

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas
Área de Concentração: Reumatologia

**POLIMORFISMO Glu298Asp DA ÓXIDO
NÍTRICO SINTETASE ENDOTELIAL NO
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tamara Mucenic

Orientador: João Carlos Tavares Brenol
Co-orientador: Ricardo Machado Xavier

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2008

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

Ao meu pai, **Solon Mucenic**, pelo constante estímulo ao aprendizado, à minha mãe, **Tânia Rudnicki**, pelo exemplo profissional. Aos dois, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, **Marcos, Márcia e Francisco**, com quem sempre posso contar.

Agradecimentos:

A realização deste trabalho só foi possível com a colaboração de diversas pessoas e instituições. A todos, manifesto minha gratidão. E de modo particular:

Ao Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol, que me acompanha desde cedo na minha carreira profissional, pela orientação dedicada e pelo constante estímulo em todas as fases de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier, pelo profundo conhecimento do método científico e pela sua capacidade em transmiti-lo.

Ao Prof. Dr. José Artur Bogo Chies, pelo fundamental apoio junto ao laboratório de genética.

Ao Bruno Paiva dos Santos, pelo trabalho laboratorial impecável.

Ao Dr. Markus Bredemeier, pelo auxílio nas análises estatísticas, com dedicação e entusiasmo.

Ao Dr. Odirlei André Monticielo, pelo apoio e pelas discussões críticas, que muito enriqueceram este trabalho.

À minha prima e amiga Patrícia Yurgel, pela revisão.

Aos colegas e funcionários do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e auxílio.

A todos os meus familiares e amigos, que estiveram presente na minha vida durante a realização deste trabalho, sou grata pela compreensão e apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Lúpus eritematoso sistêmico (LES)	13
2.1.1. Conceito, etiologia e prevalência do LES.....	13
2.1.2. Fisiopatogênese do LES.....	14
2.1.3. Suscetibilidade genética para o LES.....	15
2.1.4. Sobrevida no LES.....	17
2.1.5. Importância da aterosclerose no LES.....	17
2.1.6. Fatores de risco cardiovasculares convencionais no LES.....	18
2.1.7. Fatores de risco cardiovasculares próprios do LES.....	19
2.1.8. Disfunção endotelial no LES.....	21
2.2. Óxido Nítrico	22
2.2.1. Síntese do óxido nítrico.....	22
2.2.2. Efeitos biológicos do óxido nítrico.....	23
2.3. Gene da óxido nítrico sintase endotelial	24
2.3.1. Polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial e doença aterosclerótica.....	25
2.4. Prevalência dos polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial nas doenças reumatológicas	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS DO ESTUDO	29
4.1. Objetivo geral	29
4.2. Objetivos específicos	29
5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	30

6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	44
7. ANEXOS.....	65
7.1. ANEXO I – Protocolos de pesquisa.....	66
7.2. ANEXO II – Termo de Consentimento livre e esclarecido.....	69
7.3. ANEXO III – Critérios de classificação do LES.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

aCL – anticardiolipina

ACR – *American College of Rheumatology* – Colégio Americano de Reumatologia

AL – anticoagulante lúpico

Anti - DNA_{ds} – anti DNA de dupla hélice

Anti - Sm – anti-Smith

APC – *antigen - presenting cell* - célula apresentadora de antígenos

AR – artrite reumatóide

AVE – acidente vascular encefálico

β2GP1 – beta 2 glicoproteína 1

CE – corticosteróides

CMV – citomegalovírus

CV – cardiovascular

DAC – doença arterial coronariana

DCV – doença cardiovascular

DE – disfunção endotelial

DM – diabete melito

DNA – *deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucléico

EBV – Epstein-Baar vírus

EIM – espessamento íntima - média

eNOS – *endothelial nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintetase endotelial

ES – esclerose sistêmica

FAN – fator antinuclear

FCγR – receptor FC gama

HAS - hipertensão arterial sistêmica

HDL – *High-density lipoproteins* – lipoproteínas de alta densidade

HLA – *human leukocyte antigen* – antígeno leucocitário humano

LES – lúpus eritematoso sistêmico

IAM – infarto agudo do miocárdio

IC – intervalo de confiança

ICC – insuficiência cardíaca congestiva

IFN- γ – interferon-gama

IL-1 – interleucina -1

IL-4 – interleucina - 4

IL-10 – interleucina -10

IL-13 – interleucina -13

IMC – índice de massa corporal

iNOS – *inducible nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase indutível

LDL – *Low-density lipoproteins* – lipoproteínas de baixa densidade

LPS – lipopolissacarídeos

MBL – *mannose binding lectin* – lecitina ligadora de manose

MCP1 – *monocyte chemoattractant protein 1* - proteína quimioatraente de monócitos

MHC – *major histocompatibility complex* – complexo de histocompatibilidade principal

NOS – *nitric oxide synthase* – óxido nítrico sintase

ON – óxido nítrico

ONe – óxido nítrico endotelial

PCR – *polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase

PcR – proteína c reativa

PDCD1 – *program cell death gene 1* – gene da morte celular programada

PTPN22 – proteína tirosina fosfatase não-receptor 22

RC – razão de chances

RNA – *ribonucleic acid* – ácido ribonucléico

SAF – síndrome antifosfolípido

SLICC/ACR – *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* – índice de dano no LES

TGF β - *Transforming growth factor beta* – fator beta de crescimento e transformação

US – ultra-sonografia

UV – ultravioleta

VNTR – *variable number of tandem repeats* – número variável de repetições em tandem

vW – von Willebrand

Resumo

Objetivo: Avaliar possíveis associações entre o polimorfismo Glu298Asp da região codificadora do gene da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e a suscetibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) e manifestações clínicas relacionadas à doença.

Métodos: Cento e treze pacientes de descendência europeia com diagnóstico de LES, com 4 ou mais critérios do Colégio Americano de Reumatologia, que foram recrutados no ambulatório do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e 206 controles saudáveis, de mesma descendência europeia que os pacientes, foram genotipados através de reação em cadeia da polimerase para o polimorfismo Glu298Asp da região codificadora do gene da eNOS. Dados clínicos, demográficos, laboratoriais dos pacientes foram coletados. Manifestações clínicas do LES e doenças relacionadas foram avaliadas quanto à associação com genótipos específicos.

Resultados: A distribuição do genótipo Glu298Asp e alelos não teve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes lúpicos e controles. Não houve também associação significativa do polimorfismo com glomerulonefrite lúpica, síndrome antifosfolípideo (SAF), doença cardiovascular (DCV) e fatores de risco para DCV.

Conclusão: Os achados apresentados não evidenciaram um papel importante do polimorfismo estudado na suscetibilidade para o LES nem para as manifestações clínicas avaliadas, fato este que pode ser devido à perda de poder estatístico nestas análises de subgrupo.

1. Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica auto-imune com múltiplas manifestações clínicas e um curso e prognóstico variados [1]. A etiologia do LES permanece desconhecida e é sabidamente multifatorial, com participações genética, imunológica, hormonal e ambiental. Acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva com uma relação de nove mulheres para cada homem [2]. É uma doença complexa caracterizada por períodos de quiescência e de exacerbação, podendo envolver qualquer órgão ou sistema em uma combinação variável e desencadeando, em mais da metade dos casos, danos permanentes [3].

Existem fortes evidências de que a suscetibilidade genética exerce um papel importante na patogênese do LES. A base genética do LES é heterogênea, com um padrão de herança desconhecido, mas sabidamente não-mendeliano. [4]. Há diversos elementos complicadores do estudo de genes relacionados a esta doença, como a diversidade étnica, a heterogeneidade clínica e laboratorial e o efeito ambiental [4]. Estima-se que pelo menos quatro genes de suscetibilidade sejam necessários para o desenvolvimento do LES. Em uma pequena proporção de pacientes (<5%) um único gene pode ser responsável [5]. Assim, a identificação de novos genes associados ao desencadeamento do LES e suas manifestações clínicas é um desafio importante.

A mortalidade no LES segue um padrão bimodal, com morte precoce por atividade da doença ou infecções e mortalidade tardia ocorrendo em pacientes com doença inativa e de longa duração, cuja causa principal deve-se à aterosclerose [6]. Atualmente, a principal causa de morte em pacientes com LES, em países desenvolvidos, é a aterosclerose prematura [7]. O risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) é até 52 vezes maior nestes pacientes [8]. Apesar de os fatores de risco cardiovasculares (CV) tradicionais estarem aumentados em pacientes com LES, quando se faz um ajuste destes fatores, permanece um risco independente, dez vezes maior, de ocorrer IAM nestes pacientes [9].

A disfunção do endotélio é caracterizada pela perda das propriedades de vasodilatação, anticoagulação ou antiinflamatórias [10]. Disfunção endotelial (DE) similar tem sido encontrada na inflamação persistente das vasculites sistêmicas [10], como o LES. A DE é diretamente relacionada ao risco aumentado para aterosclerose coronariana [11], à gravidade da doença coronariana [12] e à doença coronariana em pacientes jovens [13]. A DE tem sido relatada em diversos estudos no LES [14-17].

Devido a sua função regulatória da produção de óxido nítrico em nível endotelial, o gene codificador da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) é um provável candidato para suscetibilidade de doença aterosclerótica [18]. Os três polimorfismos mais comumente avaliados são o T-786C da região promotora, o Glu298Asp no éxon 7 e uma repetição em tandem (VNTR - *variable number of tandem repeats*) de 27 pares de bases no intron 4. Uma meta-análise incluiu 26 estudos de caso-controle que avaliaram a associação entre doença coronariana e homozigose para estes polimorfismos [19]. A DE tem sido observada tanto no LES quanto em outras doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide (AR), esclerose sistêmica (ES) e algumas vasculites [20-26]. Desta forma, por suas associações com aterosclerose e outras doenças inflamatórias crônicas, o gene da eNOS, com seus polimorfismos, é um candidato interessante para suscetibilidade ao LES e suas manifestações clínicas.

O objetivo do presente estudo é verificar a associação da suscetibilidade para o LES e suas características clínicas e laboratoriais com o polimorfismo Glu298Asp da região codificadora do gene da eNOS em uma amostra representativa de pacientes e controles saudáveis da região sul do país.

2. Revisão da literatura

2.1. *Lúpus eritematoso sistêmico*

2.1.1. Conceito, etiologia e prevalência do LES

O LES é uma doença inflamatória crônica auto-imune com múltiplas manifestações clínicas e um curso e prognóstico variados [1]. A etiologia do LES permanece desconhecida e é sabidamente multifatorial, com participações genética, imunológica, hormonal e ambiental. Acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva com uma relação de nove mulheres para cada homem [2]. Estima-se que 65% dos pacientes com lúpus desenvolvem-no entre 16 e 55 anos de idade [27]. A prevalência relatada na população norte-americana é de 40-50 casos por 100 000 habitantes [28], e a incidência estimada nas Américas do Norte, Sul e Europa varia de 2 a 8 por 100 000 habitantes ao ano. [29, 30]. Estudos populacionais recentes têm mostrado um aumento na incidência da doença, o que pode refletir um diagnóstico mais precoce bem como maior identificação de doença menos grave. O único estudo brasileiro, realizado em uma região tropical, estimou uma incidência de 8,7 por 100 000 habitantes por ano [29]. Os estudos mais atuais de prevalência também têm demonstrado um aumento, já esperado, devido à melhora na sobrevida desde a década de 50 [1]. O LES é uma doença complexa caracterizada por períodos de relativa quiescência e de exacerbação, podendo envolver qualquer órgão ou sistema em uma combinação variável e desencadeando, em mais da metade dos casos, danos permanentes [3]. Por apresentar manifestações heterogêneas, convencionou-se, para fins de investigação científica, classificá-lo através da associação de achados clínicos e laboratoriais, conforme os critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology – ACR*). (Anexo III) [31-33].

2.1.2. Fisiopatogênese do LES

O LES apresenta uma grande diversidade de manifestações clínicas; potencialmente pode acometer qualquer órgão ou sistema, interagindo com todas as subespecialidades médicas. Evidências de inúmeros estudos indicam que sua patogênese é igualmente complexa, variando de paciente para paciente [34]. Esta doença heterogênea surge através da interação de uma variedade de anormalidades que causam suscetibilidade e/ou provocam o seu início e exacerbação [35]. Sabe-se atualmente que diversos fatores ambientais, hormonais e imunológicos podem levar à expressão da doença em um indivíduo geneticamente predisposto [36].

É provável que o início ocorra a partir de um gatilho ambiental. A exposição à luz ultravioleta (UV), especialmente UV-B, é um fator bem conhecido na indução e exacerbação do lúpus eritematoso sistêmico e cutâneo [5]. Há estudos demonstrando que a luz UV induz a apoptose dos queratinócitos humanos, proporcionando um mecanismo de exposição de auto-antígenos [37]. Teoricamente, agentes infecciosos podem iniciar ou causar uma reagudização do LES, ativando células B, danificando tecidos, com conseqüente liberação de auto-antígenos e precipitando a doença por mimetismo molecular [5]. Apesar de escassas evidências, alguns vírus estão implicados: Epstein-Baar (EBV), Citomegalovírus (CMV), Parvovírus B19 e Retrovírus. [35]. Estudos sugerem que cachorros de estimação de pacientes com LES têm mais chance de desenvolver a doença [38] e quem trabalha em laboratório preparando soro de pacientes com LES apresenta mais auto-anticorpos relacionados ao LES [39], reforçando a presença de um agente infeccioso no seu desencadeamento. Outro fator ambiental importante é a exposição às drogas. Pessoas híidas podem desenvolver uma doença semelhante ao LES pelo tratamento com medicações como hidralazina e procainamida, entre outras, chamada lúpus droga-relacionado [36]. Não há evidências suficientes que associem algum medicamento ao LES idiopático. Um estudo publicado em 2001 mostrou uma fraca associação entre o risco de LES e o uso de tinturas de

cabelo e tabagismo [40]. Em uma meta-análise, o tabagismo foi considerado fator de risco para o desenvolvimento do LES, com uma razão de chances (RC) de 1,5 [41].

Uma característica bem estabelecida é o acometimento do LES principalmente em mulheres na idade fértil. Há inúmeras observações mostrando que os estrógenos potencializam a sinalização de células B e T, levando à auto-imunidade [36]. Em adição, existem evidências em modelos murinos de que os andrógenos podem ser protetores para o desenvolvimento de auto-imunidade [35].

Desequilíbrio na produção de citocinas, geração e acúmulo de imunocomplexos, hiperativação de células B, células T e células apresentadoras de antígenos (*Antigen presentation cell* – APC) criam o ambiente imunológico característico do LES [36]. A produção de auto-anticorpos por células B hiper-reativas é o distúrbio imunológico central [5, 42]. Estes auto-anticorpos são direcionados a diversas macromoléculas encontradas no núcleo, citoplasma e superfície celular, além de moléculas solúveis [5]. Anticorpos antinucleares (FAN) são os mais característicos e estão presentes em mais de 95 % dos pacientes; o anti-DNA de dupla hélice e o anti-Sm são mais específicos do LES [5]

2.1.3. Suscetibilidade genética para o LES

Inúmeras evidências apontam que a suscetibilidade genética exerce um papel importante na patogênese do LES: a prevalência da doença entre familiares de pacientes lúpicos chega a 12%, mais de 200 vezes a prevalência da população geral [43]; existe uma alta taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos, de até 57%, que é aproximadamente 10 vezes maior do que entre gêmeos dizigóticos ou irmãos [44, 45]; existe uma alta porcentagem de FAN positivo em filhos de mães lúpicas [46].

A base genética do LES é complexa, com um padrão de herança desconhecido, mas sabidamente não-mendeliano. [4]. Há vários elementos complicadores do estudo de genes relacionados a esta doença, como a diversidade étnica, a heterogeneidade clínica e laboratorial e o efeito ambiental [4]. O LES é uma

doença de traço complexo, ou seja, não há uma correlação direta entre genótipo e fenótipo.

Nos últimos anos, nove mapeamentos genéticos completos, usando famílias de etnias e localizações geográficas distintas, identificaram oito *loci* de suscetibilidade para o LES em seis cromossomos diferentes, a saber: 1q23, 1q25-31, 1q41-42, 2q35-37, 4p16-15.2, 6p11-21, 12p24 e 16q12 [4].

O antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen* – HLA) é um fator genético que contribui para o risco de desenvolver LES. Alguns alelos do HLA-DRB1 vêm sendo associados ao LES em diferentes populações, como o DRB1*1501 e *0301, com um risco relativo de 2 a 3 vezes para cada um deles, em caucasianos. Existe ainda uma forte associação entre alelos do complexo de histocompatibilidade maior (*major histocompatibility complex* – MHC) de classe II e diversos auto-anticorpos [47, 48].

Genes não relacionados ao HLA têm sido associados com a doença. Dentre os genes candidatos, os que têm associação confirmada são os genes da proteína tirosina fosfatase não-receptor 22 (PTPN22) [49-52], receptor FC gama (FC γ R) [53-55], lecitina ligadora de manose (*manose binding lectine* – MBL) [56-60], proteína quimioatraente de monócitos (*monocyte chemoattractant proteine 1* – MCP1) [61-63] e o gene da morte celular programada (*program cell death gene 1* – PDCD1) [64-66]. Um mapeamento genético encontrou associação do LES com o *locus* da eNOS [67]. O polimorfismo da eNOS foi testado em 4 estudos de suscetibilidade para LES, um com associação estatisticamente significativa e outros três sem associação com LES, mas dois deles mostrando associação com glomerulonefrite lúpica [68-71].

2.1.4. Sobrevida no LES

Antes de 1950, o LES era uma doença inexoravelmente fatal. A introdução dos corticosteróides mudou este quadro [6]. Desde então, a sobrevida dos pacientes com LES tem melhorado consideravelmente, alcançando um platô na década de oitenta [7]. O LES apresenta um padrão bimodal de mortalidade, com morte precoce por atividade da doença ou infecções e mortalidade tardia ocorrendo em pacientes com doença inativa e de longa duração, cuja causa principal deve-se à aterosclerose [6]. Atualmente, a principal causa de morte em pacientes com LES, em países desenvolvidos, é a aterosclerose prematura [7]. O risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) é até 52 vezes maior nestes pacientes [8]. Apesar de os fatores de risco CV tradicionais estarem aumentados em pacientes com LES, quando se faz um ajuste destes fatores ainda permanece um risco independente dez vezes maior de ocorrer IAM nestes pacientes [9].

2.1.5. Importância da aterosclerose no LES

Um dos maiores desafios clínicos no LES é a alta incidência de aterosclerose em mulheres jovens [72]. Este achado foi inicialmente relatado em 1975, em um estudo de autópsias em 36 pacientes lúpicas. [73]. Posteriormente foi enfatizado em um relato de mortalidade tardia por IAM, em pacientes com LES [6]. A vasculopatia aterosclerótica foi identificada como a segunda causa mais comum de internação hospitalar, após exacerbações da doença [74].

Existem evidências claras de que pacientes com LES têm uma incidência de IAM dez vezes maior do que a população geral [9] e, em mulheres jovens, a incidência aumenta em até 52 vezes, comparando com mulheres de mesma faixa etária [8]. Quando comparadas com mulheres sem lúpus de mesma faixa etária, as mulheres lúpicas jovens (18-44 anos) tiveram significativamente mais hospitalizações por IAM,

insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e acidente vascular encefálico (AVE), 2,27, 3,8 e 2,05 vezes, respectivamente [75].

Um estudo realizado em 2003 concluiu que pacientes com LES tinham calcificações arteriais coronarianas com maior frequência do que em controles ($P=0,002$), com um grau de calcificação também aumentado significativamente ($P<0,001$). [76]

2.1.6. Fatores de risco CV convencionais no LES

É reconhecido que pacientes com LES apresentam uma incidência aumentada de doença cardiovascular (DCV). Ainda dispomos de poucos estudos para avaliação da associação e frequência dos fatores de risco tradicionais, e os resultados apresentados divergem.

Esdaile *et al* avaliaram retrospectivamente, em uma população de pacientes com LES, os fatores de risco tradicionais de Framingham e desfechos vasculares (IAM não-fatal, morte por DCV, DCV em geral e AVE). Dos 263 pacientes acompanhados, 44 apresentaram pelo menos um evento CV e estes pacientes tinham maiores níveis basais para a maioria dos fatores de risco estudados. Encontraram correlação significativa para idade, hipertensão e dislipidemia [9].

Svenungsson *et al* estudaram os fatores de risco CV no LES em um grupo de 26 mulheres lúpicas com DCV, comparadas com 26 mulheres lúpicas sem DCV e 26 mulheres hípidas, pareadas por idade. Não encontraram diferença entre HAS, tabagismo, índice de massa corporal (IMC) ou diabetes melito (DM) entre os grupos. Observaram apenas diferença significativa no aumento na concentração de triglicérides e na redução do HDL (*high-density lipoprotein* – lipoproteína de alta densidade) colesterol no grupo de LES com DCV, porém o LDL (*low-density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade) colesterol não diferiu entre os grupos [77].

Em outro estudo, estimando o risco em 10 anos para DCV fatal, os autores demonstraram que os fatores de risco tradicionais contribuem para o processo, sendo a HAS o mais implicado [78].

Dois estudos encontraram o tabagismo como um fator de risco isolado para doença cardiovascular nos pacientes lúpicos, contrariando diversos estudos prévios [76, 79].

2.1.7. Fatores de risco CV próprios do LES

Atualmente não é possível explicar o excesso de risco CV em portadores de LES exclusivamente por fatores de risco convencionais [9].

Um estudo comparando mulheres lúpicas e controles, com base nos fatores de risco de Framingham, não encontrou diferença estatisticamente significativa no cálculo do risco para DCV em 10 anos [80].

Diversos estudos associaram o uso de corticosteróides (CE) com DCV, mortalidade e aterosclerose subclínica, principalmente em relação a maior dose cumulativa. [77, 78, 81-84]. O mecanismo exato através do qual a prednisona poderia afetar as coronárias permanece incerto e não parece ser único. Os CE podem indiretamente aumentar o risco CV por gerar fatores de risco tradicionais [85]. Sabe-se que pode aumentar o colesterol LDL e os triglicérides de modo dose-dependente [86], causar HAS por retenção de sal e água [84], levar à intolerância aos carboidratos [87] e elevar os níveis de homocisteína [81]. O efeito do CE pode também ser superestimado pois seu uso pode prolongar a sobrevida destes pacientes, dando mais chance para o desenvolvimento da aterosclerose [88]. Além disso, doses cumulativas elevadas podem estar associadas com doença mais ativa ou com duração prolongada do LES [1, 85, 88].

As evidências sugerem fortemente que a inflamação tem um papel importante no início e progressão da aterosclerose em pacientes sem doença reumatológica [89].

Estudos epidemiológicos têm relacionado a presença de reagentes de fase aguda, mediadores celulares de inflamação e ativação endotelial com evidência clínica de aterosclerose na população geral, o que justifica o mecanismo de DCV acelerada no LES [85].

Em estudo de casos de LES com doença inativa e controles pareados por idade e sexo, os participantes foram submetidos a método de imagem ultrassonográfico para avaliar risco aterosclerótico em artérias carótidas comuns internas, e foram comparados quanto aos fatores de risco tradicionais para doença aterosclerótica. Quando comparados, pacientes com DVC manifesta apresentavam maior duração da doença, maior índice de dano medido pelo SLICC/ACR (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR*), maior dose cumulativa de azatioprina, maiores níveis de proteína C reativa (PcR) e de fator von-Willebrand (vW) [78].

Diferentes mecanismos pelos quais os anticorpos antifosfolípides podem afetar a vasculopatia aterosclerótica têm sido sugeridos, permanecendo ainda controversos [88]. Anticorpos contra LDL oxidado têm reação cruzada com anticorpos anticardiolipinas (aCL) em pacientes com LES [90]. Ainda não está claro se em pacientes com IAM não-lúpicos a presença do anticorpo está relacionada com a aterosclerose e formação de trombos [91, 92].

Um estudo comparou cinco grupos de mulheres na pré-menopausa: pacientes com síndrome antifosfolípico (SAF); LES com anticorpos aCL; LES sem anticorpos aCL; AR e controles hígidos. Observou-se que após ajuste para outros preditores de aterosclerose, pacientes com LES e SAF tinham ainda um risco elevado em 4 vezes para lesões de carótida ou femoral quando comparados com pacientes com AR e controles. O grupo de pacientes com SAF não diferiu do grupo das pacientes lúpicas, com ou sem aCL. Altos títulos de aCL e beta2glicoproteína 1 (β_2 GP1) não se associaram a esse processo [93]. Contrariando este resultado, outro estudo mostrou maior presença de anticoagulante lúpico (AL) em pacientes com LES e aterosclerose,

comparados com lúpicos sem aterosclerose e controles hígidos. Anticardiolipina IgG foi mais freqüente em lúpicos quando comparados aos controles [77].

Drogas antimaláricas reduzem o colesterol total de pacientes lúpicos que estão recebendo CE [94, 95]. Estudos mostraram que a hidroxicloroquina, tanto na dose de 200mg quanto de 400mg, associou-se a menores níveis de colesterol em pacientes com LES em uso de CE [96, 97]. Mostrou-se também que o efeito hipolipemiante da hidroxicloroquina ocorre mesmo na ausência de uso de CE [98].

A hidroxicloroquina tem ainda uma possível ação antitrombótica. É um inibidor plaquetário e parece diminuir o risco de tromboembolismo em pacientes com anticorpos aCL [95]. Para melhor avaliar a relação entre a presença de anticorpos aCL, o uso de hidroxicloroquina e a ocorrência de eventos trombóticos em pacientes com LES, foram selecionados 442 pacientes da coorte LUMINA. Contrariando resultados anteriores, o uso de hidroxicloroquina, que pareceu ser protetor contra eventos trombóticos em análise univariada, não manteve este efeito na análise multivariada [99].

2.1.8. Disfunção endotelial no LES

As funções normais das células endoteliais são reconhecidamente críticas para todos os aspectos da homeostase vascular. Desta maneira, o metabolismo ativo destas células é necessário para o contínuo ajuste do tônus vascular, controle da pressão arterial e outras funções [100], como controle de adesão plaquetária, balanço das atividades fibrinolíticas e pró-trombóticas e permeabilidade seletiva a células e proteínas [10, 101]. A DE é caracterizada pela perda destas propriedades de vasodilatação, anticoagulação ou antiinflamatórias [10]. A função endotelial pode ser medida *in vivo* avaliando a resposta à administração de acetilcolina, um vasodilatador endotélio-dependente, que leva à liberação de óxido nítrico endotelial (ONe).

Similarmente, DE tem sido encontrada na inflamação persistente das vasculites sistêmicas [10], como o LES. A DE é diretamente relacionada ao risco aumentado para aterosclerose coronariana [11], à gravidade da doença coronariana [12] e à doença coronariana em pacientes jovens [13]. A DE tem sido identificada em diversos estudos no LES [14-17]

O primeiro estudo avaliando DE por ultra-sonografia (US) braquial em pacientes com LES evidenciou DE quando comparados com controles pareados por sexo e idade, mesmo em pacientes sem fatores de risco CV tradicionais, podendo representar um processo precoce de aterosclerose [102]. Um estudo piloto com 36 pacientes lúpicas e 22 controles saudáveis mostrou DE nas pacientes e associação significativa entre DE, dislipidemia e menopausa. Não ocorreu, no entanto, relação com desfecho CV no seguimento de 5 anos [14].

Com o objetivo de avaliar se a DE ocorre no LES e se é associada com fatores de risco CV tradicionais, um grupo de pesquisadores estudou 62 pacientes com LES e 38 controles saudáveis. Foram medidos nos pacientes a função endotelial por US da artéria braquial, espessamento íntima – média (EIM) de artérias carótidas e presença de placas nestas artérias, além de parâmetros clínicos. Pacientes lúpicos apresentaram DE mesmo ajustando para outros fatores de risco tradicionais; entre os pacientes, evidenciou-se uma correlação negativa entre DE e EIM [17].

Kiss *et al* mostraram que pacientes lúpicos, quando comparados com controles, apresentavam DE, e esta diferiu de forma significativa entre pacientes com ou sem complicações CV [16].

2.2. Óxido nítrico

2.2.1. Síntese do óxido nítrico

O óxido nítrico (ON) é um gás com peso molecular de 30 daltons, que se difunde livremente através das membranas celulares e tem uma meia-vida de 15

segundos [103, 104]. O ON é sintetizado, via oxidação da L-arginina, por uma família de óxido nítrico sintases (*nitric oxide synthases* – NOS) [105]. As isoformas das NOS podem ser tanto cálcio-dependentes e expressas constitutivamente (NOS1 – neuronal e NOS3 – endotelial) quanto cálcio-independente e indutível (NOS2) [105]

As NOS constitutivas produzem quantidades pequenas de ON por períodos curtos. Em contraste, a NOS induzida por estímulos, como o inflamatório, gera grandes e sustentadas concentrações de ON [103].

2.2.2. Efeitos biológicos do ON

Os efeitos biológicos do ON são extremamente variáveis, de acordo com seu local de produção, quantidade gerada e alvos no ambiente onde é liberado. Múltiplos fatores são importantes em determinar o papel duplo do ON, fisiológico e fisiopatológico [105]. A pequena quantidade de ON produzida por NOS constitutiva é suficiente para sinalização intra e intercelular, incluindo homeostase da microvasculatura, enquanto que maior concentração gerada pela NOS indutível é microbicida e pró-inflamatória, danificando as células e tecidos adjacentes [105].

2.2.2.1. Efeitos biológicos da NOS1

A NOS1 é expressa no sistema nervoso central e no sistema nervoso autonômico dos grandes vasos do trato gastrointestinal, células β pancreáticas, plaquetas e células epiteliais [103, 104]. Tem como principais efeitos promover a motilidade gastrintestinal e agir como mediador na neurotransmissão [105].

2.2.2.2. Efeitos biológicos da NOS indutível

Em contraste com as isoformas constitutivas, a NOS indutível (iNOS) é expressa após exposição a diversos estímulos, como citocinas inflamatórias, incluindo

interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (*tumoral necrose factor* – TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeos (LPS) [105]. A iNOS é expressa nos macrófagos, células endoteliais, condrócitos, hepatócitos, sinoviócitos, células do músculo liso entre outros [103]. A sua expressão é regulada pelo balanço de citocinas no microambiente [103], de forma que citocinas antiinflamatórias como o fator beta de crescimento e transformação (*transforming growth factor-beta* – TGF- β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) inibem a expressão da iNOS [104]. A iNOS gera quantidades de ON significativamente maiores e mais sustentadas quando comparada com as formas constitutivas. Suas principais ações estão na defesa do hospedeiro, inflamação, dor e dano tecidual (cartilagem, epitélio) [105]

2.2.2.3. Efeitos biológicos da eNOS

A eNOS está presente nas células endoteliais, miocárdicas e neurônios. Sofre estímulo de acetilcolina, adenosina difosfato, trombina, fator de crescimento endotelial e alterações de fluxo sanguíneo [103].

A eNOS regula o tônus de vasos sanguíneos, a agregação plaquetária, a diapedese e adesão de polimorfonucleares [104, 105].

2.3. Gene da eNOS

O gene da eNOS foi seqüenciado pela primeira vez em 1993. Localiza-se no braço curto do cromossomo 7 (7q35-36), contém 26 exons ao longo de 21 kilobases de DNA genômico e codifica um RNA mensageiro de 4052 nucleotídeos [106] (Figura 1). Desde então, muitas variações têm sido descritas na região promotora, éxons e íntrons [107].

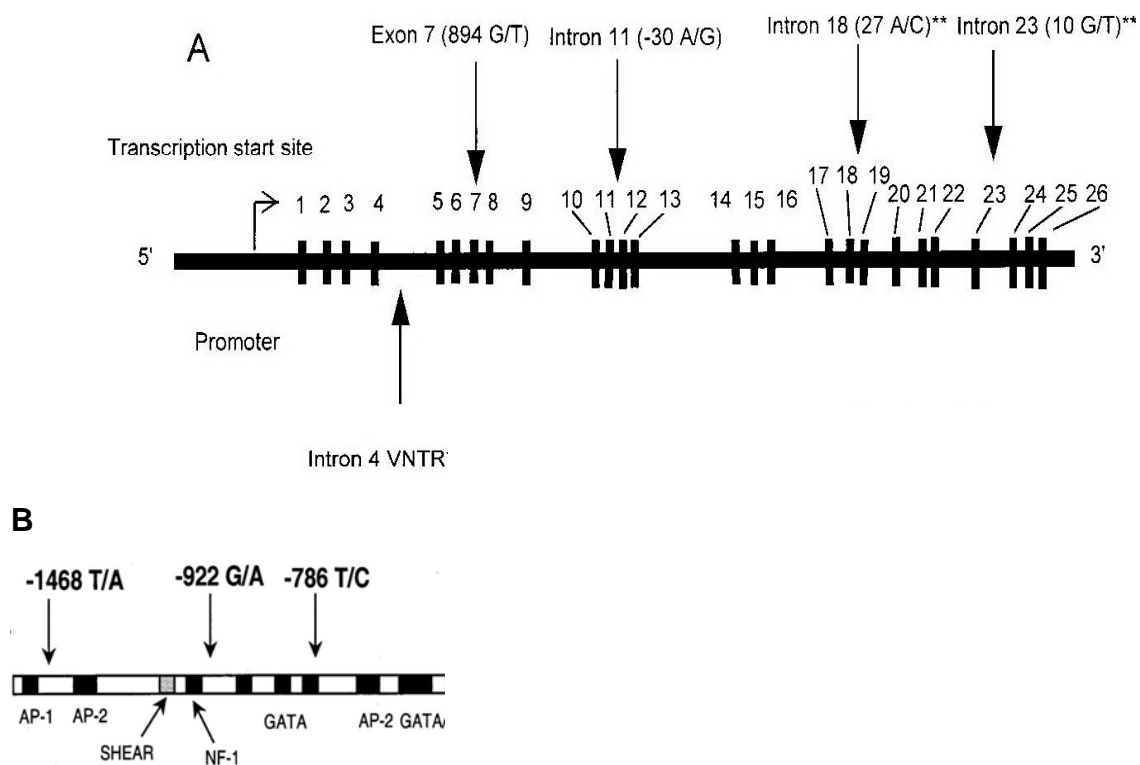


Figura 1A. Organização do gene da eNOS incluindo a localização dos polimorfismo mais estudados 1B. Detalhe da região promotora. O gene da eNOS é composto por 26 éxons. Adaptado de Tanus *et al* [108].

2.3.1. Polimorfismos da eNOS e doença aterosclerótica

Devido a sua função regulatória da produção de ON em nível endotelial, o gene codificador da eNOS é um provável candidato para suscetibilidade de doença aterosclerótica [18]. Os três polimorfismos mais comumente avaliados são o T-786C da região promotora, o Glu298Asp no éxon 7 e uma repetição em tandem (VNTR – *variable number of tandem repeats*) de 27 pares de bases no íntron 4.

Existem diversas publicações, tanto de estudos transversais quanto de caso-controle, para associações entre polimorfismos da eNOS e DCV. Os resultados são conflitantes, principalmente os provenientes de estudos pequenos e de baixo poder estatístico. Citando os resultados positivos, o Glu298Asp foi associado com doença arterial coronariana (DAC) [109-111]. O T-786C mostrou associação com espasmo

coronariano [112] e o VNTR do íntron 4 foi associado tanto com IAM [113] quanto com doença arterial periférica e coronariana [114].

Uma meta-análise incluiu 26 estudos de caso-controle que avaliaram a associação entre doença coronariana e homozigose para os polimorfismos citados acima. Nos resultados, observa-se que as homozigoses para os alelos “a” do íntron-4 e Asp298 determinam risco moderado para DCV (RC 1,31; IC 95% 1,13-1,51; e RC, 1,34; IC 95%, 1,03-1,75; respectivamente) [19]. Foi observada também associação estatisticamente significativa (RC 1,30, IC 95% 1,01-1,66) do polimorfismo T-786C e DCV, em outro estudo [115].

2.4. Prevalência dos polimorfismos da eNOS nas doenças reumatológicas

O LES, assim como outras doenças reumatológicas com processo inflamatório crônico, tem um maior risco CV [116] . A DE tem sido observada tanto no LES quanto em outras doenças auto-imunes, como AR, ES e algumas vasculites [20-26].

No LES, foram publicados 4 estudos. O primeiro deles analisou os polimorfismos T-786C, íntron 4 e Asp298 em 88 pacientes com LES e 199 controles e encontrou associação entre o alelo íntron 4b e pacientes (RC 2.16, 95% IC 1.29-3.60, $p= 0.005$), porém não encontrou associação com manifestações clínicas, presença de auto-anticorpos ou gravidade da doença [71].

Em outro estudo, não foi verificada diferença entre pacientes com LES e controles para VNTR do íntron 4; porém, teste de regressão logística mostrou que em portadores de LES o genótipo a/b foi fator de risco para glomerulonefrite (RC=3,28; IC 95% 1,04-10,2, $P=004$) [70].

Um terceiro estudo não mostrou associação nem para suscetibilidade da doença, nem para o desenvolvimento de nefrite nos pacientes, quando avaliou os polimorfismos VNTR do íntron 4 e T-786C [69].

Um estudo mais recente avaliou 190 pacientes lúpicos e 145 controles, numa população específica da ilha de Creta, na Grécia. Não houve associação para suscetibilidade ao LES no polimorfismo íntron 4 avaliado. Porém houve uma forte associação para o genótipo a/b (RC 2.71, 95% IC: 1.4 – 5.2; $p < 0,01$) e o alelo a (RC 1.96 95% IC 1.11-3.44; $p < 0,025$) e glomerulonefrite lúpica [68]

3. JUSTIFICATIVA

A justificativa do presente estudo vem da necessidade em se identificar marcadores genéticos associados à suscetibilidade do lúpus eritematoso sistêmico e às suas diversas manifestações clínicas, especialmente as mais graves, como a glomerulonefrite, com o objetivo de prevenir ou minimizar os efeitos da doença. Além disso, visa a buscar a associação entre marcadores genéticos de doença cardiovascular e lúpus eritematoso sistêmico, uma doença com alta incidência de aterosclerose. Conforme discutido, os polimorfismos dos genes da óxido nítrico sintetase endotelial são potenciais candidatos, mas com resultados da literatura escassos e ainda controversos. Não temos dados ainda destes polimorfismos na população brasileira. Considerando que os marcadores genéticos variam conforme a constituição genética de cada população, é importante a obtenção de dados específicos para a nossa população.

4. OBJETIVOS DO ESTUDO

4.1. Objetivo geral

Avaliar a associação da suscetibilidade para o lúpus eritematoso sistêmico e de características clínicas (glomerulonefrite lúpica, síndrome antifosfolípido, doença cardiovascular e fatores de risco para doença cardiovascular) com o polimorfismo Glu298Asp do gene da óxido nítrico sintetase endotelial.

4.2. Objetivos específicos

Verificar a frequência do polimorfismo Glu298Asp em uma população de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e grupo controle.

Comparar a frequência do polimorfismo Glu298Asp entre uma população de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e grupo controle.

Verificar a associação do polimorfismo Glu298Asp com glomerulonefrite lúpica, síndrome antifosfolípido, doença cardiovascular e fatores de risco para doença cardiovascular em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Petri, M., *Epidemiology of systemic lupus erythematosus*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2002. 16(5): p. 847-58.
2. D'Cruz, D.P., *Systemic lupus erythematosus*. Bmj, 2006. 332(7546): p. 890-4.
3. Gudmundsson, S. and K. Steinsson, *Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in an unselected population*. J Rheumatol, 1990. 17(9): p. 1162-7.
4. Tsao, B.P., et al., *Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1997. 99(4): p. 725-31.
5. Mok, C.C. and C.S. Lau, *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. J Clin Pathol, 2003. 56(7): p. 481-90.
6. Urowitz, M.B., et al., *The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus*. Am J Med, 1976. 60(2): p. 221-5.
7. Petri, M., *Systemic lupus erythematosus: 2006 update*. J Clin Rheumatol, 2006. 12(1): p. 37-40.
8. Manzi, S., et al., *Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study*. Am J Epidemiol, 1997. 145(5): p. 408-15.
9. Esdaile, J.M., et al., *Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2001. 44(10): p. 2331-7.

10. Buckley, C.D., et al., *Endothelial cells, fibroblasts and vasculitis*. Rheumatology (Oxford), 2005. 44(7): p. 860-3.
11. Suwaidi, J.A., et al., *Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction*. Circulation, 2000. 101(9): p. 948-54.
12. Neunteufl, T., et al., *Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease*. Atherosclerosis, 1997. 129(1): p. 111-8.
13. Lieberman, E.H., et al., *Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease*. Am J Cardiol, 1996. 78(11): p. 1210-4.
14. Piper, M.K., et al., *Impaired endothelial function in systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2007. 16(2): p. 84-8.
15. Johnson, S.R., et al., *Impaired brachial artery endothelium dependent flow mediated dilation in systemic lupus erythematosus: preliminary observations*. Lupus, 2004. 13(8): p. 590-3.
16. Kiss, E., et al., *Reduced flow-mediated vasodilation as a marker for cardiovascular complications in lupus patients*. J Autoimmun, 2006. 27(4): p. 211-7.
17. El-Magadmi, M., et al., *Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women*. Circulation, 2004. 110(4): p. 399-404.
18. Hingorani, A.D., *Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000*. Atherosclerosis, 2001. 154(3): p. 521-7.
19. Casas, J.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects*. Circulation, 2004. 109(11): p. 1359-65.

20. Salvarani, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in giant cell arteritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(11): p. 3219-23.
21. Salvarani, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease*. *J Rheumatol*, 2002. 29(3): p. 535-40.
22. Kim, J.U., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis*. *Ann Rheum Dis*, 2003. 62(11): p. 1083-7.
23. Karasneh, J.A., et al., *Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease*. *Rheumatology (Oxford)*, 2005. 44(5): p. 614-7.
24. Desein, P.H., B.I. Joffe, and S. Singh, *Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. 7(3): p. R634-43.
25. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain*. *Rheumatology (Oxford)*, 2004. 43(9): p. 1182-5.
26. Fatini, C., et al., *High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) in patients with systemic sclerosis*. *Am J Med*, 2002. 112(7): p. 540-4.
27. Rothfield, N., *Clinical Features of systemic lupus erithematosus*, in *Textbook of Rheumatology*, W. Kelley, Harris, ED, Ruddy, S, Sledge, CB, Editor. 1981, WB Saunders: Philadelphia.

28. Lawrence, R.C., et al., *Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States*. Arthritis Rheum, 1998. 41(5): p. 778-99.
29. Vilar, M.J. and E.I. Sato, *Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil)*. Lupus, 2002. 11(8): p. 528-32.
30. Jimenez, S., et al., *The epidemiology of systemic lupus erythematosus*. Clin Rev Allergy Immunol, 2003. 25(1): p. 3-12.
31. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. 25(11): p. 1271-7.
32. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. 40(9): p. 1725.
33. Edworthy, S.M., et al., *Analysis of the 1982 ARA lupus criteria data set by recursive partitioning methodology: new insights into the relative merit of individual criteria*. J Rheumatol, 1988. 15(10): p. 1493-8.
34. Boumpas, D.T., et al., *Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 1: Renal, neuropsychiatric, cardiovascular, pulmonary, and hematologic disease*. Ann Intern Med, 1995. 122(12): p. 940-50.
35. Manson, J.J. and D.A. Isenberg, *The pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Neth J Med, 2003. 61(11): p. 343-6.
36. Kyttaris, V.C., et al., *New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Curr Rheumatol Rep, 2005. 7(6): p. 469-75.

37. Casciola-Rosen, L. and A. Rosen, *Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE*. *Lupus*, 1997. 6(2): p. 175-80.
38. Chiou, S.H., et al., *Pet dogs owned by lupus patients are at a higher risk of developing lupus*. *Lupus*, 2004. 13(6): p. 442-9.
39. Zarmbinski, M.A., R.P. Messner, and J.S. Mandel, *Anti-dsDNA antibodies in laboratory workers handling blood from patients with systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 1992. 19(9): p. 1380-4.
40. Cooper, G.S., et al., *Smoking and use of hair treatments in relation to risk of developing systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2001. 28(12): p. 2653-6.
41. Costenbader, K.H., et al., *Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(3): p. 849-57.
42. Pisetsky, D.S., *Autoantibodies and their significance*. *Curr Opin Rheumatol*, 1993. 5(5): p. 549-56.
43. Arnett, F.C., et al., *Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis*. *Semin Arthritis Rheum*, 1984. 14(1): p. 24-35.
44. Block, S.R., et al., *Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets*. *Am J Med*, 1975. 59(4): p. 533-52.
45. Deapen, D., et al., *A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1992. 35(3): p. 311-8.
46. Murashima, A., et al., *Long term prognosis of children born to lupus patients*. *Ann Rheum Dis*, 2004. 63(1): p. 50-3.

47. Tan, F.K. and F.C. Arnett, *The genetics of lupus*. *Curr Opin Rheumatol*, 1998. 10(5): p. 399-408.
48. Harley, J.B., et al., *The genetics of human systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(6): p. 690-6.
49. Lee, Y.H., et al., *The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. 46(1): p. 49-56.
50. Criswell, L.A., et al., *Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes*. *Am J Hum Genet*, 2005. 76(4): p. 561-71.
51. Wu, H., et al., *Association analysis of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 in systemic lupus erythematosus families: increased T allele frequency in systemic lupus erythematosus patients with autoimmune thyroid disease*. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(8): p. 2396-402.
52. Orozco, G., et al., *Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(1): p. 219-24.
53. Kyogoku, C., et al., *Association of Fc gamma receptor IIA, but not IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians*. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(2): p. 671-3.
54. Karassa, F.B., T.A. Trikalinos, and J.P. Ioannidis, *The Fc gamma RIIIA-F158 allele is a risk factor for the development of lupus nephritis: a meta-analysis*. *Kidney Int*, 2003. 63(4): p. 1475-82.

55. Karassa, F.B., T.A. Trikalinos, and J.P. Ioannidis, *Role of the Fcγ receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis*. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(6): p. 1563-71.
56. Villarreal, J., et al., *Mannose binding lectin and FcγRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients*. *Rheumatology (Oxford)*, 2001. 40(9): p. 1009-12.
57. Garred, P., et al., *Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients*. *Genes Immun*, 2001. 2(8): p. 442-50.
58. Sullivan, K.E., et al., *Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(12): p. 2046-51.
59. Ip, W.K., et al., *Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene*. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(9): p. 1663-8.
60. Davies, E.J., et al., *A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population*. *J Rheumatol*, 1997. 24(3): p. 485-8.
61. Tucci, M., et al., *Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(6): p. 1842-9.
62. Aguilar, F., et al., *MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus*. *Tissue Antigens*, 2001. 58(5): p. 335-8.

63. Tesch, G.H., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice*. J Exp Med, 1999. 190(12): p. 1813-24.
64. Croker, J.A. and R.P. Kimberly, *Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Rheumatol, 2005. 17(5): p. 529-37.
65. Prokunina, L., et al., *A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans*. Nat Genet, 2002. 32(4): p. 666-9.
66. Lindqvist, A.K., et al., *A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hSLE1) on chromosome 2q*. J Autoimmun, 2000. 14(2): p. 169-78.
67. Gaffney, P.M., et al., *Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families*. Am J Hum Genet, 2000. 66(2): p. 547-56.
68. Vazgiourakis, V., et al., *Association of the nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism with increased risk for both lupus glomerulonephritis and rheumatoid arthritis in a single genetically homogeneous population*. Lupus, 2007. 16(11): p. 867-74.
69. Douglas, G., et al., *Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2004. 31(9): p. 1756-62.
70. Lee, Y.H., et al., *Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with the development of lupus nephritis*. Lupus, 2004. 13(3): p. 188-91.

71. Serrano, N.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2004. 31(11): p. 2163-8.
72. Lockshin, M.D., J.E. Salmon, and M.J. Roman, *Atherosclerosis and lupus: a work in progress*. Arthritis Rheum, 2001. 44(10): p. 2215-7.
73. Bulkley, B.H. and W.C. Roberts, *The heart in systemic lupus erythematosus and the changes induced in it by corticosteroid therapy. A study of 36 necropsy patients*. Am J Med, 1975. 58(2): p. 243-64.
74. Petri, M. and M. Genovese, *Incidence of and risk factors for hospitalizations in systemic lupus erythematosus: a prospective study of the Hopkins Lupus Cohort*. J Rheumatol, 1992. 19(10): p. 1559-65.
75. Ward, M.M., *Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1999. 42(2): p. 338-46.
76. Asanuma, Y., et al., *Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2003. 349(25): p. 2407-15.
77. Svenungsson, E., et al., *Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus*. Circulation, 2001. 104(16): p. 1887-93.
78. de Leeuw, K., et al., *Traditional and non-traditional risk factors contribute to the development of accelerated atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2006. 15(10): p. 675-82.
79. Toloza, S.M., et al., *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXIII. Baseline predictors of vascular events*. Arthritis Rheum, 2004. 50(12): p. 3947-57.

80. Bruce, I.N., et al., *Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus: the Toronto Risk Factor Study*. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(11): p. 3159-67.
81. Ettinger, W.H., et al., *Dyslipoproteinemia in systemic lupus erythematosus. Effect of corticosteroids*. *Am J Med*, 1987. 83(3): p. 503-8.
82. Gordon, C., *Long-term complications of systemic lupus erythematosus*. *Rheumatology (Oxford)*, 2002. 41(10): p. 1095-100.
83. Doria, A., et al., *Risk factors for subclinical atherosclerosis in a prospective cohort of patients with systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2003. 62(11): p. 1071-7.
84. Petri, M., et al., *Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus*. *Am J Med*, 1992. 93(5): p. 513-9.
85. Salmon, J.E. and M.J. Roman, *Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: implications for patient management*. *Curr Opin Rheumatol*, 2001. 13(5): p. 341-4.
86. Zimmerman, J., M. Fainaru, and S. Eisenberg, *The effects of prednisone therapy on plasma lipoproteins and apolipoproteins: a prospective study*. *Metabolism*, 1984. 33(6): p. 521-6.
87. Axelrod, L., *Glucocorticoid therapy*. *Medicine (Baltimore)*, 1976. 55(1): p. 39-65.
88. Moder, K.G., T.D. Miller, and H.D. Tazelaar, *Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus*. *Mayo Clin Proc*, 1999. 74(3): p. 275-84.
89. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.

90. Vaarala, O., et al., *Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus*. *Lancet*, 1993. 341(8850): p. 923-5.
91. Vaarala, O., et al., *Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men*. *Circulation*, 1995. 91(1): p. 23-7.
92. Zuckerman, E., et al., *Anticardiolipin antibodies and acute myocardial infarction in non-systemic lupus erythematosus patients: a controlled prospective study*. *Am J Med*, 1996. 101(4): p. 381-6.
93. Vlachoyiannopoulos, P.G., et al., *Atherosclerosis in premenopausal women with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: a controlled study*. *Rheumatology (Oxford)*, 2003. 42(5): p. 645-51.
94. Rahman, P., et al., *The cholesterol lowering effect of antimalarial drugs is enhanced in patients with lupus taking corticosteroid drugs*. *J Rheumatol*, 1999. 26(2): p. 325-30.
95. Wallace, D.J., et al., *The relevance of antimalarial therapy with regard to thrombosis, hypercholesterolemia and cytokines in SLE*. *Lupus*, 1993. 2 Suppl 1: p. S13-5.
96. Petri, M., et al., *Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis*. *Am J Med*, 1994. 96(3): p. 254-9.
97. Hodis, H.N., et al., *The lipid, lipoprotein, and apolipoprotein effects of hydroxychloroquine in patients with systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 1993. 20(4): p. 661-5.

98. Wallace, D.J., et al., *Cholesterol-lowering effect of hydroxychloroquine in patients with rheumatic disease: reversal of deleterious effects of steroids on lipids*. Am J Med, 1990. 89(3): p. 322-6.
99. Ho, K.T., et al., *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort (LUMINA): XXVIII. Factors predictive of thrombotic events*. Rheumatology (Oxford), 2005. 44(10): p. 1303-7.
100. Pearson, J.D., *Normal endothelial cell function*. Lupus, 2000. 9(3): p. 183-8.
101. Hunt, B.J., *The endothelium in atherogenesis*. Lupus, 2000. 9(3): p. 189-93.
102. Lima, D.S., et al., *Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2002. 29(2): p. 292-7.
103. Clancy, R.M., A.R. Amin, and S.B. Abramson, *The role of nitric oxide in inflammation and immunity*. Arthritis Rheum, 1998. 41(7): p. 1141-51.
104. Bernardeau, C., et al., *Nitric oxide in rheumatology*. Joint Bone Spine, 2001. 68(6): p. 457-62.
105. Abramson, S.B., et al., *The role of nitric oxide in tissue destruction*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2001. 15(5): p. 831-45.
106. Marsden, P.A., et al., *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. J Biol Chem, 1993. 268(23): p. 17478-88.
107. Wang, X.L. and J. Wang, *Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease*. Mol Genet Metab, 2000. 70(4): p. 241-51.

108. Tanus-Santos, J.E., M. Desai, and D.A. Flockhart, *Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants*. *Pharmacogenetics*, 2001. 11(8): p. 719-25.
109. Hingorani, A.D., et al., *A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK*. *Circulation*, 1999. 100(14): p. 1515-20.
110. Shimasaki, Y., et al., *Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 31(7): p. 1506-10.
111. Hibi, K., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction*. *Hypertension*, 1998. 32(3): p. 521-6.
112. Nakayama, M., et al., *Synergistic interaction of T-786-->C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene and smoking for an enhanced risk for coronary spasm*. *Pharmacogenetics*, 2003. 13(11): p. 683-8.
113. Ichihara, S., et al., *Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population*. *Am J Cardiol*, 1998. 81(1): p. 83-6.
114. Fowkes, F.G., et al., *Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and nitric oxide synthase (ecNOS) genes and risks of peripheral arterial disease and coronary heart disease: Edinburgh Artery Study*. *Atherosclerosis*, 2000. 150(1): p. 179-85.
115. Rossi, G.P. and G. Maiolino, *Do meta-analyses of association studies of endothelial nitric oxide synthase variants and ischemic heart disease provide conclusive answers?* *Circulation*, 2004. 110(11): p. e305-6; author reply e305-6.

116. Bjornadal, L., et al., *Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95*. J Rheumatol, 2004. 31(4): p. 713-9.

6. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Glu298Asp ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Tamara Mucenic¹, Ricardo Machado Xavier², Markus Bredemeier³, Bruno Paiva dos Santos⁴, José Artur Bogo Chies⁵, João Carlos Tavares Brenol⁶

Supported in part by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

1. MD Postgraduate student: Medical Sciences; Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
2. PhD in Immunology, Shimane University, Japan. Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.
3. PhD in Medicine: Medical Sciences, UFRGS. Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
4. Graduate student in Biological Sciences, UFRGS
5. PhD in Life Sciences – Immunology, Paris VI University. Assistant Professor in the Genetics Department, UFRGS.
6. PhD in Medicine: Medical Sciences, UFRGS. Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.

Address reprint request and correspondence to:

João Carlos Tavares Brenol, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos, 2350, sala 645

90035-003 - Porto Alegre, Brasil.

E-mail: jbrenol@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Objective: To examine potential associations of the Glu298Asp polymorphism in the coding region of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene with susceptibility to and clinical expression of systemic lupus erythematosus (SLE).

Methods: One hundred and thirteen consecutive patients with European ancestry, with diagnosis of SLE, satisfying the American College of Rheumatology criteria, who were recruited from the outpatient clinic of the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and 206 healthy controls from the same geographic area were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) for the Glu298Asp polymorphism in the coding region of the eNOS gene. Clinical, demographic and laboratorial data was collected. Clinical manifestations of SLE and related diseases were evaluated for the association with specific genotypes.

Results: The allelic and genotypic distribution of the Glu298Asp did not differ significantly between SLE patients and controls. We found no association of the polymorphism with lupus nephritis, antiphospholipid syndrome (APS), cardiovascular disease (CVD) and risk factors to CVD.

Conclusion: The presented results do not provide support for a major role of eNOS Glu298Asp neither in the susceptibility for SLE nor in its clinical manifestation, which can be due to loss of statistical power in this subgroup analysis.

Key-words: Systemic lupus erythematosus; polymorphisms; Glu298Asp; eNOS; endothelial nitric oxide synthase.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an idiopathic multisystemic autoimmune inflammatory chronic disease with a broad range of clinical presentations and a variable course and prognosis [1-3]. In recent years, complete genome scans have identified SLE susceptibility loci, [4] including the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) *locus* [5]. At least four susceptibility genes are necessary for phenotypical expression, in most of the cases [6]. Differences in the contribution of specific genetic variants to the SLE phenotype from populations of different ancestral backgrounds are becoming increasingly apparent. [7]. In this regard, identification of new genes, related to SLE susceptibility and clinical manifestations is necessary in each population.

The risk of acute myocardial infarction (MI) is increased up to 52 fold in lupus patients [8] and is probably related to endothelial dysfunction (ED) [9-12]. The gene that encodes the production of endothelial nitric oxide (eNOS) is a potential candidate to atherosclerosis-susceptibility gene. The eNOS gene polymorphisms that are responsible for differences in the expression or activity of the encoded protein are the T-786C on promoter region, the Glu298Asp in exon 7 and a tandem repeat (VNTRs - *variable number of tandem repeats*) of 27 base pairs in intron 4 [13].

The aim of the present study is to investigate associations between the polymorphism Glu298Asp in the coding region of the eNOS gene and SLE susceptibility and clinical manifestations in individuals with European ancestry from South Brazil.

PATIENTS AND METHODS

Study population

The study population was comprised of 113 SLE patients with European ancestry from the outpatient clinic of the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The medical records were reviewed for documentation of demographic, clinical, and laboratorial data. All patients fulfilled the SLE American College of Rheumatology criteria [14]. Those patients had the genomic DNA collected and stored.

The clinical manifestations evaluated were photosensitivity, malar rash, discoid rash, oral or nasal ulcers, arthritis, serositis (pleuritis or pericarditis), nephritis and CNS disease, defined as seizures or psychosis. For the laboratorial evaluation were included hematological disorders (hemolytic anemia, leukopenia, lymphopenia or thrombocytopenia), positive ANA, and several antibodies as anti-DNA_{ds}, anti-Sm, anticardiolipin and lupus anticoagulant. The patients were also evaluated in regard to secondary antiphospholipid syndrome (APS), cardiovascular disease (CVD), including MI, angina, stroke, arterial or venous thromboembolism, transient ischemic attack and cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes mellitus, smoking, hypercholesterolemia and family history for CVD).

The control group was composed of 206 healthy volunteers with European ancestry. Both groups are descend from European immigrants (mainly of Portuguese, German and Italian). Blood samples were obtained for DNA extraction. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and informed consent was obtained from all patients.

DNA Extraction and Genotyping

DNA was isolated from peripheral blood cells using the protocol described by Lahiri and Nurnberger [15]. DNA samples were stored at -20°C. The missense variant Glu298Asp in exon 7 was identified using the set of primers described in Shimasaki *et al* [16]. PCR samples were prepared to a final volume of 25 μ l as follows: 1 μ l of DNA (0.2–0.5 μ g); 2.5 μ l of 10X PCR buffer [200 mM Tris–HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]; 1 μ l of 50 mM MgCl₂; 1 μ l of 3 mM dNTP mix; 1 μ l of 10 pmol primer mix; and 1U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) and were submitted to 35 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 1min, and 72°C for 1 min. The resulting 248-bp fragment was digested with the enzyme *Eco24I* (for 3h at 37°C), yielding 163-bp and 85-bp fragments (wild-type Glu allele) or no digestion (variant 298Asp allele), as visualized in 3% agarose gel.

Statistical analysis

Data was analyzed using EPI-INFO version 6 and SPSS for Windows version 11.0. The association between categorical variables was tested using Pearson chi-square or Yates corrected chi-square. The crude and Mantel-Haenszel (M-H; for stratified analysis) odds ratios (OR), along with 95% confidence intervals, were calculated for the carriers of the allele Asp. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested comparing the observed genotypic frequencies with the expected ones (considering the observed allelic frequencies) using the chi-square goodness-of-fit test. A two-tailed P value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The demographics, clinical and laboratorial features of lupus patients and demographic features of controls are shown in table I. The mean age of patients with CVD (41.55 years SD 13.38) was not different from the whole population of SLE patients mean age (data not shown).

The allele and genotype frequencies of the Glu298Asp eNOS polymorphism did not differ significantly between patients and controls, as shown in table II. The crude and M-H (stratified by sex) odds ratios of the presence of the allele Glu298Asp were 1.02 (95% CI: 0.62 to 1.66; P = 0.962) and 1.09 (0.61 to 1.95; P = 0.870), respectively. Patients and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Table III compares clinical characteristics with the missense variant Glu298Asp. There are no statistically significant differences among the genotypic groups in respect to lupus nephritis, secondary APS, associated CVD or the presence of two or more risk factors to CVD.

DISCUSSION

In recent years, several studies have tested the association between candidate genes and the development of SLE and specific clinical manifestations in patients of different ethnic origins. Influenced by the higher incidence of CVD in SLE patients and the association of atherosclerosis and eNOS polymorphisms, there is a growing interest to determine whether eNOS polymorphism may enhance the risk of developing SLE or its clinical manifestations.

In a multivariate analysis, Asp298 homozygosity was considered an independent risk factor for CAD with an OR of 4.2 (95% IC: 2.2 -7.9; $p < 0.0001$), when compared with Glu298 homozygotes [17]. In several studies, the variant Glu298Asp was associated to hypercholesterolaemia [18], hypertension [19-24], MI [16, 17, 25], early CAD [26, 27] coronary artery spasm [28-30], carotid plaques [31], carotid intima-media thickness (IMT) [32] and stroke [33, 34]. This polymorphism expression can result in ED and CAD through the impaired NO synthesis [35]. There were some conflicting results [36-44], especially related to hypertension. But a meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects, confirmed the evidence that the Asp298 homozygotes are at an increased risk to CVD [45]. Another recent meta-analysis suggests that current data on the relationship between eNOS variants and hypertension are subject not only to important heterogeneity but also to publication bias [46].

There is no previous study associating this polymorphism and CVD in SLE patients. The studies that tried to associate SLE or SLE clinical manifestations with Glu298Asp obtained conflicting results [47-50]. A study examined the 3 eNOS polymorphisms frequency in SLE [47], with positive association of intron 4b allele with disease. Another study analyzed 2 eNOS polymorphisms: T-786C and intron 4, plus the ECA intron 16I/S polymorphism, in lupus patients and controls, with no correlation with disease nor lupus nephritis [48]. A third study did not find increased frequency on

intron 4 polymorphism in lupus patients but a positive correlation with lupus nephritis was present, in a Korean population. [49]. A more recent study evaluated 190 lupus patients and 145 controls, in a specific Cretan population. The intron 4 polymorphism was not associated with susceptibility to SLE but it had a strong association with lupus nephritis [50].

Besides SLE [51], other chronic inflammatory rheumatic disorders, such as rheumatoid arthritis, systemic sclerosis and several vasculitides are associated with eNOS polymorphisms [52-59], but these results are also inconclusive [57, 60].

The present study included only patients with European ancestry to minimize ethnic influence of eNOS genotypic frequency [61]. The controls included were also subjects living in the same geographic area and from similar ethnic origins of the patients, descending from European immigrants.

Our results demonstrate that the Glu298Asp polymorphism did not increase SLE susceptibility. To our knowledge, this is the only study comparing the Glu298Asp polymorphism frequency with CVD and CV risk factors in SLE patients. There is one single study testing the same polymorphism in a smaller population of SLE patients and controls with a distinct ethnic background [47]. They did not find associations between missense variant Glu298Asp, neither with SLE presence nor its clinical manifestations.

A few studies showed significant evidence for association of mutated Glu298Asp with end-stage renal disease (ESRD), in diabetic or non-diabetic patients [62-64]. Some of those studies included lupus patients, but with no specific subgroup analysis. Those evidences suggest that the Glu298Asp polymorphism can be further evaluated in lupus nephritis. This study tried to identify possible association of the polymorphism with lupus nephritis; although no significant association was observed between SLE clinical manifestations and missense variant Glu298Asp in exon 7, this could be explained by the lack of statistical power for the subgroup analysis.

The relevance of studying CVD in SLE patients is due to the fact that CV diseases are one of the major causes of death in this group of patients. All the efforts to identify earlier patients at risk to develop CVD will permit optimization of the treatment and consequent increased patients' survival.

This study can not suggest that the Glu298Asp polymorphism is an indicative of risk to CVD in SLE population. There is a possibility that increasing the number of patients, an association of the missense gene with lupus nephritis, CVD or CV risk factors can be found.

References

1. D'Cruz, D.P., *Systemic lupus erythematosus*. *Bmj*, 2006. **332**(7546): p. 890-4.
2. Petri, M., *Epidemiology of systemic lupus erythematosus*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2002. **16**(5): p. 847-58.
3. Gudmundsson, S. and K. Steinsson, *Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in an unselected population*. *J Rheumatol*, 1990. **17**(9): p. 1162-7.
4. Manson, J.J. and D.A. Isenberg, *The pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *Neth J Med*, 2003. **61**(11): p. 343-6.
5. Gaffney, P.M., et al., *Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families*. *Am J Hum Genet*, 2000. **66**(2): p. 547-56.
6. Mok, C.C. and C.S. Lau, *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *J Clin Pathol*, 2003. **56**(7): p. 481-90.
7. Croker, J.A. and R.P. Kimberly, *Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Rheumatol*, 2005. **17**(5): p. 529-37.
8. Manzi, S., et al., *Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study*. *Am J Epidemiol*, 1997. **145**(5): p. 408-15.
9. El-Magadmi, M., et al., *Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women*. *Circulation*, 2004. **110**(4): p. 399-404.
10. Johnson, S.R., et al., *Impaired brachial artery endothelium dependent flow mediated dilation in systemic lupus erythematosus: preliminary observations*. *Lupus*, 2004. **13**(8): p. 590-3.

11. Kiss, E., et al., *Reduced flow-mediated vasodilation as a marker for cardiovascular complications in lupus patients*. J Autoimmun, 2006. **27**(4): p. 211-7.
12. Piper, M.K., et al., *Impaired endothelial function in systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2007. **16**(2): p. 84-8.
13. Hingorani, A.D., *Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000*. Atherosclerosis, 2001. **154**(3): p. 521-7.
14. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
15. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
16. Shimasaki, Y., et al., *Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(7): p. 1506-10.
17. Hingorani, A.D., et al., *A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK*. Circulation, 1999. **100**(14): p. 1515-20.
18. Hu, C.J., et al., *Association between polymorphisms of ACE, B2AR, ANP and ENOS and cardiovascular diseases: a community-based study in the Matsu area*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(1): p. 20-5.
19. Miyamoto, Y., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension*. Hypertension, 1998. **32**(1): p. 3-8.
20. Shoji, M., et al., *Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan*. Life Sci, 2000. **66**(26): p. 2557-62.

21. Jachymova, M., et al., *Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **284**(2): p. 426-30.
22. Yasujima, M., S. Tsutaya, and M. Shoji, *[Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and hypertension]*. *Rinsho Byori*, 1998. **46**(12): p. 1199-204.
23. Jia, C.Q., et al., *[Effects of G894T mutation in the endothelial nitric oxide synthase gene on blood pressure]*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2003. **24**(1): p. 36-9.
24. Pereira, A.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene variant modulates the relationship between serum cholesterol levels and blood pressure in the general population: new evidence for a direct effect of lipids in arterial blood pressure*. *Atherosclerosis*, 2006. **184**(1): p. 193-200.
25. Hibi, K., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction*. *Hypertension*, 1998. **32**(3): p. 521-6.
26. Jia, C.Q., et al., *[Association between G894T mutation in endothelial nitric oxide synthase gene and premature coronary heart disease]*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2005. **26**(1): p. 51-3.
27. Cam, S.F., et al., *The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population*. *Thromb Res*, 2005. **116**(4): p. 287-92.
28. Yoshimura, M., et al., *Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-->C and missense Glu298Asp variants*. *J Investig Med*, 2000. **48**(5): p. 367-74.
29. Benjafeld, A.V. and B.J. Morris, *Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension*. *Am J Hypertens*, 2000. **13**(9): p. 994-8.

30. Chang, K., et al., *The Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with coronary spasm*. Coron Artery Dis, 2003. **14**(4): p. 293-9.
31. Lembo, G., et al., *A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis*. Stroke, 2001. **32**(3): p. 735-40.
32. Czarnecka, D., et al., *Ambulatory blood pressure, left ventricular mass and vascular phenotypes in relation to the endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp and intron 4 polymorphisms in a population-based family study*. J Hum Hypertens, 2005. **19**(5): p. 413-20.
33. Elbaz, A., et al., *Association between the Glu298Asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. The GENIC Investigators*. Stroke, 2000. **31**(7): p. 1634-9.
34. Berger, K., et al., *The glu298asp polymorphism in the nitric oxide synthase 3 gene is associated with the risk of ischemic stroke in two large independent case-control studies*. Hum Genet, 2007. **121**(2): p. 169-78.
35. Golser, R., et al., *Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system*. Nitric Oxide, 2003. **8**(1): p. 7-14.
36. Afrasyap, L. and G. Ozturk, *NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2004. **36**(10): p. 661-6.
37. Tsujita, Y., et al., *Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study*. J Hypertens, 2001. **19**(11): p. 1941-8.

38. Wolff, B., et al., *Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism, blood pressure and hypertension in a general population sample*. J Hypertens, 2005. **23**(7): p. 1361-6.
39. Kato, N., et al., *Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension*. Hypertension, 1999. **33**(4): p. 933-6.
40. Wang, C.L., et al., *Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese*. J Formos Med Assoc, 2001. **100**(11): p. 736-40.
41. Karvonen, J., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort*. J Intern Med, 2002. **251**(2): p. 102-10.
42. Schmoelzer, I., et al., *Lack of association of the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase with manifest coronary artery disease, carotid atherosclerosis and forearm vascular reactivity in two Austrian populations*. Eur J Clin Invest, 2003. **33**(3): p. 191-8.
43. Kishimoto, T., et al., *eNOS Glu298Asp polymorphism and hypertension in a cohort study in Japanese*. Prev Med, 2004. **39**(5): p. 927-31.
44. Jaramillo, P.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism in Chilean subjects with coronary artery disease and controls*. Clin Chim Acta, 2006. **371**(1-2): p. 102-6.
45. Casas, J.P., et al., *Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects*. Circulation, 2004. **109**(11): p. 1359-65.
46. Pereira, T.V., et al., *Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias*. J Hypertens, 2007. **25**(9): p. 1763-74.

47. Serrano, N.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2004. **31**(11): p. 2163-8.
48. Douglas, G., et al., *Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2004. **31**(9): p. 1756-62.
49. Lee, Y.H., et al., *Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with the development of lupus nephritis*. Lupus, 2004. **13**(3): p. 188-91.
50. Vazgiourakis, V., et al., *Association of the nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism with increased risk for both lupus glomerulonephritis and rheumatoid arthritis in a single genetically homogeneous population*. Lupus, 2007. **16**(11): p. 867-74.
51. Bjornadal, L., et al., *Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95*. J Rheumatol, 2004. **31**(4): p. 713-9.
52. Oksel, F., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism is associated with Behcet's disease*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(5 Suppl 42): p. S79-82.
53. Fatini, C., et al., *High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) in patients with systemic sclerosis*. Am J Med, 2002. **112**(7): p. 540-4.
54. Salvarani, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease*. J Rheumatol, 2002. **29**(3): p. 535-40.
55. Salvarani, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in giant cell arteritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(11): p. 3219-23.

56. Kim, J.U., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62**(11): p. 1083-7.
57. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain*. *Rheumatology (Oxford)*, 2004. **43**(9): p. 1182-5.
58. Dessein, P.H., B.I. Joffe, and S. Singh, *Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(3): p. R634-43.
59. Karasneh, J.A., et al., *Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease*. *Rheumatology (Oxford)*, 2005. **44**(5): p. 614-7.
60. Kara, N., et al., *Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (glu298asp) with Behcet's disease in the Turkish population*. *Arch Dermatol Res*, 2006. **297**(10): p. 468-71.
61. Tanus-Santos, J.E., M. Desai, and D.A. Flockhart, *Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants*. *Pharmacogenetics*, 2001. **11**(8): p. 719-25.
62. Noiri, E., et al., *Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease*. *Hypertension*, 2002. **40**(4): p. 535-40.
63. Suzuki, H., et al., *Association of a missense Glu298Asp mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene with end stage renal disease*. *Clin Chem*, 2000. **46**(11): p. 1858-60.
64. Nagase, S., et al., *Association of ecNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases*. *Mol Cell Biochem*, 2003. **244**(1-2): p. 113-8.

TABLES

Table I. Clinical, demographic, and laboratory features of patients genotyped for the Asp298Glu polymorphism*.

	SLE	Controls
	n = 113	N=206
Female	99 (87,6)	66 (32,0)
Age, years – mean (SD)	37,4 (13,6)	43,5 (8,5)
Disease duration, years – Median (percentile 25,75) *	13 (9 -19)	—
Cutaneous involvement	102 (90,3)	—
arthritis	88 (77,9)	—
Serositis **	30/112 (26,8)	—
Nephritis	57 (50,4)	—
CNS	14 (12,4)	—
hematological	81 (71,7)	—
ANA	110 (97,3)	—
Anti-DNA **	55/110 (50)	—
Secondary APS **	8/110 (7,3)	—

* Data are presented as number (percentage) of patients, except when indicated otherwise. ** Data not available for all patients; the values represent the number of patients with the indicated abnormalities over the number of patients that were examined, with percentages given in parentheses. * data available only for 110 patients.

Table II. Frequencies of the genotypes and alleles of the Glu298Asp eNOS polymorphism in patients with SLE and controls*

Glu298Asp	SLE (n=113)	Controls (n=206)	P*
Alleles, number of alleles (%)			0,975
allele Asp	74 (32,7)	133 (32,3)	
allele Glu	152 (67,3)	279 (67,7)	
Genotype, number of subjects (%)			0,988
Asp/Asp	11 (9,7)	19 (9,2)	
Asp/Glu	52 (46)	95 (46,1)	
Glu/Glu	50 (44,2)	92 (44,7)	

* Pearson chi-square test or Yates corrected chi-square.

Table III. Comparison of clinical characteristics of patients according to the genotype of the Glu298Asp*

Clinical features	SLE patients divided by genotypes			P*
	Asp/Asp	Asp/Glu	Glu/Glu	
nephritis	8/11 (72,7)	28/52 (53,8)	21/50 (42)	0,146
Secondary APS	1/10 (10)	3/51 (5,9)	4/49 (8,2)	0,855
CVD	3/9 (33,3)	11/43 (25,6)	9/45 (20)	0,642
≥ 2 CVD RF	3/10 (30)	25/43 (58,1)	20/43 (46,5)	0,229

*The values represent the number of patients with the indicated abnormalities over the number of patients that were examined, with percentages given in parentheses. * Pearson chi-square. SLE: systemic lupus erythematosus; APS: antiphospholipid syndrome; CVD: cardiovascular disease; RF: risk factor

7. ANEXOS

7.1. Anexo I – Protocolos de pesquisa

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DO AMBULATÓRIO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTEMICO - HCPA

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Registro: _____ Sexo: F M

Raça: branca negra mista outra _____

Data de nascimento: _____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Endereço: _____

Cidade: _____

Telefones: _____

INICIO DOS SINTOMAS: _____

DATA DO DIAGNÓSTICO: _____

INÍCIO DO ACOMPANHAMENTO NO HCPA: _____

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO PARA LES (ACR 1997)

- Rash malar
- Rash discóide
- Fotossensibilidade
- Úlceras orais/nasais
- Artrite
- Serosite: pleurite pericardite
- Doença renal classe: _____ sem biópsia
- Doença neurológica: psicose convulsões
- Hematológico a) anemia hemolítica
b) leucopenia / linfopenia
c) plaquetopenia
- FAN positivo: _____
- Imunológico a) antiDNA
b) antiSm
c) aCL IgG / IgM _____ AL VDRL falso positivo

Tabagismo	
ativo	sim não
Ex-tabagista	sim não
Etilismo	sim não

Doença CV	sim não
HF de LES	sim não
HF de doença CV	sim não
SS secundária	sim não
SAF secundária	sim não
HAS	sim não
diabetes	sim não
dislipidemia	sim não

Doença CV: IAM, angina, AVC, trombose, claudicação, _____.

TRATAMENTOS MEDICAMENTOSOS

Medicamento	Evento Adverso q indicou suspensão	Tempo de uso	Dose máx.
<i>AINEs</i>			
<i>Prednisona</i>			*
D-CQ / HCQ			
Azatioprina			
Pulsoterapia metilprednisolona			
Ciclofosfamida IV			
Micofenolato			
Ciclofosfamida VO			
Dapsona			
Danazol			
CaCO ₃ / vit D ₃			
Bisfosfonados			
Metotrexate			
Ciclosporina			
AAS ou ticlopidina			
Anticoagulantes			
Estatinas			
ACO ou injetáveis			
TRH			

Pesquisador: _____
Data: _____

SLICC

ITEM	escore
OCULAR	
Catarata	0,1
Retinopatia ou atrofia óptica	0,1
NEUROPSIQUIÁTRICO	
Déficit cognitivo OU psicose maior	0,1
Convulsões (necessitando tratamento por 6 meses)	0,1
AVC em qualquer época (se > 1 escore 2)	0,1/ 2
Neuropatia craniana ou periférica (exclui óptica)	0,1
Mielite transversa	0,1
RENAL	
DCE estimada ou medida < 50%	0,1
Proteinúria >3,5g/ 24 h	0,1
OU doença renal em estágio final	OU 3
PULMONAR	
Hipertensão pulmonar	0,1
Fibrose pulmonar (clínico e radiográfico)	0,1
Pulmão encolhido (Rx)	0,1
Fibrose pleural (Rx)	0,1
Infarto pulmonar (Rx)	0,1
CARDIOVASCULAR	
Angina OU bypass arterial	0,1
IAM em qualquer época (se > 1 escore 2)	0,1/ 2
Cardiomiopatia (disfunção ventricular)	0,1
Doença valvular (sopros >3+/6)	0,1
Pericardite por 6 meses ou pericardiectomia	0,1
DOENÇA VASCULAR PERIFÉRICA	
Claudicação por 6 meses	0,1
Perda de tecido (polpas digitais)	0,1
Perda significativa de tecido (dedo ou membro) (se > 1 escore 2)	0,1/ 2
Trombose venosa com ulceração, edema OU estase venosa	0,1
GASTROINTESTINAL	
Infarto ou ressecção do intestino, fígado, baço ou VB (se > 1sítio, escore 2)	0,1/ 2
Insuficiência mesentérica	0,1
Peritonite crônica	0,1
Constricção OU cirurgia TGI superior em qualquer ocasião	0,1
Pancreatite crônica	0,1
MUSCULOESQUELÉTICO	
Atrofia ou fraqueza muscular	0,1
Artrite deformante ou erosiva	0,1
Osteoporose com fratura	0,1
Necrose avascular (se > 1 escore 2)	0,1/ 2
Osteomielite	0,1
Ruptura de tendão	0,1
PELE	
Alopecia crônica cicatricial	0,1
Extensa cicatrização ou panículo (exceto em couro cabeludo ou polpa digital)	0,1
INSUFICIÊNCIA GONADAL PREMATURA	0,1
DIABETES (independente do tratamento)	0,1
MALIGNIDADE (exceto displasia) (se > 1 sítio, escore 2)	0,1/ 2
TOTAL	

7.2. ANEXO II – Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO

ESTUDO DE POLIMORFISMO DA OXIDO NÍTRICO SINTETASE EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E SUA RELAÇÃO COM ATEROSCLEROSE.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Os portadores de lúpus eritematoso sistêmico apresentam mais chance de ter problemas cardiovasculares do que outras pessoas, como o infarto, a angina, o derrame cerebral, a trombose das pernas e a embolia pulmonar.

Este estudo está sendo realizado para tentar identificar os fatores de risco para problemas cardiovasculares em pessoas com lúpus.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Será coletada uma amostra de sangue. O exame de sangue será destinado à avaliação genética e só será utilizado para a análise de genes relacionados ao aumento de risco cardiovascular e à atividade da doença. O uso dessa parte do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

1. Avaliar o risco cardiovascular de cada paciente, permitindo prevenir problemas cardiovasculares futuros.
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a lúpus eritematoso sistêmico e sobre as doenças cardiovasculares.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma)

HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em 2006, e para avaliar o risco genético apenas através dos genes da óxido nítrico sintetase. No entanto, é possível que mais genes e outros fatores relacionados ao risco cardiovascular em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico possam vir a ser analisados mais adiante. Outra possibilidade é que em 5 ou 10 anos os pacientes sejam contatados novamente para verificar se houve surgimento de problemas cardiovasculares de fato.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala com um X apenas uma das opções abaixo:

() Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise dos genes da óxido nítrico sintetase.

() Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise dos genes genes da óxido nítrico sintetase e de outros genes relacionados à doença cardiovascular e ao lúpus eritematoso sistêmico que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 200__.

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. João Carlos T. Brenol

Tel: (051) 2101 8340; FAX: (051) 3331 3834

Tamara Mucenic Tel: (051) 9964 5360

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde: Telefone: (051) 2101 8304

7.3. ANEXO III – Critérios diagnósticos do Lúpus Eritematoso sistêmico do Colégio Americano de Reumatologia

1. Rash malar

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

2. Rash Discóide

Placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrização atrófica nas lesões antigas

3. Fotossensibilidade

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

4. Úlcera oral

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

5. Artrite

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

6. Serosite

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

ou

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

7. Alteração renal

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

ou

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

8. Alteração neurológica

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

Ou

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

9. Alteração hematológica

(a) anemia hemolítica – com reticulocitose

Ou

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

Ou

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

Ou

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

10. Alteração imunológica

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

Ou

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

Ou

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

11. Anticorpo antinuclear (FAN)

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

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