

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE BIOMEDICINA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA

**A INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO ARG194TRP  
NO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DE  
REPARO DE DNA XRCC1 EM PACIENTES COM  
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

FERNANDA SOUZA PERUZZATO

Orientador: JOSÉ ARTUR BOGO CHIES

Departamento de Genética / Laboratório de Imunogenética / Professor  
Associado II

Porto Alegre

2010

**Fernanda Souza Peruzzato**

**A INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO ARG194TRP  
NO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DE  
REPARO DE DNA XRCC1 EM PACIENTES COM  
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado à Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como pré-requisito para a  
obtenção de grau em Biomedicina.

Orientador: José Artur Bogo Chies

**Porto Alegre**

**2010**

**Dedico este trabalho à minha família, especialmente à minha mãe, que sempre me proporcionou todos os recursos para que eu pudesse chegar até aqui, além de todo amor, dedicação e incentivo. Amo muito vocês!**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos colegas do Laboratório de Imunogenética da UFRGS pela recepção, amizade, ensinamentos e disposição em ajudar a qualquer hora e no que fosse necessário. Ao meu orientador, que acreditou em mim desde o início, dando-me incentivo e auxílio. Também agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus amigos e colegas Paula Rohr, Bruno Paiva e Mariana Botton, que me ajudaram muito nesta etapa final.

Agradeço aos meus amigos e à minha família pelo carinho, confiança e apoio.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	5
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	6
<b>1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)</b>	6
<b>1.2 Manifestações</b>	7
<b>1.3 Epidemiologia do LES</b>	9
<b>1.4 Etiologia</b>	11
<b>1.4.1 Fatores Ambientais</b>	12
<b>1.4.2 Fatores Hormonais</b>	13
<b>1.4.3 Susceptibilidade Genética</b>	14
<b>1.5 Reparo de DNA</b>	16
<b>1.6 X-Ray Repair Crosscomplementing Group 1 (XRCC1)</b>	18
<b>1.7 LES e XRCC1</b>	20
<b>2. ARTIGO CIENTÍFICO</b>	22
<b>Resumo</b>	23
<b>Introdução</b>	24
<b>Materiais e Métodos</b>	26
<b>Resultados</b>	29
<b>Discussão</b>	31
<b>Agradecimentos</b>	36
<b>Referências Bibliográficas</b>	37
<b>Figuras</b>	41
<b>Tabelas</b>	42
<b>3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	48
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	49
<b>5. ANEXOS</b>	56

## RESUMO

A XRCC1 é uma proteína envolvida em mecanismos de reparo a danos oxidativos, como o reparo por excisão de base (BER). Polimorfismos no gene que codifica esta proteína podem estar influenciando na susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) uma vez que estímulos ambientais, assim como a própria natureza inflamatória da doença, podem causar danos ao DNA. Dessa forma, o objetivo do estudo foi investigar uma possível associação entre o polimorfismo no códon 194 do gene da XRCC1 (Arg194Trp) e o desenvolvimento de LES em pacientes do Rio Grande do Sul, considerando o grupo total e estratificando de acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais. Foi estudado um total de 240 pacientes e 214 indivíduos controles. A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as freqüências alélicas ( $p$  Fischer = 0,105) e genóticas ( $p$  Fischer = 0,294) comparadas entre pacientes e controles. Quando o grupo de pacientes foi estratificado segundo suas características clínicas, foram encontradas associações significativas com os genótipos derivados da variante polimórfica e a presença de *rash* discóide ( $p$  Fisher = 0,004), anticorpos anti-DNA ( $p$  Fisher = 0,013) e anticorpos anti-Scl70 ( $p$  Fisher = 0,031). Os dados sugerem que há uma possível influência do polimorfismo Arg194Trp na predisposição a certas características clínicas e laboratoriais da doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lúpus Eritematoso Sistêmico, Reparo de DNA, *X-Ray Repair Crosscomplementing Group 1* (XRCC1), polimorfismo Arg194Trp, susceptibilidade genética.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença auto-imune grande complexidade, cujas manifestações clínicas variam entre os pacientes (Anolik 2007). O curso desta doença geralmente envolve períodos de atividade e de remissão. Suas principais consequências são febre, fraqueza, artrite, eritemas (*rashes*) cutâneos e disfunção renal.

O LES caracteriza-se pela formação não-controlada de auto-anticorpos e pela excessiva deposição de complexos imunes em diversos tecidos causando inflamação e dano sistêmico (Castro, Balada *et al.* 2008). Os auto-anticorpos formados podem atuar contra uma ampla variedade de antígenos teciduais órgão-específicos, tanto nucleares como de superfície celular. Alguns dos antígenos nucleares alvo incluem DNA, histonas e pequenas ribonucleoproteínas; enquanto antígenos de superfície celular estão, por exemplo, em plaquetas e eritrócitos, além de fatores de coagulação. Quando os complexos antígeno-anticorpo começam a se depositar nos tecidos, ocorre o que se chama de hipersensibilidade do tipo III, onde há ativação da cascata do complemento (Kindt, Goldsby *et al.* 2008). Todo esse processo resultará em dano tecidual, de acordo com o órgão afetado.

Os mecanismos precisos envolvidos na origem desta doença não estão claros, mas sabe-se que o LES pode ser desencadeado por fatores ambientais, como certas drogas e exposição ao sol, bem como por fatores hormonais. Ainda, diversos estudos mostram evidências de susceptibilidade genética na patogênese da doença. Todos estes fatores contribuem, em conjunto, com a expressão de auto-anticorpos pelo organismo.

## 1.2 Manifestações

O LES é uma doença de características clínicas e sorológicas diversas. Sua evolução é geralmente crônica, onde períodos de atividade se intercalam com períodos de remissão. Essa heterogeneidade leva a inconsistências na classificação e na avaliação de pacientes com LES, principalmente naqueles estudos que avaliam a melhor terapia a ser utilizada (Hay 1995).

Dessa forma, com o objetivo de permitir um diagnóstico mais confiável e auxiliar os médicos nos cuidados primários, convencionou-se realizar o diagnóstico de LES através da associação de achados clínicos e laboratoriais, conforme os critérios de classificação propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 (Tabela 1), que foram revisados em 1997 (Tan, Cohen *et al.* 1982; Hochberg 1997). Entretanto, como a determinação de presença ou relevância de um critério exige frequente interpretação, estes critérios são inevitavelmente controversos (Manzi 2001).

### Critérios para Classificação de LES

1.	<i>Rash</i> malar
2.	<i>Rash</i> discóide
3.	Fotossensibilidade
4.	Úlcera oral
5.	Artrite
6.	Serosite
7.	Alteração renal
8.	Alteração neurológica
9.	Alteração hematológica
10.	Alteração imunológica
11.	Anticorpo antinuclear

**Tabela 1:** Pacientes necessitam preencher, no mínimo, quatro desses onze critérios para serem diagnosticados com LES (modificado de Hay, 1995).

Os principais sintomas que constituem a doença incluem perda de peso, mal-estar e letargia, sendo que qualquer sistema orgânico pode ser afetado. A lesão cutânea é a característica mais freqüente, e consiste em uma erupção eritematosa em áreas expostas cronicamente à luz ultravioleta, como a testa, as bochechas, o pescoço, os braços e as mãos. Existe uma ampla variedade de manifestações na pele, além do típico *rash* malar, que se caracteriza como um eritema em forma de “asa de borboleta”. Lesões discóides também podem ser observadas, podendo estas regredir sem qualquer sequela, ou resultarem em cicatrizes cutâneas. Também pode haver urticária, bolhas, púrpura, áreas de vitiligo, nódulos subcutâneos e espessamento da pele. Úlceras orais, geralmente no palato mole ou duro, são comuns e normalmente indolores. Ainda, a alopecia no LES pode ter várias formas, algumas vezes junto com erupções cutâneas discóides, mas mais freqüentemente aparecendo como uma perda difusa de cabelos, que é revertida após o surto agudo (Boey 1998; Manzi 2001).

Efeitos nas articulações são vistos em mais de 95% dos pacientes. Qualquer articulação pode ser acometida e há semelhança com a artrite reumatóide, com a diferença que é rara a ocorrência de erosões ósseas e deformidade grave. Pericardite e pleurite são, respectivamente, típicas manifestações cardíacas e pulmonares, podendo haver acúmulo de fluido e dor. As desordens hematológicas mais comuns incluem anemia, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia (Manzi 2001). Ainda, eventos cardiovasculares têm se mostrado como grandes causas de morbidade e mortalidade nos pacientes com LES (Bruce, Urowitz *et al.* 2003).

O comprometimento renal é freqüente e grave no LES, afetando cerca de 30% dos pacientes com a doença. É uma das complicações mais perigosas e de difícil tratamento que um paciente pode desenvolver. Esse comprometimento vai desde mínimos traços de proteinúria e de alguns cilindros hemáticos até a hematúria maciça, proteinúria e insuficiência renal. Acometimento neuropsiquiátrico é visto em aproximadamente 20% dos casos, sendo mais frequente a presença de psicose e depressão (Manson

*and Rahman 2006*). A pneumonia também causa morbidade e mortalidade no LES, representando a doença pulmonar mais comum nesta população. A taxa de infecções no LES parece ser maior que em outras doenças auto-imunes e estados imunocomprometidos e, visto a importância clínica da infecção no LES, trabalhos têm avaliado fatores de risco clínicos e demográficos por infecção, incluindo idade, raça, nível de escolaridade, acesso a planos de saúde, severidade ou duração do LES, presença de leucopenia e uso de terapias imunossupressoras (Kinder, Freemer *et al.* 2007). Além disso, pacientes com LES podem apresentar outras doenças auto-imunes concomitantes (Monticielo, Mucenic *et al.* 2008).

A morte nos pacientes pode ser devido à atividade do LES, principalmente quando órgãos ou sistemas vitais estão envolvidos, a complicações decorrentes do tratamento, como no caso de infecções devido à imunossupressão, ou a sequelas de longo prazo (Bernatsky, Boivin *et al.* 2006).

### **1.3 Epidemiologia do LES**

Embora considerada como uma doença rara, o LES é relativamente comum em certos grupos. Isso pode ser devido ao desenvolvimento de diversos testes imunológicos que passaram a identificar casos atípicos e benignos que antes não podiam ser diagnosticados. Muitos estudos epidemiológicos sobre essa doença têm sido feitos ao redor do mundo, sendo que a maior quantidade de dados disponíveis se refere aos Estados Unidos da América e à União Européia (Jimenez, Cervera *et al.* 2003).

Sabe-se que a prevalência de LES pode variar de 17 a 48/100.000 indivíduos na população mundial (Tebbe *and* Orfanos 1997), sendo em torno de 10 vezes mais comum em mulheres do que em homens, e tipicamente inclui mulheres em idade reprodutiva (Cervera, Khamashta *et al.* 2003).

Muitos estudos sobre a prevalência de LES na população em geral mostram diferenças marcantes. Essa variação de resultados pode ser devido ao tipo de metodologia utilizada na avaliação de casos, bem como a causas

sócio-econômicas. Entretanto, diferenças geográficas não podem ser excluídas e podem ser resultado da variabilidade de fatores genéticos e ambientais nas diversas populações. Dessa forma, o LES é mais comumente encontrado em alguns países e, mesmo em um único país, certos grupos étnicos parecem ser mais susceptíveis a desenvolver a doença do que outros (Lau, Yin *et al.* 2006). Quando comparada à da população européia, a prevalência de LES é maior nas populações americanas afro-descendentes, afro-caribenhas, nativas norte-americanas, indianas, polinésias e chinesas (Molokhia *and* McKeigue 2006).

Uma pesquisa feita com a população da cidade de Natal, no nordeste brasileiro, mostrou uma incidência de LES de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano. Para mulheres, a incidência calculada foi de 14 casos para cada 100.000 pessoas por ano, e para homens de 2,2 casos a cada 100.000 por ano. A média de idade de novos casos de LES esteve em torno de 31,8 anos nesse estudo, sendo 31,4 anos para mulheres, e 35 anos para homens (Vilar *and* Sato 2002).

Determinar a causa de morte em pacientes com LES pode ser complicado em diversos casos, devido à natureza complexa da doença. Geralmente, a mortalidade precoce, que ocorre dentro de cinco anos a partir do início da doença, tem sido associada à atividade lúpica, principalmente quando há acometimento renal e do sistema nervoso central. Já a mortalidade tardia, que ocorre após cinco anos do início da doença, mostrou-se relacionada a doenças malignas ou cardiovasculares, devido a complicações da doença e do tratamento. As infecções também têm sido principais causas de mortalidade em qualquer estágio da doença, e são potencialmente decorrentes da imunossupressão (Ruiz-Irastorza, Khamashta *et al.* 2001; Jimenez, Cervera *et al.* 2003).

Nos últimos 40 anos, houve significativa melhora na sobrevivência de pacientes lúpicos. Enquanto que, na primeira metade do século 20, o LES era descrito como “de modo geral, uma doença progressiva que se encerra fatalmente”, com um tempo habitual de aparecimento até a morte variando de 3 meses a 1 ano (Borchers, Keen *et al.* 2004) e estudos no ano de 1955

mostravam uma taxa de sobrevivência em cinco anos inferior a 50%, os últimos trabalhos têm indicado que mais de 93% dos pacientes com LES sobrevivem por cinco anos e 85% por dez anos (Jimenez, Cervera *et al.* 2003).

De fato, muitos avanços estão contribuindo para esse melhor prognóstico da doença, como o diagnóstico precoce e a utilização de terapias mais adequadas. Há alguns anos a terapia utilizada envolvia uma série de procedimentos, incluindo transfusões repetidas, injeções intravenosas de vacinas contra *Streptococcus*, vitamina B concentrada, dentre outros. Com o passar do tempo e o avanço da área médica, os métodos terapêuticos utilizados vêm mudando drasticamente. A introdução de corticosteróides, agentes imunossupressores, novos agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, medicamentos que reduzem os níveis de colesterol, além de diálise crônica, transplante renal e o tratamento mais eficiente de condições de comorbidade, como hipertensão e hiperlipidemia, desempenharam um importante papel para reforçar ainda mais a sobrevivência dos pacientes (Borchers, Keen *et al.* 2004).

Como já mencionado, as manifestações, assim como a gravidade da doença, podem variar em diferentes grupos populacionais, razão pela qual se deve avaliar com cuidado os trabalhos realizados em grupos populacionais distintos.

#### **1.4 Etiologia**

Permanecem desconhecidos os exatos mecanismos envolvidos na etiologia do LES, porém há evidências da participação de fatores hormonais e ambientais, bem como genéticos, na patogênese da doença (Garred, Voss *et al.* 2001). Dessa forma, o LES pode ser entendido como uma patologia de causa multifatorial, onde vários estímulos ambientais (e potencialmente hormonais) atuam sobre um indivíduo geneticamente susceptível (Cooper, Dooley *et al.* 1998).

### 1.4.1 Fatores Ambientais

É inquestionável a contribuição ambiental para a expressão do LES. Mudanças epigenéticas, como a metilação do DNA, têm sido consideradas como fatores ambientais associados com a doença. A exposição à luz ultravioleta é um fator de risco conhecido e várias toxinas ambientais, como as presentes no cigarro, estão sendo consideradas em estudos epidemiológicos (Rahman *and* Isenberg 2008).

Estudos sugerem que os raios ultravioletas podem estimular os queratinócitos a expressar antígenos nucleares em sua superfície, aumentando a secreção de citocinas que estimulariam linfócitos B à produção de anticorpos auto-reativos (Lehmann, Holzle *et al.* 1990; Casciola-Rosen, Anhalt *et al.* 1994).

O vírus Epstein-Barr (EBV) também tem sido identificado como um possível fator no desenvolvimento do LES. Este vírus pode residir em células B ou interagir com esses linfócitos. Segundo Gross *et al.* (2005) foi observada uma alta frequência de células B infectadas com EBV em pacientes lúpicos comparados com controles, sendo as células infectadas predominantemente linfócitos B de memória. Não houve relação com a terapia de imunossupressores e pacientes com LES ativo possuíam um maior número de células infectadas do que pacientes com a doença quiescente (Gross, Hochberg *et al.* 2005). Entretanto, há um paradoxo no fato de que embora 90% da população adulta esteja infectada com o vírus EBV, a prevalência de LES permanece baixa. Isso acentua o caráter multifatorial desta patologia (D'Cruz, Khamashta *et al.* 2007). Outros vírus, como Citomegalovírus, Parvovírus B19 e alguns retrovírus, também foram relacionados ao LES, porém as evidências ainda são controversas. Infecções como tripanossomíase e micobacterioses poderiam induzir a produção de anticorpos contra DNA e sintomas semelhantes ao LES (Via *and* Handwerger 1993; Steinberg 1995).

Metais pesados, como por exemplo, mercúrio, podem induzir doença renal auto-imune ou síndromes similares ao LES em alguns sistemas

experimentais, mas estudos com humanos que corroboram essas evidências são limitados. Por outro lado, existem muitos estudos epidemiológicos que relacionam a poeira de sílica com o LES e outras doenças auto-imunes (Cooper, Dooley *et al.* 1998).

#### **1.4.2 Fatores Hormonais**

O LES é uma doença que afeta principalmente mulheres em idade reprodutiva e isso sugere um forte papel de hormônios estrógenos no desenvolvimento da doença. Estudos experimentais em camundongos demonstraram exacerbação da doença na presença de estrogênios e melhoria por hormônios androgênicos (Ansar Ahmed, Penhale *et al.* 1985). Outros estudos sugerem que há relação causal ou modulatória entre o LES e a atividade dos hormônios estradiol, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), progesterona e prolactina (McMurray *and* May 2003).

Diferenças entre pacientes do sexo masculino e feminino em relação a andrógenos e estrógenos, entretanto, não explicam completamente a distribuição de LES e de outras doenças auto-imunes por idade e sexo e não podem explicar diferenças nos riscos de ocorrência e morbidade associados a cada sexo (Cooper, Dooley *et al.* 1998).

Uma questão persistente é que se o risco de desenvolvimento de LES está relacionado com a exposição a estrogênio, é de se esperar um risco reduzido da doença em mulheres com uma menopausa natural mais precoce. Entretanto, não há dados de estudos epidemiológicos para apoiar ou refutar essa hipótese. Além disso, uma menopausa precoce pode ser uma manifestação de uma condição auto-imune, podendo estar relacionada com o LES. Se este for o caso, a idade da menopausa poderia gerar uma confusão de associação entre a duração do uso da terapia de reposição hormonal e o risco de desenvolver o LES (Cooper, Dooley *et al.* 1998).

Devido às muitas questões sobre o envolvimento dos hormônios na patogênese do LES, pesquisas a respeito de fontes genéticas e ambientais

de variabilidade no metabolismo hormonal podem contribuir substancialmente para o entendimento da etiologia do LES.

### 1.4.3 Susceptibilidade Genética

Há claras evidências da forte base genética no desenvolvimento do Lúpus Eritematoso Sistêmico e, durante cerca de 20 anos, estudos de associação vêm sendo feitos para tentar elucidar o papel genético envolvido nessa doença.

São raras as doenças que são atribuídas a apenas uma mutação em um gene, onde o padrão de herança segue as leis da genética Mendeliana clássica. Em doenças complexas, como o LES, sabe-se que muitos fatores genéticos interagem com fatores ambientais determinando susceptibilidade a doença, e um gene apenas não é suficiente para a expressão patológica (Lindqvist *and* Alarcon-Riquelme 1999). No caso do LES, a interação de diferentes genes predispõe à desordem imunológica que, em dado momento, conduz a falha de mecanismos de tolerância imunológica, permitindo ativação policlonal de linfócitos B, com conseqüente produção de auto-anticorpos, formação de imunocomplexos e deposição dos mesmos em órgãos (Monticielo, Mucenic *et al.* 2008).

De 5-12% dos familiares de pacientes com LES desenvolverão a doença, o que representa um risco 100 vezes superior ao da população em geral (Arnett, Reveille *et al.* 1984). Outros estudos mostram que parentes de pessoas com LES não necessariamente apresentam essa doença, às vezes apresentando outra desordem autoimune (Brunjes, Zike *et al.* 1961; Lawrence, Martins *et al.* 1987). Crianças nascidas de mães lúpicas têm teste positivo para fator antinuclear em cerca de 27% das vezes, sem necessariamente desenvolver um quadro clínico compatível com LES (Murashima, Fukazawa *et al.* 2004).

Tem-se estudado inúmeros marcadores genéticos e determinou-se que certos marcadores são mais comuns em pacientes de LES do que na população em geral. Como exemplo, tem-se o complexo principal de

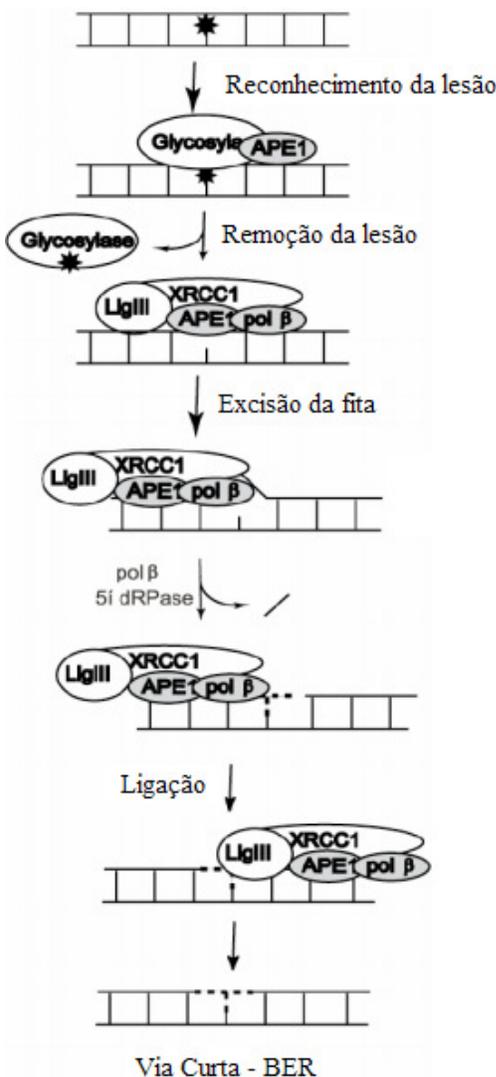
histocompatibilidade (MHC), cuja associação genética com o LES já foi demonstrada há vários anos, principalmente em populações derivadas do norte europeu. HLA-DR2 e HLA-DR3 estão associados a aumento no risco da doença (Castro, Balada *et al.* 2008). Estudos apontam outros genes como importantes na patogênese do LES, como por exemplo, genes de receptores Fc da imunoglobulina G (Jonsen, Bengtsson *et al.* 2004). Esses receptores ligam-se a fragmentos Fc da imunoglobulina G (IgG) e transmitem sinais efetores em diversos tipos de células do sistema imune. Variantes alélicas nos genes desses receptores que levam à redução da afinidade de ligação a subclasses de IgG são bons candidatos em estudos de predisposição ao LES, uma vez que levam a ineficiente remoção dos imunocomplexos (Castro, Balada *et al.* 2008). Deficiências hereditárias, completas e parciais, de diversos componentes do sistema complemento, tais como C1q, C1r, C1s, C4 e C2, e alelos nulos de C4A (C4AQ0), também foram descritas como fatores de predisposição ao LES (Huang, Wang *et al.* 2003; Saevarsdottir, Kristjansdottir *et al.* 2006).

Desordens do sistema imune, que incluem defeitos na sua regulação, como por exemplo, falhas na ativação e diferenciação funcional de células B, células T, células dendríticas, entre outras células, foram associadas à presença de diferentes variantes gênicas. Esses fatores também podem estar relacionados à alteração na degradação de proteínas, ao transporte anormal de peptídeos através das membranas celulares, defeitos na cascata do complemento, disfunção retículo-endotelial, produção anormal de imunoglobulinas, células apoptóticas e liberação de hormônios (Garrett-Sinha, John *et al.* 2008; Monticielo, Mucenic *et al.* 2008). Dessa forma, essas variantes gênicas e suas diversas combinações podem levar a respostas anormais que, associadas a fatores ambientais, podem resultar em múltiplos processos patológicos e variadas expressões clínicas do LES.

## 1.5 Reparo de DNA

Sabe-se que as células humanas estão constantemente sendo expostas a diversos tipos de agentes genotóxicos, tanto de origem endógena como exógena. Sistemas de reparo de DNA são responsáveis por manter a integridade do genoma das células frente a danos causados pelo ambiente e por erros de replicação celular (Sobti, Mahdi *et al.* 2009). Estudos revelam que mecanismos deficientes de reparo resultam na falha de funções vitais, estando associados com câncer, defeitos de nascimento e envelhecimento acelerado (Meza-Espinoza, Peralta-Leal *et al.* 2009). Polimorfismos em genes envolvidos no reparo do DNA podem alterar a função protéica e causar defeitos na capacidade de reparo, o que leva à instabilidade genética e, eventualmente, à carcinogênese (Batar, Guven *et al.* 2009).

Danos induzidos ao DNA por hidrólise, espécies reativas de oxigênio, agentes alquilantes, radiação ionizante, entre outros, modificam as bases nitrogenadas e a estrutura da dupla-hélice. O principal mecanismo utilizado na remoção de bases modificadas no organismo é o reparo por excisão de base (BER, do inglês *Base Excision Repair*), considerado como a primeira defesa contra agentes endógenos e exógenos (Dalhus, Laerdahl *et al.* 2009; Kiran, Saxena *et al.* 2010). O BER inicia-se por uma DNA-glicosilase lesão específica e completa-se seguindo por um dos dois sub-caminhos: um curto (*short-patch BER*), no qual apenas um nucleotídeo é substituído, ou um longo (*long-patch BER*), onde de 2-13 nucleotídeos são substituídos (Almeida *and* Sobol 2007). A maioria dos reparos ocorre pela via mais curta, onde há a maior participação da proteína XRCC1 (Figura 1).



**Figura 1:** O processo se inicia por uma glicosilase que hidrolisa a ligação glicosídica entre a base da lesão e as moléculas de desoxirribose, formando um sítio AP (apurínico ou apirimidínico). Este sítio é reconhecido e clivado pela AP endonuclease (APE1), deixando na fita danificada uma extremidade 3' OH e outra 5' desoxirribose-fosfato (5'dRP). Então, a DNA polimerase  $\beta$  (pol  $\beta$ ) hidrolisa a 5'dRP e preenche a lacuna deixada na fita, para que, logo em seguida, ocorra a ligação pela DNA Ligase III. A XRCC1 age como uma proteína âncora, interagindo com todas as outras (modificado de Almeida e Sobol, 2007).

## 1.6 X-Ray Repair Crosscomplementing Group 1 (XRCC1)

A XRCC1 é conhecida como uma importante proteína envolvida no reparo de excisão de base (BER), participando como uma proteína multidomínio que serve como âncora desse mecanismo, interagindo com e estimulando a maioria das enzimas envolvidas nesse processo. Sua importância na estabilidade genética está indicada pela alta frequência de aberrações cromossômicas espontâneas e deleções em células XRCC1 mutantes, e pela letalidade embrionária em camundongos nocaute XRCC1 (Whitehouse, Taylor *et al.* 2001).

O gene que codifica a XRCC1 está localizado no braço longo do cromossomo 19, na posição 19q13.2, e possui um comprimento de 32 kb, incluindo 17 éxons. A proteína caracteriza-se pela presença de 633 aminoácidos e um peso molecular de 70 kDa (Duell, Millikan *et al.* 2001).

A XRCC1 não possui atividade catalítica por si própria, mas age tanto como uma plataforma como um modulador de diferentes atividades envolvidas no BER. Há interação e formação de complexo com as proteínas DNA polimerase  $\beta$ , DNA ligase III e poli (ADP-ribose) polimerase através das regiões N-terminal, C-terminal e central da XRCC1, respectivamente, e com a polinucleotídeo quinase humana, trazendo estas ao sítio de dano ao DNA (Whitehouse, Taylor *et al.* 2001). Dessa forma, a XRCC1 fornece uma ligação física nas etapas de incisão e ligação do BER.

Já foram descritos diversos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no gene da XRCC1, entretanto, apenas oito são variantes não sinônimas. Dentre essas, os três SNPs mais comumente analisados são os que correspondem ao códon 194 (mudança de arginina para triptofano), ao códon 280 (arginina para histidina), e ao códon 399 (arginina para glicina). Esses polimorfismos podem influenciar a interação da proteína com outras enzimas do BER, pois ocorrem em regiões evolutivamente conservadas, que são importantes para a função da XRCC1. Consequentemente, podem alterar a eficiência da atividade de reparo, pois alteram a interação proteína-proteína (Saadat 2010). Muitos grupos têm estudado a distribuição

genotípica dos polimorfismos da XRCC1, bem como possíveis associações com doenças, principalmente cânceres. No entanto, os resultados obtidos a partir de estudos de associação variam entre diferentes populações (Kiran, Saxena et al. 2010).

O polimorfismo do códon 194 (rs1799782), localizado no éxon 6 do gene que codifica a proteína XRCC1 caracteriza-se por uma substituição de citosina por timina na posição 26304, acarretando a mudança do aminoácido arginina por um triptofano (Yan, Yanan *et al.* 2009). Essa variante está presente na região de dobradiça entre a interação do domínio N-terminal da XRCC1 com a DNA polimerase  $\beta$  (Weng, Lu *et al.* 2008). A transição da carga positiva da arginina para o aminoácido hidrofóbico triptofano nessa região conservada pode alterar a função da XRCC1.

Assim como outros polimorfismos de proteínas de reparo de DNA que já foram descritos, o polimorfismo Arg194Trp pode estar influenciando a susceptibilidade ao câncer. Muitos trabalhos estão tentando elucidar esse papel, mas os resultados vêm mostrando-se controversos. Em um estudo com a população da Carolina do Norte (EUA), não foi encontrada associação significativa deste polimorfismo com o câncer de mama (Duell, Millikan *et al.* 2001). Da mesma forma, em outro trabalho, não foi observada associação entre o polimorfismo Arg194Trp e o câncer de pulmão (Butkiewicz, Rusin *et al.* 2001). Entretanto, um estudo sugeriu que o alelo Trp aumenta a capacidade de reparação (Frosina 2004). Segundo Rohr *et al.* (2010), o aumento na função de XRCC1 pela presença do alelo Trp pode levar à proteção contra pesticidas (Rohr, da Silva et al. 2010). De fato, a maioria dos estudos disponíveis na literatura mostra a associação do alelo Trp com um risco reduzido ao câncer, como o câncer de pulmão e o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Sturgis, Castillo *et al.* 1999; Ratnasinghe, Yao *et al.* 2001; Goode, Ulrich *et al.* 2002). Em um pequeno estudo de 98 casos e 161 controles, os resultados foram contrários aos da maioria dos demais trabalhos. Neste caso, a presença do alelo Trp se mostrou como um fator de maior risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (Olshan, Watson *et al.* 2002).

## 1.7 LES e a XRCC1

Sabe-se que o Lúpus Eritematoso Sistêmico caracteriza-se pela presença de auto-anticorpos contra uma variedade de antígenos próprios, incluindo aqueles presentes nas membranas celulares, no citoplasma e no núcleo. Entretanto, dentre todos esses antígenos, o DNA tem sido considerado o mais importante alvo na produção de auto-anticorpos no LES (Blount, Griffiths *et al.* 1990). Os exatos mecanismos que levam à formação desses anticorpos não estão esclarecidos e o que está estabelecido é que o DNA nativo, por si só, é pouco imunogênico (Al Arfaj, Chowdhary *et al.* 2007). Estudos têm demonstrado que essa antigenicidade do material genético pode ser aumentada consideravelmente na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) e drogas, entre outros agentes, que podem causar alteração na conformação da dupla-hélice, quebra nas fitas e dano às bases nitrogenadas (Blount, Griffiths *et al.* 1989; Bassi, Xavier *et al.* 2008).

Embora a patogênese do LES seja multifatorial, a natureza inflamatória da doença implica na presença de um possível estresse oxidativo, que pode contribuir para a disfunção das células imunes, produção de antígenos próprios e reatividade de auto-anticorpos (Zhang, Ye *et al.* 2010). Tem sido proposto que espécies reativas de oxigênio geradas de fagócitos ativados ultrapassam a membrana celular e reagem com o DNA nuclear, resultando na indução subsequente de auto-anticorpos anti-DNA, que contribuem para o desenvolvimento do LES. Foi descrito que essas EROs podem induzir patologia em pacientes com LES, pois mantém presente na circulação desses indivíduos uma forma antigênica do DNA (Lunec, Herbert *et al.* 1994; Al Arfaj, Chowdhary *et al.* 2007). Segundo Ahsan *et al.* (2003), a detecção de 8-hidroxi guanosina no DNA de complexos imunes de pacientes com LES reforça a evidência de que espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas na patogênese desta doença (Ahsan, Ali *et al.* 2003). Além disso, a radiação solar ultravioleta tem se mostrado um forte indutor de alterações no DNA celular por mecanismos que incluem a

produção de EROs e sabe-se que a fotossensibilidade é uma das características clínicas mais comuns de pacientes com LES (Cooke, Mistry *et al.* 1997).

Levando-se em conta que os diversos estímulos ambientais envolvidos no desenvolvimento do LES, como drogas e irradiação ultravioleta, assim como a própria natureza inflamatória da doença podem produzir dano oxidativo, quebras no DNA e/ou modificação de bases, é de se esperar que, uma vez produzido, esse dano ao material genético seja reconhecido e corretamente reparado por mecanismos específicos, como o reparo por excisão de base (BER).

Com relação ao Lúpus Eritematoso Sistêmico, ainda há poucos trabalhos que pesquisam uma associação desta doença com polimorfismos no gene da proteína de reparo de DNA XRCC1, importante no processo de reparo BER. Em um estudo recente com a população chinesa Han, onde os polimorfismos no códon 194 e no códon 399 da XRCC1 são comuns, foi revelado que há um envolvimento da variante A/G do códon 399 na patogênese do LES. Entretanto, para o SNP no códon 194 não houve diferença nas freqüências alélicas e genotípicas entre pacientes e controles (Lin, Wan *et al.* 2009). Em outro trabalho, realizado na cidade de Ribeirão Preto, no Brasil, foi investigada a eficiência de leucócitos do sangue periférico de pacientes com LES em reparar dano ao DNA induzido por radiação ionizante, bem como possíveis associações com a doença de polimorfismos em proteínas de reparo. Neste trabalho, o polimorfismo do códon 399 da XRCC1 esteve associado com a presença de anticorpos anti-DNA e foi visto que leucócitos de pacientes com LES reparam menos eficientemente o dano ao DNA induzido por radiação (Bassi, Xavier *et al.* 2008).

Com base nisso, decidimos estudar o gene que codifica a proteína de reparo de DNA XRCC1, investigando a influência do polimorfismo no códon 194 do gene que codifica esta proteína em pacientes com LES no Rio Grande do Sul, Brasil.

## 2. ARTIGO CIENTÍFICO

Em preparação para submissão ao periódico *Lupus*

# **A INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO ARG194TRP NO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DE REPARO DE DNA XRCC1 EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

<sup>1</sup>Fernanda Souza Peruzzato, <sup>1</sup>Paula Rohr, <sup>1</sup>Kátia Kvitko <sup>2</sup>Odirlei André  
Monticielo, <sup>2</sup>João Carlos Tavares Brenol, <sup>2</sup>Ricardo Machado Xavier,  
<sup>1</sup>José Artur Bogo Chies\*

<sup>1</sup> Departamento de Genética, UFRGS, Brasil.

<sup>2</sup> Divisão de Reumatologia, Departamento de Medicina Interna, Hospital de  
Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, Brasil.

\* Autor correspondente: José Artur Bogo Chies

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS

Av. Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43323 - Lab. 212

Agronomia - Porto Alegre, RS – Brasil. CEP 91501-970

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

Endereço de email: jabchies@terra.com.br

## Resumo

A XRCC1 é uma proteína envolvida em mecanismos de reparo a danos oxidativos, como o reparo por excisão de base (BER). Polimorfismos no gene que codifica esta proteína podem estar influenciando na susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) uma vez que estímulos ambientais, assim como a própria natureza inflamatória da doença, podem causar danos ao DNA. Dessa forma, o objetivo do estudo foi investigar uma possível associação entre o polimorfismo no códon 194 do gene da XRCC1 (Arg194Trp) e o desenvolvimento de LES em pacientes do Rio Grande do Sul, considerando o grupo total e estratificando de acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais. Foi estudado um total de 240 pacientes e 214 indivíduos controles. A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências alélicas ( $p$  Fischer = 0,105) e genotípicas ( $p$  Fischer = 0,294) comparadas entre pacientes e controles. Quando o grupo de pacientes foi estratificado segundo suas características clínicas, foram encontradas associações significativas com os genótipos derivados da variante polimórfica e a presença de *rash* discóide ( $p$  Fisher = 0,004), anticorpos anti-DNA ( $p$  Fisher = 0,013) e anticorpos anti-Scl70 ( $p$  Fisher = 0,031). Os dados sugerem que há uma possível influência do polimorfismo Arg194Trp na predisposição a certas características clínicas e laboratoriais da doença.

**Palavras-chave:** Lúpus Eritematoso Sistêmico, Reparo de DNA, *X-ray repair crosscomplementing group 1* (XRCC1), polimorfismo Arg194Trp, associação.

### **Introdução**

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença auto-imune de grande complexidade, cujas manifestações clínicas variam entre os diferentes pacientes (1). Na maioria dos casos, seu curso envolve períodos de atividade e de remissão. O LES caracteriza-se pela formação não-controlada de auto-anticorpos predominantemente direcionados contra DNA ou antígenos nucleares, e pela excessiva deposição de complexos imunes em diversos tecidos, causando inflamação e dano sistêmico (2). Seus principais sintomas são febre, fraqueza, artrite, *rashes* cutâneos e disfunção renal.

Os mecanismos exatos que levam ao desenvolvimento desta doença não estão claros, mas sabe-se que o LES pode ser desencadeado por fatores ambientais como certas drogas e exposição ao sol, bem como por fatores hormonais. Ainda, diversos estudos mostram evidências de susceptibilidade genética na patogênese da doença (3).

Dentre todos os antígenos, o DNA tem sido considerado o mais importante alvo na produção de auto-anticorpos no LES (4). Os exatos mecanismos que levam à formação desses anticorpos não estão esclarecidos e o que está estabelecido é que o DNA nativo, por si só, é pouco imunogênico (5).

Tem sido demonstrado que essa antigenicidade do material genético pode ser aumentada consideravelmente na presença de, entre outros agentes, espécies reativas de oxigênio (EROs) ou drogas, as quais podem causar alteração na conformação da dupla-hélice, quebra nas fitas e dano às bases nitrogenadas (6, 7). Levando-se em conta que os diversos estímulos ambientais envolvidos no desenvolvimento do LES, como drogas e irradiação ultravioleta, assim como a própria natureza inflamatória da doença podem produzir dano oxidativo, é de se esperar que, uma vez produzido, esse dano ao material genético seja reconhecido e corretamente reparado por mecanismos específicos, como o reparo por excisão de base (BER).

A XRCC1 é uma importante proteína envolvida no mecanismo de reparo BER, desempenhando um papel central na medida em que interage e agrega no sítio de dano ao DNA outras proteínas envolvidas neste processo, como a DNA ligase III, a DNA polimerase  $\beta$  e a poli (ADP-ribose) polimerase (8).

Poucos trabalhos até então estudaram associações entre polimorfismos do gene da XRCC1 e a susceptibilidade ao LES. Os três SNPs mais comumente analisados são os que correspondem ao códon 194 (mudança de arginina para triptofano), ao códon 280 (arginina para histidina), e ao códon 399 (arginina para glicina). Esses polimorfismos podem influenciar a interação da proteína com outras enzimas do BER, pois ocorrem em regiões conservadas da proteína (9).

O polimorfismo no códon 194 do gene da XRCC1, denominado Arg194Trp (rs1799782), tem sido analisado em muitos estudos que buscam

entender seu envolvimento nos mais variados tipos de câncer. Os resultados mostram-se controversos, embora grande parte dos trabalhos relate que a variante Trp melhora a eficiência do reparo, reduzindo o risco ao câncer (10-12).

Diante dessas considerações, e tendo em vista que apenas um trabalho estudou a variante Arg194Trp no LES (13), o presente estudo teve como objetivo investigar uma possível associação entre a presença do polimorfismo no códon 194 do gene da XRCC1 e a susceptibilidade para o desenvolvimento de LES em pacientes do sul do Brasil, bem como a potencial associação entre esta variante e a sintomatologia clínica dos pacientes.

## **Materiais e Métodos**

### *Amostras*

Foram analisados 240 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e 214 indivíduos controles. As amostras dos indivíduos com LES foram provenientes de pacientes em tratamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A amostra do grupo controle é constituída de indivíduos saudáveis, com banco de amostras já estabelecido no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foram incluídos, neste estudo, pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Reumatologia do HCPA e apenas os indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a utilização de DNA

previamente coletado e purificado a partir de amostras de sangue para análise da variante polimórfica.

### *Caracterização Clínica dos Pacientes com LES*

As informações referentes às características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES foram coletadas a partir de dados contidos nos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e de Informações em Saúde (SAMIS) do HCPA. O diagnóstico de LES foi feito de acordo com os critérios estabelecidos pelo *American College of Rheumatology (ACR)*. Para cada paciente foi preenchida ficha clínica. Foram discriminadas informações sobre as seguintes manifestações clínicas e laboratoriais: presença ou ausência de rash malar, rash discóide, fotossensibilidade, úlceras orais, serosite, artrite, manifestações hematológicas, manifestações renais, manifestações neurológicas e auto-anticorpos (fator antinuclear, anticorpo anti-DNA de dupla hélice, anticorpo anticardiolipina, anticoagulante lúpico e anticorpos contra antígenos extraíveis do núcleo - anti-ENA).

### *Análise do Polimorfismo Arg194Trp*

O DNA utilizado para a técnica de caracterização do polimorfismo foi extraído pelo método de *salting out* a partir de amostras de 5mL de sangue periférico, como descrito por Lahiri e Nurnberger (14). A região do gene da XRCC1 que continha o polimorfismo Arg194Trp foi amplificada por meio da PCR/RFLP, com os *primers* e as condições descritas por De Ruyck *et al.*,

2005 (15). Após amplificação, os fragmentos de 504 pb foram digeridos *overnight* pela enzima de restrição *PvuII*, e os genótipos foram visualizados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. Para o genótipo Arg/Arg foi visualizada uma banda de 431 pb, referente ao sítio de digestão obrigatória da enzima (o fragmento complementar da clivagem, correspondente a 73bp não é passível de visualização em gel de agarose 3%); para Arg/Trp estavam presentes as bandas de 431 e 368 pb (o fragmento complementar da clivagem, correspondente a 63bp não é passível de visualização em gel de agarose 3%) essa última referente à presença de um alelo Trp; e para Trp/Trp apenas uma banda de 368 pb (Figura 1).

#### *Análise Estatística*

As freqüências alélicas e genótípicas da variante polimórfica foram determinadas através da contagem dos alelos e genótipos. As freqüências alélicas e genótípicas dos pacientes foram comparadas com as freqüências observadas nos indivíduos controle usando-se o Teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) ou o Teste Exato de Fisher (programas: WinPepi versão 10.5 e SPSS 18.0). Os resultados foram apresentados na forma de freqüência (%) e com nível de significância estabelecido em  $\alpha < 0,05$ . Foram também realizadas comparações no grupo de pacientes com LES, relacionando as variáveis clínicas e laboratoriais desses pacientes com as freqüências obtidas do polimorfismo através do Teste Exato de Fisher.

## **Resultados**

### *Frequências do polimorfismo Arg194Trp*

As características dos pacientes e controles com relação à origem étnica e ao sexo encontram-se na tabela 1. A distribuição dos genótipos mostrou-se de acordo com o esperado, tanto no grupo de pacientes como o de controles, satisfazendo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências genotípicas e alélicas foram comparadas entre o grupo de pacientes e controles, estando apresentadas na tabela 2. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre esses grupos tanto para os genótipos ( $p$  fisher = 0,294) como para os alelos ( $p$  fisher = 0,105).

### *Manifestações clínicas e laboratoriais do LES*

As frequências genotípicas e a presença ou não do alelo Trp foram analisadas entre os pacientes e as diferentes manifestações clínicas e laboratoriais do LES. As características dos pacientes quanto à presença dessas manifestações encontram-se na tabela 3, enquanto que a distribuição dos genótipos em relação à presença destas manifestações encontra-se na tabela 4. Na tabela 5 analisou-se a relação entre os diferentes sintomas e a presença ou não do alelo Trp, considerando os pacientes heterozigotos e homozigotos Trp/Trp como um só grupo. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre a presença de rash discóide e o polimorfismo Arg194Trp tanto na análise dos genótipos ( $p = 0,004$ ), como na análise da presença de Trp ( $p = 0,002$ ). O

alelo que codifica para o Trp estava em maior frequência nos pacientes com *rash* discóide em comparação àqueles que não apresentam essa manifestação, e isso se refletiu nos genótipos. O odds ratio calculado foi de 3,84 ( $p = 0,002$ ), com um intervalo de confiança de IC 95% = [1,69-8,70].

Com relação à análise da presença de anticorpos anti-DNA, as diferenças foram significativas ( $p = 0,013$ ) apenas na análise dos genótipos, na qual houve predomínio de heterozigotos no grupo de pacientes que não apresentam anti-DNA. Em contrapartida, nessa mesma análise, observou-se predomínio de homozigotos para a variante Trp nos indivíduos que apresentavam anti-DNA. Quando heterozigotos e homozigotos foram reunidos pela presença da variante Trp, não houve diferença significativa ( $p = 0,160$ ).

Os dados obtidos também mostraram significância estatística entre a frequência dos genótipos ( $p = 0,031$ ) e a presença do alelo que codifica para Trp ( $p = 0,028$ ) quando separamos os pacientes segundo a presença de anti-Scl70. Observou-se que 50% dos indivíduos positivos para anti-Scl70 eram heterozigotos para a variante polimórfica contra 14% heterozigotos nos pacientes que não apresentam anti-Scl70, ou seja, houve um predomínio de heterozigotos no grupo de pacientes positivos para tal característica clínica. Também houve um predomínio de homozigotos Arg/Arg no grupo de pacientes sem Anti-Scl. Em relação à análise da presença do alelo que codifica para Trp, a presença desta variante também foi predominante no grupo de pacientes positivos para anti-Scl70.

## **Discussão**

Apesar do exato mecanismo envolvido na antigenicidade do DNA não ser conhecido, sabe-se que o desenvolvimento do LES é influenciado por diversos fatores, incluindo sexo, etnia, variáveis ambientais e herança genética. Diversos estudos têm sugerido uma relação entre a natureza inflamatória da doença e a presença de um estado de estresse oxidativo (5, 16). Tal estado pode contribuir para a disfunção imunológica das células, produção de auto-antígenos e reatividade de auto-anticorpos, pois esses agentes oxidantes produzem modificações na dupla-hélice de DNA, como quebras de fita e modificação de bases, aumentando a antigenicidade do material genético. Danos como esses também podem ser consequência de estímulos ambientais, principalmente a exposição à radiação ultravioleta (6, 17).

Alguns trabalhos têm sugerido, através de ensaios funcionais, que células de pacientes com LES possuem deficiência na capacidade de reparar modificações oxidativas do DNA, assim como possuem maior nível de dano basal ao material genético (7, 18, 19). Ainda há poucos estudos que buscam uma associação entre polimorfismos em genes de reparo de DNA e o LES, principalmente no que se refere àqueles envolvidos no mecanismo de reparo de excisão de bases.

No presente estudo, nosso grupo investigou o polimorfismo Arg194Trp no gene da proteína de reparo XRCC1 e o desenvolvimento de Lúpus Eritematoso Sistêmico. Não houve diferença significativa entre a

freqüência do polimorfismo em euro e afro-descendentes no grupo controle, assim como entre homens e mulheres, motivo pelo qual as análises foram realizadas sem subgrupamento por origem étnica ou sexo. Um trabalho realizado com uma amostra populacional da Carolina do Norte, EUA, também não encontrou diferença estatisticamente significativa entre as freqüências alélicas do polimorfismo Arg194Trp entre euro e afro-descendentes (20). Segundo Meza-Espinoza *et al.* (2009), que estudou a influência desse polimorfismo no desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda infantil, a freqüência do Arg194Trp foi similar entre homens e mulheres mexicanos (21).

No presente trabalho, nenhuma associação significativa foi encontrada entre as freqüências genotípicas e alélicas de pacientes e controles, o que está de acordo com um trabalho realizado em Taiwan (13). Esse estudo foi o único que, até então, considerou o LES e o polimorfismo Arg194Trp.

As freqüências genotípicas encontradas em indivíduos controles neste estudo foram similares àquelas relatadas em um trabalho com uma amostra populacional brasileira do estado de São Paulo (22).

Mesmo que não tenhamos encontrado um resultado estatisticamente significativo, pôde-se observar a tendência de maior prevalência da variante Trp no grupo de pacientes. Porém, há poucos trabalhos que avaliam esse polimorfismo e LES. Dessa forma, mais estudos são necessários para esclarecer uma possível relação entre esse polimorfismo e a doença.

Analisando as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES, nossos resultados sugerem que a presença da variante Trp, tanto em homozigose como em heterozigose, está associada com o desenvolvimento de *rash* discóide. Atráves do cálculo de *odds ratio*, viu-se que a presença deste polimorfismo aumenta 3,84 vezes a chance de um indivíduo com LES desenvolver *rash* discóide.

Os resultados também se mostraram interessantes com relação à presença de anticorpos anti-DNA. Quando analisamos somente a presença da variante Trp, ou seja, juntando os heterozigotos e os homozigotos Trp/Trp, não houve diferença significativa, sugerindo que esse polimorfismo não estaria influenciando na presença de anticorpos anti-DNA. Entretanto, quando a distribuição genotípica foi comparada entre pacientes positivos e negativos para anticorpos anti-DNA, os heterozigotos estavam em menor frequência no grupo com anticorpos anti-DNA, enquanto que os homozigotos para a variante Trp estiveram mais presentes neste mesmo grupo. Esses resultados são confusos e podem ser devido ao baixo número amostral de indivíduos homozigotos Trp/Trp, deixando em dúvida a significância fisiológica.

Com relação à presença de anticorpos anti-Scl70, ou seja, um tipo de anticorpo antinuclear, mais especificamente anti-topoisomerase I, nossos resultados mostraram que 50% dos pacientes com essa característica eram homozigotos Arg/Arg e 50% eram heterozigotos, enquanto entre os pacientes negativos para anticorpos anti-Scl70, 14% eram heterozigotos. Esse dado chama a atenção, mas considerando-se que apenas oito

indivíduos eram positivos para anticorpos anti-Scl70 e que nenhum era homozigoto Trp/Trp, a influência desse polimorfismo na patogênese do LES deve ser analisada com cautela e mais estudos, aumentando o número de pacientes com essa característica clínica, devem ser realizados.

O presente estudo foi o primeiro que analisou e encontrou valores significativos entre a presença do polimorfismo Arg194Trp do gene da proteína XRCC1 e as manifestações clínicas do LES, como presença de *rash* discóide, anti-DNA e anti-Scl70. Não foram realizados estudos funcionais, então nada pode ser afirmado a respeito da eficiência do reparo em pacientes que possuem esse polimorfismo na nossa amostra. Assim, pretendemos dar continuidade a estas análises através da aplicação de testes funcionais, como por exemplo, ensaio Cometa.

Além disso, nosso grupo está avaliando outros polimorfismos do gene que codifica a XRCC1, como o que envolve o códon 399, como potenciais marcadores no LES. Trabalhos que estudaram a associação de polimorfismos no gene da XRCC1 com a doença indicam que esse polimorfismo possui influência no desenvolvimento do LES (7, 13). Além disso, estudos que avaliaram a presença dessa variante com relação ao desempenho do reparo de DNA verificaram que ela está associada a um reparo deficiente em resposta a mutagênicos ambientais e radiação ionizante (23, 24).

Visto que o papel do polimorfismo Arg194Trp no reparo de DNA em pacientes com LES ainda não está elucidado, a análise conjunta dos

polimorfismos nos códons 194 e 399 nestes pacientes, bem como estudos de desequilíbrio de ligação, podem revelar a real associação com a doença.

### **Agradecimentos**

Este estudo recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradecemos também ao apoio técnico dos colegas do Laboratório de Imunogenética da UFRGS.

### Referências Bibliográficas

1. Anolik JH. B cell biology and dysfunction in SLE. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65(3):182-6.
2. Castro J, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. The complex immunogenetic basis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2008 May;7(5):345-51.
3. Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. 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 Dec;2(8):442-50.
4. Blount S, Griffiths H, Emery P, Lunec J. Reactive oxygen species modify human DNA, eliciting a more discriminating antigen for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1990 Sep;81(3):384-9.
5. Al Arfaj AS, Chowdhary AR, Khalil N, Ali R. Immunogenicity of singlet oxygen modified human DNA: implications for anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2007 Jul;124(1):83-9.
6. Blount S, Griffiths HR, Lunec J. Reactive oxygen species induce antigenic changes in DNA. *FEBS Lett.* 1989 Mar 13;245(1-2):100-4.
7. Bassi C, Xavier D, Palomino G, Nicolucci P, Soares C, Sakamoto-Hojo E, et al. Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008 Nov;17(11):988-95.

8. Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD, et al. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*. 2001 Jan 12;104(1):107-17.
9. Saadat M. Haplotype analysis of XRCC1 (at codons 194 and 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Apr 17.
10. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Dec;11(12):1513-30.
11. Ratnasinghe D, Yao SX, Tangrea JA, Qiao YL, Andersen MR, Barrett MJ, et al. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Feb;10(2):119-23.
12. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*. 1999 Nov;20(11):2125-9.
13. Lin YJ, Wan L, Huang CM, Chen SY, Huang YC, Lai CH, et al. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and associations with systemic lupus erythematosus risk in the Taiwanese Han Chinese population. *Lupus*. 2009 Dec;18(14):1246-51.
14. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991 Oct 11;19(19):5444.

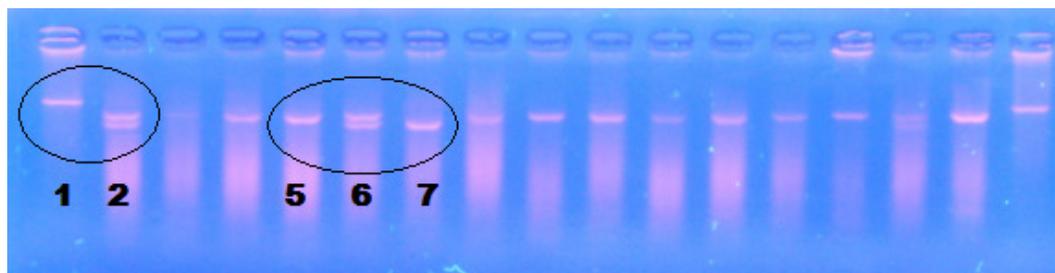
15. De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, et al. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Jul 15;62(4):1140-9.
16. Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P. 8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett*. 1994 Jul 11;348(2):131-8.
17. Zhang Q, Ye DQ, Chen GP, Zheng Y. Oxidative protein damage and antioxidant status in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol*. 2010 Apr;35(3):287-94.
18. McConnell JR, Crockard AD, Cairns AP, Bell AL. Neutrophils from systemic lupus erythematosus patients demonstrate increased nuclear DNA damage. *Clin Exp Rheumatol*. 2002 Sep-Oct;20(5):653-60.
19. McCurdy D, Tai LQ, Frias S, Wang Z. Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Radiat Res*. 1997 Jan;147(1):48-54.
20. Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res*. 1999 Jun 1;59(11):2557-61.
21. Meza-Espinoza JP, Peralta-Leal V, Gutierrez-Angulo M, Macias-Gomez N, Ayala-Madrigal ML, Barros-Nunez P, et al. XRCC1 polymorphisms

and haplotypes in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia. *Genet Mol Res.* 2009;8(4):1451-8.

22. Duarte MC, Colombo J, Rossit AR, Caetano A, Borim AA, Wornrath D, et al. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2005 Nov 14;11(42):6593-600.

23. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.* 2000 Oct 16;159(1):63-71.

24. Aka P, Mateuca R, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat Res.* 2004 Nov 22;556(1-2):169-81.

**Figuras**

**Figura 1** Exemplos de genotipagem em gel de agarose 3%. Na canaleta 1 pode-se observar o marcador de peso molecular correspondente a 504pb. Na canaleta 2 tem-se os marcadores moleculares correspondentes às bandas de 431pb e 368pb. As canaletas 5, 6 e 7 correspondem a genotipagem de três indivíduos, um homocigoto Arg/Arg, um heterocigoto Arg/Trp, e um homocigoto Trp/Trp, respectivamente.

**Tabelas****Tabela 1** Características dos pacientes e controles.

	Pacientes	Controles
Amostra	240	214
Idade (anos)		
Média ± D.P.	31,49 ± 13,25	37,76 ± 10,3
Etnia		
Euro-descendentes	76,20%	87,90%
Afro-descendentes	23,80%	12,10%
Sexo		
Masculino	7,50%	41,60%
Feminino	92,50%	58,40%

**Tabela 2** Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo Arg194Trp nos grupos de pacientes e controles.

	Pacientes <sup>a</sup>	Controles <sup>b</sup>
Genótipo	n=240	n=214
Arg/Arg	200 (83,33%)	189 (88,32%)
Arg/Trp	37 (15,42%)	24 (11,21%)
Trp/Trp	3 (1,25%)	1(0,47%)
<sup>a, b</sup> p fischer = 0,294		
Alelos	2n= 480	2n=428
Arg	437 (91,04%)	402(93,93%)
Trp	43 (8,96%)	26(6,07%)
<sup>a, b</sup> p fischer = 0,105		

**Tabela 3** Características dos pacientes quanto à presença de manifestações clínicas e laboratoriais do LES.

Características Clínicas	Pacientes (n = 240)	
	sim	Total
Rash Malar	126(52,7%)	239
Rash discóide	32(13,4%)	239
Fotossensibilidade	173(72,4%)	239
Úlceras orais/nasais	83(34,7%)	239
Artrite	194(81,2%)	239
Serosite	87(36,6%)	238
Pleurite	73(30,7%)	238
Pericardite	42(17,6%)	238
Nefrite	106(44,4%)	239
Desordens Neurológicas	33(13,8%)	239
Desordens Hematológicas	183(76,6%)	239
FAN positivo	236(99,2%)	238
Anti-DNA	112(47,3%)	237
Anti-Sm	47(19,9%)	236
Anticardiolipina IgG/IgM	72(30,5%)	236
Anticoagulante lúpico	17(7,2%)	237
VDRL falso-positivo	14(5,9%)	237
Anti-Ro	93(41,9%)	222
Anti-La	31 (14%)	222
Anti-RNP	68(30,6%)	222
Anti-Sc170	8(3,6%)	222

Abreviações: FAN, fator anti-nuclear; VDRL, teste laboratorial de pesquisa de doença venérea.

**Tabela 4** Distribuição genotípica do polimorfismo Arg194Trp de acordo com a presença ou ausência de características clínicas.

		Genótipos Pacientes			Total	valor p*
		Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp		
Rash malar	sim	107(84,92%)	17(13,49%)	2(1,59%)	126	0,605
	não	92(81,42%)	20(17,70%)	1(0,88%)	113	
					239	
Rash discóide	sim	20(62,5%)	11(34,38%)	1(3,12%)	32	0,004
	não	179(86,47%)	26(12,56%)	2(0,97%)	207	
					239	
Fotossensibilidade	sim	148(85,55%)	23(13,29%)	2(1,16%)	173	0,242
	não	51(77,27%)	14(21,21%)	1(1,52%)	66	
					239	
Úlceras orais/nasais	sim	72(86,75%)	10(12,05%)	1(1,20%)	83	0,668
	não	127(81,41%)	27(17,31%)	2(1,28%)	156	
					239	
Artrite	sim	162(83,51%)	30(15,46%)	2(1,03%)	194	0,73
	não	37(82,22%)	7(15,56%)	1(2,22%)	45	
					239	
Serosite	sim	72(82,76%)	14(16,09%)	1(1,15%)	87	0,934
	não	127(84,11%)	22(14,57%)	2(1,32%)	151	
					238	
Pleurite	sim	62(84,93%)	11(15,07%)	0(0%)	73	0,75
	não	137(83,03%)	25(15,15%)	3(1,82%)	165	
					238	
Pericardite	sim	36(85,72%)	5(11,90%)	1(2,38%)	42	0,505
	não	163(83,16%)	31(15,82%)	2(1,02%)	196	
					238	
Nefrite	sim	88(83,02%)	15(14,15%)	3(2,83%)	106	0,151
	não	111(83,46%)	22(16,54%)	0(0%)	133	
					239	
Desordens Neurológicas	sim	28(84,85%)	4(12,12%)	1(3,03%)	33	0,421
	não	171(83,01%)	33(16,02%)	2(0,97%)	206	
					239	
Desordens Hematológicas	sim	153(83,61%)	28(15,30%)	2(1,09%)	183	0,786
	não	46(82,14%)	9(16,07%)	1(1,79%)	56	
					239	
FAN positivo	sim	197(83,48%)	36(15,25%)	3(1,27%)	236	0,308
	não	1(50%)	1(50%)	0(0%)	2	
					238	

Anti-DNA	sim	98(87,50%)	11(9,82%)	3(2,68%)	112	0,013
	não	100(80%)	25(20%)	0(0%)	125	
					237	
Anti-Sm	sim	40(85,11%)	7(14,89%)	0(0%)	47	1
	não	157(83,07%)	29(15,34%)	3(1,59%)	189	
					236	
Anticardiolipina IgG/IgM	sim	57(79,17%)	13(18,05%)	2(2,78%)	72	0,22
	não	140(85,37%)	23(14,02%)	1(0,61)	164	
					236	
Anticoagulante lúpico	sim	15(88,24%)	2(11,76%)	0(0%)	17	1
	não	183(83,19%)	34(15,45%)	3(1,36%)	220	
					237	
VDRL falso-positivo	sim	10(71,43%)	3(21,43%)	1(7,14%)	14	0,115
	não	188(84,69%)	32(14,41%)	2(0,90%)	222	
					236	
Anti-Ro	sim	79(84,95%)	13(13,98%)	1(1,07%)	93	0,875
	não	106(82,17%)	21(16,28%)	2(1,55%)	129	
					222	
Anti-La	sim	24(77,42%)	6(19,35%)	1(3,23%)	31	0,301
	não	161(84,29%)	28(14,66%)	2(1,05%)	191	
					222	
Anti-RNP	sim	58(85,29%)	10(14,71%)	0(0%)	68	0,741
	não	127(82,47%)	24(15,58%)	3(1,95%)	154	
					222	
Anti-Sci70	sim	4(50%)	4(50%)	0(0%)	8	0,031
	não	181(84,58%)	30(14,02%)	3(1,40%)	214	
					222	

---

\*Teste Exato de Fischer

**Tabela 5** Relação entre a presença da variante Trp e as manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes (considerando-se apenas os pacientes que apresentavam o sintoma em questão).

Características Clínicas	Pacientes			
	Presença do Alelo Trp		total	valor p*
	sim	não		
Rash Malar	19 (15,08%)	107 (84,92%)	126	0,492
Rash discóide	12(37,50%)	20 (62,50%)	32	0,002
Fotossensibilidade	25(14,45%)	148(85,55%)	173	0,174
Úlceras orais/nasais	11(13,25%)	72(86,75%)	83	0,364
Artrite	32(16,49%)	162(83,51%)	194	0,826
Serosite	15(17,24%)	72(82,76%)	87	0,856
Pleurite	11(15,07%)	62(84,93%)	73	0,85
Pericardite	6(14,29%)	36(85,71%)	42	0,82
Nefrite	18(16,98%)	88(83,02%)	106	1
Desordens Neurológicas	5(15,15%)	28(84,85%)	33	1
Desordens Hematológicas	30(16,39%)	153(83,61%)	183	0,838
FAN positivo	39(16,53%)	197(83,47%)	236	0,308
Anti-DNA	14(12,50%)	98(87,50%)	112	0,16
Anti-Sm	7(14,89%)	40(85,11%)	47	0,829
Anticardiolipina IgG/IgM	15(20,83%)	57(79,17%)	72	0,256
Anticoagulante lúpico	2(11,76%)	15(88,24%)	17	0,746
VDRL falso-positivo	4(28,57%)	10(71,43%)	14	0,256
Anti-Ro	14(15,05%)	79(84,95%)	93	0,716
Anti-La	7(22,58%)	24(77,42%)	31	0,434
Anti-RNP	10(14,71%)	58(85,29%)	68	0,698
Anti-Scl70	4(50%)	4(50%)	8	0,028

\*Teste Exato de Fischer

### 3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como uma primeira análise referente à influência do polimorfismo Arg194Trp do gene que codifica a proteína XRCC1 no Lúpus Eritematoso Sistêmico, não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre as freqüências genótípicas ( $p$  fisher = 0,294) e alélicas ( $p$  fisher = 0,105) desta variante entre pacientes e controles.

Quando estratificamos a amostra de pacientes de acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais da doença, encontramos associações entre a presença da variante Trp e a presença de *rash* discóide ( $p$  fisher = 0,004), anticorpos anti-DNA ( $p$  fisher = 0,013) e anticorpos anti-Scl70 ( $p$  fisher = 0,031).

Esses resultados sugerem que o alelo Trp não influencia na predisposição à doença, entretanto existe uma possível influência do polimorfismo Arg194Trp na predisposição a certas características clínicas e laboratoriais do LES.

Este trabalho consiste em análises preliminares de uma pesquisa que prevê ainda aumentar o número amostral, tanto de pacientes como de controles, e incluir o estudo que está sendo realizado com o polimorfismo no códon 399 do gene que codifica a proteína de reparo XRCC1 em pacientes com LES.

No futuro, pretendemos estudar polimorfismos em genes de outras proteínas de reparo de DNA e sua influência no LES, bem como enriquecer essas análises, aplicando testes funcionais (Ex. Ensaio Cometa).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, S. Z. and R. A. El-Zein (2000). "The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK." Cancer Lett **159**(1): 63-71.
- Ahsan, H., A. Ali, et al. (2003). "Oxygen free radicals and systemic autoimmunity." Clin Exp Immunol **131**(3): 398-404.
- Aka, P., R. Mateuca, et al. (2004). "Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations?" Mutat Res **556**(1-2): 169-81.
- Al Arfaj, A. S., A. R. Chowdhary, et al. (2007). "Immunogenicity of singlet oxygen modified human DNA: implications for anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus." Clin Immunol **124**(1): 83-9.
- Almeida, K. H. and R. W. Sobol (2007). "A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification." DNA Repair (Amst) **6**(6): 695-711.
- Anolik, J. H. (2007). "B cell biology and dysfunction in SLE." Bull NYU Hosp Jt Dis **65**(3): 182-6.
- Ansar Ahmed, S., W. J. Penhale, et al. (1985). "Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action." Am J Pathol **121**(3): 531-51.
- Arnett, F. C., J. D. Reveille, et al. (1984). "Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis." Semin Arthritis Rheum **14**(1): 24-35.
- Bassi, C., D. Xavier, et al. (2008). "Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus." Lupus **17**(11): 988-95.
- Batar, B., M. Guven, et al. (2009). "DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia." Leuk Res **33**(6): 759-63.

- Bernatsky, S., J. F. Boivin, et al. (2006). "Mortality in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **54**(8): 2550-7.
- Blount, S., H. R. Griffiths, et al. (1989). "Reactive oxygen species induce antigenic changes in DNA." FEBS Lett **245**(1-2): 100-4.
- Blount, S., H. Griffiths, et al. (1990). "Reactive oxygen species modify human DNA, eliciting a more discriminating antigen for the diagnosis of systemic lupus erythematosus." Clin Exp Immunol **81**(3): 384-9.
- Boey, M. L. (1998). "Systemic lupus erythematosus in Singapore." Ann Acad Med Singapore **27**(1): 35-41.
- Borchers, A. T., C. L. Keen, et al. (2004). "Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus." Autoimmun Rev **3**(6): 423-53.
- Bruce, I. N., M. B. Urowitz, et al. (2003). "Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus: the Toronto Risk Factor Study." Arthritis Rheum **48**(11): 3159-67.
- Brunjes, S., K. Zike, et al. (1961). "Familial systemic lupus erythematosus." AmJMed **30**: 529-36.
- Butkiewicz, D., M. Rusin, et al. (2001). "Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer." Carcinogenesis **22**(4): 593-7.
- Casciola-Rosen, L. A., G. Anhalt, et al. (1994). "Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes." J Exp Med **179**(4): 1317-30.
- Castro, J., E. Balada, et al. (2008). "The complex immunogenetic basis of systemic lupus erythematosus." Autoimmun Rev **7**(5): 345-51.
- Cervera, R., M. A. Khamashta, et al. (2003). "Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients." Medicine (Baltimore) **82**(5): 299-308.
- Cooke, M. S., N. Mistry, et al. (1997). "Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species--implications for anti-DNA antibodies in lupus." Free Radic Biol Med **22**(1-2): 151-9.

- Cooper, G. S., M. A. Dooley, et al. (1998). "Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **41**(10): 1714-24.
- D'Cruz, D. P., M. A. Khamashta, et al. (2007). "Systemic lupus erythematosus." Lancet **369**(9561): 587-96.
- Dalhus, B., J. K. Laerdahl, et al. (2009). "DNA base repair--recognition and initiation of catalysis." FEMS Microbiol Rev **33**(6): 1044-78.
- De Ruyck, K., M. Van Eijkeren, et al. (2005). "Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes." Int J Radiat Oncol Biol Phys **62**(4): 1140-9.
- Duarte, M. C., J. Colombo, et al. (2005). "Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer." World J Gastroenterol **11**(42): 6593-600.
- Duell, E. J., R. C. Millikan, et al. (2001). "Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(3): 217-22.
- Frosina, G. (2004). "Commentary: DNA base excision repair defects in human pathologies." Free Radic Res **38**(10): 1037-54.
- Garred, P., A. Voss, et al. (2001). "Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients." Genes Immun **2**(8): 442-50.
- Garrett-Sinha, L. A., S. John, et al. (2008). "IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus." Curr Opin Rheumatol **20**(5): 519-25.
- Goode, E. L., C. M. Ulrich, et al. (2002). "Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(12): 1513-30.
- Gross, A. J., D. Hochberg, et al. (2005). "EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective." J Immunol **174**(11): 6599-607.

- Hay, E. M. (1995). "Systemic lupus erythematosus." Baillieres Clin Rheumatol **9**(3): 437-70.
- Hochberg, M. C. (1997). "Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **40**(9): 1725.
- Huang, Y. F., W. Wang, et al. (2003). "Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients." Eur J Immunogenet **30**(2): 121-4.
- Jimenez, S., R. Cervera, et al. (2003). "The epidemiology of systemic lupus erythematosus." Clin Rev Allergy Immunol **25**(1): 3-12.
- Jonsen, A., A. A. Bengtsson, et al. (2004). "Analysis of HLA DR, HLA DQ, C4A, FcgammaRIIa, FcgammaRIIIa, MBL, and IL-1Ra allelic variants in Caucasian systemic lupus erythematosus patients suggests an effect of the combined FcgammaRIIa R/R and IL-1Ra 2/2 genotypes on disease susceptibility." Arthritis Res Ther **6**(6): R557-62.
- Kinder, B. W., M. M. Freemer, et al. (2007). "Clinical and genetic risk factors for pneumonia in systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **56**(8): 2679-86.
- Kindt, T. J., R. A. Goldsby, et al. (2008). "Imunologia de Kuby." **Artmed 6<sup>o</sup> ed.**: 439.
- Kiran, M., R. Saxena, et al. (2010). "Distribution of XRCC1 genotypes in north Indian population." Indian J Med Res **131**: 71-5.
- Lahiri, D. K. and J. I. Nurnberger, Jr. (1991). "A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies." Nucleic Acids Res **19**(19): 5444.
- Lau, C. S., G. Yin, et al. (2006). "Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview." Lupus **15**(11): 715-9.
- Lawrence, J. S., C. L. Martins, et al. (1987). "A family survey of lupus erythematosus. 1. Heritability." J Rheumatol **14**(5): 913-21.
- Lehmann, P., E. Holzle, et al. (1990). "Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation." J Am Acad Dermatol **22**(2 Pt 1): 181-7.

- Lin, Y. J., L. Wan, et al. (2009). "Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and associations with systemic lupus erythematosus risk in the Taiwanese Han Chinese population." Lupus **18**(14): 1246-51.
- Lindqvist, A. K. and M. E. Alarcon-Riquelme (1999). "The genetics of systemic lupus erythematosus." Scand J Immunol **50**(6): 562-71.
- Lunec, J., K. Herbert, et al. (1994). "8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus." FEBS Lett **348**(2): 131-8.
- Lunn, R. M., R. G. Langlois, et al. (1999). "XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency." Cancer Res **59**(11): 2557-61.
- Manson, J. J. and A. Rahman (2006). "Systemic lupus erythematosus." Orphanet J Rare Dis **1**: 6.
- Manzi, S. (2001). "Epidemiology of systemic lupus erythematosus." Am J Manag Care **7**(16 Suppl): S474-9.
- McConnell, J. R., A. D. Crockard, et al. (2002). "Neutrophils from systemic lupus erythematosus patients demonstrate increased nuclear DNA damage." Clin Exp Rheumatol **20**(5): 653-60.
- McCurdy, D., L. Q. Tai, et al. (1997). "Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis." Radiat Res **147**(1): 48-54.
- McMurray, R. W. and W. May (2003). "Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis." Arthritis Rheum **48**(8): 2100-10.
- Meza-Espinoza, J. P., V. Peralta-Leal, et al. (2009). "XRCC1 polymorphisms and haplotypes in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia." Genet Mol Res **8**(4): 1451-8.
- Molokhia, M. and P. McKeigue (2006). "Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations." Lupus **15**(11): 827-32.
- Monticelio, O. A., T. Mucenic, et al. (2008). "The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus." Clin Rheumatol **27**(4): 413-9.

- Murashima, A., T. Fukazawa, et al. (2004). "Long term prognosis of children born to lupus patients." Ann Rheum Dis **63**(1): 50-3.
- Olshan, A. F., M. A. Watson, et al. (2002). "XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer." Cancer Lett **178**(2): 181-6.
- Rahman, A. and D. A. Isenberg (2008). "Systemic lupus erythematosus." N Engl J Med **358**(9): 929-39.
- Ratnasinghe, D., S. X. Yao, et al. (2001). "Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(2): 119-23.
- Rohr, P., J. da Silva, et al. (2010). "BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure." Environ Mol Mutagen.
- Ruiz-Irastorza, G., M. A. Khamashta, et al. (2001). "Systemic lupus erythematosus." Lancet **357**(9261): 1027-32.
- Saadat, M. (2010). "Haplotype analysis of XRCC1 (at codons 194 and 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures." Breast Cancer Res Treat.
- Saevarsdottir, S., H. Kristjansdottir, et al. (2006). "Mannan-binding lectin and complement C4A in Icelandic multicase families with systemic lupus erythematosus." Ann Rheum Dis **65**(11): 1462-7.
- Sobti, R. C., S. A. Mahdi, et al. (2009). "The influence of variations in the DNA repair (XRCC1) gene on HIV-1/AIDS among Indian population." Folia Biol (Praha) **55**(5): 183-6.
- Steinberg, A. D. (1995). "Insights into the basis of systemic lupus." J Autoimmun **8**(6): 771-75.
- Sturgis, E. M., E. J. Castillo, et al. (1999). "Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck." Carcinogenesis **20**(11): 2125-9.
- Tan, E. M., A. S. Cohen, et al. (1982). "The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum **25**(11): 1271-7.

- Tebbe, B. and C. E. Orfanos (1997). "Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus." Lupus **6**(2): 96-104.
- Via, C. S. and B. S. Handwerger (1993). "B-cell and T-cell function in systemic lupus erythematosus." Curr Opin Rheumatol **5**(5): 570-4.
- Vilar, M. J. and E. I. Sato (2002). "Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil)." Lupus **11**(8): 528-32.
- Weng, Z., Y. Lu, et al. (2008). "Effects of the XRCC1 gene-environment interactions on DNA damage in healthy Japanese workers." Environ Mol Mutagen **49**(9): 708-19.
- Whitehouse, C. J., R. M. Taylor, et al. (2001). "XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair." Cell **104**(1): 107-17.
- Yan, L., D. Yanan, et al. (2009). "Polymorphisms of XRCC1 gene and risk of gastric cardiac adenocarcinoma." Dis Esophagus **22**(5): 396-401.
- Zhang, Q., D. Q. Ye, et al. (2010). "Oxidative protein damage and antioxidant status in systemic lupus erythematosus." Clin Exp Dermatol **35**(3): 287-94.

**ANEXOS****ANEXO 1****NORMAS PARA PREPARAÇÃO DE ARTIGOS DA REVISTA LUPUS****LUPUS**

Manuscripts should be typed double-spaced with a wide margin.

The Title page, Authors and Affiliations, Corresponding Author, Summary and Keywords should be included within the main document.

The Summary should not exceed 200 words. It should be written in a style that conveys the essential message of the paper in abbreviated form.

The Introduction should assume that the reader is knowledgeable in the Field and should therefore be as brief as possible.

In the Materials and methods section, methods that have been published in detail elsewhere should not be described in detail. SI units should be used throughout the text.

**REFERENCES**

It is important that references comply with the style of the journal. Exhaustive lists should be avoided. References should follow the Vancouver format, listed (double-spaced) in numerical order corresponding to the order of citation in the text.

All authors should be quoted for papers with up to six authors; for papers with more than six authors, the first three only should be quoted followed by et al.

No issue numbers should be quoted.

Abbreviations for titles of medical periodicals should conform to those used in the latest editions of Index Medicus and Current Contents. The first and last page numbers for each reference should be provided. Abstracts and letters must be identified as such.

Papers in press and papers already submitted for publication may be included in the list of references. No citation is required for work that is not yet submitted for publication.

Personal communications may be allocated a number and included in the list of references in the usual way or simply referred to in the text. Authors must obtain permission from the individual concerned to quote his or her unpublished work.

#### Examples of References

##### Journal article:

1 Derksen RHW, Bouma BN, Kater L. The association between the lupus anticoagulant and cerebral infarction in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1986; 15: 179-184.

##### Journal article, in press:

2 Mendonca LLF, Khamashta MA, Nelson-Piercy A, Hunt BJ, Hughes GRV. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as a possible cause for reversible infertility. *Rheumatology* (in press).

##### Journal article submitted for publication:

3 Khamashta MA, Cervera R, Asherson RA. Association of antibodies against phospholipids with heart valve disease in systemic lupus erythematosus (submitted for publication).

Complete book:

4 Wallace DJ, Dubois EL. Dubois' Lupus Erythematosus. Lea & Febiger, 1987, p 51.

Chapter in book:

5 Christian CL. Etiologic hypotheses for systemic lupus erythematosus. In: Lahita RG (ed) Systemic Lupus Erythematosus. Wiley, 1987, 65-79.

Abstract:

6 Valesini G, Luan FL, Falco M. Clonal analysis of affinity purified anticardiolipin antibodies. Clin Exp Rheumatol 1988; 6: 214 (abstract 102).

Letter to the Editor:

7 Sills EM. Systemic lupus erythematosus in a patient diagnosed as having Shulman disease. Arthritis Rheum 1988; 31: 694 (letter).

## **TABLES**

Each table should be numbered consecutively with an Arabic numeral. Each should have a separate caption or title. Methods not described in the text and abbreviations should be explained at the foot of the table. Footnotes should be designated by superior lower case letters (a, b, c etc). Vertical lines should not be inserted in the table.

Tables must be referred to specifically in the text of the paper.

## **FIGURES**

Artwork should be supplied as EPS files or .tif files, at a minimum resolution of 300 dpi for superior reproduction.

Lettering should be planned for 50% reduction; text should be readable after reduction.

Figures should be referred to as Figure 1, Figure 2 etc.

Figures can be reproduced in colour if necessary but the authors will be expected to contribute towards the cost of publication.

Figures must be referred to specifically in the text of the paper.

Coloured photographs - important information Colour photographs, when accepted, will be published online. In the printed version, they will be in black and white (unless colour prints are paid for). Authors who submit in colour must ensure that their figures are of the highest definition for the black and white version otherwise these may not be accepted. In particular immuno-fluorescent figures must be paid for in colour or omitted from the manuscript and replaced in a descriptive format.

## ANEXO 2

### **NORMAS PARA APRESENTAÇÃO ORAL E ESCRITA DO TRABALHO EXPERIMENTAL DO ESTÁGIO EM PESQUISA E MONOGRAFIA**

1. O trabalho experimental do aluno, realizado obrigatoriamente durante a atividade Estágio em Pesquisa e Monografia, deverá ser apresentado na forma escrita e oral ao final dos seis meses da atividade.
2. Aquele aluno que optar por realizar o Estágio Curricular Supervisionado em Biomedicina em atividade de pesquisa, sob a orientação do mesmo Professor/Pesquisador e na mesma linha de pesquisa do Estágio em Pesquisa e Monografia, poderá apresentar o seu trabalho ao final dos seis meses deste segundo estágio.

Do trabalho escrito:

1. O trabalho escrito deverá ser organizado da seguinte forma:
  - a. Folha de rosto com título, nome do aluno, nome do orientador, nome do co-orientador quando existente, curso e ano;
  - b. Agradecimentos e dedicatória (quando existentes);
  - c. Índice geral;
  - d. Resumo;
  - e. Introdução compreensiva;
  - f. Trabalho experimental na forma de artigo científico, seguindo a formatação exigida pelo periódico onde seria submetido, ainda que os resultados obtidos sejam apenas preliminares;
  - g. Conclusões e Perspectivas;
  - h. Bibliografia adicional que não esteja presente no artigo científico;
  - i. Anexos.
2. O aluno poderá optar por escrever o artigo científico, referido no item f acima, na língua inglesa.
3. O trabalho deverá ser impresso em folha A4, com tipo de letra tamanho 12, páginas numeradas a partir da folha de rosto e respeitando as seguintes margens:

- a. Margem esquerda: 4,0 cm;
  - b. Margem direita: 2,5 cm;
  - c. Margem superior: 2,5 cm;
  - d. Margem inferior: 2,5 cm.
4. O aluno deverá entregar uma cópia impressa do trabalho escrito para cada membro da Banca Examinadora pelo menos 15 dias antes da apresentação oral.
  5. O aluno deverá entregar à Comissão de Graduação uma cópia impressa e uma na forma eletrônica, em CD, do trabalho escrito, após terem sido efetuadas as correções solicitadas pela Banca Examinadora.

Da apresentação oral:

1. O aluno deverá apresentar oralmente o seu trabalho no dia e horário determinados pela Comissão de Graduação para este fim.
2. Será alocado a cada aluno 20 minutos para a apresentação oral e 10 minutos adicionais para arguição dos membros da Banca Examinadora.

Da Banca Examinadora:

1. A Banca Examinadora será constituída de dois professores, pesquisadores ou doutorandos indicados pelo orientador do aluno.
2. Não será exigida a presença dos integrantes da Banca Examinadora no dia da apresentação oral.

Do conceito final:

1. O conceito final do aluno será calculado a partir dos conceitos emitidos pelos integrantes da Banca Examinadora e do orientador do aluno.





