

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE DO
RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE OS NÍVEIS LIPÍDICOS E
ATEROSCLEROSE NA POPULAÇÃO DE PORTO ALEGRE**

SILVANA DE ALMEIDA

Dissertação de Mestrado submetida
ao Curso de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, para obtenção do
grau de Mestre em Genética e Biologia
Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Helena Hutz

Porto Alegre
2001

Dedico esta dissertação ao meu amor, Edson.

Agradecimentos,

À minha orientadora Dra. Mara Helena Hutz pela dedicação de sua orientação, pelo apoio nos momentos de dificuldade e por ter aceitado reduzir o tempo de mestrado de duas orientadas, mesmo sabendo que isso iria lhe dar muito trabalho.

À Dra. Sídia M. Callegari-Jacques, pelo auxílio na análise estatística e por tornar esta difícil área tão mais agradável e simples.

Aos colegas Fabiana M. de Andrade (Bia), Marcel Arsand e Marilu Fiegenbaum pela coleta da amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia e, principalmente, à Fabiana pela iniciativa desta coleta e planejamento da amostra e entrevista.

Ao pessoal do Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente à Maria Perpétua de Oliveira Pinto e Ana Lúcia Souza Antunes, por possibilitarem a coleta desta amostra.

Aos colegas Domingos Lázaro Rios e André F. Vargas pela coleta da amostra de indivíduos com cardiopatia isquêmica aterosclerótica e ao pessoal do Serviço de Hemodinâmica do Hospital e Clínicas de Porto Alegre, em especial aos Drs. Marco R. Torres e Alcides J. Zago.

Aos colegas de sala e laboratório Bina, Bia, Biazinha, Fabi, Erik, Everaldo, Marilu, Marcel, Tatiana, Vanessa e Verônica pelos bons momentos que curtimos juntos e pela amizade.

Ao técnico dos laboratórios de DNA e Eletroforese, André Abreu Martins pelos "papos cabeça", pelas brincadeiras e por tornar o nosso trabalho no laboratório mais fácil.

Às "lipídicas" (Marilu e Bia) pelas preciosas discussões sobre lipoproteínas e estatística.

Ao Elmo por sua boa vontade em ajudar sempre.

Ao meu namorado, Edson, pela ajuda com a utilização do computador desde a iniciação científica, por não reclamar dos finais de semana na genética, por seu amor e por me escutar e incentivar sempre.

À minha mãe, Terezinha, por todo carinho, ajuda e por sempre confiar em mim e apoiar minhas decisões.

Ao meu pai, Luiz e minha avó, Arinda, que embora não estejam mais entre nós, contribuíram muito para minha educação.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos pela colaboração com o silêncio (sempre que possível) e por estarem sempre tão presentes.

À vó Mila e ao vô Texeira pelo carinho e pela admiração ao meu trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica e mestrado.

As pesquisas realizadas nos laboratórios de DNA e Eletroforese são financiadas pelo CNPq, FINEP, PRONEX, FIPE-HCPA e FAPERGS.

SUMÁRIO

I – <u>INTRODUÇÃO</u>	7
I.1 – LIPÍDIOS	7
I.1.1 – METABOLISMO DE LIPÍDIOS	8
I.1.2 – FATORES QUE INFLUENCIAM OS NÍVEIS LIPÍDICOS	9
I.2 – HORMÔNIOS ESTERÓIDES.....	10
I.2.1 – ESTRÓGENOS	11
I.3 – RECEPTORES DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES	12
I.3.1 – RECEPTORES DE ESTRÓGENOS.....	13
I.3.1.1 – <u>Gene do Receptor de Estrógenos-α</u>	17
I.4 – ESTRÓGENOS E LIPOPROTEÍNAS	21
I.5 – ESTRÓGENOS E DOENÇA CARDIOVASCULAR	25
II – <u>JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS</u>	30
III – <u>AMOSTRAS E MÉTODOS</u>	30
III.1 – AMOSTRA.....	30
III.2 – ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS.....	34
III.2.1 – SÍTIOS <i>PvuII</i> E <i>XbaI</i>	35
III.2.2 – SÍTIO <i>BstUI</i>	36
III.3 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
IV – <u>RESULTADOS</u>	40
IV.1 - INDIVÍDUOS SEM EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DE CARDIOPATIA	40
IV.1.1 - CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DE INDIVÍDUOS SEM EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DE CARDIOPATIA.....	40
IV.1.2 - ANÁLISE POPULACIONAL.....	40
IV.1.3 - ASSOCIAÇÃO COM NÍVEIS LIPÍDICOS.....	43
IV.1.3.1 - <u>Análises Uni-loco</u>	43
IV.1.3.1.1 - Sítio <i>BstUI</i>	43

IV.1.3.1.2 - Sítio <i>PvuII</i>	49
IV.1.3.1.3 - Sítio <i>XbaI</i>	54
IV.1.3.2 - <u>Análises Haplotípicas</u>	54
IV.2 - PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA ATEROSCLERÓTICA E SEUS CONTROLES.....	59
IV.2.1 - CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM CARDIOPATIA E CONTROLES.....	59
IV.2.2 - ANÁLISES UNI-LOCO	59
IV.2.2.1 - <u>Avaliação de Risco para Cardiopatia</u>	59
IV.2.2.2 - <u>Avaliação de Gravidade da Cardiopatia</u>	64
IV.2.3 - ANÁLISES HAPLOTÍPICAS	66
IV.2.3.1 - <u>Avaliação de Risco para Cardiopatia</u>	66
IV.2.3.2 - <u>Avaliação de Gravidade da Cardiopatia</u>	68
V - <u>DISCUSSÃO</u>	70
V.1 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO COM NÍVEIS LIPÍDICOS.....	70
V.2 - AVALIAÇÕES DE RISCO E GRAVIDADE PARA CARDIOPATIA	75
V.3 - PERSPECTIVAS	79
VI - <u>RESUMO E CONCLUSÕES</u>	81
VII - <u>SUMMARY AND CONCLUSIONS</u>	85
VIII - <u>BIBLIOGRAFIA</u>	88
IX - <u>ANEXOS</u>	99

I – INTRODUÇÃO

I.1 – LIPÍDIOS

Os lipídios desempenham diversas funções no organismo, são importantes fontes de energia, constituintes das membranas celulares e também precursores de hormônios esteróides, prostaglandinas e ácidos biliares (MONTGOMERY e cols.,1996). Por serem hidrofóbicos, os principais lipídios encontrados no sangue, triglicerídeos e ésteres de colesterol, são transportados pelo plasma associados a proteínas, em forma de partículas lipoprotéicas (GINSBERG, 1998).

De acordo com o tamanho da partícula, composição química, características físico-químicas, padrão de flutuação e mobilidade eletroforética, seis classes de lipoproteínas podem ser identificadas: quilomícrons, lipoproteínas de muito baixas densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e a lipoproteína [a] (BACHORIK e cols., 1999).

O componente protéico das lipoproteínas é denominado apolipoproteína ou apoproteína e cada classe de lipoproteína possui uma composição apolipoprotéica particular e relativamente constante (tabela I.1). Estas proteínas agem na ativação ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico ou na ligação de lipoproteínas a receptores na superfície celular, desempenhando um papel importante no transporte dos lipídios (MONTGOMERY e cols.,1996; BACHORIK e cols., 1999).

Tabela I.1: Principais componentes protéicos das diferentes classes de lipoproteínas (MONTGOMERY, 1996).

Lipoproteínas	Principais apolipoproteínas
Quilomícrons	B48, AI e AIV
Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL)	B100, E, CI, CII, CIII
Lipoproteínas de densidade intermediária (IDL)	B100, E
Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)	B100
Lipoproteína (a)	B100, apo(a)
Lipoproteínas de alta densidade (HDL)	AI, AII, AIV

I.1.1 – METABOLISMO DE LIPÍDIOS

Os lipídios podem ser obtidos pela dieta (origem exógena) ou então sintetizados no fígado (origem endógena). O colesterol, os triglicerídeos e os fosfolipídios obtidos da dieta são transportados do intestino ao tecido adiposo e ao fígado pelos quilomícrons. Estes são hidrolisados por lipases existentes nos capilares do tecido adiposo e de outros tecidos periféricos. O resíduo resultante desta hidrólise, denominado quilomícron remanescente, é rico em colesterol e é captado pelo fígado (BACHORIK e cols.,1999).

Os quilomícrons remanescentes captados pelo fígado são digeridos enzimaticamente, utilizados na formação de novas partículas lipoprotéicas e secretados para o sangue na forma de VLDL. A lipoproteína lipase, existente nos capilares, hidrolisa os triglicerídeos presentes na VLDL nascente, convertendo-a a VLDL remanescente. O remanescente resultante, rico em colesterol, é captado pelo fígado e após lipólise mais intensa é convertido a IDL e LDL. A LDL é a principal carreadora de colesterol no sangue, transportando-o aos tecidos periféricos e regulando sua biossíntese nestes locais. Frações significantes da IDL e LDL são metabolizadas pelo fígado, no

entanto, aproximadamente 60% da LDL é utilizada pelos tecidos extra-hepáticos (MONTGOMERY e cols., 1996).

A HDL é secretada tanto pelo fígado quanto pelos intestinos, como partículas em forma de disco que contêm colesterol e fosfolípidios e parece ser a responsável pelo transporte reverso do colesterol. A HDL adquire colesterol não-esterificado excedente nos tecidos periféricos por ação da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). Os ésteres de colesterol podem ser transferidos da HDL para VLDL e IDL pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). Após hidrólise pela lipoproteína lipase, VLDL e IDL remanescentes são captados e o colesterol hepático pode ser excretado como ácidos biliares ou colesterol livre, podendo ser reabsorvido ou eliminado nas fezes (MONTGOMERY e cols.,1996; BACHORIK e cols.,1999).

Embora, todos os tecidos possam sintetizar colesterol, o LDL colesterol é preferencialmente usado. Aproximadamente 70% do LDL plasmático é retirado da circulação e internalizado pelo receptor de LDL. A atividade deste receptor é regulada principalmente pela necessidade de colesterol intracelular (MONTGOMERY e cols., 1996). Os ésteres de colesterol transportados pelo HDL, também são internalizados via receptor ("*scavenger*" classe B tipo I – SR-B1), que também possui sua expressão regulada principalmente pela concentração intracelular de colesterol (ACTON e cols.,1996; TRIGATTI e cols., 2000).

I.1.2 – FATORES QUE INFLUENCIAM OS NÍVEIS LIPÍDICOS

As concentrações de lipídios e lipoproteínas plasmáticas variam dentro de uma mesma população, entre populações e em um mesmo indivíduo sob diferentes condições. Os principais fatores que contribuem para o nível individual das concentrações de lipoproteínas e lipídios são: idade, sexo,

peso corporal, dieta, uso de álcool, prática de exercícios físicos, fatores genéticos e distúrbios crônicos como o hipotireoidismo, hepatopatia obstrutiva ou nefropatia (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 1990, 1995).

Alguns trabalhos epidemiológicos verificaram diferenças no perfil lipídico entre homens e mulheres de mesma idade e ainda mudanças nos níveis lipídicos das mulheres após a menopausa, em relação aos níveis observados no período reprodutivo (revisão em KNOPP e cols.,1994; revisão em GUETTA e CANNON,1996). A administração de estrógeno em mulheres na menopausa reverteu às alterações lipídicas citadas, o que sugere um papel importante dos hormônios sexuais, principalmente do estrógeno, na determinação da concentração dos lipídios plasmáticos (revisão em GODSLAND, 2001).

I.2 – HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Os hormônios esteróides são moléculas lipofílicas, derivadas do colesterol e utilizadas como mensageiros químicos pelo organismo. Estes hormônios exercem sua função na célula alvo após ligação ao receptor específico, localizado predominantemente dentro do núcleo. O complexo receptor-esteróide reconhece seqüências específicas em certos genes, elementos de resposta a hormônios (HRE), liga-se a estas seqüências e recruta os demais fatores de transcrição ativando a transcrição destes genes. Portanto, os esteróides regulam a síntese de algumas proteínas pela alteração da taxa de transcrição de seus genes (MENDELSON,1996; WILLIAMS e STANCEL,1996).

Os hormônios esteróides são divididos em quatro classes principais: progestágenos, andrógenos, estrógenos e corticóides. Nos vertebrados, estes hormônios agem em vários tecidos e influenciam muitos aspectos biológicos,

incluindo diferenciação sexual, fisiologia reprodutiva, regulação osmótica e metabolismo intermediário (LINDZEY E KORACH, 1997).

I.2.1 – ESTRÓGENOS

Os estrógenos são hormônios endógenos que atuam em numerosas ações fisiológicas. Nas mulheres, pode-se citar seus efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do trato reprodutor para fertilização e implantação do óvulo e no metabolismo mineral, dos carboidratos, das proteínas e dos lipídios (WILLIAMS e STANCEL,1996).

Os estrogênios naturais são esteróides com 18 carbonos, contendo um anel fenólico A e um grupamento β -hidroxila ou cetona na posição 17 do anel D. O anel fenólico A é o principal padrão estrutural responsável pela ligação seletiva, de alta afinidade, aos receptores estrogênicos (WILLIAMS e STANCEL,1996). O estrógeno mais potente, de ocorrência natural, é o 17 β -estradiol, seguido pelo estrona e pelo estriol (SPRITZER e cols.,1992).

Estes hormônios agem em muitos tecidos e tem inúmeras ações metabólicas nos seres humanos e animais. Em alguns casos, não está claro se os efeitos resultam diretamente das ações dos estrógenos no tecido em questão ou secundariamente às suas ações em outros locais (WILLIAMS e STANCEL,1996). No entanto, sabe-se que muitos tecidos não-reprodutivos (ossos, fígado, sistema nervoso central, coração, endotélio e músculo liso vascular) apresentam receptores para estrógenos (KARAS e cols.,1994; LOSORDO e cols.,1994; VENKOV e cols.,1996), deste modo vários efeitos metabólicos podem resultar diretamente de eventos mediados por receptores nos órgãos afetados.

Todos os receptores de esteróides apresentam a mesma estrutura geral, (figura I.2). Três regiões altamente conservadas ocorrem nestes receptores: o domínio de ligação ao DNA e duas regiões próximas à extremidade carboxi-terminal (HBD₁ e HBD₂). O domínio de ligação ao DNA é composto por 66-68 aminoácidos com nove resíduos de cisteínas e duas unidades de repetição ricas em cisteína, lisina e arginina que formam dois motivos de ligação ao DNA (dedos de zinco). As duas regiões HBD₁ e HBD₂ são formadas por 42 e 22 aminoácidos hidrofóbicos, respectivamente (MENDELSON,1996).

Entre a extremidade amino-terminal e o domínio de ligação ao DNA existe uma região hipervariável (HV) em tamanho e seqüência. Com base nas similaridades e diferenças nesta região é possível dividir os receptores em duas subfamílias (figura I.2). A primeira subfamília é composta por receptores de glicocorticóides, mineralocorticóides, progestágenos e andrógenos que possuem uma região hipervariável com 420-603 aminoácidos e a segunda subfamília, que apresenta 24-185 aminoácidos nesta região, é constituída pelos receptores de estrógenos, hormônios da tireóide, vitamina D₃ e ácido retinóico (MENDELSON,1996).

I.3.1 – RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Os receptores estrogênicos (REs) são muito semelhantes aos receptores dos demais esteróides e, assim como os outros, localizam-se mais freqüentemente no núcleo das células (MENDELSON,1996). Até o momento foram identificadas três isoformas de receptores estrogênicos: RE α (forma clássica), RE β e o recentemente descrito RE Δ (KUIPER e cols.,1996; ALI e cols.,2000), sendo os três codificados por genes distintos. Pouco se sabe a respeito do RE Δ , mas algumas diferenças em propriedades e no

padrão de expressão entre RE α e RE β já foram descritas (GUSTAFSSON, 2000; OHLSSON,2000).

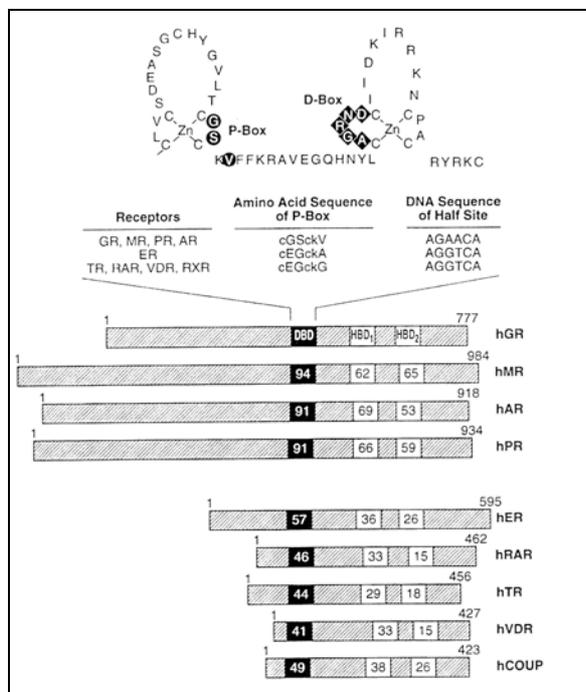


Figura I.2: Estrutura da superfamília dos receptores de esteróides. hGR: receptor de glicocorticóide; hMR: receptor de mineralocorticóide; hAR: receptor de andrógenos; hPR: receptor de progestágeno; hER: receptor de estrógenos; hRAR: receptor de ácido retinóico; hTR: receptor de hormônio da tireóide; hVDR: receptor de 1,25-dihidroxivitamina D₃; hCOUP: receptor órfão; P-Box: constituído por três aminoácidos que determinam especificidade para ligação ao elemento de resposta; D-Box: três aminoácidos importantes para a dimerização do complexo esteróide-receptor; HBD1 e HBD2: domínios de ligação aos hormônios, os números dentro das caixas representam a percentagem de similaridade em aminoácidos com o hGR; os números à direita indicam a quantidade de aminoácidos em cada receptor; a região localizada à esquerda do domínio de ligação ao DNA é denominada região hipervariável (MENDELSON,1996).

A estrutura protéica do RE α é dividida funcionalmente em seis regiões (A/B,C,D,E e F), sendo elas responsáveis pela ligação ao hormônio (SBD – “steroid binding domain”), ligação ao DNA (DBD – “DNA binding domain”), ativação transcricional, dimerização e direcionamento do receptor ao núcleo. A partir de estudos mutacionais, sabe-se que a região E é responsável pela interação com o hormônio, a região C possui dois motivos de ligação ao DNA

(dedos de zinco) e portanto, é responsável pelo reconhecimento e ligação aos elementos de resposta no DNA. O papel preciso das demais regiões ainda não está bem estabelecido, mas em alguns tipos celulares a região A/B é importante na ativação transcricional (KUMAR e cols.,1987).

Para que os receptores permaneçam na célula como monômeros e não se liguem aos elementos de resposta sem o estrógeno, devem estar associados a duas fosfoproteínas (proteínas de choque térmico), uma de 90.000 e outra de 70.000 dalton (90 hsp - "*heat shock protein*" e 70 hsp , respectivamente). Com esta conformação o receptor é incapaz de se ligar ao DNA ou regular a expressão dos genes. Após a ligação do estrógeno ao receptor, este se dissocia do complexo, modifica sua conformação e permite a formação de um homodímero com outro receptor (figura I.3). O homodímero formado apresenta alta afinidade pelos elementos de resposta presentes no gene alvo. A fosforilação do complexo, antes ou depois da ligação ao DNA, permite que o dímero module a transcrição do gene em questão (MENDELSON, 1996).

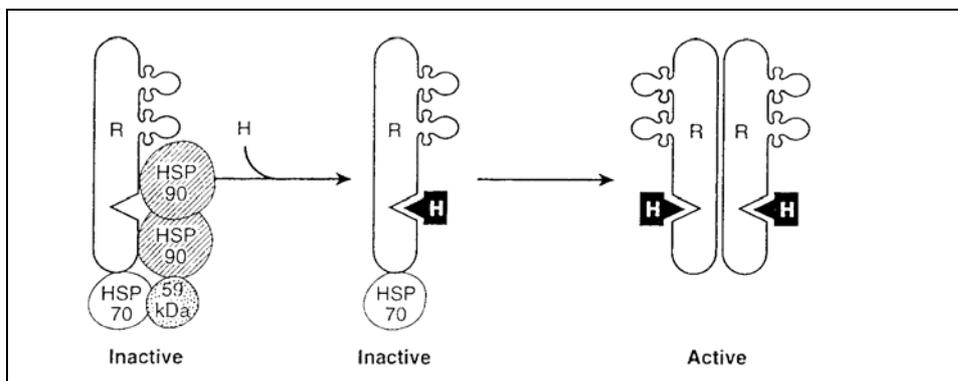


Figura I.3: Ativação do receptor pela ligação ao hormônio. R: receptor, H: hormônio, HSP: proteínas de choque térmico (MENDELSON, 1996).

O complexo receptor-estrógeno reconhece um elemento de resposta específico, que consiste em uma seqüência repetida de forma invertida que é separada por três nucleotídeos (AGGTCA_nnnTGACCT), enquanto todos os receptores pertencentes a primeira sub-família (glicocorticóides,

mineralocorticóides, andrógenos e progestágenos) reconhecem outro elemento de resposta (AGAACAAnnTGTTCT). A especificidade para o reconhecimento do "meio-sítio" (AGAACA versus AGGTCA) é determinada por três aminoácidos no primeiro dedo de zinco (*P-box*). Nos receptores da primeira sub-família estes aminoácidos são: glicina, serina e valina, ao passo que no receptor de estrógenos são: glutamato, glicina e alanina (MENDELSON, 1996).

No processo de ativação da transcrição, de genes que possuem elemento de resposta ao estrógeno, diversas proteínas estão envolvidas e são denominadas de co-ativadores (pCAF, CBP, p160, p300, PBP). O complexo de ativação da transcrição é montado e desmontado em ciclos repetidos, apesar da estimulação pelo estrógeno ser contínua. A formação deste complexo é iniciada pela ligação do estrógeno ao seu receptor, reconhecimento do elemento de resposta, recrutamento dos diversos co-ativadores e do aparato de transcrição (RNA pol II e os demais fatores de transcrição). Após a fosforilação do domínio C-terminal da subunidade maior da RNA pol II, ocorre liberação dos co-ativadores e do receptor-estrógeno. A seguir o complexo é novamente formado, para um novo ciclo de transcrição, mas este re-início ocorre sem a presença do co-ativador p300. A montagem e desmontagem do complexo de ativação da transcrição pelo estrógeno estão esquematizadas na figura I.4 (SHANG e cols.,2000).

Um mecanismo alternativo de ativação da transcrição pelo estrógeno pode ocorrer em genes que apresentem um elemento "*enhancer*" AP1. Para a ativação da transcrição destes genes, dois fatores de transcrição (*Fos* e *Jun*) ligam-se a este sítio e o homodímero receptor-estrógeno liga-se nestas duas proteínas e recrutam os demais fatores de transcrição. A indução da transcrição de genes contendo o sítio AP1 pelo estrógeno pode ser diferente para os receptores α e β (PAECH e cols.,1997).

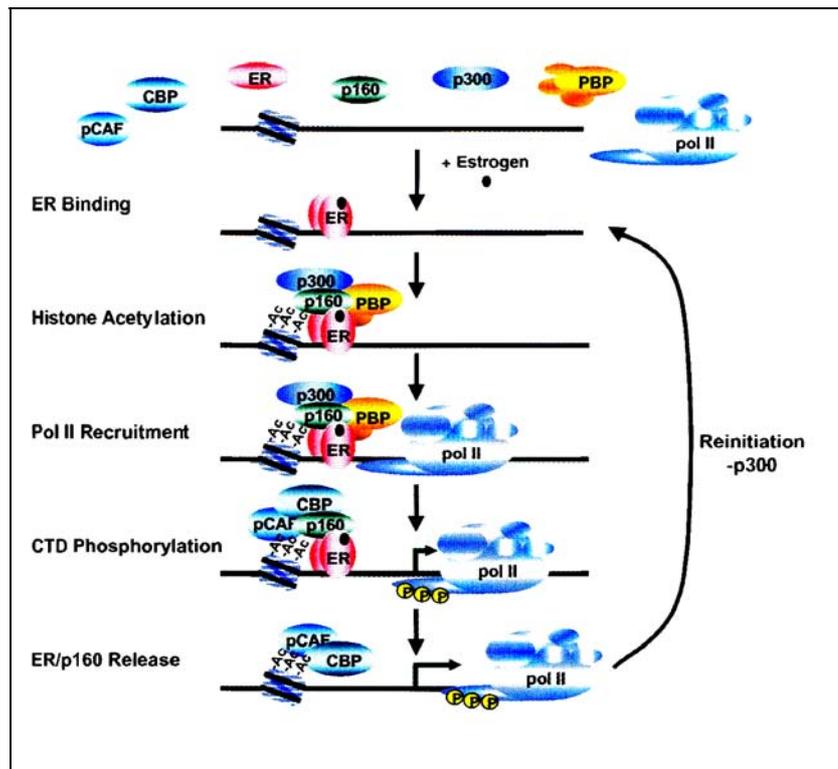


Figura I.4: Mecanismo de ativação da transcrição pelo complexo receptor-estrógeno. pCAF, CBP, p160, p300, PBP: co-ativadores da transcrição; ER: receptor de estrógenos; pol II: RNA polimerase II; P: grupamento fosfato (SHANG e cols.,2000).

I.3.1.1 – Gene do Receptor de Estrógenos- α

O gene do RE α localiza-se no cromossomo 6q25.1 (MENASCE e cols.,1993) e é composto por oito exons e sete introns (PONGLIKITMONGKOL e cols.,1988). A estrutura do gene, do cDNA e a correspondência destes com os diferentes domínios da proteína estão esquematizados na figura I.5.

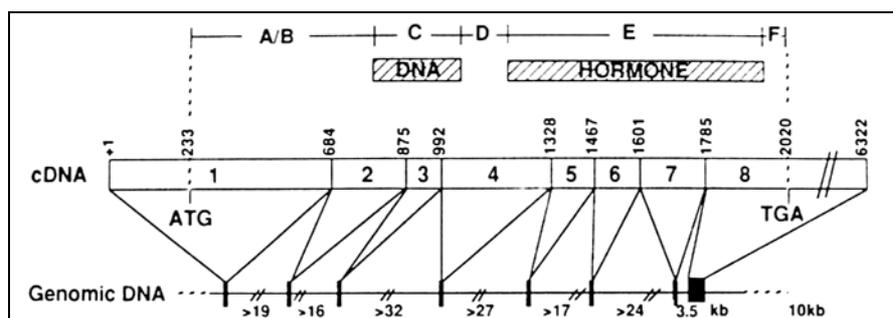


Figura 1.5: Representação esquemática do gene, cDNA e da estrutura proteica do receptor de estrógeno. No DNA genômico os números demonstrados correspondem ao tamanho aproximado de cada intron; no cDNA estão representados os números dos nucleotídeos que limitam cada exon, os oito exons existentes e os sítios de início e término da tradução (ATG e TGA, respectivamente); na proteína estão representadas as seis regiões e os domínios de ligação ao DNA e ao hormônio (PONGLIKITMONGKOL e cols.,1988).

Três polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição (RFLPs) foram descritos neste gene, dois localizados no primeiro intron (*PvuII* e *XbaI*) (CASTAGNOLI e cols.,1987; ZUPPAN e cols.,1989) e o terceiro no exon 1 (variante B - *BstUI*) (GARCIA e cols.,1989; MACRI e cols.,1992; TAYLOR e cols.,1992). Um polimorfismo de repetições curtas em tandem (STRP) foi descrito na região 5' "upstream" e consiste em repetições do dinucleotídeo TA (SANO e cols.,1995).

O sítio de restrição para enzima *PvuII* é determinado pela transição T/C (P2/P1) no primeiro intron, à aproximadamente 0.4 kb "upstream" do exon 2 (CASTAGNOLI e cols.,1987). Há uma hipótese de que esta transição afetaria o "splicing" do RNA mensageiro, resultando em alteração na expressão da proteína (MATSUBARA e cols.,1997).

O segundo polimorfismo, *XbaI* está à aproximadamente 50pb do sítio *PvuII* (ZUPPAN e cols.,1989). Um forte desequilíbrio de ligação foi descrito entre estes polimorfismos (KOBAYASHI e cols.,1996; MATSUBARA e cols.,1997). HAN e cols.(1997), após o seqüenciamento do produto da reação em cadeia de polimerase (PCR) contendo o sítio *XbaI*, determinaram que este localiza-se à aproximadamente 0.35 kb "upstream" do exon 2 e ocorre por uma transição A/G (X1/X2).

A variante B é determinada por uma transversão G/C (tipo B-selvagem/ tipo B-variante) no exon 1 e resulta em uma mutação silenciosa no códon 87 (GCG/GCC) (GARCIA e cols.,1989; MACRI e cols.,1992; TAYLOR e cols.,1992).

Diversos trabalhos investigaram associação entre os polimorfismos *PvuII*, *XbaI* e variante B com câncer de mama, osteoporose, aborto espontâneo e hipertensão (LEHRER e cols.,1993; ANDERSEN e cols.,1994; BERKOWITZ e cols.,1994; KOBAYASHI e cols.,1996; HAN e cols.,1997; WEEL e cols.,1999; VANDEVYVER e cols.,1999; DENG e cols.,2000). As frequências dos alelos desses três sítios de restrição polimórficos em diversas populações estão apresentadas na tabela I.2. A prevalência do alelo P1 do sítio de restrição para *PvuII* variou de 57% em uma amostra de belgas (VANDEVYVER e cols.,1999) a 39% em uma série de japoneses (MATSUBARA e cols.,1997), embora outros estudos dessa mesma população verificaram prevalências um pouco mais elevadas para esse alelo. Em asiáticos, o alelo X1 do polimorfismo *XbaI* variou de 19 a 31% dos cromossomos investigados (KOBAYASHI e cols.,1996; HAN e cols.,1997; MATSUBARA e cols.,1997; KIKUCHI e cols.,2000). Apenas um estudo descreveu a frequência deste alelo em caucasóides (32%; ANDERSEN e cols.,1994). Embora apenas quatro investigações tenham referido a prevalência da variante B, este polimorfismo não foi detectado em asiáticos (tabela I.2). No entanto, apenas três estudos verificaram a influência de polimorfismos neste gene com a doença cardíaca e/ou níveis lipídicos.

Tabela I.2: Frequências alélicas dos polimorfismos *PvuII*, *XbaI* e variante B:

Populações	N	<i>PvuII</i> – P1	<i>XbaI</i> – X1	B-selvagem	Referências
<i>Japoneses</i> ¹	102	0.43	0.31	NI	KIKUCHI e cols.,2000
<i>Japoneses</i>	238	0.45	0.19	NI	KOBAYASHI e cols.,1996
<i>Japoneses</i>	94	0.39	0.19	1.00	MATSUBARA e cols.,1997
<i>Coreanos</i> ²	248	0.42	0.22	1.00	HAN e cols.,1997
<i>Caucasóides</i> ³	204	NI	0.32	NI	ANDERSEN e cols.,1994
<i>Caucasóides</i> ⁴	43	NI	NI	0.86	BERKOWITZ e cols.,1994
<i>Caucasóides</i> ⁵	108	0.49	NI	0.86	DENG e cols.,2000
<i>Caucasóides</i> ⁶	900	0.47	NI	NI	WEEL e cols.,1999
<i>Caucasóides</i> ⁷	171	0.57	NI	NI	VANDEVYVER e cols.,1999

P1: ausência do sítio de restrição para a enzima *PvuII*; X1: ausência do sítio de restrição para a enzima *XbaI*; N: número de indivíduos investigados; NI: Não investigado; ¹Crianças saudáveis; ²Mulheres no período pós-menopausa; ³Noruega; ⁴Branco não-hispânico (EUA); ⁵Mulheres no período pós-menopausa (EUA); ⁶Holanda, ⁷Bélgica.

MATSUBARA e cols.(1997) investigaram a possível associação destes três polimorfismos em mulheres, no período pós-menopausa, e homens japoneses com níveis lipídicos e severidade da doença cardíaca. Os resultados obtidos por estes pesquisadores sugeriram que estes polimorfismos não estão associados com a prevalência ou severidade de doença cardíaca ou com os níveis lipídicos. No entanto, KIKUCHI e cols.(2000) verificaram associação entre os níveis de LDL e o polimorfismo *XbaI* em crianças japonesas, os homozigotos para ausência do sítio de

restrição (X1/X1) apresentaram níveis de LDL superiores aos portadores dos demais genótipos.

KUNNAS e cols. (2000), determinaram uma associação entre o microssatélite (TA)_n e severidade da doença coronariana em homens finlandeses.

I.4 – ESTRÓGENOS E LIPOPROTEÍNAS

Alguns trabalhos epidemiológicos verificaram diferenças no perfil lipídico entre homens e mulheres de mesma idade (figura I.6). As mulheres no período reprodutivo apresentam níveis de LDL mais baixos e de HDL mais altos que homens da mesma idade, após a menopausa os níveis de HDL das mulheres diminuem um pouco e os níveis de LDL aumentam ultrapassando os níveis observados nos homens (revisão em KNOPP e cols.,1993). Estas observações sugerem um papel importante dos hormônios sexuais na determinação da concentração dos lipídios plasmáticos.

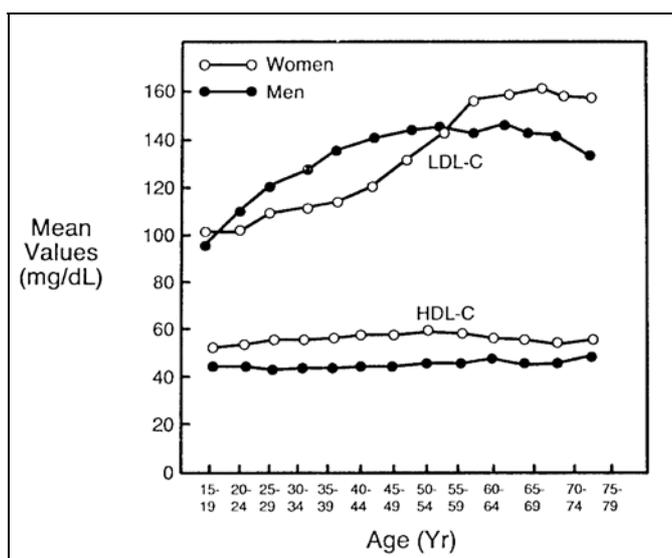


Figura I.6: Comportamento das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL) em homens e mulheres (KNOPP e cols.,1993).

Corroborando a hipótese da importância dos hormônios sexuais no perfil lipídico, diversos trabalhos demonstraram que após a menopausa ocorre modificação nestes níveis em relação aos observados antes da menopausa. O colesterol total, LDL e triglicérides aumentam (revisão em GUETTA e CANNON,1996; ALOYSIO e cols.,1999) e o HDL diminui (revisão em GUETTA e CANNON,1996). ALOYSIO e cols.(1999) não detectaram variação nos níveis de HDL em mulheres italianas pré e pós-menopausa.

Acreditando no papel dos hormônios no metabolismo lipídico, diversos trabalhos procuraram determinar a influência da reposição hormonal sobre esses níveis em mulheres pós-menopausa. Em alguns destes estudos foi investigado o efeito da administração concomitante de estrógenos e progestágenos, em outros a administração de estrógenos somente. GODSLAND (2001) compilou resultados de trabalhos com este objetivo de 1974 à 2000 e chegou aos seguintes resultados, a administração oral de estrógenos eqüinos conjugados e 17 β -estradiol reduziu os níveis de colesterol total e LDL e aumentou os níveis de HDL e triglicérides. A magnitude das mudanças variou de acordo com o estrógeno administrado e dose, por exemplo, altas doses de estrógenos eqüinos conjugados apresentaram maior efeito sobre os níveis de HDL e triglicérides, mas não modificaram a variação dos níveis de colesterol total e LDL. A via de administração também parece ser importante, estrógenos administrados por via parenteral diminuíram os níveis de colesterol total e LDL e aumentaram os níveis de HDL, com menor efeito que a terapia oral, e ainda diminuíram os níveis de triglicérides, enquanto a terapia oral aumentou.

CAMPOS e cols.(1997) estudaram o efeito do estrógeno na produção e catabolismo das lipoproteínas e suas sub-classes e observaram que de um modo geral, a taxa de produção de todas as lipoproteínas (exceto IDL) são aumentadas sob influência dos estrógenos. No entanto, as frações lipoprotéicas podem ter seus níveis mantidos, aumentados ou reduzidos, de acordo com a alteração ou a manutenção da taxa de catabolismo das

mesmas. Outro efeito do estrógeno é o aumento da taxa de remoção de colesterol do organismo, com conseqüente redução do conteúdo de colesterol das diferentes frações lipoprotéicas, esta remoção mais eficiente é ocasionada pelo acréscimo na produção de ácido biliar (KUSHWAHA e BORN,1991).

A elevação de triglicérides plasmáticos é caracterizada pelo acréscimo nos níveis de grandes partículas de VLDL, enquanto as partículas pequenas (mais aterogênicas) não apresentam alteração em suas quantidades absolutas, pois apesar de terem sua produção aumentada são rapidamente retiradas da circulação. Este hormônio aumenta a conversão das grandes partículas de VLDL para partículas pequenas desta lipoproteína, e por isso diminui a conversão direta das grandes partículas a IDLs. Além do aumento nos níveis de VLDL, os estrógenos ocasionam mudança na composição destas lipoproteínas, pois a remoção plasmática mais eficiente diminui a probabilidade de que a VLDL adquira colesterol da HDL, com isso ocorre uma redução do conteúdo de colesterol da VLDL e aumento da proporção de triglicérides (KNOPP e cols.,1994;CAMPOS e cols.,1997).

Segundo CAMPOS e cols. (1997), a administração de estrógenos não ocasiona variação no tamanho das partículas ou na taxa de produção e catabolismo das IDLs, mas proporciona alteração na origem destas partículas. Uma pequena porção é formada diretamente pelo fígado, enquanto grande parte é obtida pela lipólise de pequenas VLDLs. A quantidade de IDL que é removida diretamente pelo fígado é muito pequena, a maior parte é convertida à LDL. A manutenção dos níveis de IDL parece ser conseqüência da interação entre o aumento da atividade do receptor de LDL e decréscimo da ação da lipase hepática.

Como já descrito, a administração de estrógeno aumenta a produção de LDL via lipólise de IDL, no entanto, mesmo assim ocorre redução nos níveis plasmáticos de LDL pelo aumento da remoção desta lipoproteína. O acréscimo na taxa de remoção ocorre, provavelmente, pela conversão

acelerada do colesterol hepático à ácidos biliares (KUSHWAHA e BORN,1991) e pelo aumento da expressão de receptores de LDL por “*up-regulation*” (WINDLER e cols.,1980; ERIKSSON e cols.,1989). Como esta remoção é direcionada à partículas maiores e menos densas de LDL, ocorre um aparente aumento de partículas menores, mais densas e mais aterogênicas. No entanto, CAMPOS e cols.(1997) determinaram que este aumento é somente relativo, os estrógenos não influenciam nos níveis absolutos das partículas menores.

WAKATSUKI e cols. (2001) observaram que, após a administração de estrógenos, um grupo de mulheres japonesas apresentou elevação dos níveis de triglicérides e diminuição do tamanho das partículas de LDL, enquanto outro grupo manteve os níveis de triglicérides plasmáticos e não apresentou variação no tamanho das partículas. Este resultado demonstra que a administração de estrógeno pode estar sujeita a diferenças farmacogenéticas.

O aumento dos níveis de HDL, com a administração deste hormônio, pode ser explicado por dois mecanismos: aumento da produção de apo AI e diminuição da expressão do receptor SR-B1 no fígado. O aumento da produção da apo AI ocorre pelo acréscimo na taxa de transcrição do gene sob ação do estrógeno, LAMON-FAVA (2000a) determinou que na região 5' não traduzida do gene, entre os nucleotídeos -256 e -41, existe um local importante para a ativação transcricional. Algumas evidências sugerem que a ativação acontece por um mecanismo desconhecido e não pelo modo clássico, ligação receptor-hormônio a um elemento de resposta. Com relação ao receptor SR-B1, LANDSCHULZ e cols. (1996) demonstraram que sob ação de 17 β -estradiol houve diminuição da expressão deste receptor no fígado e aumento da expressão em tecidos esteroideogênicos não placentários (glândula adrenal e ovário) de ratos. A redução da expressão deste receptor no tecido hepático pode contribuir para uma menor captação de HDL pelo fígado e a conseqüente elevação dos níveis plasmáticos. O mecanismo pelo

qual o estrógeno regula a expressão do SR-B1 ainda não está bem estabelecido, além disso, duas outras questões precisam ser examinadas, primeiro as doses administradas aos ratos neste experimento foram supra-fisiológicas e segundo, embora tenha ocorrido a redução da expressão do SR-B1 no fígado de ratos, pode não acontecer o mesmo em humanos.

BAGATELL e cols. (1994), ao ocasionarem uma deficiência seletiva de estradiol em homens saudáveis, utilizando um antagonista de estradiol e um inibidor de uma enzima necessária a sua síntese, observaram a diminuição nos níveis de HDL. Estes dados indicam que, mesmo em pequena quantidade, o estradiol presente em homens é importante no metabolismo desta lipoproteína e talvez de outras.

Mulheres com doença cardiovascular apresentam altas concentrações de pequenas partículas de quilomícrons remanescentes no período pós-prandial, a administração de 17β -estradiol aumentou o catabolismo destas partículas em 41% e atenuou a redução do HDL em 66% neste mesmo período (WESTERVELD, 1998).

Em conclusão, os estrógenos têm múltiplos efeitos no metabolismo das lipoproteínas, aumentando intensamente o transporte destas na corrente circulatória. Esta adaptação provavelmente é uma necessidade reprodutiva, aumentando a disponibilidade de colesterol e ácidos graxos no ovário e placenta para crescimento e desenvolvimento do feto (KNOPP e ZHU, 1997).

I.5 – ESTRÓGENOS E DOENÇA CARDIOVASCULAR

Os hormônios sexuais parecem ser fatores importantes na determinação do risco de desenvolvimento de cardiopatia. Trabalhos epidemiológicos têm demonstrado que a mortalidade por doença cardíaca é mais prevalente entre mulheres no período pós-menopausa, enquanto na idade reprodutiva as mulheres apresentam somente cerca de 25% da

mortalidade observada entre homens da mesma idade (SPRITZER e OSÓRIO, 1998). Outra evidência, para esta constatação, é o fato de que mulheres que tiveram os dois ovários retirados, e não receberam reposição estrogênica, desenvolveram cardiopatia duas vezes mais do que aquelas que receberam a reposição (revisão em GUETTA e CANNON, 1996).

De acordo com as revisões de HERRINGTON (2000) e STEVENSON (2000) a utilização de estrógenos, após a menopausa, pode reduzir o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular em mulheres que ainda não tenham comprometimento cardíaco. A redução na incidência de doença cardiovascular pode variar entre 40-50%, no entanto, a administração concomitante de progestágeno interfere nos efeitos benéficos dos estrógenos (revisão em STEVENSON, 2000). Porém, estes resultados são baseados em estudos epidemiológicos, que por estarem sujeitos a diversos interferentes, podem não representar apenas o efeito estrogênico. Estudos padronizados e controlados, planejados para eliminar estes interferentes, começaram a ser realizados e poderão elucidar o papel da reposição hormonal e do estrógeno na prevenção da doença cardiovascular.

Estudos controlados já foram executados para avaliar o efeito da reposição como terapia secundária, ou seja, em mulheres que já apresentam comprometimento cardíaco, e demonstraram que a reposição hormonal, ou apenas estrogênica, não apresenta efeitos benéficos (revisão em MOSCA e cols.,2001).

Apesar de algumas ações desfavoráveis, a maioria dos trabalhos apóia um papel positivo deste hormônio na prevenção de cardiopatia. As alterações lipídicas, já descritas, parecem conferir cerca de 25-50% dos efeitos cardioprotetores dos estrógenos (BARRETT e BUSH, 1991), o restante da proteção conferida pelo hormônio deve-se, provavelmente, a sua ação em outros fatores de risco ou diretamente sobre as artérias, pois células de músculo liso vascular (KARAS e cols.,1994) e endoteliais (VENKOV e cols.,1996) apresentam receptores estrogênicos.

Em geral, o efeito deste hormônio nas artérias é benéfico, a administração oral ou transdérmica diminui o índice de resistência vascular e a pressão sanguínea em mulheres saudáveis (WEST e cols.,2001). De acordo com HERRINGTON (2000), alguns dos efeitos benéficos dos estrógenos nos vasos sanguíneos são os mesmos observados pelo aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico. O óxido nítrico proporciona a inibição da retenção e penetração de LDL na parede do vaso, diminui a proliferação e contração das células do músculo liso vascular, a adesão de monócitos e a adesão e agregação plaquetária. O estrógeno é capaz de estimular a enzima necessária à síntese do óxido nítrico (óxido nítrico sintetase endotelial), proporcionando aumento de seus níveis e conseqüentemente os efeitos descritos acima. Parte do efeito cardioprotetor do estrógeno via óxido nítrico, parece ocorrer pela redução da expressão ("*downregulation*") dos receptores AT1 do sistema renina-angiotensina pelo óxido nítrico. O receptor AT1 induz vasoconstrição, crescimento celular e a liberação de radicais livres nos vasos (NICKENIG e cols.,2000). CHEN e cols. (1999) demonstraram que 17 β -estradiol ativou a óxido nítrico sintetase em isolados de membrana plasmática de células endoteliais em poucos minutos, o que evidenciou um modo de ativação diferente da clássica ativação transcricional. A ativação desta enzima pelo 17 β -estradiol parece ter ocorrido pelo aumento intracelular de cálcio mediado pela ativação das enzimas tirosina quinase/MAP quinase (quinase da proteína de mitógenos ativados). Em um estudo complementar, CHAMBLISS e cols.(2000) demonstraram que o receptor α de estrógeno está localizado em um módulo funcional com a óxido nítrico sintetase endotelial, em regiões da membrana plasmática das células endoteliais denominadas "*caveolae*".

Adicionalmente à ação do estrógeno sobre o óxido nítrico, este hormônio reduz a liberação de endotelina-1, o mais potente vasoconstritor natural e poderoso agente mitogênico das células de músculo liso vascular. Mulheres no climatério tiveram redução de 15-20% nos níveis plasmáticos de

endotelina-1 em resposta a reposição hormonal (revisão em STEVENSON, 2000). O efeito inibitório do estradiol na síntese de endotelina parece ser mediado apenas em parte pelo receptor de estrógeno α , enquanto o restante do efeito ocorre por um mecanismo receptor-independente (DUBEY e cols.,2001).

As células endoteliais são importantes na manutenção da integridade do vaso e na prevenção da formação da placa aterosclerótica (HOLM e cols.,1999). Um trabalho com camundongos demonstrou que o estradiol influencia favoravelmente, ou seja, acelera a reendotelialização da artéria carótida após dano e que esta ação ocorre via RE α (BROUCHET e cols.,2001).

Modificações causadas por oxidação na LDL aumentam seu potencial aterogênico. SUBBIAH e cols.(1993) e RUIZ-SANZ e cols. (2001) demonstraram com estudos "*in vitro*" e "*in vivo*", respectivamente, que o estrógeno em grande quantidade reduziu a suscetibilidade da LDL à oxidação. No entanto, o mecanismo exato pelo qual o estrógeno ocasionou esta mudança não foi esclarecido, pode ter ocorrido por ação antioxidante direta do estrógeno em contato com a LDL, por alteração na composição desta lipoproteína, ou seja, redução da quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, ou pela combinação dos dois fatores (RUIZ-SANZ e cols., 2001). Porém, WEN e cols. (2000) sugeriram, com um estudo "*in vitro*", que níveis fisiológicos de estrógeno não modificam a oxidação da LDL.

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), também denominado fator de permeabilidade vascular, pode estar envolvido no desenvolvimento da aterosclerose em humanos, pois é um mitógeno para células endoteliais e é expresso em grandes quantidades em artérias parcialmente obstruídas por placas ateroscleróticas. Reposição hormonal em mulheres normocolesterolêmicas pós-menopausa reduziu a liberação de VEGF o que pode ter ocorrido pela proteção contra oxidação que o estrógeno

confere ao LDL, pois, os níveis de mRNA do VEGF aumentam de acordo com os níveis de LDL oxidado (SUMINO e cols.,2000).

Conforme revisão em STEVENSON (2000), a deposição anormal e a remodelação da matriz extracelular são processos importantes na patogênese e progressão da aterosclerose. Um grupo de enzimas denominadas metaloproteinases de matrizes (MMPs) são responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular como colágeno e proteoglicanos e conseqüentemente podem estar envolvidas no desenvolvimento da doença cardiovascular. O estradiol aumenta a liberação de MMPs de modo dose-dependente, portanto altas doses de estrógenos podem promover a formação de lesão aterosclerótica.

Mulheres na menopausa, com doença cardiovascular, que estavam recebendo estrógeno apresentaram redução dos níveis de três moléculas relacionadas à adesão (selectina-E, a molécula de adesão intercelular-1 e a molécula de adesão da célula vascular-1). A concentração destas moléculas de adesão é mais alta em pacientes com doença cardiovascular do que em pessoas saudáveis. No entanto, marcadores de inflamação não-específicos (interleucina-6 e proteína C-reativa) apresentaram leve acréscimo de seus níveis sugerindo que o estrógeno pode ter iniciado ou agravado uma inflamação já presente (ZANGER e cols.,2000).

Além de todas as ações dos estrógenos sobre fatores descritos anteriormente, a coagulação e a fibrinólise também são influenciadas por este hormônio (ROSSOUW, 1999). A fibrinólise é ativada pelo acréscimo nos níveis de plasminogênio, redução da lipoproteína (a), redução do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) e redução do fibrinogênio. O efeito desfavorável do estrógeno ocorre pela ativação da coagulação, com aumento dos níveis de fator VII e maior conversão do fator X a fator Xa (HERRINGTON, 2000). O mecanismo pelo qual o estrógeno influencia na homeostase ainda não está bem estabelecido, mas pode ser pela redução da oxidação do LDL (GUETTA e CANNON, 1996).

II – JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Diversas evidências sugerem uma importante interação dos estrógenos com níveis lipídicos e com a severidade de doença coronariana. No entanto, os mecanismos pelos quais esta interação ocorre não são bem determinados. Segundo OHLSSON e cols. (2000) e HODGIN e cols.(2001), a maior parte dos efeitos ateroprotetores deste hormônio é mediada por sua ligação ao receptor α .

Deste modo torna-se interessante à análise da relação entre alterações no gene deste receptor com os níveis de lipídios séricos e a severidade de doença cardíaca. Pois, os três únicos estudos feitos com este objetivo apresentaram resultados contraditórios.

Os polimorfismos *PvuII*, *XbaI* e variante B localizam-se em uma região do gene correspondente ao local do receptor que é responsável pela ativação transcricional de genes que possuem elementos de resposta à estrógenos, portanto, alterações nesta área podem ocasionar modificações na atividade moduladora de transcrição. Apesar dos polimorfismos *PvuII* e *XbaI* estarem localizados em introns podem estar envolvidos no “*splicing*” do RNA mensageiro, localizados em regiões regulatórias ou mesmo estarem em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo que determina diretamente a estrutura protéica. Apesar da variante B ocorrer por uma mutação silenciosa, a expressão da proteína pode estar alterada pela modificação do tRNA utilizado no processo de tradução.

Assim o presente trabalho tem como objetivo geral contribuir para a melhor compreensão do papel da variabilidade genética do receptor α de

estrógeno sobre os níveis lipídicos e a cardiopatia isquêmica aterosclerótica. São objetivos específicos deste trabalho:

1 – Determinar as freqüências dos alelos de três variantes do gene $RE\alpha$ (*Bst*UI, *Pvu*II, *Xba*I) bem como os haplótipos derivados desses polimorfismos em indivíduos saudáveis e com cardiopatia isquêmica aterosclerótica da população de Porto Alegre.

2 – Investigar se ocorre associação entre os alelos, genótipos e haplótipos do gene $RE\alpha$ e os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos na amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia.

3 – Verificar a existência de associação entre os alelos, genótipos e haplótipos do $RE\alpha$ observados com a prevalência e a severidade de cardiopatia isquêmica aterosclerótica.

III – AMOSTRA E MÉTODOS

III.1 - AMOSTRA

Neste estudo foram analisados 765 indivíduos de Porto Alegre descendentes de europeus:

- ✓ 413 caucasóides sem evidências clínicas de cardiopatia, sendo 228 mulheres e 185 homens.
- ✓ 352 caucasóides com cardiopatia isquêmica aterosclerótica, sendo 138 mulheres e 214 homens.

A amostra de caucasóides não cardiopatas foi obtida junto ao Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram realizadas as dosagens de lipídios séricos e de glicose. Os indivíduos assinaram um termo de consentimento (anexo 1) e foram submetidos a uma entrevista (anexo 2) para obtenção de dados relativos a prática de esportes; uso de álcool, fumo ou medicamentos; presença de história familiar de hipertensão ou doença cardíaca. No momento da entrevista o peso e altura foram medidos. Essa amostra foi considerada como representativa da população de Porto Alegre.

Para análise de associação com níveis lipídicos foram excluídos desta amostra 34 indivíduos com glicemia acima de 110 mg/dl (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2000), 1 indivíduo com hipotireodismo, 10 indivíduos que estavam em tratamento com β -bloqueadores, 3 com corticóides e 1 com hipolipemiante (MANTEL-TEEUWISSE e cols.,2001). Para 13 indivíduos não

estavam disponíveis informações de peso, altura, glicemia ou climatério e também foram excluídos da análise. As amostras de DNA de quatro indivíduos apresentaram problemas de amplificação. Após a exclusão dos indivíduos que apresentavam alguma das situações descritas acima, 347 indivíduos permaneceram na amostra para análise de associação, 189 mulheres e 158 homens.

Nas análises de associação com colesterol total e HDL foram utilizados todos os 347 indivíduos da amostra. Sete indivíduos não puderam ser analisados para LDL, porque apresentavam níveis de triglicérides superiores a 400 mg/dl e desta forma não foi possível utilizar a fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD e cols.,1972) para calcular a concentração desta lipoproteína. Os níveis de triglicérides apresentam muita variação e conseqüentemente um desvio padrão muito grande, o que pode levar a erros do tipo I ou tipo II. Deste modo, foram excluídos 17 indivíduos que apresentavam níveis de triglicérides superiores a 348 mg/dl (a média deste nível na amostra mais dois desvios padrão) para o estudo de associação com este lipídio.

Para detecção do efeito da interação dos genótipos com fumo pelo delineamento fatorial, foram excluídos da amostra 14 ex-fumantes e 1 indivíduo que não apresentava informação para fumo, permanecendo 331 indivíduos na amostra. Na investigação do efeito da interação do genótipo com sedentarismo, também por delineamento fatorial, 21 indivíduos foram excluídos da amostra por não apresentarem informação sobre prática de esportes. Foram considerados não sedentários indivíduos praticando exercício físico regular, fora do ambiente de trabalho (HAN e cols.,1998).

Para avaliação de risco para cardiopatia foram selecionados 143 indivíduos da amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia com o objetivo de formar uma amostra controle para cardiopatia. A redução do número de indivíduos foi necessária para obtenção de uma média de idade nesta amostra que não diferisse estatisticamente da média de idade da amostra de pacientes com cardiopatia. Nesta amostra não foram excluídos

diabéticos ou indivíduos que estivessem ingerindo algum medicamento, pois estes também não foram excluídos da amostra de cardiopatas.

A amostra de pacientes com cardiopatia foi obtida no Serviço de Hemodinâmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde compareceram para realizar cineangiocoronariografia. As dosagens bioquímicas desses pacientes foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do HCPA. Após assinarem o termo de consentimento (anexo 3) os pacientes foram submetidos a uma entrevista (anexo 4) semelhante a dos indivíduos saudáveis. No momento da entrevista foram medidos o peso e altura dos pacientes. Para 6 indivíduos não estavam disponíveis informações sobre os níveis de colesterol total e LDL, para um indivíduo não havia informação sobre HDL, peso e altura não estiveram disponíveis para 4 indivíduos e ainda faltaram informações sobre prática de esportes (11 indivíduos) e fumo (3 indivíduos).

Para investigação da gravidade de cardiopatia, a amostra foi dividida em indivíduos com cardiopatia grave (CAD^+) e com cardiopatia leve (CAD^-). Esta divisão foi feita de acordo com a percentagem de obstrução das artérias coronarianas, indivíduos com menos de 10% de estenose luminal em alguma das artérias foram classificados como CAD^- , enquanto os pacientes com mais de 60% de obstrução em pelo menos uma artéria foram classificados como CAD^+ . Trinta indivíduos que apresentavam comprometimento entre 10-60% foram excluídos desta análise.

Esse projeto faz parte de um projeto mais amplo já aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (anexo 5).

III.2 – ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

O DNA das amostras de sangue total foi extraído pela técnica de LAHIRI e NURNBERGER (1991). E os fragmentos contendo os sítios de

interesse foram amplificados pela reação em cadeia de polimerase (PCR), de acordo com os seguintes protocolos:

III.2.1 – Sítios *PvuII* e *XbaI*

O fragmento contendo os sítios *PvuII* e *XbaI* foi amplificado utilizando os primers descritos por YAICH e cols.(1992).

Primers

RESPX1 – 5' CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC 3'

RESPX2 – 5' TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA 3'

Condições de Amplificação

O DNA genômico (aproximadamente 0.1 μ g) foi amplificado em 30 μ l de solução tampão (10 mM Tris-HCl [pH 9.0], 50 mM de KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) contendo 200 μ M de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos, 0.5 Unidades de Taq polimerase e 20.0 pmol de cada um dos primers.

A reação foi executada com uma desnaturação inicial à 94° C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (94° C por 30 s), anelamento (60° C por 40 s) e extensão (72° C por 90 s) e com uma extensão final de 10 minutos à 72° C.

Este material foi submetido e eletroforese em gel de agarose 1.5%, contendo brometo de etídio, e visualizado sob luz ultravioleta para verificação do sucesso da amplificação.

Condições de Clivagem e Eletroforese

O produto de amplificação (1.3 kb - quilobases) foi submetido à clivagem, separadamente, com as enzimas *PvuII* e *XbaI* conforme as recomendações do fabricante. Após a reação de clivagem, a separação dos fragmentos foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio. O alelo com o sítio *PvuII* presente apresentou dois fragmentos com aproximadamente 0.85 e 0.45 kb, enquanto o alelo com o sítio *XbaI* presente apresentou os fragmentos com aproximadamente 0.9 e 0.4 kb.

III.2.2 – Sítio *BstUI*

O fragmento contendo o sítio *BstUI* (variante B) foi amplificado utilizando os primers descritos por ANDERSEN e cols.(1994).

Primers

RESB1 – 5' CGC GCA GGT CTA CGG TCA G 3'

RESB2 – 5' GCT GCG GCG GCG GGT GCA 3'

Condições de Amplificação

O DNA genômico (aproximadamente 0.1µg) foi amplificado em 25 µl de solução tampão (50 mM Tris-HCl [pH 8.4], 10 mM de KCl, 1.0 mM MgCl₂) contendo 200 µM de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos, 1.0 Unidade de *Taq* polimerase e 10 pmol de cada um dos primers.

A reação foi executada com uma desnaturação inicial de 5 minutos seguida de 35 ciclos com os seguintes passos: desnaturação (94° C por 30 s), anelamento (60° C por 30 s) e extensão (72° C por 20 s).

Este material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1.5%, contendo brometo de etídio, e visualizado sob luz ultravioleta para verificação do sucesso da amplificação.

Condições de Clivagem e Eletroforese

O produto de amplificação (143 pb) foi submetido à clivagem com a enzima *Bst*UI conforme as recomendações do fabricante. Após a reação de clivagem, a separação dos fragmentos foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%. O alelo com o sítio *Bst*UI presente apresentou três fragmentos (2, 54, 87 pb), enquanto o alelo sem este sítio apresentou os fragmentos de 2 e 141 pb.

III.3 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As freqüências alélicas e genotípicas foram determinadas por contagem gênica e as freqüências haplotípicas foram obtidas pelo método de máxima verossimilhança no programa Multiple Locus Haplotype Analysis versão 2.0 (LONG e cols., 1995; LONG, 1999; PETERSON e cols.,1999). O teste de χ^2 foi utilizado para verificação do ajustamento ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O teste para verificação de desequilíbrio de ligação entre os três sítios foi executado no Programa Arlequin versão 2.000 (SCHNEIDER e cols., 2000) e o D' foi calculado manualmente conforme descrito por LEWONTIN e cols. (1988).

Todas as análises descritas a seguir foram realizadas com o auxílio do programa SPSS versão 8.0.

Os níveis de colesterol total, LDL e triglicerídeos na amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia foram transformados em logaritmo natural para obtenção de uma curva de distribuição normal.

A concentração de lipídios séricos é uma característica multifatorial e, portanto, é influenciada por diversos fatores. Deste modo, para as análises uni-locos foi utilizado delineamento fatorial, no qual é possível analisar o efeito da interação entre o genótipo e fatores como sexo, prática de esportes e fumo.

Nas análises uni-locos, quando foi testado o efeito interação genótipo*sexo sobre os níveis lipídicos, estes níveis foram ajustados por idade e índice de massa corporal (IMC - relação peso/altura²) utilizando o método de regressão múltipla. A idade e o IMC foram utilizados no ajuste dos níveis lipídicos, porque pela análise de correlação de Spearman estas duas variáveis foram estatisticamente correlacionadas com as concentrações de lipídios séricos. Deste modo um modelo de regressão múltipla utilizando como variáveis independentes a idade e o IMC foi montado para cada um dos níveis lipídicos, que foram ajustados pela soma dos resíduos não padronizados na média. Os níveis lipídicos não foram ajustados por sexo porque no delineamento fatorial o efeito desta variável foi testado. Nestas análises fatoriais foram utilizados apenas os homens e as mulheres no período reprodutivo, pois mulheres nesta fase apresentam maior concentração de estrógeno do que as mulheres no climatério e assim a identificação de diferenças entre homens e mulheres devem-se possivelmente ao efeito deste hormônio.

Na análise haplotípica ou análise uni-locos quando não foi testado o efeito do sexo, os níveis lipídicos foram ajustados por regressão múltipla para aquelas variáveis já descritas anteriormente e também pelo sexo e interação desta variável com idade e IMC. Para cada nível lipídico um modelo de regressão múltipla foi montado, permaneceram no modelo as variáveis estatisticamente significantes e aquelas que mesmo não apresentando

influência significativa sobre o nível em questão, neste modelo, são reconhecidamente importantes por estudos epidemiológicos. O CT e o LDL foram ajustados por sexo, idade, IMC e pela interação sexo*idade; o HDL por sexo, idade e IMC e os triglicérides por sexo, idade, IMC e sexo*IMC. Nestas análises a amostra total foi utilizada, ou seja, as mulheres no climatério foram incluídas, pois não foi investigado o efeito do sexo.

Na análise haplotípica foram analisados os portadores de um determinado haplótipo versus os portadores dos demais. Nesta abordagem as médias dos níveis ajustados em cada grupo foram comparadas por análise de variância (ANOVA). A homogeneidade de variâncias foi testada pelo teste de Levene, quando as diferenças foram estatisticamente significantes ($p < 0.05$), o teste não paramétrico Mann-Whitney U foi empregado.

Para determinar o efeito dos genótipos e haplótipos sobre o risco de desenvolvimento de placa de atheroma bem como da severidade da cardiopatia utilizou-se regressão logística. Na primeira análise, a variável dependente foi a presença de cardiopatia, enquanto que para a gravidade, a variável dependente foi a percentagem de estenose luminal ($>70\%$ versus $<10\%$).

Nas comparações das médias, das amostras de homens e mulheres e de controles e cardiopatas, foi utilizado o teste t para amostras não pareadas. A comparação das proporções da amostra controle e de cardiopatas e comparação das frequências alélicas foi feita pelo teste exato de Fisher. As frequências genotípicas e haplotípicas nas duas amostras foram comparadas pelo teste de χ^2 . Estes testes foram executados no programa InStat 3.0.

Foram considerados estatisticamente significantes os testes com p inferiores a 5%.

IV – RESULTADOS

IV.1 – INDIVÍDUOS SEM EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DE CARDIOPATIA

IV.1.1 - CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA DE INDIVÍDUOS SEM EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DE CARDIOPATIA

Amostra de indivíduos não cardiopatas utilizada na análise de associação com níveis lipídicos foi composta por 347 indivíduos, sendo 158 homens (46%) e 189 mulheres (54%). Cento e trinta mulheres encontravam-se no período reprodutivo (70%). Nessa amostra, 16% eram hipertensos, 63% sedentários, 31% fumantes e 4% ex-fumantes.

Na tabela IV.1 estão descritas as médias dos níveis lipídicos, do IMC e da idade na amostra total, na amostra de homens e na de mulheres. As mulheres apresentaram em média níveis mais baixos de colesterol total, LDL e triglicérides que os homens, apesar destas diferenças não serem estatisticamente significantes. Os níveis de HDL observados nas mulheres foram superiores aos níveis observados nos homens ($p < 0.001$). As médias de IMC e idade também não diferiram estatisticamente entre as duas amostras, embora a média de idade dos homens tenha sido um pouco superior.

IV.1.2 - ANÁLISE POPULACIONAL

Os três marcadores foram polimórficos na amostra investigada. A frequência da variante B (sítio *Bst*UI presente) foi de 4% dos cromossomos investigados. Já os sítios *Pvu*II e *Xba*I foram mais variáveis, a prevalência do alelo 1 destes sítios foi 41 e 34%, respectivamente. As frequências genotípicas observadas para esses três sítios encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela IV.1: Média dos níveis lipídicos, índice de massa corporal e idade na amostra total, em homens e mulheres da amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia separadamente.

Parâmetros	Todos		Homens		Mulheres		p
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
Col. Total (mg/dl)	347	197 ± 44.3	158	201 ± 43.4	189	193 ± 44.8	0.094
HDL (mg/dl)	347	44 ± 11.7	158	41 ± 10.3	189	47 ± 12.2	<0.001
LDL (mg/dl)	340	125 ± 38.2	153	129 ± 37.8	187	121 ± 38.1	0.054
Triglicerídeos (mg/dl)	330	122 ± 66.0	147	129 ± 68.4	183	117 ± 63.7	0.103
IMC (kg/m²)	346	26.0 ± 4.7	158	26.3 ± 4.3	188	25.7 ± 5.1	0.257
Idade (anos)	347	41.3 ± 15.5	158	42.9 ± 14.3	189	39.9 ± 16.4	0.065

DP: desvio padrão; n: número de indivíduos; os valores de p referem-se a comparação das médias entre homens e mulheres

Tabela IV.2: Freqüências alélicas e genotípicas para os sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I na amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia.

Sítios	Freqüências alélicas		Freqüências genotípicas	
	1	11	12	22
<i>Bst</i> UI	0.964	0.928	0.072	0.000
<i>Pvu</i> II	0.408	0.156	0.504	0.340
<i>Xba</i> I	0.339	0.104	0.470	0.426

1: ausência do sítio de restrição; 2: presença do sítio de restrição; n=347; Teste para Equilíbrio de Hardy-Weinberg: ***Bst*UI** - $\chi^2_{GL=2} = 0.485$, p=1.000; ***Pvu*II** - $\chi^2_{GL=2} = 0.677$, p=0.713; ***Xba*I** - $\chi^2_{GL=2} = 0.823$, p=0.663.

Os três sítios de restrição estão em forte desequilíbrio de ligação (tabela IV.3). Como seria de se esperar os sítios *Pvu*II e *Xba*I, mais próximos fisicamente, pois ambos localizam-se no intron 1, apresentaram D' maior (98%).

Sete dos oito haplótipos possíveis foram encontrados nesta amostra (tabela IV.4), os dois haplótipos mais prevalentes foram 1-2-2 e 1-1-1 (58 e 33%, respectivamente).

Tabela IV.3: Desequilíbrio de ligação entre os sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I.

Sítios	D'	$\chi^2_{GL=1}$	p
<i>Bst</i>UI - <i>Pvu</i>II	0.5153	17.25	<0.001
<i>Bst</i>UI - <i>Xba</i>I	0.8158	6.84	0.009
<i>Pvu</i>II - <i>Xba</i>I	0.9840	392.10	<0.001

Ordem dos sítios no cromossomo: 5'-*Bst*UI-*Pvu*II-*Xba*I-3'

Tabela IV.4: Freqüências haplotípicas para os sítios 5'-*Bst*UI-*Pvu*II-*Xba*I-3'.

Haplótipos	n	Freqüência
1-1-1	231	0.332
1-1-2	31	0.045
1-2-1	2	0.003
1-2-2	404	0.583
2-1-1	3	0.004
2-1-2	20	0.029
2-2-2	3	0.004

1: sítio de restrição ausente; 2: sítio de restrição presente; n: número de cromossomos.

IV.1.3 – ASSOCIAÇÃO COM NÍVEIS LIPÍDICOS

As análises de associação foram feitas com os níveis de colesterol total, LDL e triglicerídeos transformados para logaritmo natural e ajustados conforme descrito na análise estatística, mas as médias mostradas nas tabelas são não transformadas e não ajustadas para melhor visualização das diferenças. Como o HDL não foi transformado em logaritmo natural os valores mostrados na tabela correspondem aos níveis ajustados.

IV.1.3.1- Análises Uni-loco

IV.1.3.1.1- Sítio *Bst*UI

Na tabela IV.5 são apresentadas as médias dos níveis lipídicos separadas por sexo e genótipo do sítio *Bst*UI. A interação sexo**Bst*UI não apresentou influência sobre as concentrações de colesterol total, LDL e triglicerídeos. Em relação aos níveis de HDL, a interação sexo**Bst*UI

apresentou um efeito estatisticamente significativo ($p=0.021$), ou seja, este polimorfismo influenciou os níveis de HDL somente nas mulheres, em média as mulheres heterozigotas para este sítio apresentaram níveis de HDL mais altos que as homozigotas B-selvagem/B-selvagem (figura IV.1).

Na tabela IV.6 estão apresentadas as médias dos níveis lipídicos agrupados por genótipo e atividade física. A interação sedentarismo**Bst*UI não apresentou influência sobre as concentrações de lipídios plasmáticos.

O efeito da interação fumo**Bst*UI sobre os níveis de lipídicos está representado na tabela IV.7. Não foi detectado efeito significativo desta interação sobre os níveis de colesterol total, LDL e triglicerídeos. Mas a interação fumo**Bst*UI influenciou significativamente os níveis de HDL ($p=0.008$), os heterozigotos não fumantes apresentaram níveis de HDL superiores aos homozigotos 11 também não fumantes, enquanto os heterozigotos fumantes apresentaram níveis de HDL um pouco menores que os homozigotos 11 também fumantes (figura IV.2).

Tabela IV.5: Efeito dos genótipos do sítio *Bst*UI e do sexo sobre os níveis lipídicos.

SEXO	<i>Bst</i>UI	Média ± DP	N	Interação	p		
Col. Total (mg/dl)							
feminino	11	176 ± 33.4	119	sexo* <i>Bst</i> UI	0.582		
	12	197 ± 23.7	11				
masculino	11	200 ± 42.6	148				
	12	218 ± 54.0	10				
LDL (mg/dl)							
feminino	11	108 ± 29.2	118			sexo* <i>Bst</i> UI	1.000
	12	117 ± 32.5	11				
masculino	11	129 ± 37.6	143				
	12	138 ± 41.9	10				
HDLaj (mg/dl)							
feminino	11	47 ± 10.4	119	sexo* <i>Bst</i> UI	0.021		
	12	57 ± 14.7	11				
masculino	11	41 ± 10.1	148				
	12	41 ± 6.5	10				
TRI (mg/dl)							
feminino	11	99 ± 50	118			sexo* <i>Bst</i> UI	0.208
	12	90 ± 23	10				
masculino	11	126 ± 65	137				
	12	173 ± 95	10				

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos.

Tabela IV.6: Efeito dos genótipos do sítio *Bst*UI e da atividade física sobre os níveis lipídicos.

ATIVIDADE FÍSICA	<i>Bst</i>UI	Média ± DP	N	Interação	p		
Col. Total (mg/dl)							
não sedentário	11	198 ± 46.4	111	sedentar* <i>Bst</i> UI	0.098		
	12	189 ± 35.1	11				
sedentário	11	191 ± 40.8	191				
	12	229 ± 38.5	13				
LDL (mg/dl)							
não sedentário	11	126 ± 39.1	107			sedentar* <i>Bst</i> UI	0.349
	12	119 ± 33.1	11				
sedentário	11	121 ± 36.0	188				
	12	141 ± 40.5	13				
HDLaj (mg/dl)							
não sedentário	11	46 ± 10.4	111	sedentar* <i>Bst</i> UI	0.077		
	12	47 ± 11.4	11				
sedentário	11	43 ± 10.8	191				
	12	53 ± 15.4	13				
TRI (mg/dl)							
não sedentário	11	111 ± 60	102			sedentar* <i>Bst</i> UI	0.450
	12	116 ± 70	11				
sedentário	11	124 ± 67	185				
	12	139 ± 83	12				

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos

Tabela IV.7: Efeito dos genótipos do sítio *Bst*UI e do fumo sobre os níveis lipídicos.

FUMO	<i>Bst</i>UI	Média ± DP	N	Interação	p
Col. Total (mg/dl)					
não fumante	11	195 ± 45.1	206		
	12	213 ± 41.6	19		
fumante	11	194 ± 41.8	101	fumo* <i>Bst</i> UI	0.392
	12	188 ± 28.3	5		
LDL (mg/dl)					
não fumante	11	124 ± 38.9	200		
	12	130 ± 39.8	19		
fumante	11	121 ± 35.5	100	fumo* <i>Bst</i> UI	0.695
	12	126 ± 27.2	5		
HDLaj (mg/dl)					
não fumante	11	44 ± 10.5	206		
	12	54 ± 13.1	19		
fumante	11	44 ± 11.5	101	fumo* <i>Bst</i> UI	0.008
	12	38 ± 4.5	5		
TRI (mg/dl)					
não fumante	11	116 ± 60.4	196		
	12	123 ± 78.8	18		
fumante	11	125 ± 67.3	95	fumo* <i>Bst</i> UI	0.766
	12	113 ± 30.4	5		

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos

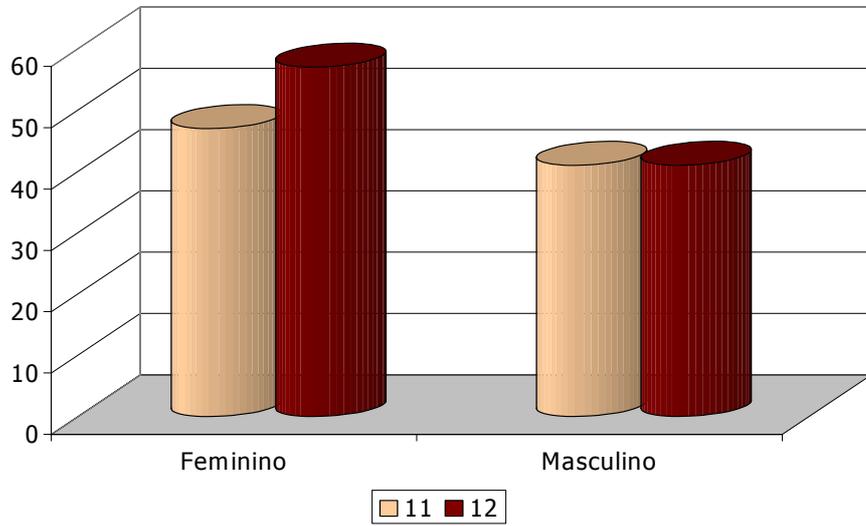


Figura IV.1: Efeito da interação sexo**BstUI* sobre os níveis de HDL.

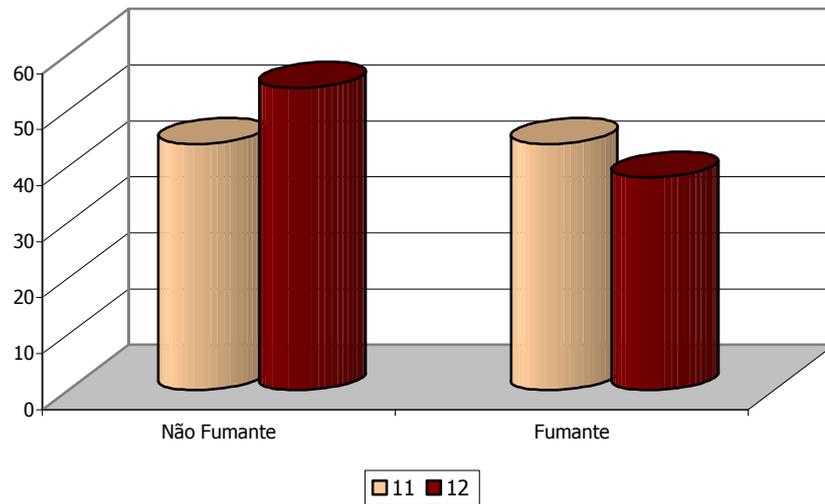


Figura IV.2: Efeito da interação fumo**BstUI* sobre os níveis de HDL.

IV.1.3.1.2- Sítio *PvuII*

A tabela IV.8 mostra as médias dos níveis lipídicos separadas por sexo e pela presença do alelo P1 do sítio *PvuII*, os genótipos P1P1 e P1P2 foram agrupados para a análise porque as médias dos níveis lipídicos entre estes dois grupos foram muito semelhantes. A interação sexo**PvuII* não influenciou significativamente os níveis de colesterol total, LDL e triglicerídeos. Mas influenciou as concentrações plasmáticas de HDL ($p=0.003$), as mulheres portadoras de ao menos um alelo P1 apresentaram níveis de HDL maiores que as não portadoras. O efeito deste polimorfismo para os homens foi bem menor e na direção contrária, ou seja, portadores do alelo P1 apresentaram níveis de HDL um pouco menores que os não portadores (figura IV.3).

O efeito da interação sedentarismo**PvuII* está representado na tabela IV.9, não foi observado efeito significante desta interação com colesterol total, LDL e triglicerídeos. Para os níveis de HDL a interação sedentarismo**PvuII* apresentou efeito estatisticamente significativo ($p=0.022$), indivíduos homocigotos P2/P2 e não sedentários apresentaram níveis de HDL superiores aos não sedentários portadores do alelo P1, ao passo que os homocigotos P2/P2 e sedentários apresentaram níveis de HDL um pouco inferiores aos níveis observados nos sedentários portadores do alelo P1 (figura IV.4).

Nenhum efeito significativo sobre concentrações de lipídios plasmáticos foi constatado pela interação fumo**PvuII* (tabela IV.10).

Tabela IV.8: Efeito da presença do alelo P1 do sítio *PvuII* e do sexo sobre os níveis lipídicos.

SEXO	<i>PvuII</i>	Média ± DP	N	Interação	p
Col. Total (mg/dl)					
feminino	11 e 12	182 ± 32.9	85	sexo* <i>PvuII</i>	0.538
	22	170 ± 32.4	45		
masculino	11 e 12	203 ± 45.5	106		
	22	196 ± 38.7	52		
LDL (mg/dl)					
feminino	11 e 12	112 ± 29.4	85	sexo* <i>PvuII</i>	0.974
	22	104 ± 29.3	44		
masculino	11 e 12	131 ± 38.4	102		
	22	125 ± 36.7	51		
HDLaj (mg/dl)					
feminino	11 e 12	49 ± 11.5	85	sexo* <i>PvuII</i>	0.003
	22	44 ± 9.7	45		
masculino	11 e 12	40 ± 8.7	106		
	22	43 ± 11.7	52		
TRI (mg/dl)					
feminino	11 e 12	97 ± 51.8	84	sexo* <i>PvuII</i>	0.186
	22	99 ± 40.3	44		
masculino	11 e 12	133 ± 72.1	97		
	22	121 ± 60.4	50		

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos

Tabela IV.9: Efeito da presença do alelo P1 do sítio *PvuII* e da atividade física sobre os níveis lipídicos.

ATIVIDADE FÍSICA	<i>PvuII</i>	Média ± DP	N	Interação	p		
Col. Total (mg/dl)							
não sedentário	11 e 12	198 ± 48.4	80	sedentar* <i>PvuII</i>	0.479		
	22	196 ± 39.7	42				
sedentário	11 e 12	197 ± 41.8	135				
	22	186 ± 41.3	69				
LDL (mg/dl)							
não sedentário	11 e 12	126 ± 40.2	77			sedentar* <i>PvuII</i>	0.639
	22	124 ± 35.7	41				
sedentário	11 e 12	125 ± 36.1	133				
	22	118 ± 37.4	68				
HDLaj (mg/dl)							
não sedentário	11 e 12	44 ± 10.6	80	sedentar* <i>PvuII</i>	0.022		
	22	48 ± 9.8	42				
sedentário	11 e 12	44 ± 11.4	135				
	22	42 ± 11.3	69				
TRI (mg/dl)							
não sedentário	11 e 12	117 ± 66.3	72			sedentar* <i>PvuII</i>	0.173
	22	103 ± 49.9	41				
sedentário	11 e 12	126 ± 71.9	130				
	22	126 ± 62.6	67				

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos

Tabela IV.10: Efeito da presença do alelo P1 do sítio *PvuII* e do fumo sobre os níveis lipídicos.

FUMO	<i>PvuII</i>	Média ± DP	N	Efeito	p
Col. Total (mg/dl)					
não fumante	11 e 12	201 ± 45.6	145	fumo* <i>PvuII</i>	0.281
	22	189 ± 43.5	80		
fumante	11 e 12	194 ± 44.1	73		
	22	193 ± 34.3	33		
LDL (mg/dl)					
não fumante	11 e 12	127 ± 38.8	142	fumo* <i>PvuII</i>	0.968
	22	121 ± 39.1	78		
fumante	11 e 12	124 ± 37.1	72		
	22	118 ± 30.2	33		
HDLaj (mg/dl)					
não fumante	11 e 12	45 ± 11.2	145	fumo* <i>PvuII</i>	0.107
	22	44 ± 10.7	80		
fumante	11 e 12	42 ± 10.8	73		
	22	46 ± 12.3	33		
TRI (mg/dl)					
não fumante	11 e 12	121 ± 66.9	136	fumo* <i>PvuII</i>	0.193
	22	111 ± 56.3	78		
fumante	11 e 12	122 ± 66.9	69		
	22	132 ± 63.9	31		

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos

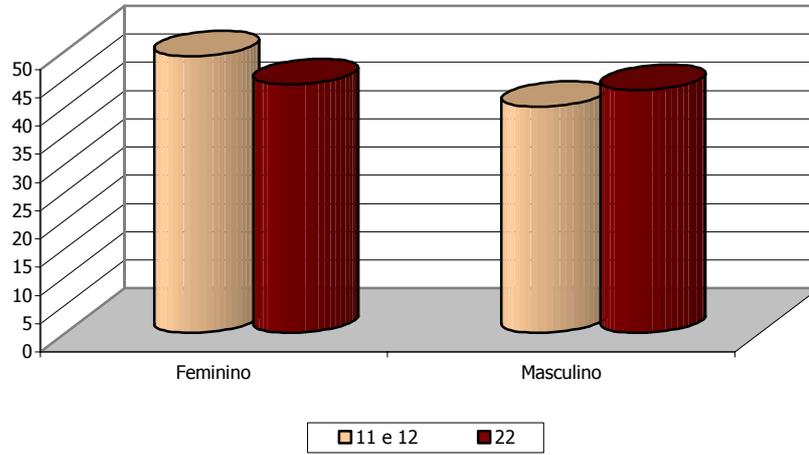


Figura IV.3: Efeito da interação sexo**PvuII* sobre os níveis de HDL.

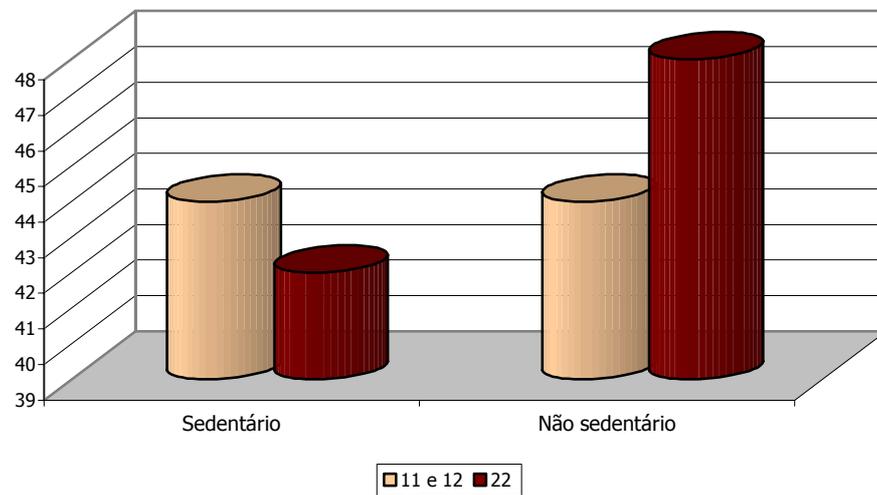


Figura IV.4: Efeito da interação sedentarismo**PvuII* sobre os níveis de HDL.

IV.1.3.1.3- Sítio *Xba*I

As tabelas IV.11 e IV.12 mostram as médias dos níveis lipídicos separados por sexo e presença do alelo X2 do sítio *Xba*I e por atividade física e presença X2, respectivamente. Não foi constatado nenhum efeito significativo da interação sexo**Xba*I e sedentarismo**Xba*I sobre as concentrações de lipídios plasmáticos.

A interação fumo**Xba*I não apresentou influência significativa sobre os níveis de colesterol total, LDL e HDL (tabela IV.13). No entanto, a interação fumo**Xba*I apresentou efeito significativo sobre os níveis de triglicerídeos ($p=0.041$), fumantes portadores do alelo X2 apresentaram níveis de triglicerídeos superiores aos fumantes homocigotos X1/X1 (figura IV.5).

IV.1.3.2- Análises Haplotípicas

A análise do efeito dos haplótipos sobre os níveis lipídicos foi executada apenas na amostra total devido à baixa frequência de alguns haplótipos. O haplótipo 2-1-2 presente em apenas 3% da população estudada foi o único haplótipo que apresentou influência sobre os níveis lipídicos (tabela IV.14). Em média, os portadores do haplótipo 2-1-2 apresentaram níveis de CT e HDL maiores que os portadores dos demais haplótipos ($p=0.048$ e $p=0.009$, respectivamente) e níveis de triglicerídeos inferiores ($p=0.019$).

Tabela IV.11: Efeito da presença do alelo X2 do sítio *Xba*I e do sexo sobre os níveis lipídicos.

SEXO	<i>Xba</i>I	Média ± DP	N	Interação	p		
Col. Total(mg/dl)							
feminino	11	171 ± 47.8	11	sexo* <i>Xba</i> I	0.216		
	12 e 22	178 ± 31.6	119				
masculino	11	204 ± 41.9	18				
	12 e 22	200 ± 43.7	140				
LDL (mg/dl)							
feminino	11	105 ± 42.2	11			sexo* <i>Xba</i> I	0.174
	12 e 22	110 ± 28.2	118				
masculino	11	133 ± 30.9	18				
	12 e 22	129 ± 38.7	135				
HDLaj (mg/dl)							
feminino	11	50 ± 14.1	11	sexo* <i>Xba</i> I	0.553		
	12 e 22	47 ± 10.9	119				
masculino	11	41 ± 9.6	18				
	12 e 22	41 ± 9.9	140				
TRI (mg/dl)							
feminino	11	80 ± 24.7	11			sexo* <i>Xba</i> I	0.678
	12 e 22	100 ± 49.4	117				
masculino	11	125 ± 84.0	16				
	12 e 22	130 ± 66.6	131				

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos

Tabela IV.12: Efeito da presença do alelo X2 do sítio *Xba*I e da atividade física sobre os níveis lipídicos.

ATIVIDADE FÍSICA	<i>Xba</i>I	Média ± DP	N	Interação	p
Col. Total (mg/dl)					
não sedentário	11	196 ± 42.1	14	sedentar* <i>Xba</i> I	0.578
	12 e 22	198 ± 45.5	108		
sedentário	11	189 ± 43.4	21		
	12 e 22	194 ± 41.8	183		
LDL (mg/dl)					
não sedentário	11	123 ± 36.0	14	sedentar* <i>Xba</i> I	0.891
	12 e 22	126 ± 39.0	104		
sedentário	11	122 ± 34.2	21		
	12 e 22	122 ± 36.9	180		
HDLaj (mg/dl)					
não sedentário	11	47 ± 13.3	14	sedentar* <i>Xba</i> I	0.547
	12 e 22	46 ± 10.1	108		
sedentário	11	42 ± 9.8	21		
	12 e 22	43 ± 11.5	183		
TRI (mg/dl)					
não sedentário	11	125 ± 64.7	13	sedentar* <i>Xba</i> I	0.091
	12 e 22	110 ± 60.6	100		
sedentário	11	105 ± 69.9	20		
	12 e 22	128 ± 68.4	177		

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos

Tabela IV.13: Efeito da presença do alelo X2 do sítio *Xba*I e do fumo sobre os níveis lipídicos.

FUMO	<i>Xba</i>I	Média ± DP	N	Interação	p
Col. Total (mg/dl)					
não fumante	11	198 ± 35.1	21		
	12 e 22	197 ± 46.1	204		
fumante	11	177 ± 48.0	14	fumo* <i>Xba</i> I	0.064
	12 e 22	196 ± 39.7	92		
LDL (mg/dl)					
não fumante	11	128 ± 25.2	21		
	12 e 22	124 ± 40.1	199		
fumante	11	109 ± 39.5	14	fumo* <i>Xba</i> I	0.060
	12 e 22	124 ± 34.1	91		
HDLaj (mg/dl)					
não fumante	11	43 ± 9.9	21		
	12 e 22	45 ± 11.1	204		
fumante	11	45 ± 13.5	14	fumo* <i>Xba</i> I	0.434
	12 e 22	43 ± 11.0	92		
TRI (mg/dl)					
não fumante	11	123 ± 76.8	20		
	12 e 22	117 ± 61.9	194		
fumante	11	95 ± 46.7	13	fumo* <i>Xba</i> I	0.041
	12 e 22	129 ± 67.4	87		

DP: desvio padrão; TRI: triglicerídeos; N: número de indivíduos

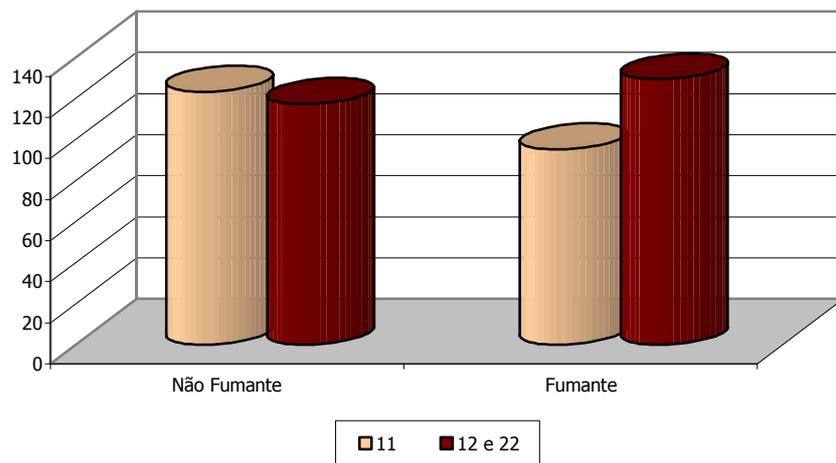


Figura IV.5: Efeito da interação fumo* *XbaI* sobre os níveis de triglicerídeos.

Tabela IV.14: Efeito da presença do haplótipo 2-1-2 (5'-*Bst*UI-*Pvu*II-*Xba*I-3') sobre os níveis lipídicos.

	Portadores 2-1-2			Não portadores 2-1-2			p
	Média	DP	n	Média	DP	n	
Col. Total (mg/dl)	212	39.6	20	196	44.4	327	0.048
LDL (mg/dl)	135	38.4	20	124	38.1	320	0.156
HDLaj (mg/dl)	51	12.8	20	44	10.9	327	0.009
TRI (mg/dl)	115	72.1	19	123	65.7	311	0.019

DP: desvio padrão; n: número de indivíduos

IV.2 – PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA ATEROSCLERÓTICA E SEUS CONTROLES

IV.2.1 - CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DE PACIENTES COM CARDIOPATIA E CONTROLES

As médias dos níveis lipídicos, IMC e idade, bem como as proporções de mulheres no climatério, fumantes, ex-fumantes, sedentários, hipertensos e diabéticos nas amostras de pacientes com cardiopatia e controle para cardiopatia estão na tabela IV.15. As médias dos níveis lipídicos, IMC e idade não diferiram entre as amostras, as prevalências de mulheres no climatério, fumantes, sedentários e diabéticos também não foram diferentes. No entanto, a amostra de cardiopatas possui menos mulheres que a amostra controle ($p < 0.001$), mais ex-fumantes ($p < 0.001$) e hipertensos ($p < 0.001$).

IV.2.2- ANÁLISES UNI-LOCO

IV.2.2.1 - Avaliação de Risco para Cardiopatia

Na tabela IV.16 estão representadas as frequências alélicas e genotípicas dos três polimorfismos estudados na amostra de cardiopatas e seus controles. O alelo B-variante do sítio *Bst*UI esteve presente em 7% dos cromossomos da amostra de pacientes com cardiopatia e em apenas 3.5% dos cromossomos da amostra controle ($p = 0.038$) (figura IV.6).

O alelo P1 do sítio *Pvu*II e o alelo X1 do sítio *Xba*I também foram mais prevalentes em cardiopatas (41 e 32% dos cromossomos, respectivamente) do que na amostra controle (37 e 29%, respectivamente), no entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Tabela IV.15: Caracterização das amostras de cardiopatas e controles para cardiopatia.

	Cardiopatas		Controles		p
	Média ± DP	n	Média ± DP	n	
Col. Total (mg/dl)	218 ± 48.5	346	220 ± 51.3	143	0.622
LDL (mg/dl)	143 ± 41.2	346	143 ± 45.3	140	0.932
HDL (mg/dl)	43 ± 11.5	351	43 ± 12.1	143	0.769
Triglicerídeos (mg/dl)	163 ± 92.2	352	172 ± 109.8	143	0.371
IMC (kg/m ²)	28 ± 4.5	348	27 ± 3.9	134	0.428
Idade (anos)	60 ± 11.2	352	58 ± 9.9	143	0.088
Sexo (mulheres - %)	39	138	56	80	<0.001
Climatério (%)	82	113	87	65	0.441
Fumantes (%)	32	111	26	35	0.226
Ex-fumantes (%)	25	86	0.7	1	<0.001
Sedentarismo (%)	64	220	62	66	0.728
Hipertensão (%)	63	221	37	52	<0.001
Diabéticos (%)	16	57	15	19	0.779

DP: desvio padrão; n: número de indivíduos

Tabela IV.16: Frequências alélicas e genotípicas para os sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I na amostra de pacientes com cardiopatia e seus controles.

Sítios	Cardiopatas			Controles			p
	Frequências alélicas			Frequências genotípicas			
	1	2	22	11	12	22	
<i>Bst</i> UI	0.930			0.930	0.070	0.000	0.038
<i>Pvu</i> II	0.412			0.119	0.503	0.378	0.252
<i>Xba</i> I	0.325			0.056	0.476	0.469	0.366

1: sítio de restrição ausente; 2: sítio de restrição presente.

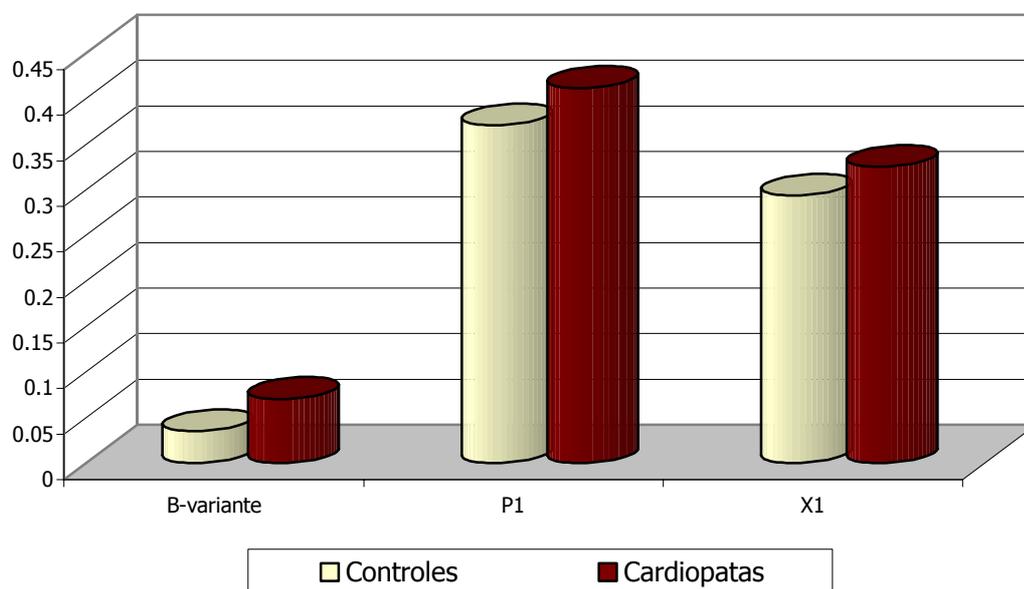


Figura IV.6: Frequências alélicas dos sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I nas amostras de controles para cardiopatia e cardiopatas. Controles X Cardiopatas: *Bst*UI: p=0.038; *Pvu*II: p=0.252 e *Xba*I: p=0.366.

As freqüências genótípicas observadas para estes três sítios estão demonstradas na figura IV.7, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as duas amostras, apesar de uma maior freqüência dos portadores de B-variante na amostra de pacientes com cardiopatia do que na amostra controle. O "odds ratio" (OR) calculado para os indivíduos portadores do alelo B-variante foi 2.11 (CI 95%:1.04-4.30; $p=0.039$).

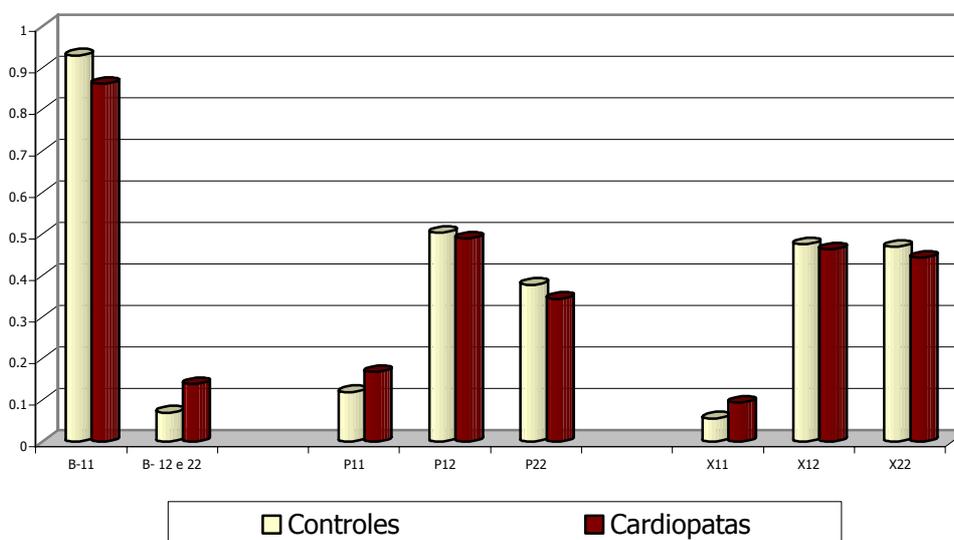


Figura IV.7: Freqüências genótípicas dos sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I nas amostras de controles e cardiopatas. Controles X Cardiopatas: *Bst*UI: $p=0.066$; *Pvu*II: $p=0.386$ e *Xba*I: $p=0.398$.

IV.2.2.2- Avaliação de Gravidade da Cardiopatia

As freqüências alélicas observadas para os sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I nos indivíduos CAD⁺ e CAD⁻ estão demonstradas na figura IV.8. O alelo B-variante foi estatisticamente mais freqüente entre os indivíduos CAD⁺ (8%) do que entre os CAD⁻ (3%) ($p=0.017$).

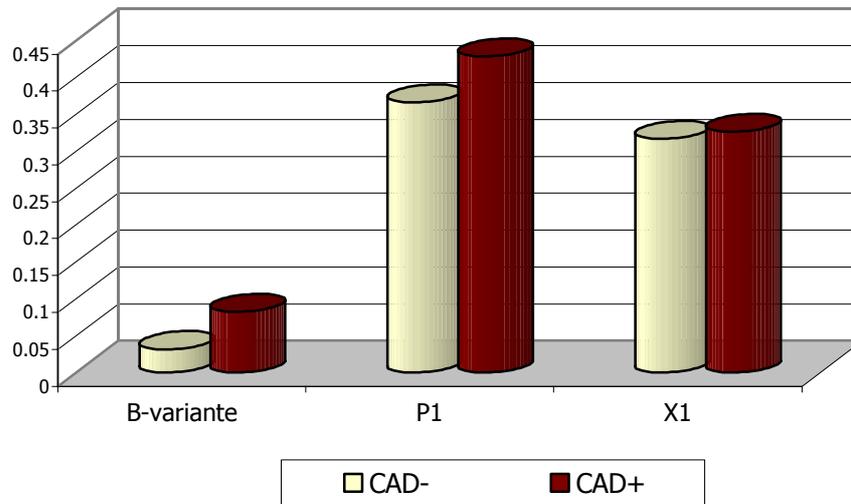


Figura IV.8: Frequências alélicas dos sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I nas amostras de CAD⁺ e CAD⁻. CAD⁺ X CAD⁻: *Bst*UI: p=0.017; *Pvu*II: p=0.130 e *Xba*I: p=0.860.

Na figura IV.9 estão representados os genótipos dos três sítios nos indivíduos CAD⁻ e CAD⁺, o genótipo P1/P1 foi mais prevalente na amostra CAD⁺ estando presente em 20% dos indivíduos, enquanto na amostra CAD⁻ esteve presente em apenas 10%, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. O genótipo B-selvagem/B-selvagem foi significativamente mais freqüente entre os CAD⁻ (p=0.023). O OR calculado para a portadores do alelo B-variante foi 2.82 (CI 95%:1.20-6.60; p=0.017).

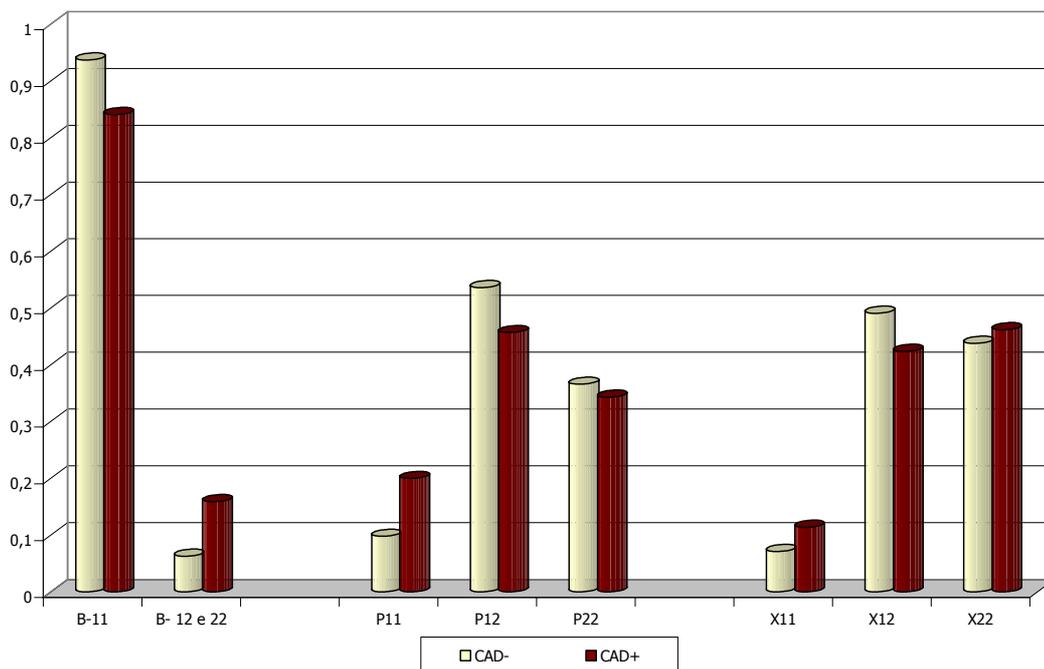


Figura IV.9: Frequências genotípicas dos sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I nas amostras de CAD⁻ e CAD⁺. CAD⁻ X CAD⁺: *Bst*UI: p=0.023; *Pvu*II: p=0.055 e *Xba*I: p=0.349.

IV.2.3- ANÁLISES HAPLOTÍPICAS

IV.2.3.1 - Avaliação de Risco para Cardiopatia

A frequência haplotípica nas amostras de controles e de cardiopatas estão na tabela IV.17, em ambas amostras o haplótipo mais prevalente foi o 1-2-2. Na amostra de pacientes com cardiopatia sete dos oito haplótipos possíveis foram encontrados, enquanto na amostra controle apenas quatro haplótipos foram detectados, provavelmente devido ao tamanho da amostra. Quando analisadas as frequências dos portadores de cada haplótipo *versus* os demais, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as duas amostras. No entanto, houve diminuição da frequência do haplótipo 1-2-2 e aumento da frequência do haplótipo 2-1-2 na amostra de

cardiopatas, embora estas diferenças tenham sido não significantes (figura IV.10).

Tabela IV.17: Frequência dos haplótipos 5'-*Bst*UI-*Pvu*II-*Xba*I-3' nas amostras de cardiopatas e seus controles.

Haplótipos	Controles (n=142)		Cardiopatas (n=348)	
	n	freqüência	n	freqüência
1-1-1	83	0.2923	221	0.3175
1-1-2	12	0.0422	20	0.0287
1-2-1	0	0.0000	2	0.0029
1-2-2	179	0.6303	405	0.5819
2-1-2	10	0.0352	44	0.0632
2-2-1	0	0	2	0.0029
2-2-2	0	0	2	0.0029

n: número de indivíduos

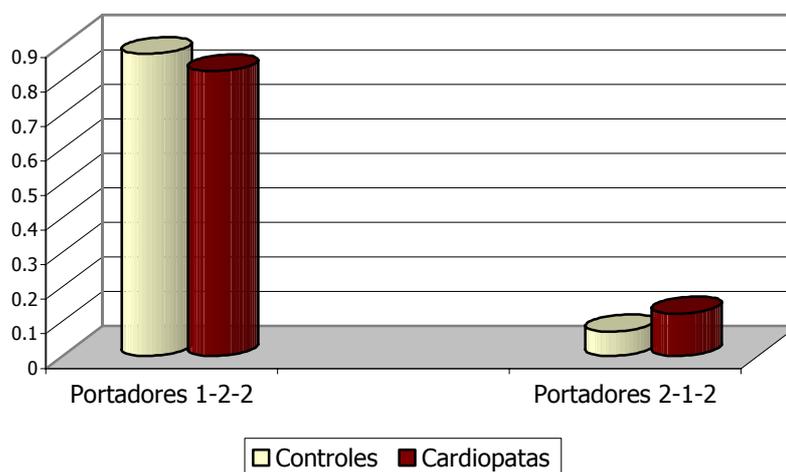


Figura IV.10: Frequência dos portadores dos haplótipos 1-2-2 e 2-1-2 (5'-*Bst*UI-*Pvu*II-*Xba*I-3') nas amostras de controles e cardiopatas. Controles X Cardiopatas: haplótipo 1-2-2: p=0.180 e haplótipo 2-1-2: p=0.108.

IV.2.3.2- Avaliação de Gravidade da Cardiopatia

A frequências haplotípicas nas amostras de CAD⁺ e CAD⁻ estão na tabela IV.18. Os portadores dos haplótipos 1-2-2 foram menos frequentes na amostra de CAD⁺ do que na amostra CAD⁻ (p=0.029) o OR calculado foi 0.4661 (CI 95%: 0.23 – 0.92; p= 0.029). Os portadores do haplótipo 2-1-2 foram mais frequentes na amostra CAD⁺ (p=0.042), o OR calculado foi 2.50 (CI 95%: 1.06-5.89; p=0.036) (figura IV.11). Não houve diferença estatisticamente significativa com relação a presença dos demais haplótipos.

Tabela IV.18: Frequência dos haplótipos 5´-*Bst*UI-*Pvu*II-*Xba*I-3´ nas amostras de CAD⁺ e CAD⁻.

Haplótipos	CAD⁻ (n=111)		CAD⁺ (n=207)	
	n	freqüência	n	freqüência
1-1-1	72	0.3214	129	0.3116
1-1-2	4	0.0179	14	0.0338
1-2-1	0	0.0000	2	0.0048
1-2-2	139	0.6205	235	0.5677
2-1-2	7	0.0313	32	0.0773
2-2-1	0	0.0000	1	0.0024
2-2-2	0	0.0000	1	0.0024

n: número de indivíduos

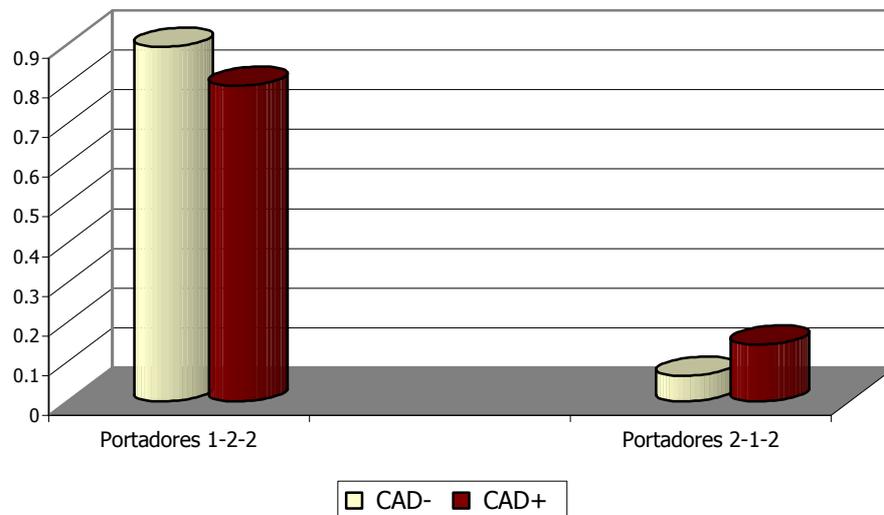


Figura IV.11: Frequência dos portadores dos haplótipos 1-2-2 e 2-1-2 (5'-*Bst*UI-*Pvu*II-*Xba*I-3') nas amostras CAD⁺ e CAD⁻. CAD⁺ e CAD⁻: haplótipo 1-2-2: p=0.029 e haplótipo 2-1-2: p=0.042.

V – DISCUSSÃO

V.1 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO COM NÍVEIS LIPÍDICOS

As freqüências alélicas obtidas para os polimorfismos *PvuII* e *XbaI* na amostra da população de Porto Alegre (tabela IV.2) foram semelhantes as freqüências encontradas em outros grupos de caucasóides (ANDERSEN e cols.,1994; WEEL e cols.,1999; VANDEVYVER e cols.,1999; DENG e cols.,2000) (tabela I.2). O alelo B-variante (sítio *BstUI* presente) foi mais prevalente entre caucasóides norte-americanos (cerca de 15%) (BERKOWITZ e cols.,1994; DENG e cols.,2000) do que na população estudada (4%). Porém, como apenas dois trabalhos descrevem a freqüência deste polimorfismo em caucasóides, e ambos se concentram em populações norte americanas, não é possível concluir se as freqüências encontradas na população de Porto Alegre diferem realmente das freqüências esperadas para populações caucasóides.

A investigação do efeito de polimorfismos no gene do receptor de estrógenos presume "*a priori*" que variantes gênicas possam direta ou indiretamente resultar em alteração na expressão ou na afinidade do receptor pelo seu ligante e, conseqüentemente, modificações na ação hormonal. Conforme mencionado na Introdução dessa Dissertação, o estrógeno apresenta influência sobre o metabolismo lipídico, presume-se então que esta influência seja maior entre as mulheres do que entre os homens. Como já esperávamos um maior efeito dos polimorfismos sobre os níveis lipídicos em mulheres no período reprodutivo, para a análise do efeito da interação sexo*genótipo foram excluídas as mulheres no climatério, devido à redução fisiológica da quantidade deste hormônio em mulheres nesta fase. Os resultados obtidos neste trabalho com relação aos níveis de

HDL e a interação sexo**Bst*UI e sexo**Pvu*II corroboram esta hipótese, pois para o sítio *Bst*UI detectamos modificação nos níveis de HDL apenas nas mulheres (figura IV.1). Já no polimorfismo *Pvu*II, a magnitude da modificação nos níveis desta lipoproteína foi maior nas mulheres do que nos homens (figura IV.3).

O efeito do polimorfismo *Bst*UI sobre os níveis de HDL pode ter ocorrido pela própria mutação, pois a seqüência não mutada (B-selvagem) GCG codifica alanina mais raramente (7.1% dos casos) do que a seqüência mutada (B-variante) GCC (29.5%) (revisão em LEHRER e cols.,1993), estes dados nos levam a pensar na possibilidade de uma maior expressão do alelo B-variante do que do alelo B-selvagem. Além disso, como já vimos os níveis de HDL aumentam sob ação do estrógeno e os indivíduos portadores de B-variante apresentaram níveis de HDL superiores aos não portadores, o que reforça a idéia de uma maior ação do estrógeno nos indivíduos portadores da mutação. Porém, somente um estudo da expressão gênica destes diferentes alelos pode confirmar ou descartar esta hipótese.

No entanto, os polimorfismos no sítio *Bst*UI e nos demais sítios estudados, *Pvu*II e *Xba*I, podem ser apenas marcadores moleculares, ou seja, estarem em desequilíbrio de ligação com algum outro polimorfismo que altere a expressão ou a estrutura do receptor. Na região 5' "upstream" do exon 1, há um polimorfismo de microsatélite (TA)_n. BECHERINI e cols. (2000) relataram um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos *Xba*I e *Pvu*II com este microsatélite, um alto grau de coincidência entre os alelos curtos do microsatélite e a presença do sítio de restrição para estes dois sítios foi observado. O polimorfismo (TA)_n foi associado com o risco de desenvolvimento de osteoporose e gravidade de cardiopatia (KUNNAS e cols.,2000) e foi sugerido, que por estar em uma região regulatória, este polimorfismo pode alterar a taxa de transcrição do gene.

Os sítios *Pvu*II e *Xba*I estão localizados em introns, e podem alterar a expressão ou estrutura do gene por alterar o "splicing" do pré-mRNA ou por

estarem em desequilíbrio de ligação com o microssatélite (TA)_n ou com algum outro polimorfismo neste gene. Os três polimorfismos estudados localizam-se em uma região da proteína responsável pela ativação transcricional de genes que possuem elementos de resposta ao estrógeno (KUMAR e cols.,1987), desta forma se algum dos polimorfismos ocasionar mudança na estrutura protéica do receptor, provavelmente modificaria o perfil de ativação transcricional destes genes.

A reposição estrogênica em mulheres no climatério proporciona redução de colesterol total e LDL e aumento dos níveis de triglicerídeos e HDL (revisão em GODSLAND, 2001). Deste modo seria esperado que modificações no gene do receptor de estrógeno, que proporcionem uma maior ou menor ação deste hormônio, levariam a alterações em todos os níveis lipídicos. No entanto, nesta mesma revisão foi constado que variações nas doses de estrógenos equinos conjugados administrados apresentavam maior efeito na magnitude da variação dos níveis de HDL e triglicerídeos, enquanto o efeito nos níveis de LDL permaneceu o mesmo. Segundo revisão em WALSH e cols. (1998) e LAMON-FAVA (2000b), um modulador seletivo do receptor de estrógeno (raloxifeno) ocasiona redução nos níveis de colesterol total e LDL, mas praticamente não modifica os níveis de HDL e triglicerídeos. Estas observações sugerem que o estrógeno atua no metabolismo do colesterol total e LDL diferentemente do modo que atua no metabolismo de HDL e triglicerídeos.

PARINI e cols. (2000) demonstraram em fêmeas de ratos que doses fisiológicas de 17β-estradiol aumentaram os níveis de apo-AI e HDL e ainda estimularam a atividade da colesterol 7α-hidroxilase, enzima que faz a conversão de colesterol à ácido biliar enquanto que o aumento da expressão dos receptores de LDL hepáticos e conseqüente redução do colesterol plasmático requerem doses farmacológicas deste hormônio. Estes mesmos autores sugerem que a expressão de LDLR hepático não estaria sob controle do estrógeno endógeno, pois a estimulação do estrógeno administrado pode

ser bloqueada pela administração de anti-estrógeno, mas a administração somente de anti-estrógeno não modifica a expressão do LDLR. Segundo OHLSSON e cols. (2000), o controle da expressão dos receptores de LDL, em camundongos, não depende dos receptores estrogênicos.

OHLSSON e cols. (2000) demonstraram que ação do estrógeno sobre os níveis de HDL em camundongos é dependente do $RE\alpha$ e os dados obtidos neste trabalho sugerem que ao menos parte da ação do estrógeno sobre os níveis desta lipoproteína em humanos também depende do $RE\alpha$. Dois possíveis mecanismos de ação deste hormônio no metabolismo da HDL já foram relatados na Introdução desta Dissertação: o aumento da produção de apo-AI (LAMON-FAVA, 2000a) ou diminuição da expressão do receptor SR-B1 no fígado (LANSCHULZ e cols.,1996). No entanto, o mecanismo ou mecanismos precisos de influência do estrógeno sobre a HDL ainda não foram determinados.

Os níveis lipídicos são características multifatoriais onde muitos fatores contribuem para sua determinação, porém cada fator isoladamente apresenta um pequeno efeito. Deste modo, a análise de mais de um fator conjuntamente pela análise fatorial possibilita a detecção de pequenos efeitos. Diversos estudos descrevem que fatores exógenos, como a atividade física, hábitos alimentares, fumo, ingestão de álcool e medicamentos, assim como características genéticas contribuem para a determinação dos lipídicos séricos (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM,1990 e 1995). Embora os resultados ainda não sejam muito consistentes, revisão em STEFANICK (1999) demonstrou que a atividade física associada a uma dieta hipocalórica e com ingestão de baixo percentual de gordura, melhora os níveis de HDL e triglicerídeos em homens e mulheres normocolesterolêmicos e ainda reduz os níveis de LDL nos indivíduos hipercolesterolêmicos. Segundo FREEMAN e cols. (1993), o fumo proporciona aumento dos níveis de LDL e triglicerídeos e redução de HDL (principalmente redução da fração HDL_2) em indivíduos saudáveis. Os mecanismos bioquímicos pelos quais

estas modificações plasmáticas ocorrem ainda não estão esclarecidos, mas os dados obtidos por estes pesquisadores sugerem que: (a) em mulheres as mudanças observadas nos níveis de HDL são ocasionadas por alterações nos triglicerídeos; (b) nos homens o mecanismo que altera os níveis de HDL é triglicerídeos-independente e (c) as mudanças nos níveis de LDL, em ambos os sexos, são totalmente explicadas por variações nos níveis de triglicerídeos. Os níveis de HDL podem ser modificados de forma triglicerídeos-independente, por um aumento da atividade da lipase hepática, que converte HDL₂ à HDL₃ ou pode envolver a proteína de transferência de ésteres de colesterol.

Neste trabalho analisamos a ação, sobre as concentrações de lipídios séricos, de fatores exógenos como a prática de esportes e o fumo conjuntamente com os genótipos dos três polimorfismos no gene do RE α . Analisando o efeito da interação sedentarismo*genótipo detectamos um efeito importante da interação sedentarismo**PvuII* com os níveis de HDL (figura IV.4). Destacando um efeito do genótipo P2/P2 na elevação dos níveis desta lipoproteína em indivíduos que praticam esportes, enquanto que sedentários portadores do mesmo genótipo apresentaram uma pequena redução nos níveis de HDL.

A interação fumo**BstUI* também foi importante sobre os níveis de HDL (figura IV.2), os portadores do alelo B-variante não fumantes apresentaram níveis de HDL mais altos, enquanto que os fumantes portadores do alelo B-variante apresentaram níveis desta lipoproteína um pouco mais baixos.

Embora variações fisiológicas de estrógeno influenciem tanto a HDL como os triglicerídeos, o efeito dos polimorfismos sobre os níveis de triglicerídeos foi bem menos consistente que o efeito sobre a HDL. Apenas a abordagem fumo**XbaI* foi significativa sobre os níveis de triglicerídeos (figura IV.5), isto ocorreu provavelmente porque este lipídio sérico é mais facilmente influenciado por fatores exógenos que a HDL. HOMMA e cols. (2000)

encontraram um elemento de resposta negativa via proteína da família AP1 no promotor da lipoproteína lipase (LPL), ou seja, uma seqüência que inibe a transcrição do gene da LPL na presença de estrógeno e que consequentemente propicia aumento nos níveis de triglicerídeos.

A análise de haplótipos representa uma maior contribuição genética e, provavelmente, por este motivo foram detectados efeitos sobre os níveis de colesterol total, HDL e triglicerídeos nos portadores do haplótipo 2-1-2, mesmo sem a análise da contribuição de fatores exógenos.

Somente um trabalho investigou a associação de polimorfismos no gene do RE α com níveis lipídicos em adultos. MATSUBARA e cols. (1997) analisaram 87 japoneses, homens e mulheres no climatério, para os sítios *PvuII*, *XbaI* e *BstUI*. O sítio *BstUI* foi monomórfico nesta amostra, assim como em outra população asiática estudada por HAN e cols. (1997) e os dois outros sítios não demonstraram influência sobre as concentrações plasmáticas de lipídios. No entanto, este resultado contraditório é facilmente explicado, pois o maior efeito dos polimorfismos no RE α no presente trabalho foi observado em mulheres no período reprodutivo. A análise de associação com os níveis lipídicos também foi realizada na amostra de pacientes com cardiopatia isquêmica aterosclerótica (anexo 6), na qual a maioria das mulheres estão no climatério, e nesta amostra não foi detectada influência destes polimorfismos com as concentrações de lipídios séricos.

V.2 – AVALIAÇÕES DE RISCO E GRAVIDADE PARA CARDIOPATIA

A presença do alelo B-variante do sítio *BstUI* foi considerada um fator de risco para o desenvolvimento de cardiopatia e para maior gravidade da aterosclerose (figuras IV.6 e IV.8), como esta variante foi mais freqüente nos dois grupos de risco, nos cardiopatas quando comparados com os controles

e nos CAD⁺ quando comparados com os CAD⁻, este achado torna-se mais consistente. No entanto, na amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia este mesmo alelo aumentou os níveis de HDL em mulheres no período reprodutivo e também em homens e mulheres não fumantes. Ao contrário dos resultados obtidos, esta alteração benéfica nos níveis de HDL poderia sugerir que este alelo conferisse um efeito protetor para cardiopatia, porém esta aparente contradição pode ser explicada por duas observações: (1) a subfração HDL₂ aumenta sob ação do estrógeno e (2) interação fumo**Bst*UI.

O estrógeno proporciona aumento dos níveis da subfração HDL₂ da HDL, provavelmente por uma redução da atividade da lipase hepática (BAGATELL e cols.,1994; KNOPP e cols.,1994; revisão em LAMON-FAVA, 2000b; NIETO e cols.,2000), esta subfração foi associada com uma redução na incidência de doenças cardiovasculares em alguns trabalhos (revisão em BAGATELL e cols.,1994). No entanto, a HDL₂ possui maior conteúdo de colesterol que a HDL₃, a diferença no conteúdo de colesterol das duas subfrações pode ocorrer pela redução na expressão do receptor SR-B1 no fígado, como ocorre em camundongos (LANSCHULZ e cols.,1996), e caracterizaria uma deficiência no transporte reverso do colesterol. Esta deficiência poderia ser considerada um fator de risco para a cardiopatia. No presente trabalho não foram determinadas as subfrações da HDL para análise de associação, portanto as colocações acima foram feitas com base em resultados de trabalhos previamente publicados.

Na análise de associação com níveis lipídicos detectou-se uma forte interação fumo**Bst*UI com os níveis de HDL (tabela IV.7), onde os não fumantes portadores do alelo B-variante apresentaram elevação dos níveis de HDL, enquanto os fumantes portadores deste mesmo alelo apresentaram até mesmo redução dos níveis desta lipoproteína. Embora as prevalências de fumantes nas amostras de cardiopatas e de seus controles não difiram estatisticamente, há entre os cardiopatas um alto índice de ex-fumantes

(25%), que possivelmente pararam de fumar com o aparecimento dos sintomas da cardiopatia. Enquanto na amostra de controles a prevalência de ex-fumantes é muito baixa (0.7%). Como a maior parte da amostra de cardiopatas é composta por fumantes e ex-fumantes, conjuntamente correspondem a 57% da amostra, possivelmente nestes indivíduos o aumento dos níveis de HDL pela presença do alelo B-variante foi anulado.

Estudos utilizando a reposição hormonal como prevenção ao desenvolvimento de aterosclerose têm sugerido efeitos benéficos (revisão em HERRINGTON, 2000 e STEVENSON, 2000). No entanto, estes estudos são observacionais e alguns autores sugerem que as mulheres que optam pela reposição hormonal são em geral mais jovens, saudáveis, têm melhores condições financeiras e maior escolaridade do que as que não fazem reposição e, portanto, as diferenças observadas entre os dois grupos não sejam apenas efeito da reposição (revisão LAMON-FAVA, 2000b). Segundo revisão em MOSCA e cols. (2001), estudos padronizados, utilizando amostras que não difiram nas características relacionadas acima, foram executados para avaliar o efeito da reposição hormonal como terapia secundária, em mulheres com comprometimento cardíaco, e sugeriram que a reposição não apresenta efeitos benéficos em relação à cardiopatia. No entanto, é preciso ressaltar que a maioria das terapias de reposição hormonal utiliza estrógeno e progestágenos associados, e que falhas na proteção contra aterosclerose pode ser resultado desta combinação, pois alguns trabalhos com animais têm enfatizado um papel importante do estrógeno e principalmente do receptor $RE\alpha$ na prevenção e regressão da aterosclerose (HODGIN e cols.,2001; BJARNASON e cols.,2001). Porém, conforme descrito na Introdução dessa Dissertação nem todos os efeitos benéficos do estrógeno na prevenção e redução da estenose luminal ocorrem via receptor, a prevenção da oxidação da LDL e a inibição do fator de crescimento do endotélio vascular parecem não depender do receptor, enquanto o $RE\alpha$ é importante na ativação da

óxido nítrico sintetase, na recuperação do endotélio e em parte da inibição da síntese de endotelina.

Uma ação ateroprotetora tem sido atribuída ao estrógeno, porém a mais alta frequência do alelo B-variante em cardiopatas e em CAD⁺ sugere uma menor expressão deste alelo, uma hipótese contrária ao que os níveis lipídicos e a frequência de utilização dos códons para alanina indicaram. No entanto, é possível que o efeito da redução dos níveis da HDL pela interação fumo*BstUI seja tão importante no risco de desenvolvimento e gravidade da doença cardiovascular, que mesmo com uma maior expressão do receptor, os demais efeitos benéficos deste hormônio sejam anulados. Um estudo para a determinação da expressão do receptor em portadores do alelo B-variante poderia determinar o papel deste receptor em humanos na doença cardiovascular, caso este polimorfismo realmente altere de modo direto a expressão do RE α .

Na análise haplotípica embora a presença de nenhum haplótipo tenha sido importante na determinação do risco de desenvolvimento de cardiopatia, os portadores do haplótipo 1-2-2 que foram estatisticamente mais freqüente entre os CAD⁻ também foram mais prevalentes na amostra controle, enquanto o haplótipo 2-1-2 foi mais freqüentes nos dois grupos de risco. O resultado obtido com relação ao haplótipo 2-1-2 parece ser apenas consequência da presença do alelo B-variante (sítio *Bst*UI presente), pois apenas dois indivíduos possuíam os outros dois haplótipos que contém este alelo entre os CAD⁺ e entre os CAD⁻ os demais haplótipos não foram observados. A presença deste mesmo haplótipo na amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia proporcionou aumento dos níveis de HDL e colesterol total e redução dos níveis de triglicérides.

KUNNAS e cols. (2000) determinaram associação da gravidade da cardiopatia em uma amostra de finlandeses com o microsatélite (TA)_n, os resultados deste trabalho e da presente investigação indicam que há uma grande possibilidade de desequilíbrio de ligação entre este microsatélite e o

sítio *Bst*UI. MATSUBARA e cols. (1997) assim como no presente trabalho não detectaram associação entre os polimorfismos *Pvu*II e *Xba*I com gravidade de cardiopatia em japoneses.

V.3 – PERSPECTIVAS

Há uma certa dificuldade na determinação da eficácia da reposição hormonal na prevenção ou na regressão da aterosclerose. Resultados controversos foram obtidos com relação à terapia primária e secundária para aterosclerose, ou seja, estudos observacionais sugerem que, na terapia primária (prevenção), a reposição apresenta efeitos benéficos (revisão em HERRINGTON, 2000 e STEVENSON, 2000), enquanto que na terapia secundária (regressão) a reposição pode não ser benéfica (revisão em MOSCA e cols.,2001). Estes resultados indicam que possivelmente diferenças genéticas, mais precisamente farmacogenéticas, entre os indivíduos estão sendo muito importantes na ação dos hormônios administrados.

Estudos farmacogenéticos poderiam ser bastante eficientes para elucidar a eficácia da terapia de reposição na prevenção e tratamento da aterosclerose, assim como de outras patologias envolvidas com a redução da produção de hormônios sexuais endógenos. Pois com o conhecimento de diferenças genéticas entre os indivíduos seria possível determinar se estas proporcionam alterações nas respostas aos fármacos. Se estas diferenças realmente ocasionam alterações na resposta a terapia, seria possível parear a amostra controle e a amostra sob tratamento, de acordo com seus genótipos, e deste modo observar mais diretamente o efeito da reposição. Polimorfismos no gene do receptor α de estrógenos parecem ser bons candidatos para estes estudos, assim como, polimorfismos nos genes dos receptores de progestágenos, pois, alguns trabalhos têm citado efeitos

importantes de progestágenos no metabolismo lipídico (ADAMS e cols.,1997; GODSLAND e cols.,2001; KNOPP e cols.,2001; LUCIANO e cols.,2001).

VI - RESUMO E CONCLUSÕES

Diversos estudos têm demonstrado a influência dos hormônios sexuais, especialmente do estrógeno, na determinação dos níveis de lipídios séricos e no desenvolvimento de cardiopatia. O receptor α de estrógenos parece mediar grande parte do efeito ateroprotetor deste hormônio. Neste trabalho foi investigada a associação de três polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição, *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I, no gene deste receptor com as concentrações de lipídios plasmáticos e com o risco de desenvolvimento e de gravidade da doença cardíaca. A análise de associação com os níveis lipídicos foi realizada em uma amostra composta por 413 indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia, os quais foram considerados representantes da população de Porto Alegre. Para análise de risco e gravidade da cardiopatia foi utilizada uma amostra composta por 352 pacientes com cardiopatia isquêmica aterosclerótica, também caucasóides de Porto Alegre. A amostra de pacientes com cardiopatia foi dividida de acordo com a obstrução luminal em CAD⁺ e CAD⁻ para análise de gravidade da cardiopatia. O DNA das amostras foi amplificado pela técnica de PCR com primers específicos e previamente descritos, a seguir foram submetidos a clivagem com as respectivas enzimas de restrição e o genótipo foi visualizado sob luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose ou acrilamida corado com brometo de etídio. As pesquisas de associação com níveis lipídicos em nível uni-loco foram realizadas por análise fatorial, pesquisando a interação dos genótipos com sexo, fumo e sedentarismo, enquanto as análises haplotípicas foram realizadas por ANOVA. Este trabalho possui como objetivos específicos: (1) determinar as freqüências dos alelos de três variantes do gene RE α (*Bst*UI, *Pvu*II, *Xba*I) bem como os haplótipos derivados desses

polimorfismos em indivíduos saudáveis e com cardiopatia isquêmica aterosclerótica da população de Porto Alegre; (2) investigar se ocorre associação entre os alelos, genótipos e haplótipos do gene RE α e os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos na amostra de indivíduos sem evidências clínicas de cardiopatia; (3) verificar a existência de associação entre os alelos, genótipos e haplótipos do RE α observados com a prevalência e a severidade de cardiopatia isquêmica aterosclerótica.

Os principais resultados e conclusões obtidas no presente trabalho foram:

1. A frequência do alelo B-variante (sítio de restrição para enzima *Bst*UI presente) foi de 4% na população de Porto Alegre. Os polimorfismos *Pvu*II e *Xba*I foram mais variáveis e as frequências dos alelos P1 e X1 (sítios de restrição ausentes) foram 41 e 34%, respectivamente.

2. Os três sítios estudados estão em forte desequilíbrio de ligação, os haplótipos mais prevalentes foram 1-2-2 e 1-1-1. Esses haplótipos foram observados em 58 e 33% do cromossomos investigados, respectivamente.

3. As interações dos polimorfismos *Bst*UI e *Pvu*II com o sexo foram estatisticamente significantes sobre os níveis de HDL ($p=0.021$ e $p=0.003$, respectivamente), sendo que o maior efeito foi observado em mulheres no período reprodutivo, conforme o esperado pela maior concentração endógena deste hormônio em mulheres nesta fase. As mulheres heterozigotas para sítio *Bst*UI apresentaram níveis de HDL mais altos que as homozigotas B-selvagem/B-selvagem e as portadoras de ao menos um alelo P1 apresentaram níveis de HDL maiores que as homozigotas P2/P2.

4. Foi detectado um forte efeito da interação fumo**Bst*UI sobre os níveis de HDL ($p=0.008$). Os heterozigotos não fumantes apresentaram níveis de HDL superiores aos homozigotos 11 também não fumantes, enquanto os heterozigotos fumantes apresentaram níveis de HDL um pouco menores que os homozigotos 11 também fumantes.

5. Para os níveis de HDL a interação sedentarismo**PvuII* apresentou efeito estatisticamente significativo ($p=0.022$), indivíduos homocigotos P2/P2 e não sedentários apresentaram níveis de HDL superiores aos não sedentários portadores do alelo P1, ao passo que os homocigotos P2/P2 e sedentários apresentaram níveis de HDL um pouco inferiores aos níveis observados nos sedentários portadores do alelo P1.

6. A interação fumo**XbaI* apresentou efeito significativo sobre os níveis de triglicédeos ($p=0.041$). Fumantes portadores do alelo X2 apresentaram níveis de triglicédeos superiores aos fumantes homocigotos X1/X1.

7. O haplótipo 2-1-2 identificado em apenas 3% da população estudada, foi o único haplótipo que apresentou influência sobre os níveis lipídicos. Em média, os portadores do haplótipo 2-1-2 apresentaram níveis de CT e HDL maiores que os portadores dos demais haplótipos ($p=0.048$ e $p=0.009$, respectivamente) e níveis de triglicédeos inferiores ($p=0.019$).

8. O alelo B-variante do sítio *BstUI* foi observado em 7% dos cromossomos da amostra de pacientes com cardiopatia e em apenas 3.5% dos cromossomos da amostra controle ($p=0.038$), o "odds ratio" (OR) calculado foi 2.11 (CI 95%:1.04-4.30; $p=0.039$). Este mesmo alelo foi estatisticamente mais freqüente entre os indivíduos CAD⁺ (8%) do que entre os CAD⁻ (3%) ($p=0.017$), o OR calculado foi 2.82 (CI 95%:1.20-6.60; $p=0.017$). Nenhuma diferença de freqüência entre estas amostras foi detectada para os demais sítios.

9. Os portadores dos haplótipos 1-2-2 foram menos freqüentes na amostra de CAD⁺ do que na amostra CAD⁻ ($p=0.029$), o OR calculado foi 2.15 (CI 95%: 1.08-4.26; $p= 0.029$). Os portadores do haplótipo 2-1-2 foram mais freqüentes na amostra CAD⁺ ($p=0.042$), o OR calculado foi 2.50 (CI 95%: 1.06-5.89; $p=0.036$).

10. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que, possivelmente, um estudo da influência dos polimorfismos no gene do RE α na expressão deste receptor, poderia contribuir para determinação do papel do estrógeno e da reposição hormonal na aterosclerose.

VII - SUMMARY AND CONCLUSIONS

Several studies have demonstrated the influence of sex hormones, mainly estrogens on lipid levels as well as on coronary artery disease. The estrogen receptor α seems to mediate the hormone atheroprotective effect. In the present study, the association of three restriction site polymorphisms in the estrogen receptor gene, *Bst*UI, *Pvu*II, and *Xba*I, with plasma lipid levels and with the risk and severity of coronary artery disease has been investigated. The association analyses with lipid levels has been performed in a sample of 413 Caucasian individuals without clinical signs of coronary artery disease. This sample was considered as representative of the Porto Alegre population. To assess the risk and severity of coronary artery disease, a sample of 352 coronary artery disease patients, all Caucasians was screened. In order to determine disease severity this sample was divided in CAD^+ and CAD^- according to the percent of luminal stenosis. DNAs were PCR amplified with previously described primers, and subsequently digested with the respective endonucleases. Genotypes were determined after electrophoresis in agarose or polyacrylamide gels stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The search for associations with lipid concentrations for single loci have been performed by factorial analyses, looking for genotype interactions with sex, tabagism, and physical activity. Haplotype analyses were carried out by ANOVA. The aims of the present investigation were: (1) To determine the allele, genotype, and haplotype frequencies of three $RE\alpha$ polymorphisms (*Bst*UI, *Pvu*II, *Xba*I) in healthy individuals and in coronary artery disease patients from the Porto Alegre

population. (2) To investigate if these variants are associated with serum cholesterol and tryglicerides levels in the healthy individuals. (3) To verify if RE α alleles, genotypes, and haplotypes were associated with coronary artery disease risk and severity.

The main results and conclusions were:

1. The RE α B-variant (*Bst*UI site present) frequency was 4% in the Porto Alegre population. *Pvu*II and *Xba*I polymorphisms were more variable in this population. The P1 and X1 alleles (restriction site absent) were 41 and 34% respectively.

2. The three sites were in strong linkage disequilibrium. Haplotypes 1-2-2 and 1-1-1 were the most prevalent. These haplotypes were respectively observed in 58% and 33% of the chromosomes investigated.

3. The *Bst*UI and *Pvu*II polymorphisms interactions with sex were statistically significant over HDL levels ($p=0.021$ and $p=0.003$ respectively). The highest effect, as expected was observed in women in the reproductive period, probably due to higher estrogen concentration. Heterozygotes for the *Bst*UI site showed higher HDL levels than homozygotes. Carriers of at least one P1 allele showed HDL levels higher than P2/P2 homozygotes.

4. A strong interaction effect between tabagism and *Bst*UI over HDL levels ($p=0.008$) was detected. No smoking heterozygotes showed HDL levels higher than no smoking 11 homozygotes, while heterozygous smokers showed HDL levels somewhat lower than 11 homozygotes.

5. The interaction between physical activity and *Pvu*II showed a statistically significant effect ($p=0.022$) over HDL levels. Homozygotes for the P2 allele and physical active had higher HDL levels than physical active P1 carriers, while P2 homozygotes that were physically inactive showed HDL levels somewhat lower than those observed in physically inactive P1 carriers.

6. The tabagism**Xba*I interaction had a significant effect over trygliceride levels ($p=0.041$). Higher trygliceride concentrations were observed in X2 carriers smokers than in X1/X1 smokers.

7. Haplotype 2-1-2 observed in 3% of the studied population, was the only haplotype that influenced lipid levels. Carriers of this haplotype CT and HDL concentrations higher than carriers of other haplotypes ($p=0.048$ and $p=0.009$ respectively), and lower tryglicerides ($p=0.019$).

8. The B-variant allele from the *Bst*UI site was observed in 7% of the chromosomes from the coronary artery disease patients, and in only 3.5% from those of the controls ($p=0.038$), the estimated odds ratio was 2.11 (95% CI:1.04-4.30; $P=0.039$). This same allele was more frequent among CAD⁺ individuals (8%) than in CAD⁻ patients(3%) ($p=0.017$). No other differences between these 2 samples were observed.

9. Carriers of the 1-2-2 haplotype were more frequent in the CAD⁺ sample than in the CAD⁻ ($p=0.029$), the estimated odds ratio was 2.15 (95%CI:1.06-4.26; $p=0.029$). Carriers of the haplotype 2-1-2 were also more frequent in the CAD⁺ sample ($p=0.042$), odds ratio 2.50 (95%CI: 1.06-5.89; $P=0.036$)

10. These results suggest the possible influence of the se polymorphism on the expression of the RE α gene. Expression studies of these receptor could contribute for the determination of the estrogen role and hormone replacement on atherosclerosis.

VIII - **BIBLIOGRAFIA**

ACTON,S.; RIGOTTI,A.; LANDSCHULZ,K.T.; XU,S.; HOBBS,H.H.; KRIEGER,M. (1996).Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. **Science**, 271:518-520.

ADAMS,M.R.; REGISTER,T.C.; GOLDEN,D.L.; WAGNER,J.D.; WILIANS,J.K. (1997). Medroxyprogesterone Acetate Antagonizes Inhibitory Effects of Conjugated Equine Estrogens on Coronary Artery Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 17:217-221.

ALI,A.F.M.; SHAYB,S.; ATTAR,A. (2000). Identification of a Novel Human Oestrogen Receptor (Delta Receptor) and it's Chromossomal Localisation. **European Journal of Cancer**, 36:S118.

ALOYSIO,D.; GAMBACCIANI,M.; MESCHIA,M.; PANSINI,F.; MODENA,A.B.; BOLIS,P.F.; MASSOBRIO,M.; MAIOCCHI,G.; PERUZZI,E.; THE ICARUS STUDY GROUP. (1999). The Effect of Menopause on Blood Lipid and Lipoprotein Levels. **Atherosclerosis**,147:147-153.

ANDERSEN,T.I.; HEIMDAL,K.R.; SKREDE,M.; TVEIT,K.; BERG,K.; BORRESEN,A-L. (1994). Oestrogen Receptor (ESR) Polymorphisms and Breast cancer Susceptibility. **Human Genetics**,94:665-670.

BACHORIK,P.S.; RIFKIND,B.M.; KWITEROVICH,P.O. (1999). Lipídeos e Dislipoproteinemias. *In*: HENRY,J.B. (Ed.). **Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais**. 2.ed. São Paulo: Ed. Mande:208-236.

BAGATELL, C.J.; KNOPP, R.H.; RIVIER,J.E.; BREMNER,W.J.(1994). Physiological Levels of Estradiol Stimulate Plasma High Density Lipoprotein₂ Cholesterol Levels in Normal Men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 78(4):855-861.

BARRETT,C.E.; BUSH,T.L. (1991). Estrogen and Coronary Heart Disease in Women. **Journal of American Medicine Associations**. 265:1861-1867.

- BECHERINI,L.; GENNARI,L.; MASI,L.; MANSANI,R.; MASSART,F.; MORELLI,A.; FALCHETTI,A.; GONNELLI,S.; FIORELLI,G.; TANINI,A.; BRANDI,M.L. (2000). Evidence of a Linkage Disequilibrium Between Polymorphisms in the Human Estrogen Receptor α Gene and Their Relationship to Bone Mass Variation in Postmenopausal Italian Women. **Human Molecular Genetics**, 9(13):2043-2050.
- BERKOWITZ,G.S.; STONE,J.L.; LEHRER,S.P.; MARCUS,M.; LAPINSKI,R.H.; SCHACHTER,B.S. (1994). An Estrogen Receptor Genetic Polymorphism and the Risk of Primary and secondary Recurrent Spontaneous Abortion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**,171:1579-1584.
- BJARNASON,N.H.; HAARBO,J.; BYRJALSEN,I.; ALEXANDERSEN,P.; KAUFFMAN,R.F.; CHRISTIANSEN,C. (2001). Raloxifene and Estrogen Reduces Progression of Advanced Atherosclerosis - A Study in Ovariectomized, Cholesterol-Fed Rabbits. **Atherosclerosis**,154: 97-102.
- BROUCHET,L.; KRUST,A.; DUPONT,S.; CHAMBON,P.; BAYARD,F.; ARNAL,J.F. (2001). Estradiol Accelerates Reendothelialization in Mouse Carotid Artery Through Estrogen Receptor- α but Not Estrogen Receptor- β . **Circulation**, 103:423-428.
- CAMPOS, H.; WALSH,B.W.; JUDGE,H.; SACKS,F.M. (1997). Effect of Estrogen on Very Low Density Lipoprotein and Low Density Lipoprotein Subclass Metabolism in Postmenopausal Women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 82(12):3955-3963.
- CASTAGNOLI,A.; MAESTRI,I.; BERNARDI,F.; DEL SENNO,L. (1987). PvuII RFLP Inside the Human Estrogen Receptor Gene. **Nucleic Acids Research**,15:866
- CHAMBLISS,K.L.; YUHANNA,I.S.; MINEO,C.; LIU,P.; GERMAN,Z.; SHERMAN,T.S.; MENDELSON,M.E.; ANDERSON,R.G.W.; SHAUL,P.W. (2000). Estrogen Receptor α and Endothelial Nitric Oxide Synthase Are Organized Into a Functional Signaling Module in Caveolae. **Circulation Research**, 87: e44-e52.
- CHEN,Z.; YUHANNA,I.S.; GALCHEVA-GARGOVA,Z.; KARAS,R.H.; MENDELSON, M.E.; SHAUL,P.W. (1999). Estrogen Receptor α Mediates the Nongenomic Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Estrogen. **The Journal of Clinical Investigation**,103(3): 401-406.

- DENG,H-W.; LI,J.; LI,J-L.; DOWD,R.; DAVIES,K.M.; JOHNSON,M.; GONG,G.; DENG,H.; RECKER,R.R. (2000). Association of Estrogen Receptor- α Genotypes with Body Mass Index in Normal Healthy Postmenopausal Caucasian Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 85 (8): 2748-2751.
- DUBEY,R.K.; JACKSON,E.K.; KELLER,P.J.; IMTHURN,B.; ROSSELLI,M. (2001). Estradiol Metabolites Inhibit Endothelin Synthesis by an Estrogen Receptor-Independent Mechanism. **Hypertension**, 37(part2): 640-644.
- ERIKSSON,M.; BERGLUND, L.; RUDLING,M.; HENRIKSSON,P.; ANGELIN,B. (1989). Effects of Estrogen on Low Density Lipoprotein Metabolism in Males. Short-term and Long-term Studies During Hormonal Treatment of Prostatic Carcinoma. **Journal Clinical Investigation**, 84:802-810.
- FREEMAN,D.J.; GRIFFIN,B.A.; MURRAY,E.; LINDSAY,G.M.; GAFFNEY,D.; PACKARD,C.J.; SHEPHERD,J. (1993). Smoking and Plasma Lipoproteins in Man: Effects on Low Density Lipoprotein Cholesterol Levels and High Density Lipoprotein Subfraction Distribution. **European Journal of Clinical Investigation**, 23:630-640.
- FRIEDEWALD,N.T.; LEVY,R.I.; FREDRICKSON,D.S. (1972). Estimation of the Concentration of Low-density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, 18:499-502.
- GARCIA,T.; SANCHEZ,M.; COX,J.L.; SHAW,P.A.; ROSS,J.B.A.; LEHRER,S.; SCHACHTER,B. (1989). Identification of a Variant form of the Human Estrogen Receptor with an Amino Acid Replacement. **Nucleic Acids Research**, 17(20):8364
- GINSBERG,H.N. (1998). Lipoprotein Physiology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North América**, 27(3):503-519.
- GODSLAND, I.F. (2001). Effects of Postmenopausal Hormone Replacement Therapy on Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein (a) Concentrations: Analysis of Studies Published from 1974-2000. **Fertility and Sterility**, 75(5):898-915.
- GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95.(1998). GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com".
- GUETTA,V.; CANNON,R.O. (1996). Cardiovascular Effects of Estrogen and Lipid-Lowering Therapies in postmenopausal Women. **Circulation**,93:1928-1937.

- GUSTAFSSON, J.-A. (2000). New Insights in Oestrogen Receptor (ER) Research – the ER β . **European Journal of Cancer**,36: S16.
- HAN,O.K.; MOON,I.G.; KANG,Y.S.; CHUNG,H.Y.; MIN,H.K.; HAN,I.K. (1997). Nonassociation of Estrogen Receptor Genotypes with Bone Mineral Density and Estrogen Responsiveness to Hormone Replacement Therapy in Korean Postmenopausal Women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 82(4): 991-995.
- HAN, T.S.; BIJNEN,F.C.H.; LEAN,M.E.J.; SEIDELL, J.C. (1998). Separate Associations of Waist and Hip Circumference With Lifestyle Factors. **International Journal of Epidemiology**, 27:422-430.
- HERRINGTON,D.(2000). Role of Estrogens, Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens in Cardiovascular Protection. **The Canadian Journal of Cardiology**,16 (suppl E):5E-9E.
- HODGIN,J.B.; KREGE,J.H.; REDDICK,R.L.; KORACH,K.; SMITHIES,O.; MAEDA,N. (2001). Estrogen Receptor α is a Major Mediator of 17 β -Estradiol's Atheroprotective Effects on Lesion Size in Apoe^{-/-} Mice. **Journal Clinical Investigation**, 107:333-340.
- HOLM,P.; ANDERSEN,H.L.; ANDERSEN,M.R.; ERHARDTSEN,E.; STENDER,S. (1999). The Direct Antiatherogenic Effect of Estrogen Is Present, Absent, or Reversed, Depending on the State of the Arterial Endothelium. **Circulation**, 100: 1727-1733.
- HOMMA,H.; KURACHI,H.; NISHIO,Y.; TAKEDA,T.; YAMAMOTO,T.; ADACHI,K.; MORISHIGE,K-I.; OHMACHI,M.; MATSUZAWA,Y.; MURATA,Y. (2000). Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, 275(15):11404-11411.
- KARAS,R.H.; PATTERSON,B.L.; MENDELSON,M.E. (1994). Human Vascular Smooth Muscle Cells Contain Functional Estrogen Receptor. **Circulation**, 89:1943-1950.
- KIKUCHI,T.; HASHIMOTO,N.; KAWASAKI,T.; UCHIYAMA,M. (2000). Association of serum Low-Density Lipoprotein Metabolism with Oestrogen Receptor Gene Polymorphisms in Healthy Children. **Acta Paediatrica**, 89:42-45.
- KNOPP,R.H.; LAROSA,J.C.; BURKMAN,R.T. (1993). Contraception and Dyslipidemia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 168:1994-2005.

- KNOPP,R.H.; ZHU,X.; BONET,B. (1994). Effects of Estrogens on Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease in Women. **Atherosclerosis**, 110(suppl.):S83-91.
- KNOPP,R.H.; ZHU,X.(1997). Editorial: Multiple Beneficial Effects of Estrogen on Lipoprotein Metabolism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 82(12):3952-3954.
- KNOPP,R.H.; BROYLES,F.E.; CHEUNG,M.; MOORE,K.; MARCOVINA,S.; CHANDLER,W.L. (2001). Comparison of the Lipoprotein, Carbohydrate, and Hemostatic Effects of Phasic Oral Contraceptives Containing Desogestrel or Levonorgestrel. **Contraception**, 63:1-11
- KOBAYASHI,S.;INOUE,S.; HOSOI,T.; OUCHI,Y.; SHIRAKI,M.; ORIMO,H. (1996). Association of Bone Mineral Density with Polymorphism of the Estrogen Receptor Gene. **Journal of Bone and Mineral Research**,11(3):306-311.
- KUIPER,G.G.J.M.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO,M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON,J-A.(1996). Cloning of a Novel Estrogen Receptor Expressed in Rat Prostate and Ovary. **Proceedings of the National Academy of Science**, 93:5925-5930.
- KUMAR,V.; GREEN,S.; STACK,G.; BERRY,M.; JIN,J-R.; CHAMBON,P. (1987). Functional Domains of the Human Estrogen Receptor. **Cell**, 51:941-951.
- KUNNAS,T.K.; LAIPPALA, P.; PENTTILÄ, A.; LEHTIMÄKI,T.; KARHUNEN,P.J. (2000). Association of Polymorphism of Human α Oestrogen Receptor Gene With Coronary artery Disease in Men: A Necropsy Study. **British Medical Journal**, 321:273-274.
- KUSHWAHA,R.S.; BORN,K.M.(1991). Effects of Estrogen and Progesterone on the Hepatic Cholesterol 7α -hydroxylase Activity in Ovariectomized Baboons. **Biophysical Acta**, 1084:300-302.
- LAHIRI,D.K.; NURNBERGER,J.I. (1991). A Rapid Non-Enzymatic Method for the Preparation of HMW DNA from Blood for RFLP Studies. **Nucleic Acids Research**,19:5444.
- LAMON-FAVA, S. (2000a). Genistein Activates Apolipoprotein A-I Gene Expression in the Human Hepatoma Cell Line Hep G2. **Journal of Nutrition**, 130:2489-2492.
- LAMON-FAVA, S. (2000b).Complete and Selective Estrogenic Effects on Lipids and Cardiovascular Disease. **Current Atherosclerosis Reports**, 2:72-75.

- LANDSCHULZ,K.T.; PATHAK, R.K.; RIGOTTI,A.; KRIEGER,M.; HOBBS, H.H. (1996). Regulation of Scavenger Receptor, Class B, Type I, a High Density lipoprotein Receptor, in Liver and Steroidogenic Tissues of the Rat. **Journal of Clinical Investigation**, 98(4): 984-995.
- LEHRER,S.; RABIN, J.; KALIR, T.; SCHACHTER, B.S. (1993). Estrogen Receptor Variant and Hypertension in Women. **Hypertension**, 21:439-441.
- LEWONTIN,R.C. (1988). On Measures of Gametic Disequilibrium. **Genetics**, 120: 849-852.
- LINDZEY,J.; KORACH,K.S. (1997). Steroid Hormones. *In*: CONN, P.M.; MELMED,S. (Eds.). **Endocrinology. Basic and Clinical Principles**, New Jersey: Humana Press, 47-58.
- LONG, J.C.; WILLIAMS, R.C.; URBANEK, M. (1995). An E-M Algorithm and Testing Strategy for Multiple Locus Haplotypes. **American Journal of Human Genetics**, 56: 799-810.
- LONG, J.C. (1999). Multiple Locus Haplotype Analysis, version 2.0. Software and documentation distributed by the author. Section on Population Genetics and Linkage, Laboratory of Neurogenetics, NIAAA, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- LOSORDO, D.W.; KEARNEY,M.; KIM,E.A.; JEKANOWSKI,J.; ISNER,J.M. (1994). Variable Expression of the Estrogen Receptor in Normal and Atherosclerotic Coronary Arteries of Premenopausal Women. **Circulation**,89:1501-1510.
- LUCIANO,A.A.; MILLER,B.E.; SCHOENENFELD,M.J.; SCHASER,R.J. (2001). Effects of Estrone Sulfate Alone or With Medroxyprogesterone Acetate on Serum Lipoprotein Levels in Postmenopausal Women. **Obstetrics and Gynecology**, 97:101-108.
- MACRI,P.; KHORIATY,G.; LEHRER,S.; KARURUNARATNE,A.; MILNE,C.; SCACHTER,B.S. (1992). Sequence of a Human Estrogen Receptor Variant Allele. **Nucleic Acids Research**, 20(8):2008.
- MANTEL-TEEUWISSE,A.K.; KLOOSTERMAN,J.M.E.; ZEE, A.H.M.; KLUNGEL,O.H.; PORSIUS,A.J.; BOER,A. (2001). Drug-Induced Lipid Changes. A Review of the Unintended Effects of Some Commonly Used Drugs on Serum Lipid Levels. **Drug Safety**, 24(6):443-456.

- MATSUBARA,Y.; MURATA,M.; KAWANO,K.; ZAMA,T.; AOKI,N.; YOSHINO,H.; WATANABE,G.; ISHIKAWA,K.; IKEDA,Y. (1997). Genotype Distribution of Estrogen receptor Polymorphisms in Men and Postmenopausal Women from Healthy and Coronary Populations and Its Relation to Serum Lipids Levels. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 17:3006-3012.
- MENASCE,L.P.; WHITE,G.R.M.; HARRISON,C.J.; BOYLE,J.M. (1993). Localization of the Estrogen Receptor Locus (ESR) to Chromosome 6q25.1 by FISH and a Simple Post-FISH Banding Technique. **Genomics**, 17:263-265.
- MENDELSON,C.R. (1996). Mechanisms of Hormone Action. *In*: GRIFFIN,J.E.; OJEDA,S.R. (Eds.). **Textbook of Endocrine Physiology**.3.ed. New York: Oxford University Press, 29-65.
- MONTGOMERY,R.; CONWAY,T.H.; SPECTOR,A.A.; CHAPPELL,D. (1996). **Biochemistry – a Case-oriented Approach**.6.ed. St. Louis: Mosby, 356-388.
- MOSCA,L.; COLLINS,P.; HERRINGTON,D.M.; MENDELSON,M.E.; PASTERNAK,R.C.; ROBERTSON,R.M.; SCHENCK-GUSTAFSSON,K.; SMITH,S.C.; TAUBERT,K.A.; WENGER,N.K. (2001). Hormone replacement Therapy and Cardiovascular Disease. **Circulation**, 104:499-503.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM.(1990) Recommendations for Improving Cholesterol Measurement: A Report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. NIH Publication. No.90-2964. Bethesda, Maryland. *In*: HENRY,J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais**. 2.ed. São Paulo: Ed. Mande:208-236.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM:(1995) **Working Group on Lipoprotein Measurement**: Recommendation for Measurement of LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and Triglycerides. NIH Publication (in press). *In*: HENRY,J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais**. 2.ed. São Paulo: Ed. Mande:208-236.
- NICKENIG,G.; STREHLOW,K.; WASSMANN,S.; BÄUMER,A.T.; ALBORY,K.; SAUER,H.; BÖHM,M. (2000). Differential Effects of Estrogen and Progesterone on AT1 Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation**, 102:1828-1833.

- NIETO,J.J.; COGSWELL,D.; JESINGER,D.; HARDIMAN,P. (2000) Lipid Effects of Hormone Replacement Therapy With Sequential Transdermal 17-Beta-Estradiol and Oral Dydrogesterone. **Obstetrics and Gynecology**, 95: 111-114.
- OHLSSON,C.; HELLBERG,N.; PARINI,P.; VIDAL,O.; BOHLOOLY,M.; RUDLING,M.; LINDBERG.M.K.; WARNER,M.; ANGELIN,B.; GUSTAFSSON, J-A. (2000). Obesity and Disturbed Lipoprotein Profile in estrogen Receptor- α -Deficient Male Mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 278:640-645.
- PAECH,K.; WEBB,P.; KUIPER,G.G.J.M.; NILSSON,S.; GUSTAFSSON,J-Å.; KUSHNER,P.J.; SCANLAN, T.S. (1997). Differential Ligand Activation of Estrogen Receptor ER α and ER β at AP1 Site. **Science**, 277(1):1508-1510.
- PARINI,P.; ANGELIN,B.; RUDLING,M. (1997). Importance of Estrogen Receptor in Hepatic LDL Receptor Regulation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 17:1800-1805.
- PARINI,P.; ANGELIN,B.; STAVRÉUS-EVERS,A.; FREYSCHUSS,B.; ERIKSSON,H.; RUDLING,M. (2000). Biphasic Effects of the Natural Estrogen 17 β -Estradiol on Hepatic Cholesterol Metabolism in Intact Female Rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**,20:1817-1823.
- PETERSON, R.J.; GOLDMAN, D.; LONG, J.C. (1999). Nucleotide Sequence Diversity in Non-coding Regions of ALDH2 as Revealed by Restriction Enzyme and SSCP Analysis. **Human Genetics**, 104: 177-187
- PONGLIKITMONGKOL,M.; GREEN,S.; CHAMBON,P. (1988) Genomic Organization of the Human Oestrogen Receptor Gene. **EMBO Journal**, 7:3385-3388.
- ROSSOUW,J.E. Hormone Replacement Therapy and Cardiovascular Disease. **Current Opinion in Lipidology**, 10:429-434.
- RUIZ-SANZ,J.I.; NAVRRO,R.; MARTÍNEZ,R.; MARTÍN,C.; LACORT,M.; MATORRAS,R.; RUIZ-LARREA,M.B. (2001). 17 β -Estradiol Affects in Vivo the Low Density Lipoprotein Composition, Particle Size, and Oxidizability. **Free Radical Biology & Medicine**, 31(3):391-397.
- SANO,M.; INOUE,S.; HOSOI,T.; OUCHI,Y.; EMI,M.; SHIRAKI,M.; ORIMO,H. (1995) Association of Estrogen Receptor Dinucleotide Repeat Polymorphism with Osteoporosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 217(1):378-383.

- SCHNEIDER,S.; KUEFFER,J-M., ROESSLI,D.; EXCOFFIER,L. (2000). Arlequin ver 2.000: A Software for Population Data Analysis. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- SHANG, Y.; HU, X.; DIRENZO,J.; LAZAR, M.A.; BROWN, M. (2000). Cofator Dynamics and Sufficiency in Estrogen Receptor-Regulated Transcription. **Cell**, 103: 843-852.
- SPRITZER,P.M.; GROSS,J.L.; MALLMANN,E.; OPPERMANN,K. (1992).Hormônios Sexuais. *In*: FUCHS,F.D.; WANNMACHER,L. (Eds.) **Farmacologia Clínica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 539-553.
- SPRITZER,P.M.; OSÓRIO,M.C. (1998) Hormônios Sexuais no Climatério. *In*: FUCHS,F.D.; WANNAMACHER,L.(Eds.) **Farmacologia Clínica**.2.Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 561-565.
- STEFANICK,M.L. (1999). Physical Activity for Preventing and Treating Obesity-Related Dyslipoproteinemias. **Official of the American College of Sports Medicine**, S609-S618.
- STEVENSON,J.C. (2000). Cardiovascular Effects of Oestrogens. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, 74:387-393.
- SUBBIAH,M.T.R.; KESSEL,B.; AGRAWAL,M.; RAJAN,R.; ABPLANALP,W.; RYMASZEWSKI,Z. (1993). Antioxidant Potential of Specific Estrogens on Lipid Peroxidation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 77:1095-1097
- SUMINO,H.; NAKAMURA,T.: ICHIKAWA,S.; KANDA,T.; SAKAMAKI,T.; SATO,K.; KOBAYASHI,I.; NAGAI,R. (2000). Serum Level of Vascular Endothelial Growth Factor is Decreased by Hormone Replacement Therapy in Postmenopausal Women Without Hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, 148:189-195.
- TAYLOR,J.A.; LI,Y.; YOU,M.; WILCOX,A.J.; LIU,E. (1992). B Region Variant of the Estrogen Receptor Gene. **Nucleic Acids Research**, 20:2895.
- THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2000). **Diabetes Care**, 23(suppl.1):S4-S19.

- TRIGATTI, B.; RIGOTTI, A.; KRIEGER, M. (2000). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, 11:123-131.
- VANDEVYVER, C.; VANHOOF, J.; DECLERCK, K.; STINISSEN, P.; VANDERVORST, C.; MICHIELS, L.; CASSIMAN, J.J.; BOONEN, S.; RAUS, J.; GEUSENS, P. (1999). Lack of Association Between Estrogen Receptor Genotypes and Bone Mineral Density, Fracture History, or Muscle Strength in Elderly Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, 14(9): 1576-1582.
- VENKOV, C.D.; RANKIN, A.B.; VAUGHAN, D.E. (1996). Identification of Authentic Estrogen Receptor in Cultured Endothelial Cells. **Circulation**, 94:727-733.
- WALSH, B.W.; KULLER, L.H.; WILD, R.A.; PAUL, S.; FARMER, M.; LAWRENCE, J.B.; SHAH, A.S.; ANDERSON, P.W. (1998). Effects of Raloxifene on Serum Lipids and Coagulation Factors in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA*, 279:1445-1451.
- WAKATSUKI, A.; IKENOUE, N.; OKATANI, Y.; FUKAYA, T. (2001). Estrogen-Induced Small Low Density Lipoprotein Particles May Be Atherogenic in Postmenopausal Women. **Atherosclerosis**, 37 (2):425-430.
- WEEL, A.E.A.; UITTERLINDEN, A.G.; WESTENDORP, I.C.D.; BURGER, H.; SCHUIT, S.C.E.; HOFMAN, A.; HELMERHORST, T.J.M.; LEEUWEN, J.P.T.M.; POLS, H.A.P. (1999). Estrogen Receptor Polymorphism Predicts the Onset of Natural and Surgical Menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 84:3146-3150.
- WEN, Y.; DOYLE, M.C.T.; COOKE, T.; FEELY, J. (2000). Effect of Menopause on Low-density Lipoprotein Oxidation: is Oestrogen an Important Determinant? **Maturitas**, 34:233-238.
- WEST, S.G.; HINDERLITER, A.L.; WELLS, E.C.; GIRDLER, S.S.; LIGHT, K.C. (2001). Transdermal Estrogen Reduces Vascular Resistance and serum Cholesterol in Postmenopausal Women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 184:926-933.
- WESTERVELD, H.E. (1998). Estrogen and Postprandial Lipid Metabolism. **Atherosclerosis**, 141 (suppl.1): S105-S107.
- WILLIAMS, C.L.; STANCEL, G.M. (1996). Estrogênios e Progestogênios. *In*: GILMAN, A.G. (Ed.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9.ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, 1045-1067.

WINDLER,E.; KOVANEN,P.T.; CHAO,Y.S.; BROWN,M.S.; HAVEL,R.J.; GOLDSTEIN,J.L. (1980). The Estradiol-stimulated Lipoprotein Receptor of Rat Liver. **Journal Biology and Chemistry**. 225: 10464-10471. In: GUETTA,V.; CANNON,R.O. (1996). Cardiovascular Effects of Estrogen and Lipid-Lowering Therapies in postmenopausal Women. **Circulation**.93:1928-1937.

YAICH, L.; DUPONT,W.D.; CAVENER,D.R.; PARL,F.F.(1992). Analysis of the *Pvu*II Restriction Fragment-length Polymorphism and Exon Structure of the Estrogen Receptor Gene in Breast Cancer and Peripheral Blood. **Cancer Research**,52:77-83.

ZANGER,D.; YANG,B.K.; ARDANS,J.; WACLAWIW,M.A.; CSAKO,G.; WAHL,L.M.; CANNON,R.O. (2000). Divergent Effects of Hormone Therapy on Serum Markers of Inflammation in Postmenopausal Women With Coronary artery Disease on Appropriate Medical Management. **Journal of the American College of Cardiology**, 36(6): 1797-1802.

ZUPPAN,P.J.; HALL,J.M.; PONGLIKITMONGKOL,M.; SPIELMAN,R.; KING,M-C.(1989).Polimorphisms at the Estrogen Receptor (ESR) Locus and Linkage Relationships on Chromosome 6q. **Cytogenetics Cell Genetics**,51:1116

IX – ANEXOS

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO SOBRE FATORES GENÉTICOS QUE AFETAM OS NÍVEIS DE COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS NA POPULAÇÃO DE PORTO ALEGRE

Através deste documento, consinto em ser entrevistado e em doar uma quantidade de 5 (cinco) ml de sangue, a ser obtida juntamente com a retirada de sangue para os exames dos quais necessito, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Estou ciente de que os objetivos deste estudo são conhecer um pouco mais sobre algumas das causas do aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos. Além disso, sei que os benefícios virão somente a longo prazo, quando será possível prever o risco genético de um indivíduo ter problemas cardiovasculares.

Os resultados do presente estudo estarão a minha disposição tão logo forem obtidos.

Tenho a garantia de que meus dados serão mantidos em sigilo, e que meu nome daqui para frente não será revelado.

Porto Alegre, / /

Assinatura do Paciente

Pesquisadora Responsável:

Dra. Mara Helena Hutz

Departamento de Genética da UFRGS

Telefone: 316 – 6720

Anexo 2

FICHA DO PACIENTE

IDENTIFICAÇÃO: _____

PRONTUÁRIO: _____

GRUPO ÉTNICO: C N

IDADE _____ PROFISSÃO _____

SEXO : MASCULINO

FEMININO { CLIMATÉRIO? SIM NÃO

{ INGERE HORMÔNIO? SIM NÃO

DADOS:



1 - Jejum? Sim Não



2 - Gravidez? Sim Não



3 - Diabete? Sim Não

4 - Complicações cardiovasculares? Sim Não

5 - História familiar de complicações cardiovasculares? Sim Não

Pai Mãe Irmão _____

6 - Hipertensão arterial prévia? Sim Não

7 - Sedentarismo? Sim Não

8 - Tabagismo? Sim Maços/dia _____ anos _____

Não

9 - Consumo de álcool: Não

< 1 copo/semana 1- 5 copos/semana >5 copos

Tipo de bebida ingerida em maior quantidade: _____

10- Ingerir algum medicamento? Sim _____

Não

11 - Peso _____ Altura _____ Cintura _____ Quadril _____

EXAMES LABORATORIAIS:

CT _____ mg/dl HDL _____ mg/dl

TRIG _____ mg/dl

GLICEMIA _____ mg/dl

LDL _____ mg/dl VLDL _____ mg/dl

CT/HDL _____ LDL/HDL _____

Anexo 3

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS NA DOENÇA CARDIOVASCULAR ISQUÊMICA ATEROSCLERÓTICA

Diante da minha doença e reconhecendo a necessidade de avaliar as possíveis causas genéticas da mesma, voluntariamente, eu consinto em ser entrevistado por um médico e em doar uma quantidade de 10 (dez) ml de sangue, a ser obtida no período em que estiver sendo submetido ao exame cineangiográfico no Laboratório de Hemodinâmica do HCPA.

Eu estou ciente de que não serei submetido a qualquer desconforto adicional pela participação nesse estudo, já que a colheita de sangue será realizada durante o procedimento de cateterismo cardíaco diagnóstico.

Os meus benefícios são a possibilidade de avaliação científica das causas de minha doença cardiovascular e a construção de conhecimento que auxilie na prevenção e no tratamento da mesma.

Os meus direitos de não fornecer informações para pessoas não-médicas e de receber sigilo pelos profissionais serão respeitados.

Os resultados do presente estudo estarão a minha disposição tão logo forem obtidos.

Finalmente, eu permito que meu nome seja registrado para possíveis seguimentos no futuro.

Porto Alegre, / /

Assinatura do Paciente

Pesquisadora responsável:

Dra. Mara Helena Hutz

Departamento de Genética – UFRGS

Telefone:316-6718

Anexo 4

FICHA DO PACIENTE

IDENTIFICAÇÃO

Prontuário:

Nome:

Cor: Branco Mulato Negro

Idade: Profissão:

Sexo: Masculino Feminino se Feminino: Climatério

DADOS:

1. Coronariografia:

Data:

Lesões Anatômicas:

2. Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) Prévio:

3. Cirurgia de Revascularização Angioplastia ou Stent:

4. Angina: Classe Funcional (1-4):

5. Hipercolesterolemia Prévia

COL: mg/dl TRI: mg/dl HDL:

mg/dl

LDL: mg/dl

6. Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) Prévia

7. Diabete Mérito (DM) Não Insulino Dependente (NID)

Insulino Dependente (ID)

Glicemia: mg/dl

8. Peso: Altura:

Sedentarismo

9. Tabagismo Maços/anos:

10. História Familiar de Infarto ou Angina: Pai Mãe Irmão

Número de Irmãos:

Anexo 5

Anexo 6:**Tabela VIII.1:** Médias dos níveis lipídicos na amostra de pacientes com cardiopatia isquêmica aterosclerótica separadas pelos genótipos dos sítios *Bst*UI, *Pvu*II e *Xba*I.

	Sítio <i>Bst</i>UI							
	11		12		22		p	
	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n		
Col. Total (mg/dl)	217 ± 46.9	292	217 ± 51.8	46	-		0.957	
HDL (mg/dl)	43 ± 10.2	295	42 ± 11.9	48	-		0.617	
LDL (mg/dl)	144 ± 40.2	292	142 ± 43.9	46	-		0.837	
TRI (mg/dl)	158 ± 87.0	292	184 ± 115.3	46	-		0.207	
	Sítio <i>Pvu</i>II							
	11		12		22		p	
	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n		
Col. Total (mg/dl)	210 ± 44.2	57	221 ± 51.3	167	216 ± 42.6	118	0.243	
HDL (mg/dl)	42 ± 10.8	59	43 ± 10.9	168	42 ± 9.5	120	0.675	
LDL (mg/dl)	138 ± 37.8	57	145 ± 43.2	167	143 ± 38.7	118	0.489	
TRI (mg/dl)	165 ± 104.7	57	166 ± 85.8	167	158 ± 94.8	118	0.423	
	Sítio <i>Xba</i>I							
	11		12		22		p	
	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n		
Col. Total (mg/dl)	213 ± 45.9	33	218 ± 49.2	158	218 ± 45.9	151	0.863	
HDL (mg/dl)	41 ± 11.3	33	42 ± 10.5	159	43 ± 10.1	155	0.698	
LDL (mg/dl)	142 ± 39.5	33	143 ± 41.5	158	144 ± 40.6	151	0.954	
TRI (mg/dl)	147 ± 68.1	33	163 ± 88.3	158	166 ± 100.3	151	0.767	

1: ausência do sítio de restrição; 2: presença do sítio de restrição; n: número de indivíduos; TRI: triglicerídeos; os níveis de col.total, HDL e LDL demonstrados correspondem aos níveis ajustados por sexo, idade e IMC, os níveis de triglicerídeos foram transformados em logaritmo natural para as análises e por isso as médias não transformadas e não ajustadas são demonstradas; para alguns indivíduos não estavam disponíveis informações dos valores de colesterol total, LDL e triglicerídeos; para a análise de associação com níveis lipídicos o único homocigoto 22 do sítio *Bst*UI foi incluído no grupo dos heterocigotos; os p são resultado de ANOVA.