

## **Avaliação do polimorfismo genético *pvuII* do receptor de lipoproteína de baixa densidade (RLDL) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.**

## **Evaluation of genetic polymorphism *pvuII* of low density lipoprotein receptor (LDLR) in patients with systemic lupus erythematosus.**

Juliana Elisa Lima<sup>1</sup>; Marcell Alysson Batisi Lozovoy<sup>2</sup>; Daniela Frizon Alfieri<sup>3</sup>; Francieli Delongui<sup>4</sup>; Ana Paula Kallaur<sup>5</sup>; Edna Maria Vissoci Reiche<sup>6</sup>; Elaine Regina Delicato Almeida<sup>7</sup>

### **Resumo**

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo, relacionada a alterações do perfil lipídico e ao metabolismo de lipoproteínas. Estudos mostram que o polimorfismo genético *PvuII* do receptor de lipoproteína de baixa densidade (RLDL) está associado às diferentes concentrações de lipoproteína de baixa (LDL) na população em geral. O presente estudo avaliou o polimorfismo genético *PvuII* do RLDL e o perfil lipídico em pacientes com LES da população sul brasileira. Foram incluídos 72 pacientes com LES e 154 doadores de sangue. Pacientes com LES apresentaram elevados níveis séricos de triglicérides (TG) quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,0001$ ). Semelhantemente, pacientes com LES ativo apresentaram maiores níveis de TG quando comparados a pacientes com LES sem atividade da doença ( $p = 0,0113$ ). Em relação à frequência do polimorfismo genético *PvuII* do RLDL, 35 (48,6%) dos pacientes com LES apresentavam o genótipo P1P1, 32 (44,4%) o genótipo P1P2 e 5 (6,9%) o genótipo P2P2. Não foram encontradas diferenças nas frequências do genótipo P1P1 vs P1P2 e P1P1 vs P2P2 quando comparado entre pacientes com LES e controles ( $p > 0,05$ ). Pacientes com LES e genótipo P1P1 apresentaram uma tendência a ter valores mais elevados de TG quando comparados a pacientes com LES e genótipo P1P2+P2P2 ( $p = 0,0687$ ). Conclui-se que polimorfismos genéticos podem contribuir para o aumento de risco cardiovascular; no entanto, deve-se levar em consideração a complexidade dos componentes genéticos e da doença avaliada. Maiores investigações são necessárias para outros genes que possam estar envolvidos na alteração do perfil lipídico nesta população.

**Palavras-chave:** Lúpus eritematoso sistêmico. Dislipidemias. Polimorfismo genético.

<sup>1</sup> Residência em Análises Clínicas e Toxicologia - Universidade Estadual de Londrina. E-mail: julianalima@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutor em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina. Professor Adjunto do departamento de Análises Clínicas e Toxicologia - Universidade Estadual de Londrina

<sup>3</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Londrina.

<sup>4</sup> Doutoranda do programa em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>5</sup> Doutoranda do programa em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

<sup>6</sup> Doutora em Medicina e Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Londrina. Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia - Universidade Estadual de Londrina

<sup>7</sup> Doutora em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina, Brasil. Professora Adjunta Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia - Universidade Estadual de Londrina

## Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disease of connective tissue related to changes in lipid profile and lipoprotein metabolism. Studies show that the genetic polymorphism of *PvuII* low density lipoprotein receptor (*LDLR*) is associated with different concentrations of low-density lipoprotein (*LDL*) in general population. The present study evaluated the genetic polymorphism of *PvuII* of *LDLR* and lipid profile in patients with SLE in southern Brazilian population. We included 72 patients with SLE and 154 blood donors. In assessing the lipid profile, SLE patients had elevated serum triglycerides (TG) levels compared with the control group ( $p < 0.0001$ ). Similarly, patients with active SLE have elevated TG levels when compared to patients without SLE disease activity ( $p = 0.0113$ ). Regarding the frequency of genetic polymorphism of *PvuII* of *LDLR*, 35 (48.6%) patients with SLE had P1P1 genotype, 32 (44.4%) P1P2 genotype and 5 (6.9%) the P2P2 genotype. There were no differences in the genotype frequencies P1P1 vs P1P2 and P1P1 vs P2P2 compared between SLE patients and controls ( $p > 0.05$ ). Patients with SLE and P1P1 genotype tended to have higher levels of TG compared with patients with SLE and P1P2 + P2P2 genotype ( $p = 0.0687$ ). We conclude that genetic polymorphism may contribute to increased cardiovascular risk; however, the complexity of genetic components and disease evaluated should be taken into consideration. Further investigations are needed for other genes that may be involved in altering the lipid profile in this population.

**Keywords:** Systemic lupus erythematosus. Dyslipidemias. Genetic polymorphism.

## Introdução

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo, que acomete diversos órgãos e sistemas e apresenta importantes distúrbios imunológicos, com a presença de autoanticorpos dirigidos contra antígenos nucleares, alguns dos quais participam de lesão tissular imunologicamente mediada (HOCHBERG et al., 2003; LOZOVYOY et al., 2011). Embora possa ocorrer em ambos os sexos e em qualquer faixa etária, é mais comum a manifestação da doença em mulheres em idade reprodutiva. A proporção entre mulheres e homens é de 9:1 para pacientes entre 15 e 50 anos, e de 2:1 para pacientes durante a infância ou no período pós-menopausa (BORBA et al., 2008; HOCHBERG et al., 2003).

Estudos mostram que a etiologia do LES é multifatorial, com o envolvimento de fatores genéticos e ambientais. Entre os fatores genéticos, diversos genes e polimorfismos genéticos estão envolvidos na fisiopatologia do LES (SALAZAR et al., 2000), e a maior prevalência da doença em parentes de primeiro e segundo grau tem sido descrita na literatura. Entre os fatores ambientais envolvidos estão os raios ultravioletas, infecções virais, substâncias

químicas, hormônios sexuais e fatores emocionais que parecem desencadear a doença (BORBA et al., 2008). A interação entre esses múltiplos fatores está associada à perda do controle imunorregulatório, com perda da tolerância imunológica, desenvolvimento de autoanticorpos, deficiência na remoção de imunocomplexos, ativação do sistema complemento e de outros processos inflamatórios que levam à lesão celular e/ou tissular (BORBA et al., 2008; HOCHBERG et al., 2003).

O LES pode atingir e comprometer a integridade de vários sistemas do corpo humano, de forma simultânea ou sucessiva, como o ósseo, articular, muscular, vascular, renal, nervoso, cardíaco, pulmonar, gastrointestinal, hematológico, ocular e auditivo (CASTRO et al., 2008). No entanto, as articulações, a pele e os rins são os afetados com mais frequência, podendo levar à falência dos órgãos ou ao comprometimento vital de suas funções (CASTRO et al., 2008; HOCHBERG et al., 2003).

Por ser uma doença multissistêmica, muitas vezes de início insidioso e com apresentação clínica variável, o diagnóstico de LES pode ser difícil, principalmente na avaliação inicial. Nenhuma alteração clínica ou laboratorial, isoladamente, faz o diagnóstico de LES,

apesar de algumas dessas alterações serem muito sugestivas de tal enfermidade (FREIRE; SOUTO; CICONELLI, 2011). Os critérios para classificação do LES foram desenvolvidos em 1971, revistos em 1982 e em 1997 pela Associação Americana de Reumatologia; em 2012, foram revistos e validados pela *Systemic Lupus Collaborating Clinics* (SLICC) (HOCHBERG, 1997; PETRI et al., 1994). O objetivo inicial da elaboração dos critérios foi a uniformização das populações para estudos científicos. No entanto, devido às suas altas sensibilidade e especificidade na prática clínica, os critérios são frequentemente utilizados para diagnóstico de pacientes com LES (FREIRE; SOUTO; CICONELLI, 2011).

O controle da atividade da doença é realizado principalmente pelo uso de corticoides e imunossupressores, fármacos que possuem vários efeitos colaterais como hipertensão arterial, diabetes, osteoporose e neoplasias, entre outros. Dessa forma, identificar, e até mesmo prever a atividade da doença é de extrema importância para um planejamento adequado do tratamento do paciente (FREIRE; SOUTO; CICONELLI, 2011). Provas sorológicas podem ser utilizadas para a avaliação da atividade da doença, sendo as mais importantes a dosagem de anticorpos anti-dsDNA e níveis séricos de complemento (NUTTALL et al., 2003).

A autoimunidade e o processo inflamatório do LES estão diretamente relacionados às alterações do perfil lipídico e ao metabolismo de lipoproteínas na doença. O padrão de dislipidemia característico do LES é a presença de maiores níveis de triglicerídeos (TG), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e de aumento moderado de lipoproteína de baixa densidade (LDL) associado a menores níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) (NUTTALL et al., 2003).

O receptor de lipoproteína de baixa densidade (RLDL) desempenha um papel crucial na homeostasia do colesterol por mediar a absorção celular de partículas lipoproteicas contendo apolipoproteínas (Apo) E e B. Mutações no gene que codifica este receptor levam ao aumento dos níveis de colesterol plasmático e podem

evoluir para lesões ateroscleróticas em idade precoce. (STRICKLAND; GONIAS; ARGRAVES, 2002)

O gene do *RLDL* está localizado no braço curto do cromossomo 19 na posição 13.2 e o polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL*, localizado no íntron 15, consiste na troca de uma citosina por uma timina (GUDNASON et al., 1998; SALAZAR et al., 2000). Este polimorfismo tem sido considerado um marcador genético ligado à variação no gene do *RLDL*, que pode levar a uma alteração estrutural com consequente alteração na atividade e no sistema regulatório do receptor (GUDNASON et al., 1998; SALAZAR et al., 2000).

Os resultados descritos na literatura ainda são contraditórios. Estudo realizado por Salazar e colaboradores (2000) evidenciou que o polimorfismo *PvuII* do *RLDL* está associado com diferentes concentrações de LDL em indivíduos normo e hipercolesterolêmicos. Gudnason e colaboradores (2000) demonstraram uma pequena, mas consistente, associação desse polimorfismo com traços plasmáticos de lipídios em homens e mulheres saudáveis da Islândia, Inglaterra e Escócia. No entanto, Taylor e colaboradores (1988), não detectaram associação entre os genótipos do *RLDL* e concentração lipídica sérica.

No Brasil, Salazar e colaboradores (2000) mostraram que o polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL* estava fortemente associado às altas concentrações de colesterol total (CT), TG, LDL e VLDL e às baixas concentrações de HDL em indivíduos com alto e baixo risco de doença arterial coronariana. No entanto, não há registros de estudos sobre a influência do polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL* no perfil lipídico de indivíduos com LES na população brasileira. Além disso, devido a mudança nos tipos de complicações nos indivíduos com LES e aumento de eventos cardiovasculares, um melhor entendimento sobre a influência do polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL* no perfil lipídico nos pacientes com LES poderia colaborar no tratamento e prevenção de eventos cardiovasculares nessa população.

## Objetivos

Avaliar o polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL* e o perfil lipídico em pacientes com LES da população sul brasileira.

## Metodologia

### *Comitê de ética*

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis antes do início do estudo.

### *Cálculo do tamanho da amostra*

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no STATCALC do Programa Epi Info versão 6.04d. Para calcular o tamanho da amostra, foram considerados os dados obtidos em um estudo anterior (SALAZAR et al., 2000), em que a frequência do alelo P1 foi de 75% em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e de 64% em controles saudáveis e a frequência do alelo P2 foi de 25% em pacientes com DAC e de 36% em controles saudáveis. De acordo com os cálculos, a estimativa do tamanho da amostra para o presente estudo foi de 70 indivíduos em cada grupo avaliado.

### *População*

A população de casos foi constituída por pacientes com LES, ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Reumatologia do ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina. A população controle foi constituída por doadores de sangue, de ambos os sexos, fidelizados ao Hemocentro Regional de Londrina, Paraná.

### *Amostra*

Foram incluídos 72 pacientes com LES diagnosticados segundo os critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia (HOCHBERG, 1997). A amostra foi obtida por conveniência de tempo e local, e de forma consecutiva.

A atividade da doença foi avaliada por meio do instrumento *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (BOMBARDIER et al., 1992) e os pacientes foram categorizados como LES inativo (SLEDAI  $\leq 3$ ) e LES ativo (SLEDAI  $> 3$ ) (AMOURA et al., 2003). Além disso, foram utilizadas provas sorológicas para complementar a análise da atividade da doença, como dosagens de anticorpos anti-dsDNA e dos componentes do sistema complemento (C3 e C4).

O grupo controle foi constituído por 154 indivíduos selecionados de forma consecutiva entre os doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina.

Os dados demográficos, clínicos e terapêuticos dos pacientes e controles inseridos no estudo foram coletados pelo grupo de pesquisa por meio de um questionário padronizado, consulta aos prontuários médicos e ao banco de dados do Hemocentro Regional de Londrina.

### *Critérios de inclusão e exclusão*

Para o grupo de pacientes com LES, foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, em tratamento ou não para o LES. Nenhum dos pacientes apresentava história prévia ou sintomas clínicos de doença renal, cardíaca, hepática, gastrointestinal ou oncológica e nenhum estava recebendo reposição hormonal, estatinas, hiperglicemiantes e antioxidantes.

Para o grupo controle, foram incluídos doadores de sangue que apresentaram reatividade negativa em todos os testes sorológicos empregados na triagem sorológica para doadores de sangue, segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

Os indivíduos também não apresentavam sinais e sintomas de processo inflamatório e infeccioso, e declararam não usar antiinflamatórios ou imunomoduladores.

#### Coleta de Sangue

Amostras de sangue periférico dos indivíduos envolvidos na pesquisa foram coletadas com o sistema de coleta a vácuo em tubos com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante e em tubos sem anticoagulante após 12 horas de jejum. Após a coleta, as amostras foram identificadas com número para garantir a confidencialidade. O material foi imediatamente centrifugado a 3000 r.p.m e *buffy-coat*, plasma e soro foram aliqüotados em tubos tipo *ependorf* e armazenados em *freezer* -80°C para posterior análise.

#### Perfil lipídico

A dosagem dos níveis de CT, LDL, HDL e TG foram realizadas em soro por um autoanalisador bioquímico (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA).

#### Polimorfismo genético *PvuII* do RLDL

O DNA genômico foi extraído com o kit de extração de DNA (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Paraná) de acordo com instruções do fabricante, com algumas modificações, como o volume de *buffy coat* utilizado (200µL) e a temperatura do tampão de eluição (70°C). A presença e integridade do DNA extraído foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado na presença de luz UV através do sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil).

Um fragmento de 800 pares de base (pb) do íntron 15 do gene do RLDL foi amplificado utilizando a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) de acordo com a literatura

(GUDNASON et al., 1998, SALAZAR et al., 2000) com algumas modificações. O *Primer 1* (RLDL 1 *sense*) é composto pela sequência 5'-TCC CCT TCA AAA TGC CCT CTT-3' e o *Primer 2* (RLDL 2 *antisense*) composto pela sequência 5'-AGC CAC CGA GCC CAG CCT AAG AA-3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) como descrito na literatura (GUDNASON et al., 1998). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 2,5mM de cada *primer*, 50mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25mM de dNTP (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,25U da enzima DNA polimerase recombinante diluída em seu tampão (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e 200ng da amostra de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PCR Sprint-Thermo Hybaid® (Biosystems, Barcelona, Espanha), com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C; seguido por 37 ciclos de 45 segundos a 95°C para desnaturação, 45 segundos a 63°C para o anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão; e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Um controle negativo (sem amostra de DNA) e um positivo foi incluído em cada bateria de PCR. A amplificação do gene do RLDL pela PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, com brometo de etídio, utilizando um marcador *ladder* de 100 pares de bases (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), corado com brometo de etídio e visualizado em presença de luz UV através do sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil).

O produto de PCR foi submetido à digestão enzimática pela enzima *PvuII* recombinante (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Dez microlitros do produto de PCR foi completamente digerido com 0,3µL de enzima *PvuII* 10U/µL por 4h a 37°C. Os fragmentos da digestão enzimática foram analisados pelo método de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) em eletroforese com gel de agarose a 3% (70V, 70 minutos), e corados

com brometo de etídio, de acordo com dados descritos na literatura (GUDNASON et al., 1998, SALAZAR et al., 2000). O alelo P1 apresenta um único fragmento de 800 pb com ausência do sítio de restrição para enzima *PvuII*, já o alelo P2 resulta em um fragmento de 200 pb e outro de 600 pb e inclui o sítio de restrição da enzima *PvuII*. As imagens foram capturadas e armazenadas pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil).

### Análise Estatística

Um banco de dados foi criado no Programa Microsoft Office Excell 2007 e a análise estatística foi realizada no Programa Graph Pad Prism 5. Variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste de Qui-

quadrado ou Exato de Fisher, quando apropriado, e as variáveis contínuas foram analisadas pelo Teste de Mann Whitney. Para a análise de variáveis contínuas de dois ou mais grupos foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis com Pós-teste de Dunn. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado pelo teste de Chi-quadrado. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### Resultados

A maioria dos pacientes com LES são do sexo feminino (91,7%), com etnia caucasiana (72,2%) e mediana de idade de 38,0 anos. Fatores demográficos foram controlados (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características demográficas dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e dos controles saudáveis da população do sul do Brasil.

	LES (n=72)	Controle (n=154)	Valor de p
Sexo <sup>a</sup> n (%)			
Feminino	66 (91,7)	132 (85,7)	0,2057
Masculino	6 (8,3)	22 (14,3)	
Etnia <sup>a</sup> n (%)			
Caucasiano	52 (72,2)	122 (72,2)	0,2441
Não caucasiano	20 (27,8)	32 (20,8)	
Idade (anos) <sup>b</sup>	38,0 (28,0 – 51,0)	36,0 (29,0 – 44,2)	0,2444

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; a Teste de Qui-Quadrado; b Teste de Mann-Whitney.

Os dados foram expressos em valor absoluto (%) ou mediana (25%-75%).

**Fonte:** Autores.

Dos 72 pacientes com LES, 42 (58,3%) apresentavam doença em atividade e 30 (41,7%) apresentavam doença inativa. Tanto o SLEDAI como anti-dsDNA apresentaram mediana de 0,0. Os produtos do complemento (C3 e C4) apresentaram uma mediana de 115,5 e 20,5, respectivamente.

Quanto ao uso de medicamento, 69 (95,8%) utilizavam corticosteroide como tratamento e 03 (4,2%) faziam uso de outras drogas para tratamento. Dos pacientes com LES, 18% apresentavam Nefrite lúpica, 4,2% apresentavam Esclerodermia e 2,8% apresentavam a Fibromialgia (Tabela 2).

**Tabela 2** - Características clínicas dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) da população do sul do Brasil.

	LES (n=72)
Atividade n (%)	
Sim	42 (58,3)
Não	30 (41,7)
SLEDAI	0,0 (0,0 – 2,75)
Anti-dsDNA (títulos)	0,0 (0,0 – 10,0)
C3 (mg/dL)	115,5 (93,5 – 130,3)
C4 (mg/dL)	20,5 (15,3 – 24,8)
Corticosteróides (mg/dia) n (%)	12,5 (5,0 – 20,0)
Sim	69 (95,8)
Não	03 (4,2)
Outras doenças n (%)	
Nefrite lúpica	13 (18,0)
Artrite reumatóide	01 (1,4)
Esclerodermia	03 (4,2)
Psicose lúpica	01 (1,4)
Fibromialgia	02 (2,8)
Fenômeno Renault	01 (1,4)

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; SLEDAI: *systemic lupus erythematosus disease activity index*; anti-dsDNA: anti-DNA dupla hélice; C3: Complemento C3; C4: Complemento C4.

Os dados foram expressos em valor absoluto (%) ou mediana (25%-75%).

**Fonte:** Autores.

Indivíduos com LES apresentaram elevados níveis séricos de TG quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferenças nos níveis séricos de CT, LDL e HDL ( $p = 0,623$ ;  $p = 0,478$ ;  $p = 0,127$ ; respectivamente) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Perfil lipídico dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e controles saudáveis da população do sul do Brasil.

	LES (n= 72)	Controle (n= 154)	Valor de p
CT	186 (161,0-213,0)	191 (165,0-215,0)	0,623
LDL	111 (88,2-134,7)	110 (87,5-127,5)	0,478
HDL	53 (44,5-63,0)	55 (48,0-66,0)	0,127
TG	119 (92,5-157,0)	87 (61,0-121,0)	< 0,0001

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico, CT: colesterol total, LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; TG: triglicerídeos.

As diferenças foram obtidas por Teste de Mann-Whitney e os dados foram expressos em mediana (25% - 75%).

**Fonte:** Autores.

Pacientes com LES ativo apresentam elevados níveis de TG quando comparados a pacientes com LES sem atividade da doença ( $p=0,0113$ ). Apesar dos pacientes com LES ativo apresentarem níveis mais elevados de CT e LDL quando comparados a

pacientes com LES inativo, não foram encontradas diferenças significativas ( $p=0,2531$  e  $p=0,4647$ , respectivamente). Não foram encontradas diferenças nos níveis de HDL entre pacientes com LES ativo e não ativo ( $p=0,8220$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Perfil lipídico dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) de acordo com a atividade da doença.

	LES ativo (n= 42)	LES inativo (n=30)	Valor de p
CT	188,0 (166,0-219,5)	186,0 (153,3-209,5)	0,2531
LDL	112,5 (94,5-130,3)	106,0 (85,0-125,0)	0,4647
HDL	53,0 (47,0-63,5)	52,5 (42,5-62,5)	0,8220
TG	137,0 (105,0-171,0)	102,0 (78,8-139,8)	0,0113

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico, CT: colesterol total, LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; TG: triglicerídeos.

As diferenças foram obtidas por Teste de Mann-Whitney. Os dados foram expressos como mediana (25% - 75%).

**Fonte:** Autores.

As frequências do polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL* encontradas no grupo de pacientes com LES e controles estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p>0,05$ ). Entre os pacientes com LES, 35 (48,6%) apresentavam o genótipo P1P1, 32 (44,4%) apresentavam o genótipo P1P2 e 5 (6,9%) apresentavam o genótipo P2P2. Entre os controles, 81 (52,6%) apresentavam o genótipo P1P1, 65 (42,2%) apresentavam o genótipo P1P2 e 8 (5,1%) apresentavam o genótipo P2P2. Não foram

encontradas diferenças nas frequências do genótipo P1P1 vs P1P2 e P1P1 vs P2P2 quando comparado entre pacientes com LES e controles ( $p=0,6592$  e  $p=0,5399$ , respectivamente). A frequência do alelo P1 foi de 0,3077 e 0,3697 entre os pacientes com LES e controles, respectivamente; e a frequência do alelo P2 foi de 0,6923 e 0,6303 nos pacientes com LES e controles, respectivamente. Não foram encontradas diferenças na frequência alélica ( $p=0,5233$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Frequência genotípica e alélica do polimorfismo genético *PvuII* do *receptor de lipoproteína de baixa densidade (RLDL)* nos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e controle da população do sul do Brasil.

	Polimorfismo genético <i>PvuII</i> do <i>RLDL</i>			Valor de p	OR (95% IC)
	LES (n= 72) n (%)	Controle (n= 154) n (%)			
P1P1	35 (48,6)	81 (52,6)			Referência
P1P2	32 (44,4)	65 (42,2)	0,6592 <sup>a</sup>	0,8777 (0,4914 – 1,568)	
P2P2	5 (6,9)	8 (5,1)	0,5399 <sup>b</sup>	0,6914 (0,2112 – 2,263)	
Alelo P2	0,6923	0,6303			
Alelo P1	0,3077	0,3697	0,5233 <sup>a</sup>	0,8666 (0,5581 – 1,346)	

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; *RLDL*: *receptor de lipoproteína de baixa densidade*; alelo P1: ausência do sítio de restrição da enzima *PvuII*; alelo P2: inclui o sítio de restrição da enzima *PvuII*; genótipo P1P1: homocigoto para o alelo P1; genótipo P1P2: heterocigoto; genótipo P2P2: homocigoto para o alelo P2; IC: Intervalo de confiança; OR: *odds ratio*.

<sup>a</sup>Teste Qui-Quadrado, <sup>b</sup> Teste Exato de Fisher. Os dados foram expressos em número absoluto (%).

**Fonte:** Autores.



A Tabela 6 mostra o perfil lipídico dos pacientes com LES de acordo com os genótipos do polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL*. Os pacientes com LES e genótipo P1P1 apresentaram uma tendência a ter valores mais elevados de TG quando comparados pacientes com LES e genótipo P1P2+P2P2 ( $p=0,0687$ ). Apesar dos indivíduos com LES e genótipo P1P1 apresentarem níveis

mais elevados de CT e LDL quando comparados aos indivíduos com LES e genótipo P1P2+P2P2, não foram encontradas diferenças significativas ( $p=0,9521$  e  $p=0,6289$ , respectivamente). Não foram encontradas diferenças nos níveis de HDL dos pacientes com LES e genótipo P1P1 quando comparado a pacientes com LES e genótipo P1P2+P2P2 ( $p=0,1562$ ).

**Tabela 6** - Perfil lipídico dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) de acordo com os genótipos do polimorfismo genético *PvuII* do receptor de *RLDL*.

	Polimorfismo genético <i>PvuII</i> do <i>RLDL</i> em pacientes com LES		Valor de p
	P1P1 (n=35)	P1P2+P2P2 (n=37)	
CT	193,0 (163,0-209,0)	183,5 (160,3-218,8)	0,9521
LDL	113,0 (94,0-127,0)	106,0 (85,0-130,0)	0,6289
HDL	48,0 (36,5-69,0)	56,0 (51,0-59,8)	0,1562
TG	126,0 (101,5-181,5)	107,5 (86,3-154,5)	0,0687

*RLDL*: receptor de lipoproteína de baixa densidade; LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; alelo P1: ausência do sítio de restrição da enzima *PvuII*; alelo P2: inclui o sítio de restrição da enzima *PvuII*; genótipo P1P1: homocigoto para o alelo P1; genótipo P1P2: heterocigoto; genótipo P2P2: homocigoto para o alelo P2.

As diferenças foram obtidas por Teste de Mann-Whitney e os dados foram expressos em mediana (25% - 75%).

**Fonte:** Autores.

Pacientes com LES ativo e genótipo P1P1 apresentaram níveis estatisticamente mais elevados de TG quando comparado a pacientes com LES ativo e genótipo P1P2+P2P2 ( $p=0,0420$ ). Apesar dos pacientes com LES em atividade e genótipo P1P1 apresentarem

níveis mais elevados de CT e LDL; e níveis diminuídos de HDL quando comparado a pacientes com LES sem atividade e genótipo P1P2+P2P2, não foram encontradas diferenças ( $p=0,7454$ ,  $p=0,6031$ ,  $p=0,5607$ , respectivamente) (Tabela 7).

**Tabela 7** - Perfil lipídico dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) de acordo com os genótipos do polimorfismo genético *PvuII* do receptor de lipoproteína de baixa densidade (*RLDL*) e a atividade da doença.

	Polimorfismo genético <i>PvuII</i> do <i>RLDL</i> em pacientes com LES		Valor de p
	P1P1 (n=35)	P1P2+P2P2 (n=37)	
CT	189,5 (153,5-209,3)	183,5 (153,3-209,5)	0,7454
LDL	110,0 (86,0-132,0)	106,0 (84,3-125,0)	0,6031
HDL	49,0 (34,8-70,8)	56,0 (49,5-59,0)	0,5607
TG	117,0 (100,0-189,0)	98,0 (78,0-138,8)	0,0420

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; *RLDL*: receptor de lipoproteína de baixa densidade; alelo P1: ausência do sítio de restrição da enzima *PvuII*; alelo P2: inclui o sítio de restrição da enzima *PvuII*; genótipo P1P1: homocigoto para o alelo P1; genótipo P1P2: heterocigoto; genótipo P2P2: homocigoto para o alelo P2. As diferenças foram obtidas por Teste Mann-Whitney e os dados foram expressos em valor em mediana (25% - 75%).

**Fonte:** Autores.

## Discussão

As características demográficas dos pacientes com LES estão de acordo com os descritos previamente na literatura, em que há um predomínio de LES em indivíduos do sexo feminino, caucasianos e com surgimento da doença na idade reprodutiva (FREIRE et al., 2006; WIJAYA et al., 2005).

A dislipidemia é comum nos pacientes com LES e é considerada um importante fator no desenvolvimento da aterosclerose e de eventos cardiovasculares nesta população (CADAVAL et al., 2009). A dislipidemia associada ao LES é mais comum do que a descrita na população em geral, com um aumento nos níveis séricos de CT, LDL, TG e Apo B e uma diminuição dos níveis de HDL (NUTTALL et al., 2003). Os resultados encontrados estão, em parte, de acordo com os descritos na literatura. Pacientes com LES apresentaram elevados níveis de TG quando comparados a controles saudáveis. No entanto, não foram encontradas diferenças nos níveis de CT, LDL e HDL.

Pacientes com LES ativo apresentaram níveis elevados de TG quando comparados a pacientes com LES inativo. Kashef e colaboradores (2007) demonstraram que a atividade lúpica está associada com dislipidemia, com níveis elevados de TG e redução dos níveis de HDL. Não se conhece o mecanismo exato desta relação, entretanto, é possível que haja um prejuízo na ativação da lipase lipoproteica, que é a principal enzima no catabolismo do VLDL, resultando no acúmulo de LDL e redução do HDL (BORBA et al., 2000; KASHEF et al., 2007).

O uso de esteróides, a síndrome nefrótica e a atividade lúpica têm sido descritos como colaboradores para o desenvolvimento da dislipidemia nos pacientes com LES (FORMIGA et al., 2001). Juntamente, vários medicamentos utilizados no LES promovem alterações deletérias no perfil lipídico previamente alterado pela própria

doença, com importância particular para o efeito dos corticosteroides (BRUCE, 2005). Seu uso crônico no LES está associado ao aumento do colesterol total e de suas frações e dos TG, que pode ser observado após um período de 1–2 meses de uso (BRUCE, 2005). Além disso, os corticosteroides induzem o aparecimento de outros fatores de risco, como hipertensão arterial, hiperinsulinemia, resistência insulínica e obesidade o qual está correlacionado a eventos cardiovasculares (BRUCE, 2005).

Nuttall e colaboradores (2003) mostraram que tanto pacientes com doença ativa e inativa apresentam alterações lipídicas, no entanto, indivíduos com doença ativa apresentam um maior processo inflamatório e agravamento das alterações lipídicas, o que demonstra que a própria doença promove um perfil de lipoproteínas proaterogênico (NUTTALL et al., 2003). Borba e Bonfá (1997), Nuttall e colaboradores (2003) e Kashef e colaboradores (2007) encontraram relação positiva entre o aumento dos níveis de LDL e TG em pacientes com doença ativa, contribuindo para um risco elevado de eventos cardiovasculares nesses pacientes.

Mutações no gene do *RLDL* têm sido associadas à disfunção deste receptor, o qual significativamente reduz o catabolismo do LDL resultando numa desordem metabólica (PEREIRA et al., 1995). Não foram encontradas diferenças nas frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL* nos pacientes com LES e controles saudáveis. Indivíduos com LES e genótipo P1P1 apresentaram uma tendência em ter níveis mais elevados de TG quando comparados a indivíduos com LES e genótipo P1P2+P2P2. Os resultados descritos na literatura ainda são contraditórios. Gudnason e colaboradores (1998) não encontraram diferenças na frequência genotípica do polimorfismo genético *PvuII* do *RLDL* entre homens e mulheres da Islândia, Inglaterra e Escócia. No entanto, encontraram níveis elevados de TG em indivíduos com o alelo P1 quando comparados a indivíduos com o alelo P2. Um estudo realizado na população

brasileira por Salazar e colaboradores (2000), encontrou diferenças significativas na frequência genotípica do polimorfismo genético *PvuII* do *LDL* em indivíduos com risco cardiovascular e controles saudáveis. Os autores evidenciaram também que o genótipo P1P1 estava fortemente associado a elevados níveis de CT, TG, LDL e VLDL, e baixos níveis de HDL.

Os mecanismos pelos quais o polimorfismo genético *PvuII* do *LDL* levam a alteração do perfil lipídico ainda são desconhecidos. É pouco provável que polimorfismo genético *PvuII* do *LDL* sozinho altere a função do receptor, visto que o polimorfismo ocorre em uma região de íntron do gene, sendo provável que ele tenha um efeito indireto no metabolismo do colesterol. No entanto, é possível que ele altere a função em outro *locus* do gene (SALAZAR et al., 2000). Gudnason e colaboradores (1998) afirmaram que o alelo P2 é um marcador de uma alteração na sequência do gene que confere um aumento na estabilidade e atividade do receptor.

## Conclusão

Os pacientes com LES e genótipo P1P1 apresentaram níveis aumentados de CT, LDL e TG, e diminuídos de HDL quando comparados a pacientes com LES e genótipos P1P2+P2P2, embora apenas os níveis de TG sejam estatisticamente significativos. Os indivíduos com LES ativo e genótipo P1P1 apresentaram níveis aumentados CT, LDL e TG aumentados, e HDL diminuídos quando comparados a pacientes com LES ativo e genótipos P1P2+P2P2. Os resultados encontrados no perfil lipídico desse estudo podem ter sido influenciados pelo uso de corticosteroides. Polimorfismos genéticos podem contribuir para o aumento de risco cardiovascular, no entanto, deve-se levar em consideração a complexidade dos componentes genéticos e da doença avaliada, lembrando que o perfil genético é apenas um dos fatores envolvidos na fisiopatologia das doenças autoimunes e que eles

não atuam isoladamente sobre uma determinada característica. Quando a etiologia de determinada característica é poligênica, o resultado no indivíduo é um somatório de pequenos efeitos de vários genes. Contudo, mais investigações ainda são necessárias para outros genes que possam estar envolvidos na alteração do perfil lipídico.

A identificação de perfis genéticos que influenciem os níveis séricos de lipídeos dos indivíduos poderia ser utilizada para propor marcadores de risco para doenças cardiovasculares na população brasileira e, principalmente, na população brasileira com LES, uma vez que já se sabe do risco aumentado de comorbidades cardiovasculares nessa população; desta forma, esses pacientes poderiam beneficiar-se com o início precoce do tratamento que previna tais complicações.

## Referências

- AMOURA, Z.; COMBADIÈRE, C.; FAURE, S.; PARIZOT, C.; MIYARA, M.; RAPHAËL, D.; GOROCHOV, G. Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. *Arthritis and Rheumatism*, Heidelberg, v. 48, n. 12, p. 3487–96, Dec. 2003.
- BOMBARDIER, C.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M. B.; CARON, D.; CHANG, C. H.; AUSTIN, A.; SCHUR, P. H. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis and Rheumatism*, Heidelberg, v. 35, n. 6, p. 630–40, Jun. 1992.
- BORBA, E. F.; BONFÁ, E. Dyslipoproteinemias in systemic lupus erythematosus: influence of disease, activity, and anticardiolipin antibodies. *Lupus*, London, v. 6, n. 6, p. 533–9, Jan. 1997.
- BORBA, E. F.; BONFÁ, E.; VINAGRE, C. G.; RAMIRES, J. A.; MARANHÃO, R. C. Chylomicron metabolism is markedly altered in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, Heidelberg, v. 43, n. 5, p. 1033–40, May 2000.

- BORBA, E. F.; LATORRE, L. C.; BRENOL, J. C. T.; KAYSER, C.; SILVA, N. A.; ZIMMERMANN, A. F.; PÁDUA, P. M.; COSTALLAT, L. T. L.; BONFÁ, E.; SATO, E. I. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia*, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 196-207, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°. 153, de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. *Diário Oficial da União*, Brasília, D. F., Poder Executivo, 24 jun. 2004. Seção 1, n. 120, p. 68-84.
- BRUCE, I. N. "Not only...but also": factors that contribute to accelerated atherosclerosis and premature coronary heart disease in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, London, v. 44, n. 12, p. 1492-502, Dec. 2005.
- CADAVAL, R. A.; MARTINEZ, J. E.; MAZZOLIN, M. A.; BARROS, R. G.; DE ALMEIDA, F. A. Avaliação do risco coronariano em mulheres com lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia*, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 658-669, dez. 2009.
- CASTRO, F. S.; SILVA, N. A.; MELO-REIS, P. R.; DIAS-PENNA, K. G.; SILVA, C. B.; BRANDÃO, N. A.; CHEN, L. C. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 24-28, fev. 2008.
- FORMIGA, F.; MECO, J. F.; PINTO, X.; JACOB, J.; MOGA, I.; PUJOL, R. Lipid and lipoprotein levels in premenopausal systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, London, v. 10, n. 5, p. 359-63, Jan. 2001.
- FREIRE, B. F.; DA SILVA, R. C.; FABRO, A. T.; DOS SANTOS, D. C. Lupus eritematoso sistêmico: novo fator de risco para aterosclerose? *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, São Paulo, v. 87, n. 3, p. 300-306, set. 2006.
- FREIRE, E. A. M.; SOUTO, L. M.; CICONELLI, R. M. Assessment measures in systemic lupus erythematosus. *Revista Brasileira de Reumatologia*, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 75-80, 2011.
- GUDNASON, V.; ZHOU, T.; THORMAR, K.; BAEHRING, S.; COOPER, J.; MILLER, G.; SCHUSTER, H. Detection of the low density lipoprotein receptor gene PvuII intron 15 polymorphism using the polymerase chain reaction: association with plasma lipid traits in healthy men and women. *Disease Markers*, London, v. 13, n. 4, p. 209-20, Feb. 1998.
- HOCHBERG, M. C. 1997 update of revised systemic lupus erythematosus. *American College of Rheumatology ACR*. 1997. Disponível em: <[https://www.rheumatology.org/Practice/Clinical/Classification/SLE/1997\\_Update\\_of\\_Revised\\_Systemic\\_Lupus\\_Erythematosus/](https://www.rheumatology.org/Practice/Clinical/Classification/SLE/1997_Update_of_Revised_Systemic_Lupus_Erythematosus/)>. Acesso em: 28 jul. 2014.
- HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J.; SMOLEN, J. S.; WEINBLATT, M. E.; WEISMAN, M. H. (Ed.). *Rheumatology*. Connective tissue disorders: systemic lupus erythematosus. 3th. ed. Mosby: Elsevier, 2003. v. 2, sec. 10.
- KASHEF, S.; GHAEDIAN, M. M.; RAJAEI, A.; GHADERI, A. Dyslipoproteinemia during the active course of systemic lupus erythematosus in association with anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) antibodies. *Rheumatology International*, Berlin, v. 27, n. 3, p. 235-41, Jan. 2007.
- LOZOVYOY, M. A. B.; SIMAO, A. N. C.; PANIS, C.; ROTTER, M. A. C.; REICHE, E. M. V.; MORIMOTO, H. K.; DICHI, I. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, London, v. 20, n. 12, p. 1250-9, Oct. 2011.
- NUTTALL, S. L.; HEATON, S.; PIPER, M. K.; MARTIN, U.; GORDON, C. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus: evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia. *Rheumatology*, London, v. 42, n. 6, p. 758-62, Jun. 2003.

PEREIRA, E.; FERREIRA, R.; HERMELIN, B.; THOMAS, G.; BERNARD, C.; BERTRAND, V.; BENLIAN, P. Recurrent and novel LDL receptor gene mutations causing heterozygous familial hypercholesterolemia in La Habana. *Human Genetics*, New York, v. 96, n. 3, p. 319–22, Sep. 1995.

PETRI, M.; LAKATTA, C.; MAGDER, L.; GOLDMAN, D. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. *The American Journal of Medicine*, Tucson, v. 96, n. 3, p. 254–9, Mar. 1994.

SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S. D.; ISSA, J. S.; HIRATA, R. D. Pvu II intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. *Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry*, Philadelphia, v. 293, n. 1-2, p. 75–88, Mar. 2000.

STRICKLAND, D. K.; GONIAS, S. L.; ARGRAVES, W. S. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 66–74, Mar. 2002.

TAYLOR, R.; JEENAH, M.; SEED, M.; HUMPHRIES, S. E. Four DNA polymorphisms in the LDL receptor gene: their genetic relationship and use in the study of variation at the LDL receptor locus. *Journal of Medical Genetics*, London, v. 25, n. 10, p. 653–9, Oct. 1988.

WIJAYA, L. K.; KASJMIR, Y. I.; SUKMANA, N.; SUBEKTI, I.; PRIHARTONO, J. The proportion of dyslipidemia in systemic lupus erythematosus patient and distribution of correlated factors. *Acta Medica Indonesiana*, Jakarta Pusat, v. 37, n. 3, p. 132–144, 2005.

Recebido em: 30 jul. 2013.

Aceito em: 7 out. 2014.

