enzimática contra ROS. A superóxido dismutase mitocondrial (SOD2) protege o organismo do estresse oxidativo convertendo o ânion superóxido  $O_2^-$  para o menos tóxico  $H_2O_2$  (PETROVIČ; PETERLIN, 2014). O SNP Ala16Val no gene da SOD2 é uma mutação que reduz a expressão da proteína e produz mRNA instável, o que afeta a entrada da proteína na mitocôndria, reduzindo sua atividade (XU et al., 2012)

Estudos demonstram a participação de diversos genes que podem contribuir para etiologia genética do LES (CRISPÍN; HEDRICH; TSOKOS, 2013). Isto sugere que polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) e deleções podem influenciar os mecanismos da doença (HARLEY, 2002; KELLY; MOSER; HARLEY, 2002). Estudos recentes demonstraram que os níveis do estado antioxidante se encontram diminuídos em pacientes com LES, principalmente em estágios graves da doença (LALWANI et al., 2015)

Diante da importância dos genes das enzimas (e seus respectivos polimorfismos), GST (GSTT1<sup>null</sup>, GSTM1<sup>null</sup> e GSTP1 Ile105Val), CAT (C-262T) e SOD2 (Ala16Val), para clínica do LES e sua resposta imune, estas mutações e suas vias de sinalização podem resultar em uma inadequada ou excessiva resposta inflamatória, modificando a clínica assim como sua imunopatogênese resultante.

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência dos polimorfismos dos genes da glutathione s-transferase (GSTT1<sup>null</sup>, GSTM1<sup>null</sup> e GSTP1 Ile105Val), Catalase (C-262T) e superóxido dismutase (Ala16Val) em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico da cidade de Manaus-Amazonas.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença dos polimorfismos e sua influência em parâmetros hematológicos e bioquímicos
- Investigar possíveis influências dos polimorfismos encontrados com a gravidade clínica da doença;
- Comparar as frequências alélicas e genóticas encontrados no LES com indivíduos controles;



### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 TIPO DE ESTUDO**

Esta pesquisa é um estudo caso-controle e analítico. As amostras foram coletadas entre o período de 2009 a 2014 no serviço de Reumatologia do Ambulatório Araújo Lima – UFAM e foram submetidas a técnicas de biologia molecular no Laboratório de Análises Especializadas em hematologia e Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

#### **3.2 POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA**

Foram selecionados pacientes em todas as faixas etárias, que atenderam a no mínimo quatro dos onze critérios de classificação estabelecidos e revisados pelo ACR (1997), atendidos no Serviço de Reumatologia do Ambulatório Araújo Lima situado no Hospital Universitário Getúlio Vargas da Universidade Federal do Amazonas na cidade de Manaus (UFAM).

A população de estudo foi dividida em três grupos segundo o índice de atividade da doença (SLEDAI), foram eles: lúpus controlado (LC), lúpus ativo (LA) e nefrite lúpica (NL).

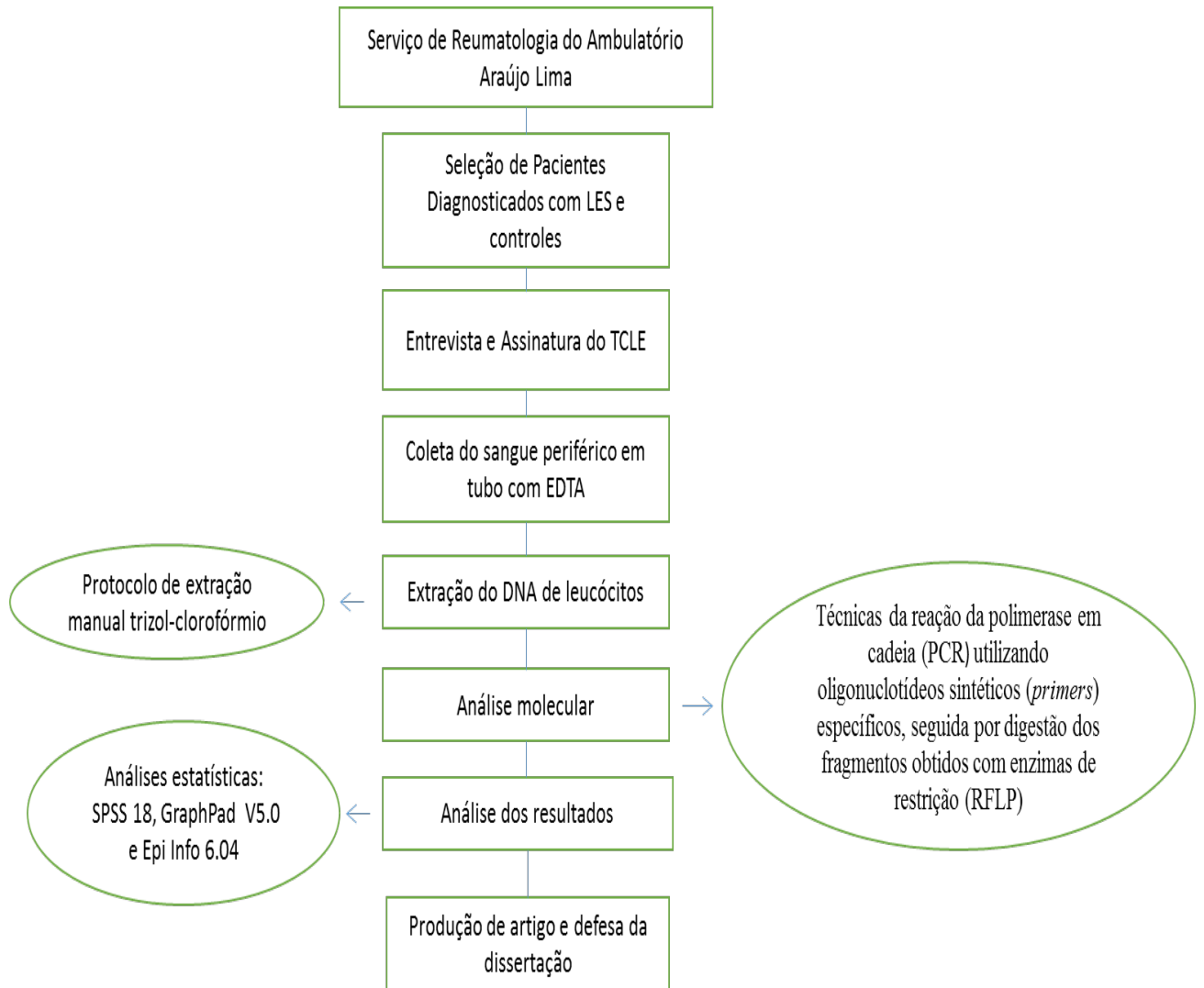
O grupo LC (n=57) foi constituído de indivíduos que não apresentaram atividade lúpica (SLEDAI = 0) por no mínimo um ano e que não apresentaram resultados laboratoriais característicos de lesão renal. O grupo LA (n=38) foi composto por pacientes

com LES ativo com SLEDAI  $\geq 4$  (quatro), sem manifestação renal. O grupo NL (n=56) foi composto por pacientes diagnosticados com lesão renal (proteinúria persistente superior a 500mg/24h ou  $\geq 3+$  no sedimento urinário).



**Figura 1.** Local de coleta dos pacientes deste projeto.

Os controles (n=139) foram constituídos por pessoas consideradas saudáveis, de gênero feminino, sem consanguinidade com pessoas com LES, com idade entre 18 e 65 anos, sem parentesco com outros participantes deste projeto, nascidos nos estados da Amazônia legal (AM, AC, AP, RR, RO, PA e TO).



**Figura 2.** Organograma do estudo

### 3.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

#### 3.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados aptos à inclusão todos os pacientes com diagnóstico para LES, segundo critérios do ACR, do sexo feminino, pós-menarca, que leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO I)

### 3.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos indivíduos que apresentaram doenças, estado ou comportamento que influencie a produção de ROS: doenças infecciosas, diabetes primária, HIV, doença renal crônica, tabagismo e gravidez.

### 3.4 INFORMAÇÕES ÉTICAS E FINANCIAMENTO

As amostras utilizadas no estudo foram obtidas por meio do projeto **“Perfil do Estresse Oxidativo na Lesão Renal de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”**, e o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas em agosto de 2011, conforme protocolo CAAE nº 0286.0.115.000-11. (ANEXO II)

Este projeto recebeu recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), assim como recursos próprios e dos projetos ao qual este Programa de Pós-Graduação se inclui.

### **3.5 AMOSTRAS**

A coleta de pacientes e controles foi realizada de 2010 a 2012. A população de estudo foi selecionada em atendimentos consecutivos, em conformidade com a demanda do ambulatório, desde que atendessem os critérios de elegibilidade.

Foram coletados dos indivíduos incluídos 3 mL de sangue periférico em um tubo contendo EDTA (anticoagulante ácido etileno diamino tetraacético). Também foram coletados de 2 a 5 mL de sangue total e soro para o grupo controle e armazenados em tubos sem anticoagulante, até seu processamento para os exames laboratoriais.

### **3.6 ENSAIOS MOLECULARES**

#### **3.6.1 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS**

O DNA genômico foi extraído a partir de 300 $\mu$ L de sangue, utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, conforme instruções do fabricante.

Após a extração, o DNA foi armazenado a -70 °C para as posteriores análises moleculares.

#### **3.6.2 GENOTIPAGEM**

Para genotipagem dos genes GSTT1 e GSTM1, foi utilizada a PCR multiplex, enquanto que para os SNPs CAT C-262T, SODAla16Val e GSTP1 Ile105val, a técnica de PCR em tempo real qPCR).

A PCR-multiplex é uma técnica que podemos amplificar mais de um região de interesse em uma única reação, utilizando-se mais de um par de *primers* ( KIM et al., 1995; YANG; ROTHMAN, 2004).

A solução (mix) foi submetida a ciclos de diferentes temperaturas em aparelho termociclador T100 (Bio-Rad, EUA). A sequência dos *Primers* e o tamanho dos fragmentos amplificados estão descritos no quadro 5 e a ciclagem no quadro 6.

<b>Primers Utilizados</b>	<b>Sequências - 5'-3'</b>	<b>Tamanho do produto amplificado</b>
<b>β-globina direto</b>	GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC	700pb
<b>β-globina reverso</b>	CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT	
<b>GSTM1 direto</b>	CTGCCCTACTTGATTGATGGG	271pb
<b>GSTM1 reverso</b>	CTGGATTGTAGCAGATCATGC	
<b>GSTT1 direto</b>	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC	480pb
<b>GSTT1 reverso</b>	TCACCGGATCATGGCCAGCA	

Quadro 5. **Primers para amplificação dos genes submetidos a PCR multiplex adaptado de GONCALVES et al., 2010)**

<b>Reagentes</b>	<b>Volume e concentração final em 1 reação de PCR</b>	<b>Programa de amplificação</b>
<b>H<sub>2</sub>O UP</b>	17,05 µL	35 ciclos
<b>Tampão (10X)</b>	2,5 µL (1X)	
<b>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</b>	0,75 µL (1,5mM)	
<b>dNTPs (10mM)</b>	0,5 µL (0,2 mM)	
<b>Iniciadores MIX* (5µM)</b>	2 µL (0,4 µM)	
<b>GoTaq Hot Start (5U/µL)</b>	0,2 µL (1U/µL)	
<b>DNA</b>	2 µL	
<b>Volume final</b>	25µL	

**Quadro 6.** Parâmetros da PCR que foram aplicados para os genes estudados

A determinação dos SNPs pela técnica qPCR foi realizada com o sistema TaqMan® e analisados através da plataforma StepOnePlus™ v. 2.0 (Applied Biosystems).

. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 10uL/reação, contendo 5uL de 2x TaqMan Universal Master Mix, 0,200uL de 20x SNP Genotyping Assay, 2,800uL de água esterilizada, com 2 uL de DNA da amostra.

A tecnologia se baseia na medição da fluorescência durante as ciclagens, emitidas através de sondas específicas para cada genótipo. A quantidade de fluorescência emitida é proporcional à quantidade do produto da PCR e permite a monitorização da reação. A curva de PCR resultante é usada para definir a fase exponencial da reação, que é condição prévia para o cálculo do número de cópias produzidas (KLEIN, 2002).

<b>Gene (polimorfismo)</b>	<b>Ref. SNP ID</b>
GSTP1 (Ile105Val)	rs1695
GSTP1 (C>T)	rs1871042
CAT (C-262T)	rs1001179
SOD (Ala16Val)	rs4880

**Quadro 7.** Sondas utilizadas para determinação dos SNP

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os softwares utilizados para as análises estatísticas foram: IBM SPSS *Statistics* para *Windows*, Versão 22.0.; *GraphPad Prism* versão 5.00 para *Windows* e Epi Info™ 7.1.5.2.

### 4.1. DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS

A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação foram utilizados os testes paramétricos ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, foi verificada a diferença entre as médias dos valores e foram observadas diferenças significativas conduzidas de múltiplas comparações de médias através do teste de Bonferroni (ou post-hoc). O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições fora do normal.



## 4.2. ANÁLISE DE VARIÁVEIS QUALITATIVAS OU CATEGÓRICAS

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Nas análises de valores inferiores a 4, estas foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Foram calculadas os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência dessas variáveis.

Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

A estatística descritiva foi aplicada para analisar as principais características clínicas e demográficas das amostras avaliadas.

A partir dos resultados de genotipagem dos SNP investigados, as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs observados foram calculadas por contagem direta e analisados pelo Teste  $\chi^2$  para análise de associação das variáveis (pacientes com LES x controles). A razão de chances (*OR*) foi calculada para estimar o risco, e o intervalo de confiança adotado foi de 95%. Valores de *OR*<1 determinam proteção, enquanto que valores *OR*>1 determinaram risco associado. Valores de *P*<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ARTIGO

#### **Glutathione S-transferase, Catalase and Mitochondrial superoxide dismutase Gene Polymorphisms Modulates Redox Potential in Systemic Lupus Erythematosus Patients from Manaus, Amazonas, Brazi**

de Oliveira, M.A.A., Mallmann, N.H., de Souza, G.K.B.B. *et al.* Glutathione S-transferase, catalase, and mitochondrial superoxide dismutase gene polymorphisms modulate redox potential in systemic lupus erythematosus patients from Manaus, Amazonas, Brazil. *Clin Rheumatol* **40**, 3639–3649 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10067-021-05680-0>

**Glutathione S-transferase, Catalase and Mitochondrial superoxide dismutase Gene Polymorphisms Modulates Redox Potential in Systemic Lupus Erythematosus Patients from Manaus, Amazonas, Brazil**

Marco Aurélio Almeida de Oliveira<sup>1</sup>; Neila Hiraishi Mallmann<sup>1</sup>; Giselle Katiane Bonfim Bacellar de Souza<sup>1</sup>; Thiago de Jesus Bacha<sup>1</sup>; Emerson Silva Lima<sup>1</sup>; Domingos Sávio Nunes de Lima<sup>2</sup>; Luiz Fernando de Souza Passos<sup>2</sup>; Marilda de Souza Gonçalves<sup>3</sup>; José Pereira de Moura Neto<sup>1</sup>

1 - Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Amazonas, Brasil.

2 - Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Medicina, Manaus, Amazonas, Brasil.

3 - Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil.

\*Address for correspondence:

José Pereira de Moura Neto, Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Avenida General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 - Coroado , Manaus - AM, CEP: 69067-005, phone + 55-92-3305-1181- R:2007 or jp-mn@hotmail.com / jpmn@ufam.edu.br

Short running title: **GST, Catalase and SOD2 gene polymorphisms modulate redox potential in SLE patients.**

**Sponsorships: Financial support was provided by grants from:**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - Processo: 1094/2013-FAPEAM.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the frequency of GST, catalase and SOD2 genetic polymorphisms and their correlation with SLE.

**Methods:** A total of 290 females (patients = 151; controls= 139), were recruited. Multiplex-PCR was performed for genotyping GSTM1 and GSTT1 genes, whereas Real time qPCR was used for determination of SNPs: CAT C262T, SOD2 C47T, GSTP1 A313G and GSTP1 IVS6 -C16T.

**Results:** Thiol levels are decreased in SLE patients ( $p < 0.001$ ), while MDA levels were significantly higher ( $p < 0.001$ ) and those carrying the polymorphisms had higher rates of oxidative stress. Patients with double null deletion GSTT1<sup>null</sup>/GSTM1<sup>null</sup> had a frequency almost five times higher than the controls ( $p < 0.001$ , OR 4.81, CI 1.98-12.11). SLE Patients had a lower wild type frequency of SOD2<sup>CC</sup> allele compared to controls (12.4% vs 27.3%). Statistical significances were observed on the association between the GSTT1<sup>null</sup>/GSTM1<sup>null</sup> with SOD2<sup>mut</sup> ( $p < 0.001$ , OR 0.15, CI 0.05- 0.47), with GSTP1 A303G ( $p = 0.012$ , OR 0.19, CI 0.05-0.69) with GSTP1 IVS6 ( $p = 0.008$ , OR 0.14, CI 0.03-0.63). The same was observed between SOD2 C47T with GSTP1 A303G ( $p = 0.09$ , OR 0.27, CI 0.09-0.74) and GSTP1 IVS6 ( $p = 0.036$ , OR 0.41, CI 0.18-0.92).

**Conclusions:** The deletion GSTT1<sup>null</sup>/GSTM1<sup>null</sup> may contribute to the increased of the oxidative stress in SLE patients. Isolateds GSTP1 and CAT polymorphisms do not seem to influence the increased oxidative stress, neither SLE clinical manifestations. SOD2 47<sup>CT/TT</sup> allele may have greater oxidative stress due to structural change in the protein and decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. The combination of polymorphic genes may be involved in the pathogenesis of the disease.

**Key words:** Systemic Lupus Erythematosus; Gene Polymorphism; Autoimmune Diseases

## KEY-POINTS:

### 1- Major question of our paper:

We believe that this paper will be of interest to the readership of your journal had the involvement of polymorphisms and mutations that these may influence the mechanisms of LUPUS disease.

### 2) Our results.

Thiol level was significantly ( $p < .001$ ) lower and MDA level significantly increased ( $p < .001$ ) among SLE patients. Those carrying the polymorphisms had higher rates of oxidative stress. SLE Patients had a frequency almost five times higher of double null deletion  $GSTT1^{\text{null}}/GSTM1^{\text{null}}$  than the controls. SLE Patients had a lower wild type frequency of  $SOD2^{\text{CC}}$  allele compared to controls (12.4% vs 27.3%). We believed the deletion  $GSTT1^{\text{null}}/GSTM1^{\text{null}}$  may contribute to the increased of the oxidative stress in SLE patients while carriers of the mutant  $SOD2\ 47^{\text{CT/TT}}$  allele may have greater oxidative stress due to structural change in the protein and decreased  $H_2O_2$  production. The combination of polymorphic genes may be involved in the pathogenesis of the disease.

### 3) Implications of our results:

Evidence for the involvement of genetic factors in severe clinical to lupus is compelling. This manuscript shows genetic insights in pathogenic pathways that may lead to severe clinical implications to LES. Therefore, it is necessary to understand their impact on overall disease pathogenesis and prognosis in these patients. We understand from general consensus about environmental factors can modify disease, however, maybe just in individuals who have a permissive genetic background. Even taht no single gene predisposes some individuals to LES, we believe the genetic factors described in this manuscript are important elements in susceptibility to severe clinical to LES.

## INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory autoimmune disease. The formation of immune complexes leads to multisystemic disorders, with specific signs and symptoms depending on the affected organ, characterized by periods of exacerbation and remission. The inflammatory nature of the disease implies the existence of increased oxidative stress in these patients, and can contribute to immune dysfunction and damage of biological molecules such as DNA, RNA, proteins and antioxidants. Although the etiology is not yet fully understood, studies show that combinations of polymorphic genes can predispose to the disease, allowing environmental factors to trigger immunopathologic responses in these patients [1].

Oxidative damage can be propagated through endogenous and exogenous pathways. Decreased levels of reduced glutathione, formation of superoxide anion ( $O_2^-$ ) via mitochondrial dysfunction and formation of hydroxyl radicals ( $OH^-$ ), for example, are endogenous causes of the oxidative stress. This state is also observed in the decrease of antioxidant defense, caused by the decrease or inactivity of the enzymes that participates in redox equilibrium [2,3]. The products of these oxidative modification cascades, such as serum levels of malondialdehyde (MDA), resulting from lipid peroxidation, are associated with the activity, organ damage and comorbidities in SLE. Inversely, decreased levels of serum thiol have been used as markers of oxidative stress [4]. Studies demonstrate that enzymes such as glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and Mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2) are altered in SLE. These enzymes have polymorphic genes that alters the structure or activity thus contributing to the increased oxidative stress [5,6]. The literature showed lupus nephropathy is a severe clinical of SLE. Recently, Bona and col (2020) showed imbalance in the redox status between lupus nephritis types, principally in active lupus nephritis patients, with potential lipid peroxidation and could also affect renal tubular function in these patients [7].

Glutathione S-transferase (GST) are a superfamily of phase II enzymes that act catalyzing the detoxification of hydrophobic and electrophilic compounds with reduced glutathione [8]. Products of GSTM1 and GSTT1 genes are involved in the detoxification of aromatic hydrocarbons, mutagens and compounds such as MDA [8]. Both genes have homozygous null variants ( $M1^{null}$  and  $T1^{null}$ ) resulting in the absence of the enzymes and they are investigated in the susceptibility to diseases such as cancers, atherosclerosis and hypertension [10-12]. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) is of importance for oxidative stress research because of its role manly in detoxifying xenobiotics, metabolizing any drugs, and because of its

involvement in cell cycle and apoptosis regulation [13,14]. Two common GSTP1 genetic polymorphisms are studied extensively. Many common GSTP1 genetic polymorphisms are studied extensively, however, functionally, the single nucleotide polymorphisms (SNP) rs1695 (A313G) and rs1871042 (IVS6 -C16T), expresses a protein with altered thermal instability and catalytic activity [15-18].

Mitochondrial superoxide dismutase 2 along with Catalase comprises the primary enzyme system defense against reactive oxygen species (ROS) [19]. Whereas SOD2 acts in the conversion of O<sub>2</sub><sup>-</sup> anion to the less toxic hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and then catalase catalyzes the conversion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and oxygen [20]. The SOD2 C47T SNP (rs4880) alters the structure of the enzyme, decreasing the efficiency of entry into the mitochondrial matrix and consequently decreases the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dismutation. Catalase is expressed in all tissue types, predominantly in the liver, kidney and erythrocytes [21]. The CAT C262T SNP (rs1001179) is found in the promoter region of the gene and is associated with low enzyme activity [22].

Studies have demonstrated the involvement of polymorphisms and mutations in several genes that contribute to the genetic etiology of SLE. This suggests that SNPs and deletions can influence the mechanisms of disease [23,24]. Recent studies have shown that the antioxidant status levels are decreased in patients with SLE, especially in severe stages of disease [25] and an Egyptian study demonstrated a strong association of the SOD2 rs2758332 not GSTP1 rs1695 polymorphism with the risk of SLE disease [26]. The aim of our study was to investigate the polymorphisms of glutathione s-transferases (T1<sup>null</sup>, M1<sup>null</sup>, P1 A313G and P1 IVS6 -C16T), superoxide dismutase (C47T), catalase (C-262T) and their correlation with SLE.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study Population**

This was a case-control study conducted in the period from 2009 to 2014. A total of 348, 187 patients and 195 healthy volunteers (controls) attending Rheumatology\_department of Federal University of Amazon (UFAM), Brazil were evaluated. All the patients as well as controls were only females. The control group consisted of people without consanguinity with patients, non-smoking, without inflammatory symptoms and diseases. Patients and controls were excluded if they exhibited diseases, condition or behavior that influences the rise of ROS, such as: infectious diseases, primary diabetes, HIV, smoking and pregnancy. The protocol was approved by the Institutional Ethical Committee from UFAM (CAAE n° 0286.0.115.000-11) and confirms to the ethical guidelines of Declaration of Helsinki 1975, as revised in 2000.

Diagnosis of SLE was based on clinical and laboratory criteria of the American College of Rheumatology (ACR) and were evaluated according to disease activity index SLEDAI at the time of sample collection and divided into three groups: Inactive Lupus (IL) (n=71) consisted of individuals who did not show lupus activity (SLEDAI = 0) for at least one year and without laboratory results characteristic of kidney injury; - Active Lupus (AL) (n = 47) composed of active lupus patients (SLEDAI  $\geq$  4) without renal manifestation; - Lupus Nephritis (LN) (n=69) of active lupus patients (SLEDAI  $\geq$  4) diagnosed with kidney injury (persistent proteinuria greater than 500mg / 24h or  $\geq$ 3 + in urinary sediment) [27]. It is important to emphasize that 85% of our LN patients were classified of group IV, patients with diffuse nephritis [28].

According to a 2013 genetic study, the ancestry of the inhabitants of Manaus is 45.9% European, 37.8% Native American and 16.3% African [29]. The authors do not speculate about the race of the participants due to the strong regional ancestral mix found in the Amazonian caboclos, which originate with the arrival of Caucasians and blacks in indigenous lands. However, in the interview and signing the informed consent form, we asked each patient/volunteer (control) to answer variables such as weight; disease time and skin color (white, black, Brown and indigenous). Brown color was the most frequent in both groups, with 82% in patients and 78% in controls, followed by 12% and 17% for white and 6% and 5% black, respectively. No indigenous people participated in the study.

### **Sample collection and clinical and laboratory analysis**



Peripheral blood samples (2-3ml) were collected in tubes containing EDTA for hematological and molecular analysis and in tube without anticoagulant for serum analysis. All the hematological, molecular and biochemical analysis were carried out at Laboratory of Hematology and Molecular Biology (LAEBM), Faculty of Pharmaceutical Sciences (FCF-UFAM), Manaus – Amazonas-Brazil.

### **Serum Biomarkers**

Serum urea, creatinine, urea, uric acid, total proteins were quantified using Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic Systems®, Inc, Branchburg, NJ). Quantitative measurement thiols and MDA were performed as described previously [4]. For total ROS stress index and total antioxidant capacity quantification were performed using established methods [30,31].

### **Sample Size and Power Analysis**

For to estimate sample size for our study, we chose the total serum thiols as the central study variable. From previous results of our group [4], it was demonstrated a detectable of  $80 \pm 50 \mu\text{mol/L}$  in serum thiol levels. It was then defined a significance of 0.05 and power at 90%, we calculated an effect size of 1.98 and estimated a sample size of 108 patients for each study group. Sample size calculation and power analysis was performed by G\*Power: Statistical Power Analyses v3.1.9.2 [32].

### **DNA extraction and Genotyping**

The DNA was extracted from leukocytes using Brazol® technique according to the manufacturer's instructions. Homozygous null deletion polymorphisms in M1 and T1 genes were determined by multiplex PCR using specific primers [33]. SNPs Genotyping was conducted using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The probes used were: GSTP1 A303G (rs1695), GSTP1 IVS -16CT (rs1871042), CAT C267T (rs1001179) and SOD2 C47T (rs4880).

### **Statistical analysis**

Analysis of the distribution of variables was performed using the Kolmogorov-Smirnov test together with ANOVA parametric tests or nonparametric Kruskal-Wallis tests. The ANOVA parametric test was used to analyze the distribution of the means of quantitative

variables with normal distribution within categories. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the off-normal distributions.

The analysis of qualitative or categorical variables of three or more groups was performed by nonparametric chi-square ( $\chi^2$ ), corrected by the Mantel-Haenszel test and Yates. The analysis values of less than 4, these were performed by Fisher's exact test. Genotypes frequencies of the SNP's observed were analyzed by  $\chi^2$  test for association analysis of the variables (SLE x controls). The odds ratio (OR) was calculated to estimate the risk, and the adopted confidence interval was 95%. When values less than 4 were obtained, a Fisher's exact test was used.

The data analysis was performed using IBM SPSS Statistics, Version 22.0; GraphPad Prism version 5.0 and Epi Info™ 7.1.5.2. A p value of less than .05 was considered statistically significant. The genotypic frequencies for polymorphisms were analyzed in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium.

## RESULTS

The genotypic frequencies of polymorphisms were 34.5% to GSTT1<sup>null</sup> and 15.8% to GSTM1<sup>null</sup>; 44.4% to GSTP1 313<sup>AG</sup> and 16.9% to GSTP1 313<sup>GG</sup>; 27.8% to GSTP1 IVS6<sup>CT</sup> and 6.7% to GSTP1 IVS6<sup>TT</sup>; 48.9% to SOD 47<sup>CT</sup> and 33.8% to SOD 47<sup>TT</sup>; 14.8% to CAT 262<sup>CT</sup> and 0.9% to CAT 262<sup>TT</sup>.

All individuals in our study (patients and controls) were women. The average age was  $32.7 \pm 6.8$  in the control group ranging from 18 to 54 years and  $33.7 \pm 9.8$  in patients ranging from 15 to 64 years. Photosensitivity were prevalent in most patients (88.4%), followed by erythematous rash (72.5%), renal disease (46.7%), hypertension (high blood pressure) (41.7%), oral ulcers (34.8%), fibromyalgia (14.9%) and antiphospholipid syndrome (12.5%). Other clinics as diabetes, cardiac failure and Asthma had a frequency below 5%. Demographic data of patients and controls and the two most frequent medications used by patients are showed in table 1. It is important to note that patients involved in this study were being treated with prednisone (20-60 mg/day) and chloroquine (150 -400 mg/day). Those patients who were being treated with concentrations above of these were excluded from the study. Corticosteroid use (prednisone) was categorized as follows: low ( $\leq 7.5$ mg/day), medium (7.5–30 mg/day) and high dose ( $>30$ mg/d) [34].

In figure 1 we can observe the involvement of the mutations on the oxidative stress index, while table 2 demonstrates the hematological, biochemical and oxidative stress parameters among SLE patients and controls. Hematocrit, hemoglobin as well as platelet counts were found to be significantly lower ( $p < .001$ ) in patients as compared to controls.

Serum urea, creatinine and uric acid levels were increased among patients, while the levels of total protein and albumin were decreased in the present study. We also evaluated serum oxidative markers such as Thiol, ROS and MDA between SLE patients and controls. Whiles thiol level was significantly ( $p < .001$ ) lower in SLE patients, MDA on the other hand was significantly increased ( $p < .001$ ) among SLE patients.

Frequencies of GSTM1 and GSTT1 genotypes between the study groups by index SLEDAI (IL, AL and LN) were also evaluated (Data not shown). We found that 20 individuals carrying the double null deletion (GSTT1<sup>null</sup>/GSTM1<sup>null</sup>) are in IL group. The comparison between the frequencies of GSTT1 and GSTM1 genotypes in patients and controls is shown in table 3. No significant differences were observed in the frequencies of GSTT1<sup>null</sup> and GSTM1<sup>null</sup> genotypes between patients and controls. However, we observed

significant differences among patients carrying GSTT1<sup>null</sup>/GSTM1<sup>null</sup> double null deletion and controls (OR 4.81, CI 1.98-12.11, p<.001).

The SOD2 C47T genotypic frequency demonstrated that patients had a lower frequency of the wild allele than the controls (12.4% vs 27.3% - p=.026). We found that frequency of the mutant allele was nearly two times higher in patients compared to wild-type allele.

Frequency analysis between two polymorphisms was performed in order to verify the joint involvement of the mutations with the disease (table 4). Associations of protection of the combined GSTs and SOD2 genotypes were observed in controls when compared to SLE patients.

The possible influence of the polymorphisms, separate and in combination, with the levels of thiols was also evaluated (Figure 2). It was shown that SLE patient's with of mutation have a higher concentration of these antioxidants, suggesting a protective effect mainly changing by GSTT1<sup>null</sup>/GSTM1<sup>null</sup> patients. Figure 3 shows greater peripheral pancytopenia in patients with SNPs and SLE, mainly involving the GSTs genotypes Mu, Theta and Pi.

## DISCUSSION

The majority frequency of women in our study is in agreement with the literature that demonstrates that SLE is predominant in women of fertile age in the proportion 1: 9 in relation to men [35,36]. The fact that SLE as well as other autoimmune diseases, are predominant in women is not fully understood, but recent study has shown that the X chromosome through independent hormones mechanisms can be one of the genetic causes of SLE based on the comparison in subjects people with X trisomy and carriers of the disease [37].

The had higher rates of oxidative stress were found in individuals carrying the polymorphisms had higher rates of oxidative stress, therefore we believe that the mutations mainly in combination contribute to increased oxidative stress. Although they did not correlate genetic markers, the same results were found in rheumatoid arthritis patients [38] and lupus nephritis patients [25], which demonstrated high levels of oxidative stress in these patients.

The GST polymorphisms are distributed heterogeneously in different populations around the world [39,40]. GSTT1<sup>null</sup> frequency was similar to other studies in Brazilian populations ranging from 23-30% [41]. However, GSTM1<sup>null</sup> frequency was different from other regions of Brazil ranging from 31 to 40% [42] but similar to other studies, particularly among Brazilian Indians and South African populations. The distribution of A313G variants of GSTP1 shows data similar to a study conducted among indigenous populations of Amazonas, wild type, heterozygous and homozygous frequency were 35%, 46% and 19%, respectively [43,44]. Our study showed for the first time the frequency of GSTP1 IVS6 -C16T in the Brazilian population corroborating with databases like dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1871042>).

The genotypic frequencies of SOD2 C47T and CAT C262T are also in accordance with data found in different Brazilian populations [45]. Taufer et al. (2005) demonstrated an approximated frequency of 60.6 % and 24.4% respectively for CT and TT genotypes of SOD2 and it was a mixed ethnicity population, like our study [46].

Lower hematocrit and hemoglobin concentrations are expected in SLE patients. Studies have shown a correlation between low levels of hematocrit with the inflammatory response and disease activity. Also, thrombocytopenia is reported to be present in approximately 33% of SLE patients, however, levels below 100.000/mm<sup>3</sup> were demonstrated only in 5% of cases [47,48].

Thiol level results corroborated with earlier studies that suggest decrease in thiol levels may be an important biomarker of disease activity [3,49]. The MDA marker this is in accordance with study by Pérez et al. (2012), that demonstrated a significant increase of MDA in SLE patients (OR 12,5; IC 3,7–41,5;  $p < .001$ ), indicating increased oxidative stress by lipid peroxidation in these patients [4].

In our study 86.8% of patients used prednisone as immunosuppressive ( $p < .001$ ) and the high frequency of the double null deletion (GSTT1null/GSTM1null) found in IL group patients suggests the possibility that this double deletion is involved in a better response to treatment. In a study of patients with acute lymphoblastic leukemia, a better prognostic factor was the initial response to treatment with prednisone and, although it was not statistically significant ( $p = .071$ ) GSTT1null deletion gave a decrease of 6.7-fold the risk of poor response to prednisone compared to wildtype individuals, while, GSTM1 and GSTP1 genotypes did not show any association [50]. Recent study, Salime and col. (2015) in an Iranian population showed high frequency to GSTT1 null in SLE patients than controls. This same study, the combination of GSTT1 null/ GSTM1 null genotypes as a risk factor for SLE (OR 2.8; CI 1.2-6.4,  $p = .014$ ) [51]. We know that glutathione (GSH) is an important antioxidant, performing concomitantly with glutathione S-transferase, important role in the detoxification via catalysis. This way, we understand that antioxidant activity of these enzymes exercise significant reduction of the formation of conjugates with endogenous dangerous compounds, avoiding the increased oxidative stress and facilitating metabolic detoxification of this xenobiotics.

Deletions on the GST genes are widely studied for associations with diseases [52,53]. Although some studies have shown the involvement of GSTT1<sup>null</sup> and GSTM1<sup>null</sup> deletions in SLE, the results are different in each population, while in our study the influence of the polymorphisms was not observed separately, other studies have reported the risk of at least one of genotypes in susceptibility to SLE. Rupasree et al. (2013) demonstrated that GSTT1<sup>null</sup> deletion may be associated with risk of SLE (OR 1.83, CI 1.11-3.01) as well as the association between polymorphisms of the enzymes GSTM1, GSTT1 and catecholamine methyltransferase (phase II enzyme) (OR 3.33, CI 2.30-4.82) [54]. Zhang et al. (2010) in a Chinese population showed significant differences between carriers of the GSTM1<sup>null</sup>, concluding the participation of the polymorphism on susceptibility to SLE [55]. Kang et al (2005) did not observe any association between GST genes and susceptibility to SLE [56]. The authors suggest that the deletions may influence some clinical manifestations, the

GSTM1<sup>null</sup> was associated with low frequency of hematological disorders ( $p=.042$ ), GSTT1<sup>null</sup> was associated with low frequencies of discoid rash ( $p=.018$ ) and nephritis ( $p=.033$ ).

In present study we also evaluated the influence of genotypes on clinical manifestations but no positive correlations were observed (data not shown). Fraser et al (2003) evaluated the polymorphisms of GST in SLE patients with workers exposed to solar radiation. The authors in their study suggested GSTM1<sup>null</sup> can modify the effects of occupational exposure and risk to SLE in Caucasians. Similarly our findings suggest that the double deletion can be a risk factor for SLE, however our results show risk among African Americans (OR 3.9) and not in Caucasians (OR 0.8) [57].

Sobkowiak et al. (2008) observed association between SOD2<sup>TT</sup> and Raynaud's phenomenon (OR 12.0, CI 2.31-62.19,  $p=.001$ ) and immunologic manifestations (OR 2.9, CI 1.20-7.24,  $p=.022$ ) in patients with SLE, which suggests the participation of mutant homozygotes in clinical manifestations of the disease [58]. Despite the significant results found in our study, there were no correlations between the clinical manifestations and SOD2 C47T polymorphism (data not shown). SOD2 in C allele carriers are able to cross the two mitochondrial membranes, whereas T variant is incorporated only in the inner membrane of the mitochondrial matrix, therefore carriers of TT genotype become 30 to 40% less effective in production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, favoring oxidative stress in these patients.

There was no positive correlation between SNPs of GSTP1 (A313G and IVS6 -C16T) and the risk to SLE (data not shown). Unlike our results, Glesse et al. (2014) demonstrated protective role of heterozygous variant GSTP1 313 AG in European descent patients [59]. We had the purpose of verifying the participation of haplotypes of GSTP1 A313G in patients with SLE. Unfortunately, few studies so far found in the literature describing possible correlations between GSTP1 IVS6 -C16T polymorphism and diseases (cognitive ability, asthma, allergies, hypertension and acute myocardial infarction) [60-63], however there were no positive correlations, and our results are the first to cite these correlations.

Also, in present study no positive correlation was observed between the CAT C262T polymorphism and SLE patients (data not shown). These observations are supported by the study which suggested that the polymorphism is associated more with lower enzyme activity rather than the risk of the disease, hence confirming our results [64]. The same was observed by Eny et al. (2005) and D'Souza et al (2008), suggesting that this polymorphism does not have a central role in the pathogenesis of SLE, however the authors urge the need for studies with combinations of genotypes to determine whether combined mutations can be influence the development of disease [65,66].

Our study suggests that polymorphisms concomitantly may influence susceptibility to SLE. Different mechanisms associated with each mutation may be able to promote an exacerbated immune response by increased oxidative stress or low antioxidant capacity in these patients. It was shown that SLE patient's with of mutation have a higher concentration of these antioxidants, suggesting a protective effect mainly changing by GSTT1<sup>null</sup>/GSTM1<sup>null</sup> patients. Studies have shown that elevated levels of thiols may reduce cellular damage caused by oxidative stress [1,2,53].

We understand that these data are important in the follow-up and treatment of patients, since spinal cord hypoplasia is a frequent finding in these patients and that these polymorphisms may aggravate clinical and severity, especially in those who use corticosteroids. We believe that this finding is of fundamental importance, since they reiterate the relevance of the hematological alterations associated with Systemic Lupus Erythematosus.



## CONCLUSION

Our study showed that patients with SLE have increased oxidative stress evidenced by increased lipid peroxidation markers and decreased levels of thiols. The double null deletion  $GSTT1^{\text{null}}/GSTM1^{\text{null}}$  may contribute to the increased oxidative stress in SLE, but has no influence on disease activity or nephritis. The isolated polymorphisms of SOD2 C47T and CAT C262T does not seem to be important in the increased oxidative stress or clinical manifestations of the disease, however, further studies are needed to determine the actual participation of polymorphisms in these patients.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. Positive correlations between oxidative stress index and genotypes from SLE patients.**

M1: GSTM1    T1: GSTT1    CAT: Catalase    SOD2: Mitochondrial superoxide dismutase 2  
 null: Deleted    wt: Wild Type    mut: Heterozygous+Homozygous mutants

### **Figure 2. Correlations between polymorphisms and serum thiols from SLE patients.**

GSTP1\*: A313G    GSTP1\*\*: IVS6 -C16T  
 CAT: Catalase    SOD2: Mitochondrial superoxide dismutase 2  
 null: Deleted    wt: Wild Type    mut: Heterozygous+Homozygous mutants

### **Figure 3. Correlations between polymorphisms and hematological parameters from SLE patients.**

M1: GSTM1    T1: GSTT1    P1\*: GSTP1 A313G    P1\*\*: GSTP1 IVS6 -C16T  
 SOD2: Mitochondrial superoxide dismutase 2  
 null: Deleted    wt: Wild Type    mut: Heterozygous+Homozygous mutants

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank all blood donors attending the FHMOAM for contributing and participating in this study. Also, the authors thank the staff of the Molecular Biology Laboratory of the Federal University of Amazonas (UFAM) and Gonçalo Moniz Institute – IGM (FIOCRUZ/BAHIA) for the technical support. Finally, the authors thank the Foundation for Research Support of the State of Amazonas (FAPEAM) for financial support. The sponsors of this study are public or nonprofit organizations that support science in general. They had no role in gathering, analyzing or interpreting the data.

Declaration of Interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

## REFERENCES

1. Zhang Q, Ye DQ, Chen GP, Zheng Y. Oxidative protein damage and antioxidant status in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol*. 2010 Apr;35(3):287-94. doi: 10.1111/j.1365-2230.2009.03437.x. Epub 2009 Oct 23. PMID: 19874339.
2. Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Nov;9(11):674-86. doi: 10.1038/nrrheum.2013.147. Epub 2013 Oct 8. PMID: 24100461; PMCID: PMC4046645.
3. Wang G, Pierangeli SS, Papalardo E, Ansari GA, Khan MF. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. *Arthritis Rheum*. 2010 Jul;62(7):2064-72. doi: 10.1002/art.27442. PMID: 20201076; PMCID: PMC2935652.
4. Pérez YG, Pérez LCG, Netto R de CM, Lima DSN de, Lima ES. Malondialdehyde and sulfhydryl groups as biomarkers of oxidative stress in patients with systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol*. 2012 Aug;52(4):658-60. PMID: 22885431
5. Sirivarasai J, Wananukul W, Kaojarern S, Chanprasertyothin S, Thongmung N, Ratanachaiwong W, Sura T, Sritara P. Association between inflammatory marker, environmental lead exposure, and glutathione S-transferase gene. *Biomed Res Int*. 2013;2013:474963. doi: 10.1155/2013/474963. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23484121; PMCID: PMC3581115.
6. Khodayari S, Salehi Z, Fakhrieh Asl S, et al. Catalase gene C-262T polymorphism: importance in ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013 May;28(5):819-822. DOI: 10.1111/jgh.12141.
7. Bona N, Pezzarini E, Balbi B, Daniele SM, Rossi MF, Monje AL, Basiglio CL, Pelusa HF, Arriaga SMM. Oxidative stress, inflammation and disease activity biomarkers in lupus nephropathy. *Lupus*. 2020 Mar;29(3):311-323. doi: 10.1177/0961203320904784. Epub 2020 Feb 16. PMID: 32063098.
8. Ye Z, Song H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2005 May;41(7):980-9. doi: 10.1016/j.ejca.2005.01.014. PMID: 15862746.
9. Thorn CF, Ji Y, Weinshilboum RM, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for GSTT1. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Aug;22(8):646-51. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283527c02. PMID: 22643671; PMCID: PMC3395771.
10. Mo Z, Gao Y, Cao Y, Gao F, Jian L. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate*. 2009 May 1;69(6):662-88. doi: 10.1002/pros.20907. PMID: 19143011.
11. Jia CY, Liu YJ, Cong XL, Ma YS, Sun R, Fu D, Lv ZW. Association of glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms with renal cell carcinoma: evidence from 11 studies. *Tumour Biol*. 2014 Apr;35(4):3867-73. doi: 10.1007/s13277-013-1513-5. Epub 2013 Dec 15. PMID: 24337975.
12. Pandey SN, Jain M, Nigam P, Choudhuri G, Mittal B. Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTM3 and the susceptibility to gallbladder cancer in North India. *Biomarkers*. 2006 May-Jun;11(3):250-61. doi: 10.1080/13547500600648697. PMID: 16760134.
13. Cowell IG, Dixon KH, Pemble SE, Ketterer B, Taylor JB. The structure of the human glutathione S-transferase pi gene. *Biochem J*. 1988;255(1):79-83. doi:10.1042/bj2550079

14. Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem.* 1988;23(3):283-337. doi: 10.3109/10409238809088226. PMID: 3069329.
15. Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis.* 2001 Jan;22(1):67-72. doi: 10.1093/carcin/22.1.67. PMID: 11159743.
16. Gulubova M, Vlaykova T. Expression of the xenobiotic- and reactive oxygen species-detoxifying enzymes, GST-pi, Cu/Zn-SOD, and Mn-SOD in the endocrine cells of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2010 Dec;25(12):1397-405. doi: 10.1007/s00384-010-1041-3. Epub 2010 Aug 17. PMID: 20714737.
17. Sánchez-Gómez FJ, Díez-Dacal B, García-Martín E, Agúndez JA, Pajares MA, Pérez-Sala D. Detoxifying Enzymes at the Cross-Roads of Inflammation, Oxidative Stress, and Drug Hypersensitivity: Role of Glutathione Transferase P1-1 and Aldose Reductase. *Front Pharmacol.* 2016;7:237. Published 2016 Aug 4. doi:10.3389/fphar.2016.00237
18. Moyer AM, Salavaggione OE, Wu TY, Moon I, Eckloff BW, Hildebrandt MA, Schaid DJ, Wieben ED, Weinshilboum RM. Glutathione s-transferase p1: gene sequence variation and functional genomic studies. *Cancer Res.* 2008 Jun 15;68(12):4791-801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6724. PMID: 18559526; PMCID: PMC2490824.
19. Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde DA, Ahuja KD, Robertson IK, Ball MJ, Geraghty DP. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Sep;26(9):2806-13. doi: 10.1093/ndt/gfq828. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21325350.
20. Xu Z, Zhu H, Luk JM, Wu D, Gu D, Gong W, Tan Y, Zhou J, Tang J, Zhang Z, Wang M, Chen J. Clinical significance of SOD2 and GSTP1 gene polymorphisms in Chinese patients with gastric cancer. *Cancer.* 2012 Nov 15;118(22):5489-96. doi: 10.1002/cncr.27599. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22517484.
21. Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, Kunde DA, Ball MJ, Robertson IK, Coombes JS. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene.* 2012 Jun 15;501(2):89-103. doi: 10.1016/j.gene.2012.04.011. Epub 2012 Apr 14. PMID: 22525041.
22. dos Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. The catalase -262C/T promoter polymorphism and diabetic complications in Caucasians with type 2 diabetes. *Dis Markers.* 2006;22(5-6):355-9. doi: 10.1155/2006/983408. PMID: 17264407; PMCID: PMC3851635.
23. Crispín JC, Hedrich CM, Tsokos GC. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol.* 2013 Aug;9(8):476-84. doi: 10.1038/nrrheum.2013.78. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23732569.
24. Rhodes B, Vyse TJ. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford).* 2008 Nov;47(11):1603-11. doi: 10.1093/rheumatology/ken247. Epub 2008 Jul 8. PMID: 18611920
25. Lalwani P, de Souza GK, de Lima DS, Passos LF, Boechat AL, Lima ES. Serum thiols as a biomarker of disease activity in lupus nephritis. *PLoS One.* 2015 Mar 23;10(3):e0119947. doi: 10.1371/journal.pone.0119947. PMID: 25799079; PMCID: PMC4370429.
26. Abd El Azeem RA, Zedan MM, Saad EA, Mutawi TM, Attia ZR. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of antioxidant enzymes SOD2 and GSTP1 genes and SLE risk and severity in an Egyptian pediatric population. *Clin Biochem.* 2021 Feb;88:37-42. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2020.11.010. Epub 2020 Nov 29. PMID: 33264651.
27. Uribe AG, Vilá LM, McGwin G Jr, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcón GS. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus

- Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2004 Oct;31(10):1934-40. PMID: 15468356.
28. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M; International Society of Nephrology Working Group on the Classification of Lupus Nephritis; Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus Nephritis. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.* 2004 Feb;65(2):521-30. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00443.x. Erratum in: *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):1132. PMID: 14717922.
29. Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de Araújo A, Leite Góes Gitaí D, Aparecida da Silva D, de Vargas Wolfgramm E, da Mota Pontes I, Ivan Aguiar J, Ozório Moraes M, Fagundes de Carvalho E, Gusmão L. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS One.* 2013 Sep 20;8(9):e75145. doi: 10.1371/journal.pone.0075145. PMID: 24073242; PMCID: PMC3779230.
30. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int.* 2005 Dec;47(6):635-9. doi: 10.1111/j.1442-200x.2005.02137.x. PMID: 16354215.
31. Harma M, Harma M, Erel O. Oxidative stress in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Feb;192(2):656-7; author reply 657. doi: 10.1016/j.ajog.2004.07.094. PMID: 15696019.
32. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods.* 2009 Nov;41(4):1149-60. doi: 10.3758/BRM.41.4.1149. PMID: 19897823.
33. Goncalves, Marilda & Neto, J & Souza, Claudio & Melo, P & Reis, Mitermayer. (2009). Evaluating glutathione S-Transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leukopenia. *International journal of laboratory hematology.* 32. e49-56. 10.1111/j.1751-553X.2009.01169.x.
34. Buttgerit F, da Silva JA, Boers M, Burmester GR, Cutolo M, Jacobs J, et al. Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann Rheum Dis* 2002;61(8):718–22.
35. Santos KSC dos, Almeida MF de, Maciel TKP, Lima DSN de. Perfil Clínico e Laboratorial de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). *Revista HUGV - Revista do Hospital Universitário Getúlio Vargas*.9. n. 1-2 jan./dez. – 2010
36. Systemic lupus erythematosus (SLE): clinical and laboratory profile of patients followed at the Onofre Lopes University Hospital (UFRN - Natal/Brazil) and early organ damage in patients with recently diagnosed disease. *Rev. Bras. Reumatol.* [online]. 2005, vol.45, n.6, pp.339-342. ISSN 1809-4570. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042005000600002>.
37. Liu K, Kurien BT, Zimmerman SL, et al. X Chromosome Dose and Sex Bias in Autoimmune Diseases: Increased Prevalence of 47,XXX in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(5):1290-1300. doi:10.1002/art.39560.
38. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2007 Feb;40(3-4):167-71. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.10.006. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17196579.
39. Zhong S, Huang M, Yang X, Liang L, Wang Y, Romkes M, Duan W, Chan E, Zhou SF. Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Clin*

- Pharmacol. 2006 Oct;62(4):457-72. doi: 10.1111/j.1365-2125.2006.02690.x. PMID: 16995867; PMCID: PMC1885164.
40. Karaca S, Karaca M, Cesuroglu T, Erge S, Polimanti R. GSTM1, GSTP1, and GSTT1 genetic variability in Turkish and worldwide populations. *Am J Hum Biol.* 2015 May-Jun;27(3):310-6. doi: 10.1002/ajhb.22671. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25515186.
  41. Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res [online].* 2004, vol.37, n.4, pp.451-458. ISSN 1414-431X. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000400002>.
  42. Hatagima A, Klautau-Guimarães MN, Silva FP Da, Cabello PH. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genet. Mol. Biol.* vol.23 no.4 São Paulo Dec. 2000. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400003>
  43. Oliveira C De, Oliveira SF De, Hatagima A, Ferreira LB, Grisolia CK, Klautau-MDN. "Glutathione S-Transferase M1 and T1 Polymorphisms in Brazilian African Descendants. *Human Biology*, vol. 79 no. 1, 2007, p. 131-140. Project MUSE, doi:10.1353/hub.2007.0025.
  44. Klautau-guimarães MDN, Hiragi CDO, Ascensão RFD, Oliveira SF, Grisolia CK, Hatagima A, et al. Distribution of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null phenotypes in Brazilian Amerindians. *Genet. Mol. Biol.* vol.28 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2005. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000100005>.
  45. Hiragi C de O, Miranda-Vilela AL, Rocha DMS, de Oliveira SF, Hatagima A, de Klautau-Guimarães MN. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione s-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three brazilian population groups. *Genet. Mol. Biol. [online].* 2011, vol.34, n.1, pp.11-18. Epub 26-Nov-2010. ISSN 1415-4757. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000102>.
  46. Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IB. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005 Apr;60(4):432-8. doi: 10.1093/gerona/60.4.432. PMID: 15933380.
  47. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.159178>. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2008;28:s11–s16
  48. Yang, M. et al. "Hematocrit Level could Reflect Inflammatory Response and Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *Clinical laboratory* 61 7 (2015): 801-7.
  49. Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005 Jul;52(7):2069-79. doi: 10.1002/art.21130. PMID: 15986354.
  50. Anderer G, Schrappe M, Brechlin AM, Lauten M, Muti P, Welte K, Stanulla M. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pharmacogenetics.* 2000 Nov;10(8):715-26. doi: 10.1097/00008571-200011000-00006. PMID: 11186134.
  51. Salimi S, Nakhac A, Jafari M, Jahantigh D, Sandooghi M, Zakeri Z, Shahrakipour M, Naghavi A, Farajian-Mashhadi F. Combination Effect of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Polymorphisms and Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *Iran J Public Health.* 2015 Jun;44(6):814-21. PMID: 26258094; PMCID: PMC4524306.
  52. Economopoulos KP, Sergentanis TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: a comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2010 Jun;46(9):1617-31. doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.009. Epub 2010 Mar 6. PMID: 20207535.

53. Tew MB, Reveille JD, Arnett FC, Friedman AW, McNearney T, Fischbach M, Ahn C, Tan FK. Glutathione S-transferase genotypes in systemic sclerosis and their association with clinical manifestations in early disease. *Genes Immun.* 2001 Jun;2(4):236-8. doi: 10.1038/sj.gene.6363756. PMID: 11477481.
54. Rupasree Y, Naushad SM, Rajasekhar L, Kutala VK. Association of genetic variants of xenobiotic metabolic pathway with systemic lupus erythematosus. *Indian J Biochem Biophys* 2013;50:447–52.
55. Zhang, Jufeng & Deng, Jingui & Zhang, David & Lu, Yanxin & Liu, Li & Wu, Qi & Shao, Yong & Zhang, Jie & Yang, Hong & Yu, Bo & Wan, Jun. (2010). Association of GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Chinese population. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 411. 878-81. 10.1016/j.cca.2010.03.007.
56. Kang TY, El-Sohehy A, Comelis MC, Eny KM, Bae SC. Glutathione S-transferase genotype and risk of systemic lupus erythematosus in Koreans. *Lupus.* 2005;14(5):381-4. doi: 10.1191/0961203305lu2100oa. PMID: 15934438.
57. Fraser PA, Ding WZ, Mohseni M, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, Gilkeson GS, Cooper GS. Glutathione S-transferase M null homozygosity and risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene-environment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol.* 2003.
58. Sobkowiak A, Lianeri M, Wudarski M, Lacki JK, Jagodziński PP. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val mitochondrial targeting sequence polymorphism in systemic lupus erythematosus in Poland. *Clin Rheumatol.* 2008 Jul;27(7):827-31. doi: 10.1007/s10067-007-0796-6. Epub 2007 Dec 19. PMID: 18095014.
59. Glesse N, Rohr P, Monticielo OA, Rech TF, Brenol JC, Xavier RM, Kvitko K, Chies JA. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases and cytochrome P450 enzymes as susceptibility factors to systemic lupus erythematosus in southern Brazilian patients. *Mol Biol Rep.* 2014 Sep;41(9):6167-79. doi: 10.1007/s11033-014-3496-8. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24981927.
60. Harris SE, Fox H, Wright AF, Hayward C, Starr JM, Whalley LJ, Deary IJ. A genetic association analysis of cognitive ability and cognitive ageing using 325 markers for 109 genes associated with oxidative stress or cognition. *BMC Genet.* 2007 Jul 2;8:43. doi: 10.1186/1471-2156-8-43. PMID: 17601350; PMCID: PMC1933580.
61. Melén E, Nyberg F, Lindgren CM, Berglund N, Zucchelli M, Nordling E, Hallberg J, Svartengren M, Morgenstern R, Kere J, Bellander T, Wickman M, Pershagen G. Interactions between glutathione S-transferase P1, tumor necrosis factor, GSTP1 and traffic-related air pollution for development of childhood allergic disease. *Environ Health Perspect.* 2008 Aug;116(8):1077-84. doi: 10.1289/ehp.11117. PMID: 18709160; PMCID: PMC2516580.
62. Joubert BR, Reif DM, Edwards SW, Leiner KA, Hudgens EE, Egeghy P, Gallagher JE, Hubal EC. Evaluation of genetic susceptibility to childhood allergy and asthma in an African American urban population. *BMC Med Genet.* 2011 Feb 14;12:25. doi: 10.1186/1471-2350-12-25. PMID: 21320344; PMCID: PMC3048491.
63. Levinsson A, Olin AC, Modig L, Dahgam S, Björck L, Rosengren A, Nyberg F. Interaction effects of long-term air pollution exposure and variants in the GSTP1, GSTT1 and GSTCD genes on risk of acute myocardial infarction and hypertension: a case-control study. *PLoS One.* 2014 Jun 10;9(6):e99043. doi: 10.1371/journal.pone.0099043. PMID: 24915237; PMCID: PMC4051658.
64. Ghaly MS, Ghattas MH, Labib SM. Association of catalase gene polymorphisms with catalase activity and susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Suez Canal area, Egypt. *Lupus.* 2012 Oct;21(11):1244-9. doi: 10.1177/0961203312451505. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22736749.



65. Eny KM, El-Soheemy A, Cornelis MC, Sung YK, Bae SC. Catalase and PPARgamma2 genotype and risk of systemic lupus erythematosus in Koreans. *Lupus*. 2005;14(5):351-5. doi: 10.1191/0961203305lu2091oa. PMID: 15934434.
66. D'souza A, Kurien BT, Rodgers R, Shenoi J, Kurono S, Matsumoto H, Hensley K, Nath SK, Scofield RH. Detection of catalase as a major protein target of the lipid peroxidation product 4-HNE and the lack of its genetic association as a risk factor in SLE. *BMC Med Genet*. 2008 Jul 7;9:62. doi: 10.1186/1471-2350-9-62. PMID: 18606005; PMCID: PMC2474584.

Table 1. Demographic Data of study populations.

Characteristics	SLE	Controls
Number	151	139
Median Age, years	33.7 ± 9.8	32.7± 6.8
Smokers	04 (2.65)	0
SLEDAI, median	12	--
SLEDAI, n (%)		
0	0	--
1-5	3 (2.0)	--
6-10	64 (42.38)	--
11-19	72 (47.68)	--
≥ 20	12 (7.94)	--
Medications (mg/day)		
Prednisone (≤ 7.5) n (%)	40 (26.50)	--
Prednisone (7.5-30) n (%)	50 (33.10)	
Prednisone (> 30) n (%)	41 (27.20)	
Chloroquine (100-200) n (%)	63 (41.70)	--
Chloroquine (400) n (%)	42 (27.80)	

SLE: Systemic Lupus Erythematosus      n: Numbers

Table 2. Hematological, biochemical and oxidative stress parameters among SLE patients and controls.

	SLE	Controls	p-value
Leukocytes (1000/mm <sup>3</sup> )	7.87 ± 2.84	7.48 ± 2.10	.405
Platelets (1000/mm <sup>3</sup> )	263.94 ± 79.89	336.53 ± 61.73	<.001
Hematocrit (%)	35.13 ± 4.49	38.48 ± 3.21	<.001
Hemoglobin (g/dL)	11.65 ± 1.37	13.4 ± 1.24	<.001
Urea (mg/dl)	40.29 ± 27.16	25.41 ± 6.71	<.001
Creatinine (mg/dl)	0.89 ± 0.73	0.51 ± 0.18	.001
Uric Acid (mg/dl)	5.51 ± 2.89	3.72 ± 1.08	<.001
Total Protein (g/l)	5.87 ± 1.26	7.89 ± 0.54	<.001
Albumin (g/l)	4.11 ± 0.69	4.62 ± 0.38	.008
Total ROS (μmol/l)	10.32 ± 5.42	27.73 ± 34.81	<.001
Thiols (mmol/L)	178.36 ± 104.71	463.00 ± 156.48	<.001
Malondialdehyde (mmol/L)	4.67 ± 1.24	0.65 ± 0.32	<.001

SLE: Systemic Lupus Erythematosus

Table 3. Frequency of GSTT1 and GSTM1 genotypes among SLE patients and controls.

Genotypes	SLE	Controls	OR (CI)	p-value
	N=144 (%)	N=145 (%)		
GSTT1 <sup>null</sup>	46 (31.9)	44 (30.3)	1.08	.799*
GSTT1 <sup>wt</sup>	98 (68.1)	101 (69.7)	(0.65-1.77)	
	n=113 (%)	n=119 (%)		
GSTM1 <sup>null</sup>	15 (13.3)	18 (15.1)	1.03	.987*
GSTM1 <sup>wt</sup>	98 (86.7)	101 (84.9)	(0.51-2.09)	
	n=126 (%)	n=107 (%)		
GSTT1 <sup>null</sup> /GSTM1 <sup>null</sup>	28 (22.2)	06 (5.6)	4.81	<.001*
GSTT1 <sup>wt</sup> /GSTM1 <sup>wt</sup>	98 (77.8)	101 (94.4)	(1.98-1.12)	

SLE: Systemic Lupus Erythematosus      wt: wild type      null: Gene Deleted  
 GSTT1: Glutathione S-transferase Theta1      GSTM1: Glutathione S-transferase Mu1  
 OR: Odds Ratio      CI: Confidence Interval      \* Yates-corrected chi-square

Table 4. Associations of GSTs (M1, T1, P1-A313G and P1-IVS6 -C16T) and SOD2 C47T genotypes among SLE patients and controls.

Combined Genotypes				p-value
	SLE (%)	Controls (%)	OR (CI)	
T1 <sup>null</sup> M1 <sup>null</sup> / SOD2 <sup>mut</sup>	12 (40.0)	27 (81.2)	0.15 (0.05-0.47)	<.001*
T1 <sup>wt</sup> M1 <sup>wt</sup> / SOD2 <sup>wt</sup>	18 (60.0)	6 (18.2)		
T1 <sup>null</sup> M1 <sup>null</sup> / P1 303 <sup>mut</sup>	22 (62.9)	34 (89.5)	0.19 (0.05-0.69)	.012**
T1 <sup>wt</sup> M1 <sup>wt</sup> / P1 303 <sup>wt</sup>	13 (37.1)	04 (10.5)		
T1 <sup>null</sup> M1 <sup>null</sup> / P1 IVS6 <sup>mut</sup>	44 (80.0)	54 (96.4)	0.14 (0.03-0.63)	.008**
T1 <sup>wt</sup> M1 <sup>wt</sup> / P1 IVS6 <sup>wt</sup>	12 (20.0)	2 (3.6)		
P1 303 <sup>mut</sup> / SOD2 <sup>mut</sup>	5 (6.1)	20 (19.6)	0.27 (0.09-0.74)	.009*
P1 303 <sup>wt</sup> / SOD2 <sup>wt</sup>	77 (93.9)	82 (80.4)		
P1 IVS6 <sup>mut</sup> / SOD2 <sup>mut</sup>	12 (21.8)	30 (40.5)	0.41 (0.18-0.92)	.036*
P1 IVS6 <sup>wt</sup> / SOD2 <sup>wt</sup>	43 (78.2)	44 (59.5)		

T: Glutathione S-transferase Theta 1      M: Glutathione S-transferase Mu 1  
P1: T: Glutathione S-transferase Pi 1      SOD2: Mitochondrial superoxide dismutase  
wt: wild type      null: Gene Deleted      mut: Mutated  
OR: Odds Ratio    CI: Confidence Interval  
\* Yates-corrected chi-square      \*\* Fisher Exact Test

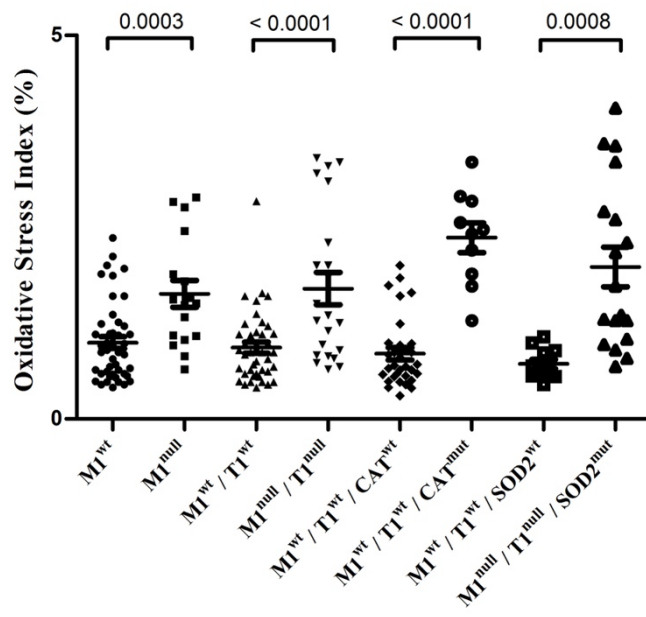


Figure 01.

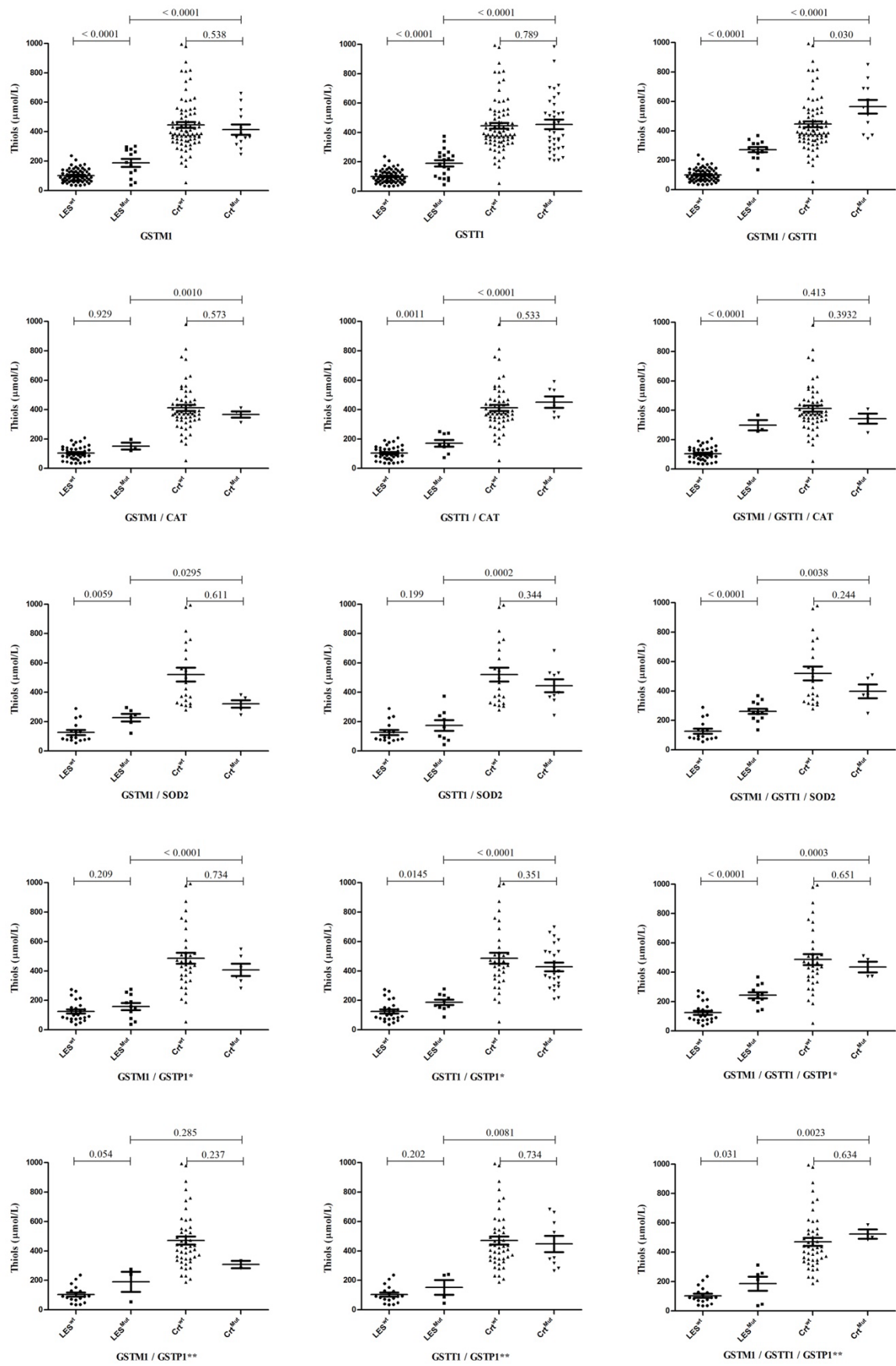


Figure 02.

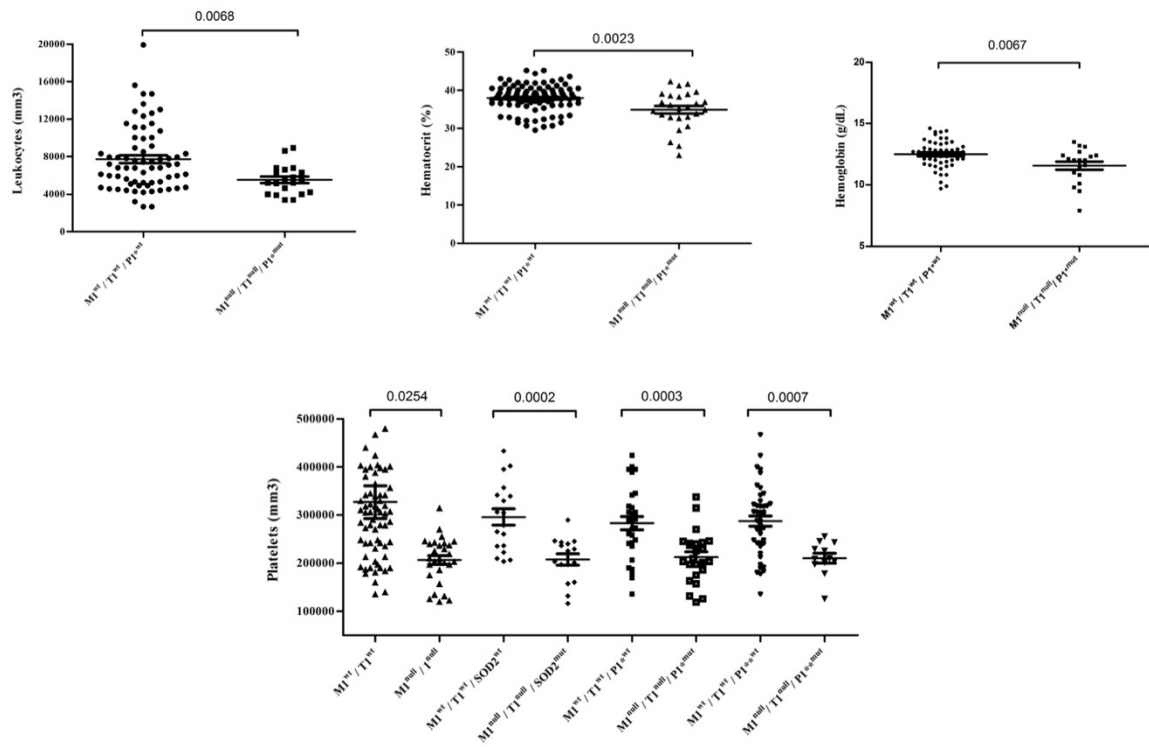


Figure 03.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGMON-LEVIN, N. et al. Systemic lupus erythematosus one disease or many? **Autoimmunity reviews**, v. 11, n. 8, p. 593–595, jun. 2012.
- ASKANASE, A.; SHUM, K.; MITNICK, H. Systemic lupus erythematosus: an overview. **Social work in health care**, v. 51, n. 7, p. 576–586, jan. 2012.
- AVALOS, I. et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. **Lupus**, v. 16, p. 195–200, 2007.
- BIJL, M.; LIMBURG, P. C.; KALLENBERG, C. G. New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis. **The Netherlands journal of medicine**, v. 59, n. 2, p. 66–75, ago. 2001.
- BORCHERS, A. T. et al. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. A277–A287, mar. 2010.
- BORCHERS, A. T. et al. Lupus nephritis: a critical review. **Autoimmunity reviews**, v. 12, n. 2, p. 174–194, dez. 2012.
- BOSCH, X. Systemic lupus erythematosus and the neutrophil. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 8, p. 758–760, 25 ago. 2011.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2013.
- CONDE, S. R. S. DA S. et al. Estudo clínico-epidemiológico de pacientes com lupus eritematoso sistêmico, em uma população da amazônia oriental. **Revista Paraense de Medicina**, v. 23, n. 2, p. 1–5, 2009.
- CRAWFORD, A. et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. **Gene**, v. 501, n. 2, p. 89–103, 15 jun. 2012.
- CRISPÍN, J. C. et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. **Trends in molecular medicine**, v. 16, n. 2, p. 47–57, 2010.
- CRISPÍN, J. C.; HEDRICH, C. M.; TSOKOS, G. C. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 9, n. 8, p. 476–84, ago. 2013.
- D'SOUZA, A. et al. Detection of catalase as a major protein target of the lipid peroxidation



- product 4-HNE and the lack of its genetic association as a risk factor in SLE. **BMC medical genetics**, v. 9, p. 62, jan. 2008.
- DEN DUNNEN, J. T.; ANTONARAKIS, S. E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Human mutation**, v. 15, n. 1, p. 7–12, jan. 2000.
- DUTKIEWICZ, G. et al. Original Article: The association of -262C/T polymorphism in the catalase gene and delayed graft function of kidney allografts. **Nephrology**, v. 15, n. 5, p. 587–591, 2009.
- DUTRA, R. DE M.; OLIVEIRA, T. B. DE. Lúpus eritematoso sistêmico (les): perfil clínico-laboratorial dos pacientes atendidos em um serviço privado de reumatologia na cidade de Santo Ângelo-RS. **RBAC**, v. 41, n. 1, p. 77–80, 2009.
- FAREED, M.; AFZAL, M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, n. 2, p. 123–134, abr. 2013.
- FEERO, W. G.; GUTTMACHER, A. E.; COLLINS, F. S. Genomic medicine - an updated primer. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 21, p. 2001–2011, 27 maio 2010.
- FORTUNA, G.; BRENNAN, M. T. Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. **Dental clinics of North America**, v. 57, n. 4, p. 631–55, out. 2013.
- FREIRE, E. A. M.; SOUTO, L. M.; CICONELLI, R. M. Medidas de avaliação em lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 1, p. 75–80, fev. 2011.
- FU, S. M.; DESHMUKH, U. S.; GASKIN, F. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus revisited 2011: end organ resistance to damage, autoantibody initiation and diversification, and HLA-DR. **Journal of autoimmunity**, v. 37, n. 2, p. 104–111, set. 2011.
- FUJII, J. et al. *World Journal of Nephrology*. v. 4, n. 2, p. 213–222, 2015.
- GALINDO, C. V. F.; VEIGA, R. K. A. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICAS DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: UMA REVISÃO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 4, p. 46–58, 2010.
- GHALY, M. S.; GHATTAS, M. H.; LABIB, S. M. Association of catalase gene polymorphisms with catalase activity and susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Suez Canal area, Egypt. **Lupus**, v. 21, n. 11, p. 1244–1249, 1 out. 2012.

- GILL, J. M. et al. Diagnosis of systemic lupus erythematosus. **American family physician**, v. 68, n. 11, p. 2179–2186, 1 dez. 2003.
- GONCALVES, M. S. et al. Evaluating glutathione S-transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leukopenia. **International journal of laboratory hematology**, v. 32, p. e49–e56, fev. 2010.
- GRIFFIN, T. J.; SMITH, L. M. Genetic identification by mass spectrometric analysis of single-nucleotide polymorphisms: ternary encoding of genotypes. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 14, p. 3298–3302, 15 jul. 2000.
- GRIFFITHS, B.; MOSCA, M.; GORDON, C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 19, n. 5, p. 685–708, out. 2005.
- GUALTIEROTTI, R. et al. Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity reviews**, v. 10, n. 1, p. 3–7, nov. 2010.
- HERRMANN, M.; VOLL, R. E.; KALDEN, J. R. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Immunology today**, v. 21, n. 9, p. 424–426, set. 2000.
- KHODAYARI, S. et al. Catalase gene C-262T polymorphism: Importance in ulcerative colitis. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 28, n. 5, p. 819–22, 2013.
- KIM, Y. et al. Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nature**, v. 376, n. 6541, p. 612–616, 17 ago. 1995.
- KIRIAKIDOU, M. Systemic Lupus Erythematosus. **Annals of internal Medicine**, v. 159, n. 7, p. ITC4–1, 2013.
- KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **Trends in molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 257–60, jun. 2002.
- KODYDKOVÁ, J. et al. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. **Folia biologica**, v. 60, p. 153–67, 2014.
- KUNZ, M. Lupus erythematosus. Part I: epidemiology, genetics and immunology. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 11, n. 8, p. 709–720, ago. 2013.
- KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Free radical mediated peroxidative damage in systemic lupus erythematosus. **Life Sciences**, v. 73, n. 13, p. 1655–1666, ago. 2003.
- LI, Y.; FANG, X.; LI, Q.-Z. Biomarker profiling for lupus nephritis. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 11, n. 3, p. 158–165, jun. 2013.

- MAIDHOF, W.; HILAS, O. Lupus: an overview of the disease and management options. **P&T**, v. 37, n. 4, p. 240–249, abr. 2012.
- MALLAVARAPU, R. K.; GRIMSLEY, E. W. The history of lupus erythematosus. **Southern medical journal**, v. 100, n. 9, p. 896–898, set. 2007.
- MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **Journal of cellular physiology**, v. 192, n. 1, p. 1–15, jul. 2002.
- MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American journal of medicine**, v. 108, n. 8, p. 652–659, 1 jun. 2000.
- MOK, C. C. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 7, p. 481–490, 1 jul. 2003.
- MOSER, K. L. et al. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Genes and immunity**, v. 10, n. 5, p. 373–9, jul. 2009.
- O'NEILL, S.; CERVERA, R. Systemic lupus erythematosus. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 841–55, dez. 2010.
- PARK, J.-H. et al. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 gene polymorphisms and carotid atherosclerosis in Korean patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology international**, v. 24, n. 3, p. 157–63, 2004.
- PATHAK, S.; MOHAN, C. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus : lessons from animal models. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 5, p. 241, 2011.
- PÉREZ, Y. G. et al. Malondialdehyde and sulfhydryl groups as biomarkers of oxidative stress in patients with systemic lupus erythematosus. v. 52, n. 4, p. 656–658, 2012.
- PERL, A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. **Nature Publishing Group**, p. 1–13, 2013.
- PETRI, M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2677–2686, ago. 2012.
- PETROVIČ, D.; PETERLIN, B. GSTM1-null and GSTT1-null genotypes are associated with essential arterial hypertension in patients with type 2 diabetes. **Clinical biochemistry**, v. 47, n. 7-8, p. 574–7, 2014.
- PONS-ESTEL, G. J. et al. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus

- erythematosus. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 39, n. 4, p. 257–268, fev. 2010.
- RAMPUDDA, M.; MARSON, P.; PASERO, G. Le principali tappe nella storia del lupus eritematoso sistemico. **Reumatismo**, v. 61, n. 2, p. 145–152, 2009.
- REYNOLDS, J. A.; IAN N BRUCE. Overview of the management of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research UK**, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2013.
- ROMERO-DIAZ, J.; ISENBERG, D.; RAMSEY-GOLDMAN, R. Measures of Adult Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis care & research**, v. 63, n. S11, p. S37–S46, nov. 2011.
- ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C. M.; AMORIM, L. M. F. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**, v. 1, n. 3, p. 233–240, 2002.
- ROTHFIELD, N.; SONTHEIMER, R. D.; BERNSTEIN, M. Lupus erythematosus: systemic and cutaneous manifestations. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 5, p. 348–62, 2006.
- ROVIN, B. H.; PARIKH, S. V. Lupus Nephritis: The Evolving Role of Novel Therapeutics. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, p. 1–14, 7 jan. 2014.
- SACHIDANANDAM, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928–933, 15 fev. 2001.
- SANTOS, K. S. C. DOS et al. PERFIL CLÍNICO E LABORATORIAL DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES). **Revistahugv - Revista do Hospital Universitário Getúlio Vargas**, v. 9, n. 1-2, p. 11–17, 2010.
- SATO, E. I. et al. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Rev Bras Reumatol**, v. 42, n. 6, p. 362–370, 2002.
- SCOFIELD, R. H.; OATES, J. The place of William Osler in the description of systemic lupus erythematosus. **The American journal of the medical sciences**, v. 338, n. 5, p. 409–412, nov. 2009.
- SEGAL, B. M. et al. Oxidative stress and fatigue in systemic lupus erythematosus. p. 984–992, 2012.
- SHAH, D. et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. **Immunology letters**, v. 129, n. 1, p. 7–12, 10 mar. 2010.
- SPURDLE, A. B. et al. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and

GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 1, p. 67–72, jan. 2001.

TANIGUCHI, N. et al. Association of the CAT-262C>T polymorphism with asthma in smokers and the nonemphysematous phenotype of chronic obstructive pulmonary disease. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 113, n. 1, p. 31–36.e2, 2014.

TOUMA, Z.; UROWITZ, M. B.; GLADMAN, D. D. SLEDAI-2K for a 30-day window. **Lupus**, v. 19, n. 1, p. 49–51, jan. 2010.

TSOKOS, G. C. Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 22, p. 2110–2121, 30 nov. 2011.

URIBE, A. G. et al. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K Are Adequate Instruments to Measure Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 10, p. 1934–1940, 2004.

VARGAS, K. S.; ROMANO, M. A. LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO. **Revista Salus-Guarapuava (PR)**, v. 3, n. 1, p. 15–22, 2009.

VILAR, M. J. P.; RODRIGUES, ULIANA M.; SATO, E. I. Incidência de Lúpus Eritematoso Sistêmico em Natal, RN – Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 6, p. 347–351, 2003.

WAHREN-HERLENIUS, M.; DÖRNER, T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. **Lancet**, v. 382, n. 9894, p. 819–831, 31 ago. 2013.

WANG, G. et al. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. **Arthritis and rheumatism**, v. 62, n. 7, p. 2064–2072, jul. 2010.

XU, Z. et al. Clinical significance of SOD2 and GSTP1 gene polymorphisms in Chinese patients with gastric cancer. **Cancer**, v. 118, n. 22, p. 5489–5496, 2012.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, p. 337–348, 2004.

YE, Z.; SONG, H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **European journal of**

**cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 41, n. 7, p. 980–989, maio 2005.

ZHANG, Q. et al. Oxidative protein damage and antioxidant status in systemic lupus erythematosus. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 3, p. 287–294, abr. 2010.

ZHONG, S. et al. Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 1-2, p. 77–85, maio 2006.

ZIEMER, M.; MILKOVA, L.; KUNZ, M. Lupus erythematosus. Part II: Clinical picture, diagnosis and treatment. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, p. 1–17, 15 jan. 2014.

ZUBAIR, A.; FRIERI, M. Lupus nephritis: review of the literature. **Current allergy and asthma reports**, v. 13, n. 6, p. 580–6, dez. 2013.

## 7. ANEXOS

### Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



#### UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você receberá as informações a seguir para que possa participar voluntariamente do estudo intitulado: **“Polimorfismos Genéticos Envolvidos Na Metabolização / Detoxificação Em Lúpus Eritematoso Sistêmico”**, que tem como objetivo determinar a correlação entre mutações em genes específicos à susceptibilidade no Lúpus Eritematoso Sistêmico e suas manifestações clínicas.

Para cada participante serão feitas algumas perguntas (aplicação de um questionário) e também retirada de uma pequena quantidade de sangue (10 mL) para que sejam realizados os exames laboratoriais e de biologia molecular, necessários para execução do estudo.

A dor que você sentirá será apenas da picada da agulha na veia do seu braço durante a coleta de sangue, e talvez apareça uma pequena mancha roxa no local que certamente desaparecerá em no máximo 4 (quatro) dias. Mas não se preocupe, tudo será feito por um profissional qualificado, com material novo, limpo e descartável.

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas e está de acordo com a legislação sobre pesquisa em seres humanos. Mas se você tiver alguma dúvida, terá o direito de falar com o realizador deste projeto – Marco Aurélio Almeida de Oliveira – no momento que precisar para ter qualquer tipo de explicação sobre a pesquisa, pelo telefone (092)8128-3000, ou no Laboratório de Análises Especializadas em Hematologia e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, situado à Rua Alexandre Amorim, 330 – Aparecida, telefone (092)3232-6504.

Nenhuma pessoa que participar deste estudo terá sua identidade ou imagem divulgada, ou seja, as informações recebidas dos participantes serão analisadas em conjunto e publicadas em revista científica de forma anônima (confidencialmente). Mesmo assim, caso você queira desistir de participar do estudo, mesmo depois de ter assinado este termo, não se preocupe, é um direito seu sair do grupo de estudo em qualquer momento, sem qualquer problema.

Ninguém pagará e nem receberá dinheiro algum para participar deste estudo, no entanto, o pesquisador se compromete em fornecer todos os resultados dos exames realizados de cada participante a fim de auxiliar no seu tratamento médico.

Esperamos, com este estudo, ajudar na ampliação das informações sobre a correlação de polimorfismos (mutações) em pacientes acometidos com lúpus e, como consequência, cooperar na criação de novas estratégias de acompanhamento clínico e laboratorial na tentativa de prever danos especialmente em órgãos vitais como os rins.

Participação voluntária:

Eu, \_\_\_\_\_, declaro ter sido suficientemente informado (a) a respeito do trabalho **“Polimorfismos Genéticos Envolvidos Na Metabolização / Detoxificação Em Lúpus Eritematoso Sistêmico”**, e concedo meu consentimento ao pesquisador Marco Aurélio Almeida de Oliveira para participar deste estudo. Afirmando estar de acordo com todos os itens deste documento que li ou que foram lidos para mim.

Data \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação neste estudo.

Data \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo



## Anexo II – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM**

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0286.0.115.000-11, intitulado: "**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO RENAL DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**", tendo como Pesquisadora Responsável Giselle Katiane Bonfim Bacellar de Souza

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 03 de agosto de 2011.

Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro  
Coordenador CEP/UFAM

**Escola de Enfermagem de Manaus – EEM/UFAM**

Rua Teresina, 4950 – Adnanópolis – CEP: 69057-070 – Manaus-AM – Fone: (92) 3305-5130 – E-mail: cep@ufam.edu.br