



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM GENÉTICA**

**POLIMORFISMO RsaI DO GENE RECEPTOR BETA DE
ESTRÓGENO EM PACIENTES COM ATEROSCLEROSE**

**Goiânia
©2019**

LILIAN CASTILHO DE ARAÚJO GIANOTTI

**POLIMORFISMO RsaI DO GENE RECEPTOR BETA DE
ESTRÓGENO EM PACIENTES COM ATEROSCLEROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética – MGene, PUC Goiás, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Dr^a. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura.

Goiânia
©2019

G434p Gianotti, Lilian Castilho de Araújo
Polimorfismo RsaI do gene receptor beta de estrógeno
em pacientes com aterosclerose / Lilian Castilho de
Araújo Gianotti.-- 2019.
78 f.: il.

Texto em português, com resumo em inglês
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Escola de Ciências Agrárias e Biológicas,
Goiânia, 2019

Inclui referências: f. 57-72

1. Polimorfismo (Genética). 2. Aterosclerose. 3.
I.Moura, Katia Karina Verolli de Oliveira. II.Pontifícia
Universidade Católica de Goiás - Programa de Pós-Graduação
em Genética. III. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 616.13-004.6



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

**ATA DA SESSÃO DE APRESENTAÇÃO E DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE
CONCLUSÃO DE CURSO DE MESTRADO**

1 No dia 18 de junho de 2019, reuniu-se a 153ª Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado,
2 composta pelos membros: Profª. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura/PUC Goiás (Presidente),
3 Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás, Profª. Dra. Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva
4 /UFG, para avaliação da dissertação intitulada “**Polimorfismo do receptor Beta de estrógeno em**
5 **pacientes com aterosclerose**”, da candidata **Lilian Castilho de Araújo Gianotti**, aluna do Mestrado
6 em Genética (MGene) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. A sessão iniciou-se
7 às 14h.40min., sob a presidência do Profª. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura, que
8 concedeu 30 minutos à candidata para expor sinteticamente o estudo. A seguir, a arguição procedeu-se
9 de forma interativa. Ao final da defesa, a sessão foi suspensa e a Comissão se reuniu em separado para
10 avaliação e atribuição de nota. Discutido o trabalho e o desempenho da mestranda, a Banca
11 Examinadora considerou-a APROVADA com a nota 10,0
12 (dez inteira.....) equivalente ao conceito “A”. Portanto, a discente foi declarada
13 **Mestre em Genética pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás**, pelo Presidente da Banca
14 Examinadora, que encerrou a sessão às 16h.00min. Não havendo nada mais a tratar, a presente ata
15 foi lavrada e assinada pelos membros da Banca Examinadora.
16 Profª. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura/PUC Goiás (Presidente) [Assinatura]
17 Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás [Assinatura]
18 Profª. Dra. Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva / UFG [Assinatura]
19 Esta ata contém 19 linhas contínuas, sem rasuras, emendas ou retificação.



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 153/2019

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: LILIAN CASTILHO DE ARAÚJO GIANOTTI

DEFENDIDA EM 18 DE JUNHO DE 2019 e APROVADA COM CONCEITO A

O título foi alterado () não () sim _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura
PUC Goiás (Presidente)

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
PUC Goiás

Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira da Costa e Silva
UFG

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Marta e Eurico, que me tanto incentivaram e me mostraram a importância de se estudar. Pessoas que me ensinaram princípios e valores.

Ao meu namorado Gilson pelo incentivo e apoio, mesmo tendo que passar muito tempo distante, e pelos passeios que não fizemos.

Aos meus irmãos e sobrinhos que souberam respeitar minha ausência em alguns momentos.

Em especial ao meu avô Antônio Gianotti, que sempre me incentivou a estudar e “ser grande”.

O meu muito obrigada com todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à Nossa Senhora por terem me permitido chegar tão longe, por realizar uma vontade que se iniciou no final dos anos 90. Pelas bênçãos que me foram concedidas e a resiliência.

Aos meus pais por terem me proporcionado uma boa educação, não só acadêmica, mas que fizeram com que me tornar-se uma pessoa de caráter. Pela dedicação que sempre tiveram por mim e meus irmãos e por horas de ausência que tiveram que ser conciliadas.

Aos meus irmãos, Caroline e David, meus sobrinhos, Isabelle, Gabriel, Helena e Ana Clara (*in memoriam*), e minha cunhada Júlia pelo apoio e paciência por tantas horas dedicadas a pesquisa e ausência.

Ao meu namorado, Gilson por estar ao meu lado há tantos anos e pelo apoio incondicional dado a mim durante o período da Pós-Graduação.

Meu eterno agradecimento a minha orientadora Professora Doutora Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura. Pela sua disponibilidade, atenção, carinho e paciência por entender os atrasos que ocorreram durante esse tempo de orientação, pois ela soube entender o meu lado profissional (Professora) e o acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa de mestrado, que me ajudou de forma extremamente positiva para a realização e continuação do Mestrado.

Aos amigos que fiz durante o período da Pós-Graduação, os “meninos” da Iniciação Científica que tanto me ajudaram na hora de fazer as PCRs e os geis. Muito obrigada Isabela Lima, Ulisses Santos, e Larissa Rodrigues. Foram muitas horas de trabalho duro, mas também tivemos muitos momentos de descontração e alegria, mesmo quando não enxergávamos absolutamente nada nos geis.

À colega e Doutoranda Andreia Marcelino Barbosa pela disponibilidade para me ensinar e ajudar sempre que precisava, pela paciência e atenção. O meu muito obrigada.

À colega e professora Doutoranda Iasmim Ribeiro da Costa Rizzo também pela disponibilidade em me ensinar e auxiliar quando precisei, pela paciência e dicas dadas a mim. O meu muito obrigada.

À colega Doutoranda Irene Plaza Pinto pela grande ajuda e disponibilidade em me ajudar, e aos conselhos de quando as PCRs não funcionavam de forma alguma.

Ao Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás por disponibilizar o Laboratório e equipamentos para realizar os testes necessários para a realização dessa dissertação.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás por me receberem tão bem e pela amizade. Pelos momentos de conversas “jogadas fora” e pelas dicas que me ajudaram bastante durante toda minha estadia por ali.

Aos funcionários da Pontifícia Universidade Católica de Goiás Natalina, e ao guardas João e Wesley, que tantas vezes se disponibilizaram a abrir a sala para que pudesse usar o termociclador e muitas vezes fazer a visualização do gel.

Ao meu colega de graduação e Pós-Graduação Fábio de Oliveira Souza, pelas horas de trabalho, pelas trocas de aprendizados e as boas conversas que tivemos nesses anos.

Aos professores que si dispuseram a nos ensinar nessa jornada do Mestrado em Genética.

Aos professores Doutores Rita de Cassia e Paulo Roberto por se disporem a participar da minha banca.

Aos pacientes que se disponibilizaram a participar deste projeto que é de grande relevância para a Ciência.

Á todos que contribuíram e torceram pelo meu sucesso.

O meu carinho e muito obrigada.

EPÍGRAFE

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 Introdução	18
2 Referencial Teórico	20
2.1 Definição/Patogênese	20
2.2 Epidemiologia	26
3 Componente Genético	28
3.1 Aterosclerose	28
3.2 Gene Receptor beta de estrógeno	31
4 Objetivos	42
4.1 Objetivo Geral	42
4.2 Objetivos Específicos	42
5 Materiais e Métodos	43
5.1 Casuística	43
5.2 Extração de DNA	44
5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	44

5.4 Análise de dados	46
6 Resultados	46
7 Discussão	50
8 Conclusão	55
REFERÊNCIAS BOBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura ilustrativa da Abordagem diagnóstica integrada na doença cardíaca e coronária. Com marcadores celulares, marcadores bioquímicos, marcadores epigenéticos e marcadores transcricionais. Fonte: Infante et al., 2017 (modificado).	24
Figura 2: Figura ilustrativa da formação da placa de ateroma no interior do vaso sanguíneos. Fonte: CRID,2014.	25
Figura 3: Figura representativa de um Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP). Fonte: Neuro Relief The NEI Connection, 2014.	29
Figura 4: Figura ilustrativa da Estrutura química de estrogênios naturais e sintéticos. Fonte Quim. Nova, Vol. 30, No. 3, 651-666, 2007.	32
Figura 5: Representação esquemática da Estrutura dos domínios funcionais e descrição dos polimorfismos no gene humano do receptor β . Éxons codificados (E) estão indicados dentro das caixas. TAF, função da atividade transcricional; URT, região não codificante. Fonte: Gennari et al., 2005.	34
Figura 6: Representação do Modelo de ação do estrógeno. Fonte: Deroo e Korach, 2006.	38
Figura 7: Foto do gel de Agarose mostrando os polimorfismos A e G.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Sequência dos primers e tamanho esperado dos fragmentos. Fonte: Aschim et al., 2005.	44
Tabela II: – Protocolo para amplificação do polimorfismo RsaI do gene RE β (RsaI variante A). Fonte: Bordin et al., 2009.	45
Tabela III: Protocolo para amplificação do polimorfismo do RsaI do gene RE β (RsaI variante G). Fonte: Bordin et al., 2009.	45
Tabela IV: Protocolo de Termociclagem para amplificação dos primers do polimorfismo RsaI do gene RE β para as variantes A e G. Fonte: Bordin et al., 2009.	45
Tabela V: Presença genotípica do polimorfismo do gene <i>RsaI</i> nos grupos caso e controle.	47
Tabela VI: Frequência do polimorfismo do gene ER β (<i>RsaI</i>) em relação ao sexo nos pacientes caso e controle.	48
Tabela VII: Frequências genotípicas do polimorfismo do gene <i>RsaI</i> em pacientes que apresentam hipertensão arterial do grupo caso.	49
Tabela VIII: Frequências genotípicas do polimorfismo do gene <i>RsaI</i> em pacientes que apresentam dislipidemia no grupo caso.	49
Tabela IX: Frequências genotípicas do polimorfismo do gene <i>RsaI</i> em pacientes do grupo caso que apresentam ou não <i>diabetes mellitus</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A – Adenina
A – Alfa
a.C. – Antes de Cristo
Ap1 – Ativador da proteína -1
Apos – Apolipoproteínas
ApoE – Apolipoproteína E
B – Beta
C - Citosina
Ca²⁺ - Íon cálcio
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico
CAM – Moléculas de adesão celular
CETP – Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CNVs – Variação no número cópias
CPEs – Células progenitoras endoteliais
CREB – Elemento responsivo de ligação à proteína
CT – Colesterol total
DAC – Doença aterosclerótica coronariana
DBD – Domínio de ligação do DNA
DCV - Doenças Cardiovasculares
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Deoxinucleotídeo trifosfato
E1 - Estrona
E2 - 17β-estradiol
E3 – Estriol
E4 – Estretol
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial
ER-X – Receptor associado à membrana
ESR 1 – Receptores de estrógeno 1
ESR 2 – Receptores de estrógeno 2
EREs – Elementos responsivos ao estrogênio
Fw – Forward
G – Guanina
GPR30 – Receptor acoplado à proteína G30
Gq-mER – Receptor de estrogênio acoplado à membrana
GST - Glutathionas S-transferase
HAS – Hipertensão arterial sistêmica
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HDL-C – Lipoproteína de alta densidade - colesterol

IL – Interleucina
IDL – Lipoproteína de densidade intermediária
KDa – Kilo Daltons
LAC – Laboratório de Análises Clínicas
LBD – Domínio de ligação COOH- terminal
LCAT – Lecitina-colesterol transferase
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LDL-C – Lipoproteína de baixa densidade – colesterol
LDLR – Receptor do gene do LDL
LDL-oxi – Lipoproteína de baixa densidade oxidada
Lp(a) – Lipoproteína a
LPL – Lipase lipoprotéica
MAP quinase – Proteína quinase ativadora de mitose
MCP-1 – Proteínas quimioatrativas dos monócitos
mg – Miligramas
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
mL – Mililitros
mM – Milimolar
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
μL – Microlitros
ncRNA – Ácido ribonucleico não codificante circulante
ng – Nanogramas
NO – Óxido Nítrico
NPR – Núcleo de Pesquisas Replicon
Nrf2 – Fator nuclear2 relacionado ao eritrócito
NTD – Domínio NH₂ terminal
OMS – Organização Mundial da Saúde
pb – Pares de bases
PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PCSK9 – Pró-proteína convertase subtilisina quexina tipo 9
PUC – Pontifícia Universidade Católica
q25.1 – Braço longo região 2 banda 5, sub-banda 1
q22-24 – Braço longo região 2 banda 2 até banda 4
RE – Receptor de estrógeno
RE α - Receptor de estrógeno alfa
RE β – Receptor de estrógeno beta
Rer – Reverse
RI – Resistência à insulina
RNA – Ácido ribonucléico

ROS – Espécies reativas de oxigênio
SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único
SUS – Sistema Único de Saúde
T - Timina
TBE – Tris-borato de EDTA
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
TG – Triglicérides
TNF – Fator de necrose tumoral
VLA – Antígeno de ativação muito tardia
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade
VSMC – Células espumosas do músculo liso vascular

RESUMO

As doenças cardiovasculares, principalmente a aterosclerose, são as doenças não transmissíveis com maior índice de mortalidade em todo o mundo, até mesmo em países onde as pessoas possuem renda média e baixa. Podem ser influenciadas por hábitos modificáveis como o sedentarismo, uso frequente do tabaco, ingestão de alimentos ricos em gorduras, hipertensão arterial, níveis elevados de colesterol de baixa densidade (LDLc), *diabetes mellitus*, obesidade. Os fatores não modificáveis ou genéticos são idade, histórico familiar e sexo. A formação da placa aterosclerótica ocorre de forma lenta, devido a um processo inflamatório e imunológico onde há alterações vasculares de células endoteliais, células espumosas, acúmulo de lipídeos modificados, calcificações, formação de trombos, presença de marcadores inflamatórios, componentes genéticos como ApoE e diversos tipos de polimorfismos como o do gene receptor de estrógeno. Em geral o desenvolvimento da aterosclerose se inicia ainda na infância, mas os sintomas começam a aparecer a partir da meia idade. O receptor de estrógeno é expresso em vários tecidos, está associado como o desenvolvimento de hipertensão arterial e o espessamento da parede ventricular em mulheres que são hipertensas, e a infertilidade masculina e feminina. Este possui dois polimorfismos, alfa e beta, onde o não funcionamento correto ou a redução do número de cópias deste segundo está ligado diretamente ao desenvolvimento da aterosclerose. Apesar da presença do polimorfismo (G1082A) não alterar sua proteína, ele pode alterar o mRNA e influenciar sua expressão. Este estudo teve como objetivo analisar o polimorfismo do receptor beta de estrógeno (RE β) em pacientes com aterosclerose e verificar se a presença desse tipo de polimorfismo está relacionado ao desenvolvimento da mesma. Foram analisados o sangue total de 55 pacientes com aterosclerose que foram diagnosticados através de exames de imagem (grupo caso), e 46 pacientes que não apresentavam a doença (grupo controle) de pacientes da Clínica Angiogyn e do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da PUC Goiás, no município de Goiânia. As amostras foram submetidas a PCR para verificar a presença do polimorfismo. Foi observado que a presença do polimorfismo AG/AA foi de 9,5 vezes maior que o genótipo GG ($p < 0,0001$) nos pacientes caso que no controle. Quando comparamos o polimorfismo e o sexo dos pacientes analisados também geraram dados significativos em relação aos genótipos AG/AA em relação ao genótipo GG.

Palavras-chave: Aterosclerose. Polimorfismo. Receptor beta de estrógeno. RsaI.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases, especially atherosclerosis, are the noncommunicable diseases with the highest mortality rates worldwide, even in countries where people have low and middle income. They may be worldwide, even in countries where people have low inactivity, frequent use of tobacco, ingestion of high fat foods, high blood pressure, high levels of low density cholesterol (LDLc), diabetes mellitus, obesity. Unmodifiable genetic factors are age, family history, and gender. Atherosclerotic plaque formation occurs slowly, due to an inflammatory and immunological process where there are vascular alterations of endothelial cells, from cells, accumulation of modified lipids, calcifications, thrombus formation, presence of inflammatory markers, genetic components such as ApoE and several types of polymorphisms such as the estrogen receptor gene. In general, the development of atherosclerosis begins in early childhood, but symptoms begin to appear from middle age. The estrogen receptor is expressed in various tissues and is associated to the development of hypertension and ventricular wall thickening in women who are hypertensive, and with male and female infertility. It has two polymorphisms, alpha and beta, where the malfunctioning or reduced copy number of this second is directly linked to the development of atherosclerosis. Although the presence of polymorphism (G1082A) does not alter its protein, it can alter mRNA and influence its expression. This study aimed to analyze the estrogen receptor beta (RE β) polymorphism in patients with atherosclerosis and to verify if the presence of this type of polymorphism is related to its development. Whole blood from 55 atherosclerosis patients who were diagnosed by imaging (case group) and 46 patients without the disease (control group) from patients at Angiogyn Clinic and the Clinical Analysis Laboratory (LAC) of PUC Goiás, in the municipality of Goiânia. The samples were submitted to PCR to verify the presence of the polymorphism. It was observed that the presence of AG/AA polymorphism was 9,5 times higher than the GG genotype ($p < 0,0001$) in the patients than in the control. When comparing the polymorphism and gender of the patients analyzed, they also generated significant data regarding the AG/AA genotypes compared to the GG genotype.

Keywords: Atherosclerosis. Polymorphism. Estrogen receptor beta. RsaI.

1. INTRODUÇÃO

As doenças do aparelho circulatório são a principal causa de mortalidade desde a década de 1960, sendo maior inclusive que a mortalidade por doenças transmissíveis no Brasil (BRASIL, 2004).

Cimadon et al. (2010) estimou que a partir de 2015 cerca de 20 milhões de pessoas morrerão anualmente por doenças cardiovasculares (DCV), e que a maioria dessas mortes, cerca de 80%, ocorrerão em países onde as pessoas possuem baixa ou média renda, e que podem ainda ser influenciados pelo sedentarismo, ingestão inadequada de alimentos ricos em gorduras e também pelo uso frequente do tabaco (CIMADON et al. 2010).

A forma mais comum de doença cardiovascular (DCV) é a aterosclerótica coronariana, que é multifatorial com determinantes genéticos e ambientais (NANNI et al. 2006).

A doença aterosclerótica coronariana (DAC) faz parte de um grupo de doenças conhecida como síndrome plurimetabólica (hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, obesidade e dislipidemia) e que são causadas principalmente por mudanças de hábitos de vida (LAGARES, 2017).

O desenvolvimento e formação da placa aterosclerótica pode ser influenciada por fatores modificáveis e não modificáveis. Os modificáveis são os hábitos alimentares, dislipidemia, uso do tabaco, sedentarismo, hipertensão arterial, *diabetes mellitus* e obesidade. Já os não modificáveis são o sexo (maior frequência nos homens que nas mulheres devida a presença do estrógeno que tem efeito protetor), histórico familiar e idade (TOLFREY, 2010; TUNSTALL et. al. 1994).

A formação da placa aterosclerótica ocorre devido um processo imuno-inflamatório (MAIURE, et al. 2013), onde alterações vasculares, do sistema imunológico e metabólicas encontram-se envolvidas, e ocorrem de forma lenta, iniciando-se ainda na infância (LOPPNOW, et al., 2011). Mas em geral os sintomas começam a se manifestar a partir da meia idade (FORD, 2003).

Diversos fatores podem favorecer o desenvolvimento da doença aterosclerótica coronariana (DAC), como regiões calcificadas, acúmulo de lipídeos modificados, células endoteliais, células musculares lisas, células espumosas, leucócitos, formação de trombos, espécies reativas de oxigênio (ROS), presença de marcadores inflamatórios como a interleucina (IL)1 e 6, fator de necrose tumoral (TNF), componentes genéticos

como Apolipoproteína E (ApoE), polimorfismos no gene CYP, e Receptores de estrógeno (FLAUZINO et al. 2014; MARINKOVIĆ et al. 2013; MARQUES e SÁ, 2011; HULSMAN et al. 2010; VILLADÓNIGA, 2008; ROSS, 1999).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Definição/Patogênese

A palavra aterosclerose é derivada do grego “athero” e que tem como significado caldo, mingau ou papa, e “sclerosis” significa enrijecimento (GOTTLIEB et al. 2005).

É um processo inflamatório crônico capaz de afetar a camada íntima e média das artérias de médio e grande calibres (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007), e que compromete sua elasticidade, dessa forma causa o seu endurecimento e espessamento. É formada basicamente por células inflamatórias, tecido fibroso e lipídios (STARY et al. 1995). Estas placas obstruem o lúmen vascular fazendo com que a túnica média subjacente torne-se enfraquecida (MARTINELLE et al. 2014).

Hipócrates (460-370 a.C.) descreveu a angina *pectoris* como sendo um dos sintomas da aterosclerose (MARTELLI, 2014; KUMAR et al. 2005; FAVARATO; LUZ, 2004), e esta foi observada em múmias egípcias há mais de 3.500 anos, sendo por isso uma doença bastante antiga (RUFFTER, 2005).

Leonardo da Vinci (1452 – 1519) observou e descreveu alterações da aterosclerose como sendo o entupimento de uma artéria, causada pelo acúmulo de gordura (KEELE, 1973).

Von Haller evidenciou no interior de uma placa aterosclerótica em 1755 uma estrutura de coloração amarelada e que se parecia com uma papa. Jean Lobstein descreveu-a como sendo aterosclerose senil (MAYERL, et al. 2006).

Felix Marchand, patologista alemão, caracterizou a aterosclerose como sendo lesões que afetam médias e grandes artérias com material lipóide contendo colesterol e o depósitos de placas de gordura (GIANNINNI, 2000).

O mundo moderno trouxe ao homem benefícios em seu estilo de vida, mas também modificações em seus hábitos. No passado gastava-se muita energia ao procurar o alimento, pois era necessário deslocar grandes distâncias. Porém, atualmente devido o aumento do sedentarismo, do consumo de açúcares e gorduras, a população teve como consequência um aumento de peso, sendo que nos homens foi de 56,5% e nas mulheres 49,1% (Ministério da Saúde, 2014).

As mudanças no estilo de vida contribuíram para o crescimento das comorbidades como a hipertensão arterial, da obesidade, e do *diabetes mellitus*. Em geral essas patologias apresentam conjuntamente alterações lipídicas, aumento do risco de doença arterial coronariana (DAC) e hipercoagulabilidade (BURKE; BELL, 2000).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, lenta, insidiosa, silenciosa, progressiva e multifatorial, resultante do acúmulo de lipídios e de várias respostas celulares e moleculares específicas (MARTINELLE et al. 2014). Seu desenvolvimento se inicia ainda na infância com a formação de estrias gordurosas, e o rompimento dessas estrias gordurosas é o principal responsável pela desregulação dos mecanismos de proteção da hemostasia endotelial (LOPPNOW, et al. 2011; FAVARATO e LUZ, 2004; CASELLA FILHO et al. 2003).

As placas de aterosclerose causam lesões no endotélio que resultam do carreamento de macrófagos (que se transformam em células espumosas devido estas conseguirem englobar grandes quantidades de lipídios) e os próprios lipídios, formando uma capa fibrosa rica em tecido conjuntivo fibroso e fibras musculares lisas (BERENSON et al. 1992; LIBBY, 2013; AMMIRATI et al. 2015; FALUDI et al. 2017) e do conseqüente espessamento das artérias e veias de grande calibre, podendo dessa forma levar a eventos isquêmicos distais ou mesmo à estenose arterial. Dessa forma as lesões iniciais podem evoluir para placas e promover o rompimento das veias e artérias, levando a agregação plaquetária e a ativação da cascata de coagulação sanguínea conseqüentemente (BADIMON et al. 2012).

Por muito tempo a aterosclerose foi considerada somente como um processo de deposição de lipídios e que tinha a capacidade de acometer as várias camadas da parede vascular de uma forma irregular, e dessa forma causando graus diversos de estenose. Vários estudos vêm mostrar que a aterosclerose é causada por diversos mediadores inflamatórios, os quais são responsáveis por sua instalação, bem como sua progressão. Dessa forma levando ao surgimento da doença aterosclerótica coronariana (DAC) (ROSS, 1999; TRACY, 1998).

A deposição das placas de gordura na parede arterial, principalmente da aorta, artérias cerebrais e coronarianas, é fator importante para a aterogênese e que pode levar ao aneurisma aórtico, isquemia cerebral e infarto do miocárdio, respectivamente (MARTELLI, 2014; GOTTLIEB et al. 2005; KUMAR et al. 2005; HACKAM; ANAND, 2003).

O aumento das lipoproteínas aterogênicas como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), quilomícrons remanescentes, tabagismo, obesidade, hipertensão arterial, sedentarismo e diabetes contribuem consideravelmente para a formação da placa aterosclerótica (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007).

Os lipídios são compostos químicos insolúveis em água, e que desempenham diversas funções no organismo. Podem ser utilizados como fonte de energia, precursor de hormônios esteroides, ácidos biliares, prostaglandina e constituinte das membranas plasmáticas (MONTGOMERY e cols.1996).

As alterações que ocorrem no metabolismo dos lipídios podem desencadear mudanças nas concentrações das lipoproteínas plasmáticas e dos lipídios circulantes, e contribuir com o surgimento e desenvolvimento de doenças crônicas, principalmente as cardiovasculares, são conhecidas como dislipidemias. Estas podem ser classificadas em primárias ou secundárias (DÂMASO, 2001; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

As primárias, ou de origem genéticas, são aquelas que incluem as alterações metabólicas e os distúrbios metabólicos. Já as chamadas dislipidemias secundárias podem ser desencadeadas por patologias como: *diabetes mellitus*, hipotireoidismo, insuficiência renal crônica, obesidade, síndrome nefrótica, uso de medicamentos como diuréticos, corticosteroides, anabolizantes, betabloqueadores, e ainda pelo uso abusivo de álcool (COUTINHO; CUNHA, 1989).

As dislipidemias têm uma base multifatorial, genética, onde podem ocorrer mutações em um ou mais genes responsáveis pelo acúmulo dessas lipoproteínas, e ambiental, onde o estilo de vida como atividade física e perda de peso são importantes para os indivíduos com dislipidemia (XAVIER et al. 2013; SPOSITO et al. 2007; SCHULZ, 2006).

Essas consideram os valores de colesterol total (CT), triglicérides (TG), LDL-C, e HDL-C. Podem ser classificadas de acordo com a fração lipídica alterada, sendo assim classificadas em hipertrigliceridemia isolada (Triglicérides \geq 150 mg/dl), hipercolesterolemia isolada (LDL – colesterol \geq 160 mg/dl), hiperlipidemia mista (LDL – colesterol \geq 160mg/dl e Triglicérides \geq 150mg/dl), redução do HDL-C (em mulheres $<$ 50mg/dl e homens $<$ 40mg/dl) isolado, ou ainda redução do HDL-C associada com o aumento do LDL-C e/ou triglicérides (SPOSITO et al. 2007; XAVIER et al. 2013).

Os hormônios esteroides formados a partir do colesterol formam ainda a vitamina D e ácidos biliares (V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2013).

As lipoproteínas plasmáticas permitem o transporte e a solubilização dos lipídios no plasma. Elas são chamadas de apolipoproteínas (apos), e podem exercer diferentes funções no metabolismo das lipoproteínas. Dentre elas tem-se as proteínas de densidade baixa (*low density lipoprotein LDL*), que são ricas em colesterol, as proteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein VLDL*), de origem hepática, e ainda as de densidade alta (*high density lipoprotein HDL*), rica em colesterol, as de densidade intermediária (*intermediary density lipoprotein IDL*), e a lipoproteína a (Lp a), que é formada pela união entre uma partícula de LDL e a Apo a (V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2013).

As lesões causadas ao endotélio desencadeiam um processo inflamatório que pode ocorrer pelo LDL oxidado (Lipoproteína de baixa densidade oxidada - LDLoxi), homocisteína, lesões mecânicas, imunológicas ou ainda mesmo causadas por vírus (Ross,1993).

Mecanismos de alterações fenotípicas do endotélio vascular e a oxidação de lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (LDL), têm grande capacidade de produzir substâncias quimiotáticas de linfócitos os quais liberam espécies reativas de oxigênio e promovem vasoconstrição. Dessa forma as propriedades antitrombóticas são reduzidas e a formação de trombos (aterotrombose) é uma das principais manifestações clínicas da aterosclerose (FALUDI et al. 2017).

O desequilíbrio plasmático juntamente com as injúrias causadas pela agressão ao endotélio, que podem ser endógenas como as citocinas e interleucinas, ou exógenas como os agentes infecciosos, são capazes de promover uma vasoconstrição, alterando a função do endotélio, sua desnudação e permitido que a permeabilidade a fatores pró coagulantes esteja aumentada, assim como a produção de glicoproteínas extracelulares e a adesão de leucócitos (ZHANG, et al. 1993; LOPPNOW, et al. 2011).

Estas disfunções do endotélio podem aumentar a permeabilidade da camada íntima das artérias às lipoproteínas plasmáticas, e como consequência aumentar o tempo de retenção no espaço subendotelial. Quando retidas no endotélio, as LDLs podem sofrer oxidação e permitir a exposição de neoepítomos, tornando-as imunogênicas (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013).

Os leucócitos penetram a parede do endotélio por diapedese através de junções celulares. Citocinas com propriedades quimioativas e proteínas quimioatrativas dos monócitos MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) são capazes de recrutar células, tendo dessa forma grande expressão em placas ateromatosas. Marcadores de ativação como antígeno de ativação muito tardia (*very late antigen, VLA*), fator de necrose tumoral (TNF), lipoproteína de alta densidade (high density lipoprotein - HDL), Interleucina – 2 (IL-2), fragmentos de fatores do complemento e outras interleucinas promovem maior adesividade e atração de monócitos, resultando assim em um maior recrutamento de células para o local da lesão (Davies, 1995). (Figura 1).

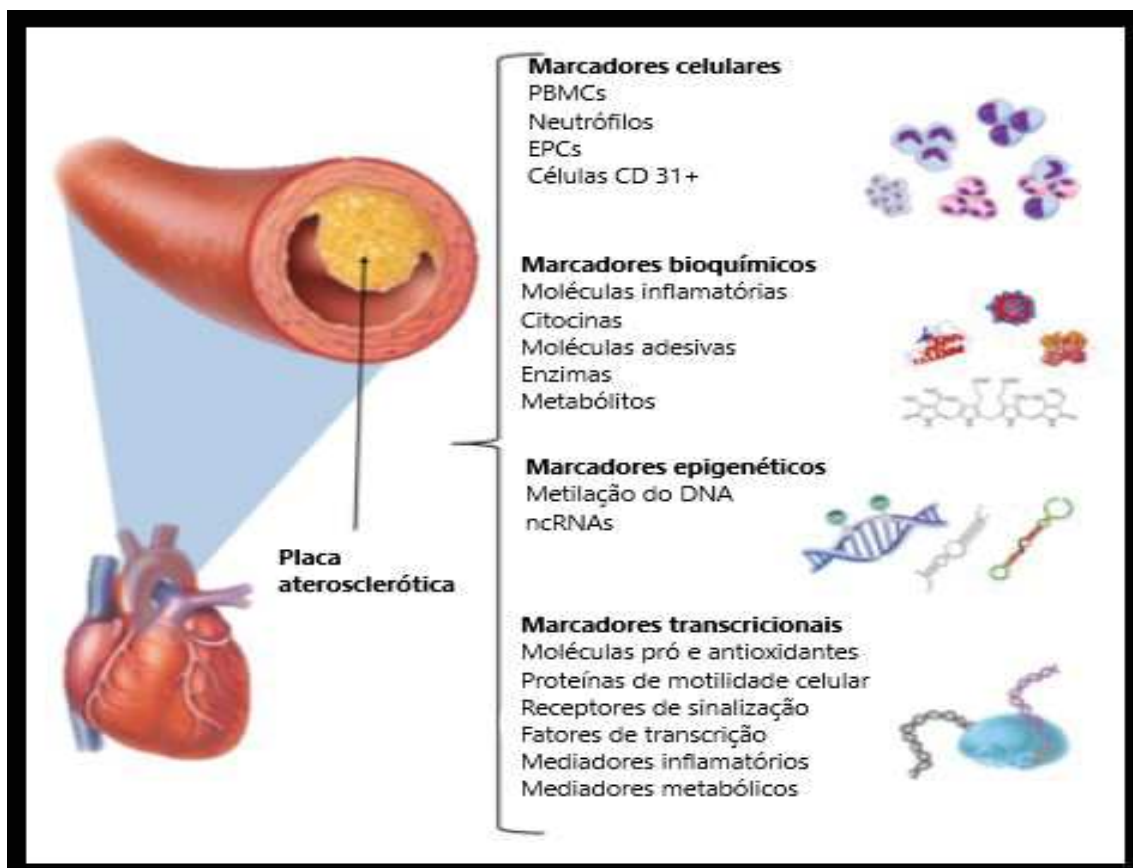


Figura 1: Abordagem diagnóstica integrada na doença cardíaca coronária. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), células progenitoras endoteliais (CPEs), RNAs não-codificantes circulantes (ncRNAs). Fonte: Infante et al., 2017 modificado.

Estudos mostram que há uma relação quando se tem níveis elevados de fibrina, fibrinogênio e seus produtos de degradação e a formação da placa de ateroma. E que o

fibrinogênio também é o precursor de trombos murais. Ainda está envolvido na agregação plaquetária e injúria celular das células endoteliais (BARBALHO et al. 2014).

Quando se tem fatores elevados de fibrinogênio e estes estão associados à fatores de risco como tabagismo, resistência à insulina (RI), dislipidemia, sedentarismo e hipertensão, os riscos de formação de trombos se elevam devido ao estreitamento do lúmen vascular e um possível rompimento da placa aterosclerótica (BARBALHO et al., 2014). (Figura 2).

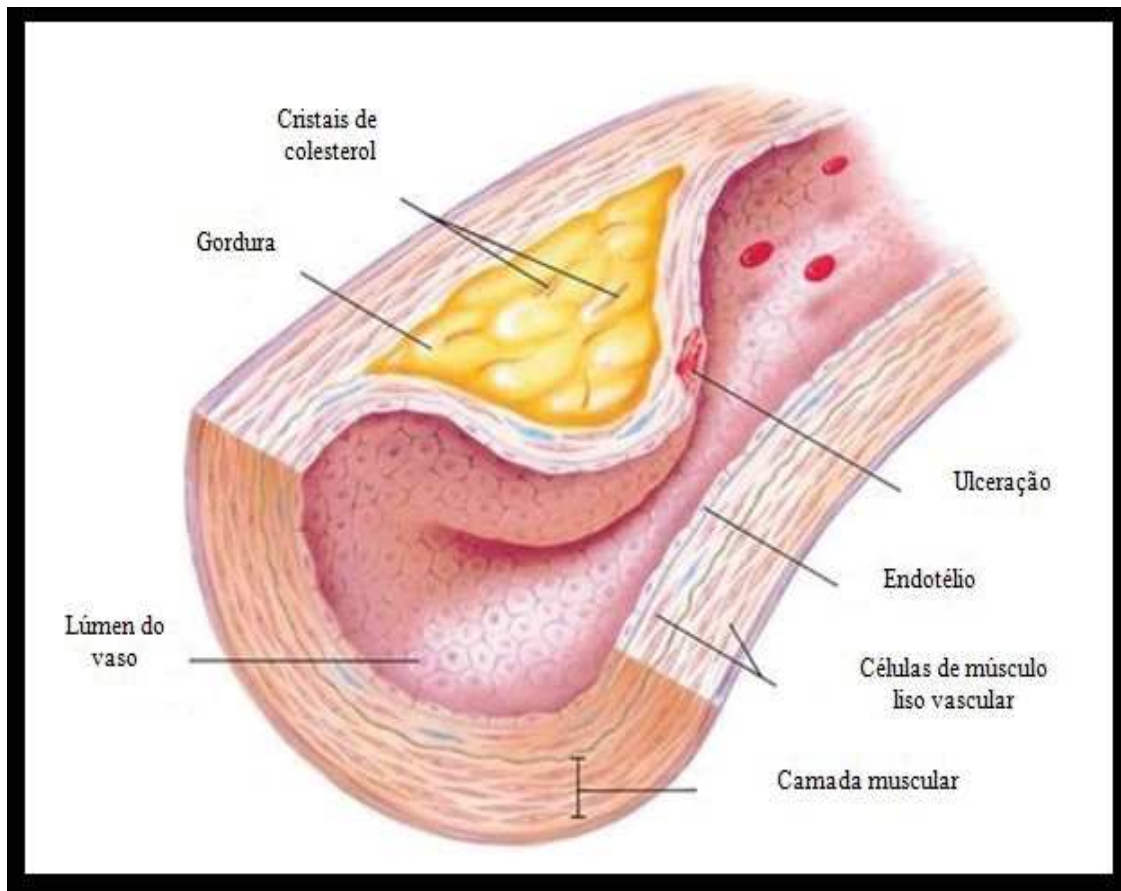


Figura 2: Formação da placa de ateroma no interior do vaso sanguíneo. Fonte: CRID, 2014.

2.2 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares (DCV) são uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo e com cerca de 17,3 milhões de mortes anuais (INFANTE et al. 2017), e que ocorre principalmente em países desenvolvidos, sendo que nos Estados Unidos chega a ser responsável por mais de 500 mil mortes anuais (FRANÇOSO; COATES, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) irá ocorrer um aumento de cerca de 223% de idosos no mundo até o ano de 2025, e com esse aumento eleva-se o risco de aumento da pressão arterial sistêmica (HAS) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005).

Infante et al. (2017) estima que em 2030 aproximadamente 23,6 milhões de pessoas morrerão por ano devido às DCV, e que estas têm uma grande importância para os sistemas públicos de saúde. A aterosclerose é uma das principais causas de doença arterial coronariana e cardiovasculares.

A principal forma de manifestação da DAC é o infarto do miocárdio, e cerca de 50% dos pacientes têm como primeiro sinal da patologia a *angina pectoris* (DALEN et al. 2014).

Países como Estados Unidos e os que fazem parte da Europa tiveram uma grande redução de doenças transmissíveis, mas em contrapartida tiveram um aumento no número de doenças crônicas como a aterosclerose e hipertensão. Isso faz com que o indivíduo tenha uma diminuição do período de vida e redução da sua idade produtiva (MOZZAFARIAN et al. 2015; MURRAY et al. 2010; HERRINGTON et al. 2016).

Em 2007 Ford et al. demonstrou que a prevalência de indivíduos com sobrepeso e obesidade chegou a 40% em algumas capitais brasileiras. A obesidade, sedentarismo, diabetes mellitus, alterações do perfil lipídico, hábitos inadequados de alimentação e aumento da pressão arterial são fatores que podem contribuir com o surgimento de DAC (CAMPELO et al. 2014).

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando que as doenças cardiovasculares são mais prevalentes em homens com idade entre 30 e 45 anos do que em mulheres com a mesma idade (TUNSTALL et al. 1994). Nestes casos a mortalidade entre homens é três vezes maior que em mulheres (SHEN et al. 2015), e que mulheres entre 45 e 64 anos têm 1:9 chances de desenvolver algum tipo de DAC, e que acima dos 65 anos esta estatística passa para 1:3 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2008).

Sugerindo que os hormônios estrogênicos têm um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular (SHEN et al. 2015; DUBEY et al. 2004; ORSHAL e KHALIL, 2004).

Framingham em 1996 fez um estudo prospectivo de longo prazo de doença cardiovascular incluindo homens e mulheres e observou que os eventos coronários eram duas vezes mais recorrentes em homens que em mulheres, mas que quando essas estavam com idades mais avançadas a prevalência era a mesma (VILLADÓNIGA, 2008).

Homens com doenças isquêmicas do coração eram duas vezes mais frequentes que as mulheres, em várias populações estudadas. Os sintomas da DAC são diferentes entre os sexos, onde os homens apresentavam maior taxa de infarto do miocárdio, enquanto as mulheres apresentavam angina (VILLADÓNIGA, 2008).

Os ataques coronários fatais foram mais frequentes em mulheres, embora aquelas que sobreviveram a esses eventos tiveram o mesmo prognóstico que os homens. Indivíduos de ambos os sexos que praticavam atividades físicas tiveram maior proteção contra doenças cardíacas e um aumento da relevância de fatores ambientais como moduladores de expressão gênica (VILLADÓNIGA, 2008).

Quando se compara mulheres menopausadas com as que estão na fase de pré-menopausa, nas primeiras as doenças cardiovasculares são mais prevalentes (SHEN et al. 2015). Cerca de 95% das mulheres desenvolvem DAC quando entram na menopausa devido aos baixos níveis de estrógeno endógeno (DUBEY et al. 2005), e sendo essa a principal causa de morte feminina (YUSUF et al. 2001; LIBBY, P., 2005). A incidência entre homens e mulheres na menopausa se iguala (SHEN et al. 2015).

Esses eventos de Doença Cardiovascular podem ocorrer de forma assintomática, e muitas vezes podem ser fatais (SANTOS; NASIR, 2009).

Segundo Herington et al. (2016) no Reino Unido a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares diminuiu de 22% em 1950 para 6% em 2010, em homens com idades entre 35 a 69 anos. Mas alguns países do Leste Europeu e Ásia mostraram um aumento no número de casos e mortes relacionados com DAC.

3. COMPONENTE GENÉTICO

3.1 Aterosclerose

O componente genético na população que apresenta doença arterial coronariana é em muitos casos desconhecido. Na prática clínica, esse componente se baseia no aparecimento precoce de DAC nos pais do indivíduo, onde a mãe com idade menor que 65 anos, o pai com menos de 55 anos ou mesmo em irmãos que apresentem esta doença (KULLO; DING, 2007).

Esta não é uma análise muito sensível, pois não leva em consideração outros fatores que podem estar associados com o desenvolvimento da DAC (MANSUR, 2000). Os riscos podem dobrar se considerarmos principalmente os parentes de primeiro grau, e está intimamente ligado ao sexo do indivíduo que apresentou o primeiro evento (KULLO & DING, 2007).

Diversos fatores genéticos estão envolvidos na fisiopatologia do organismo humano, e desempenham diferentes funções como regulação do apetite, metabolismo dos lipídios, regulação energética, e diferenciação celular. Para isso existem mais de 600 genes e locus cromossômicos que auxiliam na regulação do peso corporal, na regulação e sensibilidade à insulina e também no controle do metabolismo energético (GOODPASTE et al. 2002; MUTCH; CLÉMENT, 2006).

Ao se analisar as características genéticas da DAC e a relação que ela apresenta com os fatores ambientais pode-se identificar de forma precoce indivíduos ou mesmo famílias que possuam alto risco para seu desenvolvimento. Para isso se deve analisar um painel de polimorfismos genéticos e a estreita relação que eles têm com os fatores de risco para desenvolvimento da aterosclerose (MANSUR, 2000).

Diferentemente das doenças com padrões de transmissão mendeliana, a aterosclerose não é atribuída a genes individuais. Ela provavelmente está ligada a um conjunto de variantes gênicas que podem ser na forma de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), variações no número de sequências repetidas (CNVs), mutações, deleções, mini e microsátélites (KUEHL et al. 2001; SEO et al. 2004).

O polimorfismo de nucleotídeos único (SNP) é uma variação em uma única base nitrogenada na sequência do DNA, e que é encontrada em mais de 1% da população (BRUNTON et al. 2015). São decorrentes de uma mutação pontual no DNA, e podem ser considerados marcadores evolutivos, explicar geneticamente o risco de desenvolvimento para determinadas enfermidades como diabetes, dislipidemias, síndrome metabólica e fatores de risco cardiovasculares. Podendo ainda ser utilizados

na prevenção primária de certas doenças, no diagnóstico e uma melhora na conduta do tratamento do paciente, e ainda pode auxiliar no aconselhamento genético para pacientes que já são sabidos portadores de genes alterados (DERAM; VILLARES, 2012; FAREED; AFZAL, 2013; SABINO, 2004).

Os polimorfismos (Figura 3) podem alterar a função ou a quantidade de proteínas codificadas, e ainda podem exercer efeito dominante no desenvolvimento da aterosclerose (SEO et al, 2004).

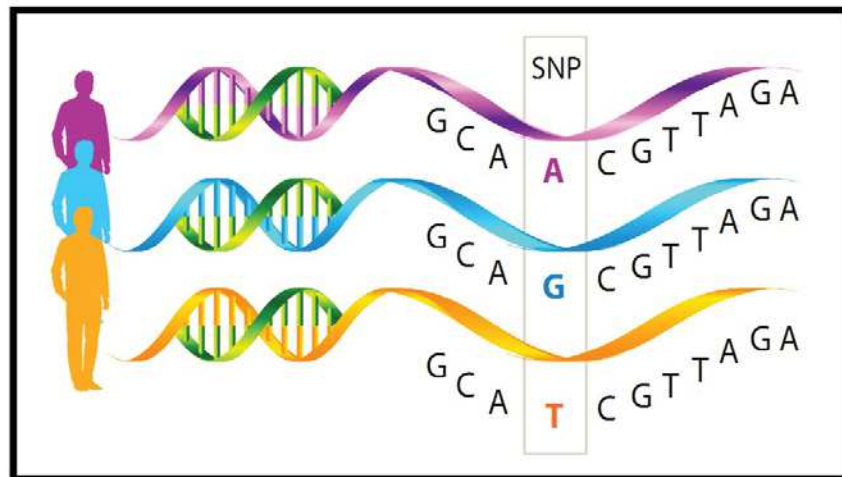


Figura 3: Figura representativa de um Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Fonte: Disponível em: <https://neuroendoimmune.wordpress.com/2014/03/27/dna-rna-snp-alphabet-soup-or-an-introduction-to-genetics/>. Março 27,2014 por NeuroRelief. **The NEI Connection** All about the Neuro-Endo-Immune Supersystem

Diversos fatores genéticos estão envolvidos com o risco de desenvolvimento da aterosclerose. Cerca de 400 genes podem estar diretamente envolvidos no desenvolvimento desta patologia, pois são responsáveis pela coagulação, metabolismo dos aminoácidos, de hidratos de carbono e de lipídios, inflamação, e regulação da função endotelial. Alguns dos genes responsáveis por essa patologia são os GSTs (Glutathione S-transferase), ApoA-I, ApoA-II, ApoB, ApoC, Apo C-III, ApoE (Apolipoproteínas), CYPs, eNOS (Óxido Nítrico Sintase endotelial), receptor do gene do LDL (LDLR), lipase hepática, lipase lipoprotéica (LPL), proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), lecitina-colesterol transferase (LCAT) e os Receptores de

estrógeno (ESR1 e ESR2) (FLAUZINO et al. 2014; MARINKOVIĆ et al. 2013; MARQUES e SÁ, 2011; VILLADÓNIGA, 2008; KULLO e DING, 2007).

As moléculas de adesão celular (CAM) foram consideradas como implicadoras de desordens vasculares como aterosclerose, vasculite, isquemia e reperfusão. Sua expressão é capaz de explicar a disfunção microvascular associada a diversos fatores que podem levar ao desenvolvimento da doença cardiovascular como a hipercolesterolemia, diabetes e hipertensão arterial (VILLADÓNIGA, 2008).

Mutações como a que ocorre com a Pro-proteína convertase subtilisina quexina tipo 9 (PCSK9) podem alterar de forma bastante grave a função da proteína que a codifica e que acaba levando o indivíduo ao desenvolvimento da Hipercolesterolemia Familiar. Porém polimorfismos neste mesmo gene ou mesmo em outros que estejam envolvidos no metabolismo de lipídios, normalmente possuem efeito menor e afetam de forma mais branda a atividade protéica, podendo algumas vezes até não levar ao desenvolvimento da doença (BOURBON, 2008).

O Nrf2 diminui o stress oxidativo e a respectiva produção do peróxido lipídico através da indução de genes antioxidantes que vão exercer efeito protetor em relação à aterosclerose (BOURBON, 2008).

No DNA ao ocorrer o processo de metilação, os mecanismos baseados no RNA e as modificações ocorridas nas histonas são eventos que podem estar envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose, ou ainda ser responsável por características herdadas dessa doença (BACCARELLI et al. 2010; LOSCALZO; HANDY, 2014).

3.2 Gene Receptor beta de estrógeno

Os hormônios esteroides são moléculas lipofílicas, derivadas do colesterol e são utilizadas pelo organismo como mensageiros químicos, e que exercem função nas células alvo após sua ligação com o receptor específico, que está localizado no núcleo celular (MENDELSON, 2002). Estes hormônios esteroides possuem um núcleo esteroide comum contendo três anéis com seis átomos de carbono e também um anel com cinco átomos de carbono (PEREIRA, MIGUEL, 2017).

Estão divididos em quatro classes: progestágenos, andrógenos, estrógenos, corticoides (glicocorticoides e mineralocorticoides). O hormônio estrógeno é de grande importância para os processos fisiológicos em homens e mulheres. Em vertebrados agem em diversos tecidos influenciando diversos aspectos biológicos, como a diferenciação sexual, manutenção da densidade óssea, regulação osmótica, a fisiologia reprodutiva e o metabolismo intermediário, auxilia na função imunológica e na homeostase mineral, estimulação do crescimento e sofrem a aromatização em andrógenos em tecidos periféricos. É metabolizado no fígado (GUEDES-ALONSO et al. 2014; KJELDSSEN; BONEFELD-JORGENSEN, 2013; HAMID; ESKICIOGLU, 2012; ANTONOVOW, 2007).

Os estrógenos são esteroides com 18 carbonos, e possuem um anel fenólico A, um grupamento β -hidroxila ou cetona na posição 17 do anel D. O primeiro anel é responsável pela ligação seletiva e de alta afinidade aos receptores estrogênicos (SAMAVAT; KURZER, 2015). São sintetizados a partir da aromatização de andrógenos. Nas mulheres são sintetizados nos ovários principalmente, mas também pode ocorrer sua produção pelas adrenais. A síntese extra gonadal pode ocorrer no tecido adiposo, placenta, coração, ossos, fígado, endotélio e músculo liso vascular (MLV), e sistema nervoso central, os quais também apresentam receptores para este hormônio. Possui ação angiogênica no útero, cérebro, membros e mamas (BERNASOCHI et al. 2019; LORGA et al. 2017; GUEDES-ALONSO et al. 2014, IGNACIO et al. 2009).

O estrógeno produzido pelas gônadas possui ação endócrina e atua nos tecidos distais, já o extragonadal possui ação apenas local (LORGA et al. 2017).

Os estrógenos incluem diversos compostos que se diferem em sua estrutura química e propriedades gerais, porém suas propriedades biológicas são comuns. Os principais representantes desse grupo são a estrona, o estriol e o estradiol (17 β -Estradiol

e 17 α -Estradiol) (GUEDES-ALONSO et al., 2014; BILA e DEZOTTI, 2007. (Figura 4.).

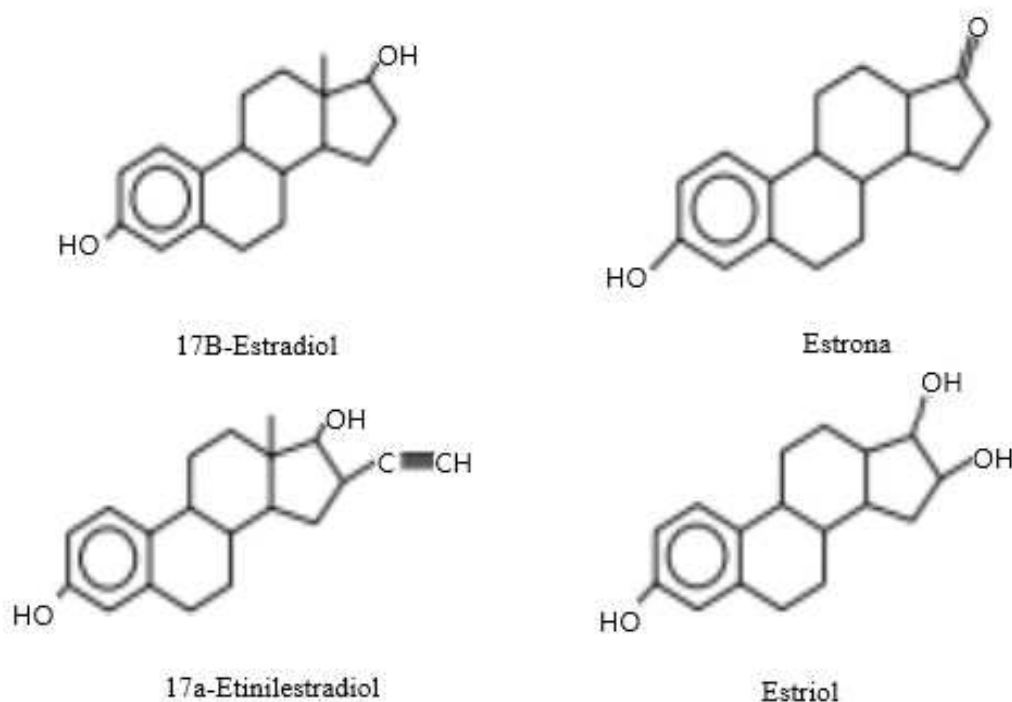


Figura 4: Estrutura química de estrogênios naturais e sintéticos. BILA e DEZOTTI. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Consequências. Quim. Nova, Vol. 30, No. 3, 651-666, 2007.

O 17 β -estradiol (E2) é o principal estrogênio circulante no organismo feminino, enquanto a estrona (E1) e o estriol (E3) são produzidos em menores quantidades, e o estretol (E4) é produzido apenas durante a gestação (COELINGH et al. 2017). Estes hormônios são sinalizadores químicos que irão atuar na comunicação em diferentes tipos celulares e que provoca uma resposta biológica específica (LUCENA, 2013).

Os hormônios estrogênicos possuem função cardioprotetora funcionando como um imunomodulador da resposta inflamatória na aterosclerose. Eles possuem a capacidade de regular o metabolismo lipídico que ocorre no fígado e conseguem diminuir o risco de DCV, pois aumenta a capacidade de síntese de LDL permitindo que seus níveis circulantes diminuam. Este hormônio também tem a capacidade de aumentar a atividade da enzima lipase lipoprotéica aumentando os níveis séricos de HDL (PALMISANO et al, 2018; USATEGUI-MARTÍN et al, 2019).

O estrógeno pode ter alguns efeitos benéficos sobre vasos sanguíneos, os mesmos observados pelo óxido nítrico, como a inibição da penetração do LDL na parede dos vasos sanguíneos, diminuição das contrações e proliferação das células do

músculo liso vascular, agregação plaquetária e dos monócitos, sendo ainda capaz de estimular a enzima produtora da síntese do óxido nítrico (LODISH et al. 2008; DEROO, KORACH, 2006; HERRINGTON, 2000).

Este hormônio pode ainda influenciar a coagulação sanguínea e fibrinólise, aumentando significativamente a produção de trombina, onde ocorre um aumento dos níveis plasmáticos de fatores de coagulação como fibrinogênio, fatores VII, VIII, IX, X, XII, XIII. Neste caso ocorre uma conversão maior de fator X a Xa (VERA et al. 2007).

A isquemia e a falência cardíaca estão ligadas às anormalidades bioenergéticas do metabolismo, devido ao aumento de apoptose, disfunção na sinalização do cálcio, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição do metabolismo energético. Estas anormalidades estão ligadas às alterações na homeostase mitocondrial (CHEN; KNOWLTON, 2010).

Estudos realizados com animais, mostram que a castração de machos não altera a reatividade vascular, porém a ovariectomia nas fêmeas causa um aumento da contração dos vasos sanguíneos. Em estudos com mulheres menopausadas que fazem o uso de reposição hormonal com estrógeno, mostra que a reatividade vascular a agentes constritores como a angiotensina II, bradicinina e acetilcolina é restaurada (CERAVOLO et al. 2007).

As taxas de lipoproteínas em geral e também suas subclasses também são alteradas sobre a influência dos estrógenos. Ele é capaz de alterar a taxa de remoção do colesterol e das suas frações lipoprotéicas devido ao aumento na produção de ácido biliar. Dessa forma o efeito cardioprotetivo do estrógeno ocorre devido à redução dos níveis séricos de lipídeos circulantes, e está ligado diretamente a ação dos receptores estrogênicos (DEROO, KORACH, 2006).

O hormônio 17β -estradiol está relacionado com o aumento da calcificação de células vasculares, pois atua na formação e a mineralização óssea, diminuindo sua perda devido a sua capacidade de inibir os osteoclastos e estimular os osteoblastos (McROBB et al. 2017). Esse hormônio exerce um efeito protetor principalmente sobre as mulheres em relação à placa aterosclerótica, pois reduz a carga da placa que está intimamente relacionada com as proteínas de baixa e alta densidade plasmática (TRAVISON et al. 2016; YANG, RECKELHOFF, 2011). O efeito protetor deste hormônio está ligado diretamente à progressão da placa aterosclerótica (OSAKO et al. 2010).

Os receptores para estrógenos e os outros tipos de hormônios esteroides (testosterona, progesterona e glicocorticoides), são receptores intracelulares e ativadores

de fatores de transcrição nuclear. Esses, quando ativados por seus antagonistas podem afetar a expressão gênica, pois atuam em sequências específicas dos genes-alvos, e também podem modular a transcrição gênica (SIMÕES, 2009; WELBOREN et al. 2009).

Os receptores de estrogênio (RE) são membro da superfamília de receptores nucleares e são ativados por fatores de transcrição do tipo ligante, que quando ativados podem iniciar ou mesmo aumentar a transcrição de genes que possuem respostas específicas ao hormônio. Estes receptores possuem seis domínios funcionais, e dois domínios que estão envolvidos na sua atividade transcricional (Xing et al. 2009; MEYER et al. 2009) (Figura 5). Isto mostra que eles possuem funções distintas para as respostas biológicas e também na regulação da transcrição gênica comandada pelo estradiol (BARDIN et al. 2004). A ação de cada receptor é dependente da quantidade e do nível de expressão de cada um desses receptores nos diferentes tecidos (CARRUBA, 2007).

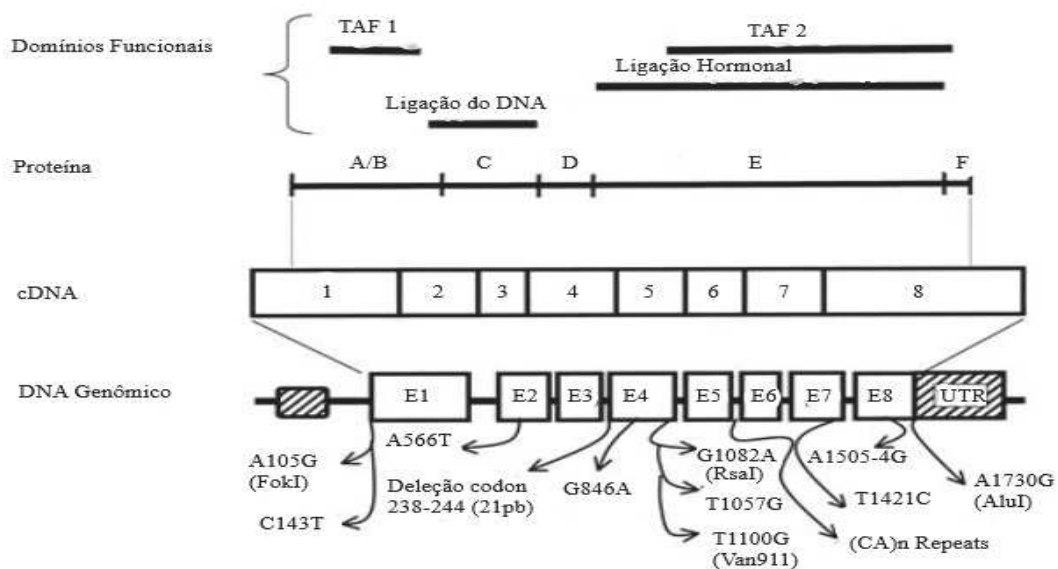


Figura 5: Estrutura dos domínios funcionais e descrição dos polimorfismos no gene humano do receptor β . Éxons codificados (E) estão indicados dentro das caixas. TAF, função da atividade transcricional; URT, região não codificante. Fonte: GENNARI et al., 2005.

Em 1995, foram encontradas as isoformas da proteína receptora para o estrogênio, e caracterizadas em diversas espécies, inclusive em humanos e roedores, sendo denominadas receptor estrogênico α (RE α) e receptor estrogênico β (RE β) (DEROO, KORACH, 2006; OGAWA et al. 1999).

A ação do estrógeno é mediada pelos dois tipos de receptores (REs) RE α e RE β , que estão localizados em cromossomos e genes diferentes. O RE α é codificado pelo gene ESR1 e localiza-se no cromossomo 6q25.1, possui 595 aminoácidos, e peso molecular de 66 KDa (MENASCE et al. 1993; GREEN et al. 1986). Possui oito éxons e sete íntrons. Existem três polimorfismos neste gene, sendo dois localizados no primeiro íntron, e o terceiro no éxon 1 (GARCIA et al. 1987).

O RE β é codificado pelo gene ESR2 e localiza-se no cromossomo 14q22-24 (SIDDIG et al., 2008; SUREKHA et al., 2009). Possui 485 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 54 KDa, existem dois tipos de polimorfismos (ALÉSSIO et al. 2008; CARRUBA, 2007; BORD et al. 2001).

Ambos possuem três domínios funcionais: o domínio de ligação do DNA (DBD), o domínio NH₂ terminal (NTD) e o domínio de ligação COOH- terminal (LBD). O NTD está ligado a transcrição e ativação de genes alvos e possui pequena similaridade entre os ER α e ER β . Já o DBD é um domínio altamente conservado entre os receptores estrogênicos e com grande identidade de aminoácidos e ação nos genes alvo. O LBD possui uma identidade intermediária entre os REs na sua sequência de aminoácidos e sítios de ligação (JIA et al. 2015). Estes genes apresentam um grau de homologia no domínio de ligação de DNA muito alto, mas se diferenciam bastante no domínio N terminal e no domínio E (CARRUBA, 2007; BORD et al. 2001).

Os ER α e ER β possuem diferentes sítios de ligação no DNA (ZHAO et al. 2010).

Tanto o RE α quanto o RE β atuam como fatores de ligação que estão localizados no citosol, mas que podem se translocar para o núcleo após sua ligação ao hormônio E₂. Dessa forma os receptores estrogênicos interagem com os Elementos Responsivos ao Estrógeno (EREs) na região promotora do gene alvo. O estrógeno ainda pode se ligar a diferentes subpopulações de receptores estrogênicos que se encontram associados à membrana plasmática e podem ativar uma variedade de cascatas de sinalização rápida intracelular (MEYER, BARTON, 2009; MEYER et al. 2009).

Os RE estão localizados na membrana mitocondrial dos tecidos cardíacos, e sua ativação ocorre via hormônio estrogênio que provoca alterações transcricionais nos genes que influenciam o correto funcionamento das mitocôndrias, na cardioproteção e na sobrevivência celular (KLINGE, 2017; KLINGE, 2008).

Algumas vezes os receptores estrogênicos podem ter a sua função não muito bem definidas dentro de uma célula devido a capacidade de formar homodímeros ou heterodímeros (SIMÕES, 2009).

Na ausência do hormônio estrogênio seus receptores permanecem inativos no citosol, mas ao fazerem a ligação hormonal os REs se deslocam para o núcleo e se ligam a sequências genômicas dos elementos responsivos ao estrogênio (ERE) na região promotora dos genes alvo, os quais irão regular sua transcrição

O receptor α tem sua maior expressão em tecidos reprodutivos, fígado, rins, mamas, adipócitos e ossos, enquanto o receptor β é expresso e encontrado em maior quantidade no sistema cardiovascular, órgãos reprodutivos masculinos, rins, sistema imune, pulmões, ovários, próstata e sistema nervoso central (SIMÕES, 2009).

Os genes que modulam para o receptor beta possuem vias de transdução de sinais e de genes que têm a capacidade de controlar a progressão do ciclo celular e da apoptose (CHANG et al. 2006), assim como também é responsável pela regulação da linhagem celular T47D (WILLIAMS et al. 2008).

O receptor beta de estrógeno é bastante expresso nos ossos, fígado, glândulas salivares, tecido adiposo, cérebro, útero, ovários, próstata, testículos, rins e endotélio vascular (ANFHEL et al. 2010; ZHAO et al. 2010). Apesar de pouco, sabe-se que o polimorfismo do RE β está relacionado a fatores de risco de desenvolvimento de DCV e alterações nos níveis séricos de lipídeos (SALITIKI et al. 2009).

A transcrição gênica pode ser regulada de forma negativa ou positiva através dos hormônios esteroides (CERAVOLO et al. 2007).

Os estrógenos podem agir por duas vias nas células endoteliais: uma pela via não genômica, a qual possui efeito rápido cerca de 5 a 20 minutos após sua exposição (LODISH et al. 2008; DEROO; KORACH, 2006) e que não ocorre a expressão gênica, apesar de ter a capacidade de promover mudanças na expressão gênica, mas o aumento da vasodilatação causada pelo óxido nítrico (NO). Aqui o estrógeno se liga a seus receptores na membrana ou próximas a ela, ou ainda à outras proteínas da membrana promovendo respostas celulares onde se tem o aumento dos níveis séricos de NO, cálcio (Ca²⁺) ou ainda a ativação de cinases (BOONYARATANAKORNKIT; EDWARDS, 2007; FU; SIMONCINI, 2007; DEROO; KORACH, 2006).

Os efeitos não genômicos que são mediados pelos estrogênios exercem influência sobre seus receptores, ER α e ER β que podem estar ligados a complexos proteicos junto à membrana plasmática e outros tipos de receptores como receptor

associado à membrana (ER-X), receptor de estrogênio acoplado à membrana (Gq-mER), e o receptor acoplado à proteína G30 (GPR30), têm a capacidade de ativar outras vias intracelulares independentes que podem fazer a transcrição nuclear (MICEVYCH; KELLY, 2012).

A resposta transcricional se deve a ligação dos dímeros aos EREs. Esses hormônios possuem a capacidade de ter efeitos genômicos quando se ligam a outros elementos responsivos (DEROO; KORACH, 2006).

A forma genômica também conhecida como forma direta ou clássica ocorre no citoplasma das células alvos e produzem mudanças conformacionais neste receptor, o qual promove a sua dimerização assim como a sua translocação ao núcleo promovendo uma resposta estrogênica (ERE) no seu gene alvo. Esse processo é lento, podendo levar horas para que ocorra (LODISH et al. 2008).

Já na via genômica, os receptores estrogênicos (RE) e do NO participam e inibem a injúria vascular nas células endoteliais, ocorrendo a diminuição da proliferação de células do músculo liso vascular. Neste caso o estrógeno se difunde pela célula e se liga a seu receptor (RE) que está localizado no núcleo, então este complexo (estrógeno-RE) se ligará a sequências reguladoras que estão nos genes-alvos, e dessa forma tem a capacidade de regular a transcrição do gene, ou ainda de forma indireta, recrutar proteínas co-reguladoras que podem diminuir ou aumentar a produção do mRNA e de sua proteína associada, o que leva à uma resposta fisiológica (LODISH et al. 2008; DEROO; KORACH, 2006) (Figura 6).

Na forma genômica o RE desencadeia uma ligação intracelular nos RE α e RE β que provoca sua dimerização e estes entram no núcleo. Dessa forma o estrogênio pode se ligar ao ERE, ou a proteína-1 específica (Sp1), ou mesmo ao ativador da proteína-1 (Ap1) para que ocorra a regulação do gene (BOPASSA et al. 2010).

Sabe-se que o estrogênio tem a capacidade de realizar efeitos genômicos via outros tipos de elementos responsivos como o cAMP elemento responsivo de ligação a proteína (CREB) e o Ativador de Proteína-1 (AP-1), entre outros tipos de fatores de transcrição (EDWARD, 2005).

O efeito genômico do estrogênio nos vasos sanguíneos está ligado à inibição da injúria vascular como também a proteção contra a aterosclerose (DEROO; KORACH, 2006).

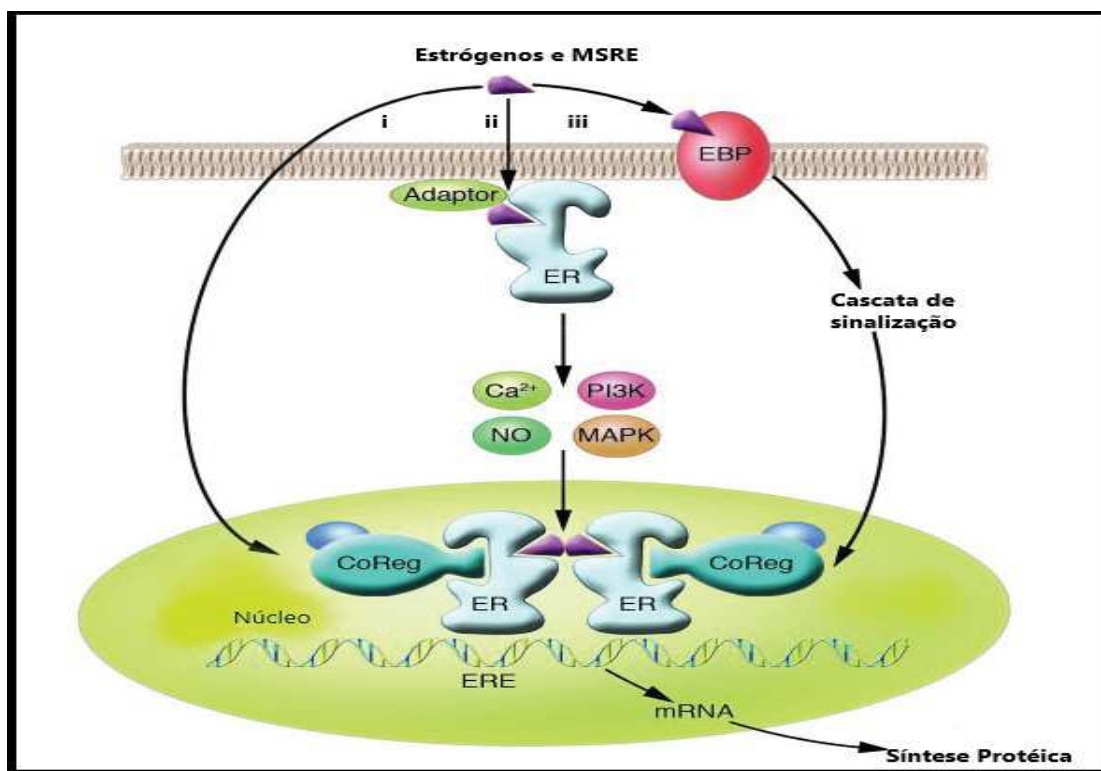


Figura 6: Modelo de ação do estrógeno: (i) Mecanismo genômico; (ii) Mecanismo não genômico, com ligação ao receptor de estrógeno (ER) na membrana plasmática; (iii) Ligação a proteínas da membrana (EBP). Adaptor: proteínas adaptadoras ao estrógeno; ER: receptor de estrógeno; EBP: proteínas da membrana plasmática que se liga ao estrógeno; ERE: elemento de resposta ao estrógeno; CoReg: proteínas com função co-reguladoras; MSRE: Modulador seletivo do receptor de estrógeno. Fonte: DEROO e KORACH, 2006. Adaptado.

Nas células vasculares, o estrógeno ao ser difundido pela membrana plasmática forma complexos com os receptores nucleares ou citosólicos, e ao se ligar à cromatina estimula sua transcrição induzindo o crescimento de células endoteliais. O 17β -estradiol (E2) tem a capacidade de promover a fosforilação e ativação de células endoteliais e de proteínas tipo MAP quinase (MAPK - proteína quinase ativadora de mitose). Nas células do músculo liso vascular o E2 pode inibir o crescimento e proliferação destas células, bem como inibir a atividade da MAPK, realizando efeito antagônico de promotores do crescimento (SCZKO et al. 2017; KHALIL, 2005; TAKEDA et al. 2002).

No endotélio vascular tem-se os dois subtipos de receptores de estrógenos α e β (RE α e RE β) (KHALIL, 2005). Ambos os polimorfismos estão associados à DAC. O polimorfismo do receptor α está ligado principalmente ao risco e a gravidade das DACs, incluindo o infarto do miocárdio e a isquemia cardíaca, principalmente em mulheres

menopausadas. Já o polimorfismo do receptor β está associado com a espessura da parede ventricular esquerda e da sua massa ventricular principalmente em mulheres hipertensas, e em homens está associado à pressão arterial (DEROO; KORACH, 2006).

Estudos feitos com ratos demonstram que indivíduos que não possuem o ER β desenvolveram hipertensão arterial com o avançar da idade e função vascular anormal. Esses estudos também mostram a função protetiva do estrógeno tanto na regulação dos níveis de colesterol como de outros lipídeos, e também o efeito sobre as células vasculares que sofrem injúria. O ER β também é capaz de diminuir o desenvolvimento da falência crônica cardíaca, assim como é capaz de mediar o efeito protetivo do estrógeno em fêmeas de ratos (DEROO; KORACH, 2006).

A ativação dos receptores pelo estrógeno está intimamente ligada a seus efeitos a curto prazo, e também com ativação de vias de sinalização que estão ligadas à inibição da contração aguda do endotélio vascular (ORSHAL; KHALIL, 2004; THOMPSON; KHALIL, 2003).

McRoob et al. (2017) reportou um aumento da expressão de mRNA ER β em células espumosas e endoteliais após a ocorrência de injúria vascular, mostrando que o ER β possui efeito direto sobre os vasos sanguíneos. Além do mais o ER β é bastante expresso nas coronárias, e em casos de calcificações severas sua expressão é aumentada.

Em 2017, McRoob et al. ao realizar experimentos com ratos “*in vitro*” e “*in vivo*” demonstrou que a diminuição ou a supressão da ação do ER β está associada a calcificação das placas ateroscleróticas, e que quando este mesmo receptor é silenciado por algum antagonista ele promove a diferenciação das células espumosas do músculo liso vascular (VSMC) em células calcificadas, assim como os osteoblastos *in vitro*.

O hormônio estradiol (E2) pode regular de forma negativa a expressão do ER β em diferentes tipos de células vasculares promovendo sua calcificação, demonstrando dessa forma um fenótipo pró-osteogênico. Hormônios antagonistas ao E2 podem induzir a mineralização e aumentar a calcificação de células vasculares, comprovando dessa forma que o bom funcionamento do ER β é importante para o efeito protetor do estrógeno sobre estas células vasculares (McROOB et al., 2017).

O ER β assim como seus outros receptores são expressos na parede arterial de homens e mulheres e seu agonista 17 β -estradiol (E2) realiza um potente efeito vasodilatador nas artérias mamárias e coronárias tanto de homens quanto de mulheres (MEYER; BARTON, 2009; HASS et al. 2007).

Segundo Meyer; Barton (2009), a expressão do receptor beta de estrógeno está ligada à calcificação das coronárias e ao aparecimento da placa aterosclerótica independentemente da idade do indivíduo. E esse mesmo receptor é expresso em maior quantidade em mulheres que estão na menopausa se comparado com o receptor alfa de estrógeno. Por isso ocorre uma diminuição da ação do óxido nítrico na ação de relaxamento do endotélio, bem como a ação do próprio hormônio estrogênio (MEYER; BARTON, 2009; TRAUPE et al. 2007).

Estudos demonstram que mulheres que apresentam mutações no ER β apresentam hipertensão, e que o polimorfismo neste mesmo receptor permite que tenham um risco aumentado de desenvolvimento de doença cardiovascular. Da mesma forma estudos vêm demonstrando que a presença de placas ateroscleróticas diminui de forma considerável o número dos receptores estrogênicos α e β , e que a inativação destes pode ocorrer devido à metilação do DNA na região promotora destes genes. Esse processo de metilação do DNA é um importante mecanismo epigenético que em geral ocorre com a progressão da placa aterosclerótica e também com o envelhecimento do indivíduo (KIM et al. 2007; O'LONE et al. 2007; REXRODE et al. 2007).

O receptor beta de estrógeno possui dois SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms* - Polimorfismos de Nucleotídeo Único) que podem estar ligados à doença coronariana aterosclerótica, e que pode variar de acordo com as etnias diversas (SHEN et al. 2015).

Esses polimorfismos neste receptor são conhecidos e são do tipo *AluI* e *RsaI*, sendo eles mutações silenciosas. O polimorfismo do tipo *RsaI* ocorre devido a troca do nucleotídeo guanina por adenina na posição 1082 (G1082A), sendo o alelo G o alelo selvagem e o alelo A a variante polimórfica (SIMÕES, 2009; BRETHERICK et al. 2008). (Figura 7.).

Segundo Stavrou et al. (2006) alguns polimorfismos não alteram o aminoácido produzido no receptor de estrógeno, mas em alguns casos pode alterar o mRNA e influenciar a sua expressão gênica.

Aschim et al. (2005) também afirma que o polimorfismo *RsaI* do ER β não altera o aminoácido na proteína produzida por ele, mas quando está em desequilíbrio de ligação pode afetar a sua função ou mesmo a expressão gênica. Um estudo de 2003 de Försti et al. demonstrou que o polimorfismo do *RsaI* está em um completo desequilíbrio de ligação com o polimorfismo no éxon 8 no ER β , o que afeta o splicing desse éxon e formam proteínas que possuem propriedades diversas daquelas produzidas por esse

receptor, e que não apresenta o polimorfismo. Isto porque este polimorfismo pode alterar a estrutura do mRNA do ER β , seu splicing, sua síntese, maturação, transporte, tradução ou mesmo sua degradação (ASCHIM et al. 2005).

4. Objetivos

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o polimorfismo RsaI do gene do receptor beta de estrógeno (ER β) em pacientes com diagnóstico de aterosclerose e no grupo controle na cidade de Goiânia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência genotípica do polimorfismo do ER β em pacientes dos grupos caso e controle.
- Avaliar a frequência genotípica presente nos diferentes sexos (caso e controle).
- Analisar frequência genotípica em relação aos fatores de risco no grupo caso e com: hipertensão arterial, dislipidemia, *diabetes mellitus*.

5. Materiais e Métodos

5.1 Casuística

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 55 pacientes (caso), que apresentavam diagnóstico prévio de aterosclerose e que foram confirmados por exames clínicos e de imagem (Eco color Doppler, angiografia digital ou angiotomografia). Foram utilizados como critérios de inclusão para participar do estudo pacientes maiores de 38 anos, com diagnóstico de DAC, que estavam fazendo tratamento medicamentoso ou não com estatinas, aqueles que já haviam sido submetidos a procedimentos vasculares intervencionistas (angiografia) e que aceitaram responder o questionário (Anexo I) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Para controle foram coletados sangue de 46 pacientes que não são portadores de aterosclerose ou comorbidades. Os critérios de exclusão são os pacientes menores de 38 anos e que não aceitaram participar da pesquisa ou não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As amostras foram coletadas no período de outubro de 2014 a fevereiro de 2015, de pacientes do Laboratório de Análises Clínicas da PUC Goiás (LAC) e da Clínica Angiogyn, ambos no município de Goiânia e que prestam atendimento a pacientes tanto do Sistema Único de Saúde (SUS) e a pacientes da rede privada. As amostras de sangue total foram coletadas em tubos de 2 mL com heparina, aliquotadas e armazenadas a -4° C.

O projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisas/Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos CEP/PUC Goiás sob o número 35321614.3.0000.0037.

5.2 Extração de DNA

Para a extração e purificação do DNA foi utilizado sangue total o Kit GFX™ (Amersham Pharmacia Biotech), onde foi feita a purificação do mesmo. Para certificar a integridade do DNA foi realizado a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e corado posteriormente com brometo de etídio a 10 mg/mL e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (Amersham Biosciences, USA) no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) PUC-Goiás.

O DNA após sua extração foi mantido em temperatura de -20°C até o momento da sua amplificação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a extração e purificação do DNA foi realizada a reação da PCR, e seus produtos foram posteriormente submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídio a 10 mg/mL em solução tampão Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x, para a verificação da presença ou não do polimorfismo.

Na Tabela I são apresentadas as sequências de oligonucleotídeos iniciadores (Primers) utilizados para a amplificação da região esperada.

Tabela I: Sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos

Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento, pares de bases (pb)
RsaI Fw	ACT TGC CAT TCT ACA	
RsaI Rer Controle	CAC AGG ACC ATG AAT CCT	409 (controle)
RsaI RevA	AGC TCT CCA AGA GCC GT	127 (variante A)
RsaI RevG	AGC TCT CCA AGA GCC GC	127 (variante G)

Fw - RsaI Forward, Rev - RsaI reverse; Fonte Aschim et al., 2005.

Para o processo de amplificação pela técnica de PCR para o gene ERβ foram utilizados os seguintes reagentes nos volumes a seguir: Tampão (10X) 2,5 µL, Cloreto de magnésio 1,5 µL, deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) 4 µL de cada, Taq polimerase 0,2 µL, Primer Forward 0,5 µL, Primer reverso controle 0,5 µL, Primer reverso A/G 0,5 µL, DNA 3 µL. O protocolo para amplificação das amostras está na Tabela II e Tabela III.

Tabela II – Protocolo para amplificação do polimorfismo RsaI do gene RE β (RsaI variante A).

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOL P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 μ L
MgCl ₂	1,5mM	1,5 μ L
dNTPs	1,25mM de cada	1 μ L= 4 μ L
Taq polimerase	2,5U/ μ L	0,2 μ L
Primer Forward	20 μ M	0,5 μ L
Primer Reverso controle	20 μ M	0,5 μ L
Primer Reverso A	20 μ M	0,5 μ L
H ₂ O Mili Q	-----	12,3 μ L
DNA amostra	300ng/ μ L	3 μ L
Volume final		25 μL

Fw - RsaI Forward; Rev - RsaI Reverse; dNTPs – deoxinucleotídeo trifosfato; Fonte: Costa e Silva, 2010.

Tabela III - Protocolo para amplificação do polimorfismo do RsaI do gene RE β (RsaI variante G).

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOL P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5 μ L
MgCl ₂	1,5mM	1,5 μ L
dNTPs	1,25mM de cada	1 μ L= 4 μ L
Taq polimerase	2,5U/ μ L	0,2 μ L
Primer Forward	20 μ M	0,5 μ L
Primer Reverso controle	20 μ M	0,5 μ L
Primer Reverso G	20 μ M	0,5 μ L
H ₂ O Mili Q	-----	13,3 μ L
DNA amostra	200ng/ μ L	3 μ L
Volume final		25 μL

Fw - RsaI Forward; Rev - RsaI Reverse; dNTPs - deoxinucleotídeotrifosfato; Fonte: Costa e Silva., 2010.

Na Tabela IV tem-se o protocolo utilizado para amplificação dos primers do polimorfismo RsaI do gene ER β para as variantes A e G utilizadas no termociclador.

Tabela IV – Protocolo para amplificação dos primer do polimorfismo RsaI do ER β para as variantes A e G

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	96°C	3	1
	96°C	1	
Amplificação cíclica	58°C	30 seg	35
	72°C	3	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C		

Fonte: Costa e Silva, 2010.

Os géis foram corados com brometo de etídio 10 mg/mL e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (Amersham Biosciences, USA) no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) PUC-Goiás. (Figura 7).

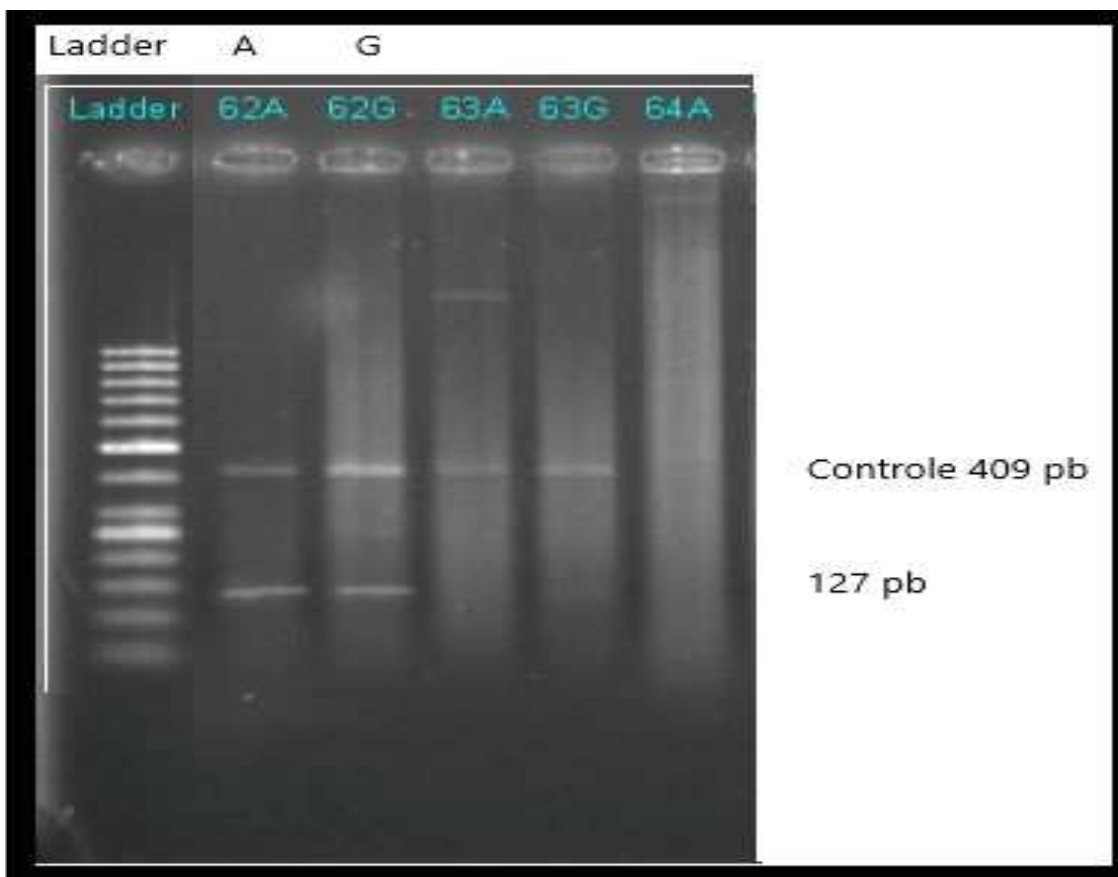


Figura 7: Foto do gel de Agarose (2%) mostrando os polimorfismos. Ladder: 50 pb; Controle: 409 pb; Alelos A e G: 127 pb.

5.4 Análise de dados

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software BioEstat®, versão 5.3 (Sociedade Civil Mimirauá/MCT - CNPq). Para a análise estatística foi utilizado o Teste G para a verificação da associação entre o polimorfismo do receptor beta de estrógeno (RE β) e o desenvolvimento de aterosclerose.

Para ser considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

Os resultados da análise do polimorfismo RsaI do gene ER β foram tabulados em planilhas com o auxílio do software Excel® (2013).

6. RESULTADOS

Na Tabela V foram relatadas as frequências dos grupos caso e controle, onde a presença de indivíduos homozigóticos (GG) teve uma frequência de 38,1% (21/55), para pacientes heterozigóticos (AG) a frequência foi de 41,9% (23/55) e os homozigóticos (AA) foi de 20,0% (11/55). Já nos pacientes controle a frequência genotípica para homozigóticos (GG) foi de 93,5% (43/46), nos pacientes heterozigóticos (AG) a frequência foi de 6,5% (3/46) e os homozigóticos (AA) a frequência genotípica foi de 0,0% (0/46). O valor encontrado de p foi de $p < 0,0001$, sendo estatisticamente significativo. (Tabela V). 61,9% (61,9/6,5) dos pacientes caso possuem ao menos um alelo polimórfico A. E sendo este alelo cerca de 9,5 vezes mais frequentes nos pacientes caso que nos pacientes controle.

Quando observamos nos grupos caso e controle a presença do polimorfismo AA, no primeiro grupo em relação ao segundo, temos uma frequência de 20 maior, já que no grupo controle não foi encontrado a presença do polimorfismo.

Tabela V: Frequência genotípica do polimorfismo do gene *RsaI* nos grupos caso e controle.

	<i>GG</i>		<i>AG</i>		<i>AA</i>		Total		<i>*p</i>
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Caso	21	38,1	23	41,9	11	20,0	55	100,0	$p < 0,0001$
Controle	43	93,5	3	6,5	0	0,0	46	100,0	

*Teste G

Na Tabela VI foram relatadas a frequência do polimorfismo do gene *RsaI* do ER β em relação ao sexo dos indivíduos do grupo caso e controle, respectivamente. Em pacientes do sexo masculino a frequência do genótipo homozigótico (GG) foi de 37,9% (11/29), heterozigótico (AG) a frequência foi de 41,4% (12/29), e os homozigóticos (AA) a frequência foi de 20,7% (6/29). No grupo controle a frequência genotípica de pacientes homozigóticos (GG) foi de 85,7% (18/21), em pacientes heterozigóticos (AG) foi de 4,8% (1/21), e nos pacientes homozigóticos (AA) foi de 0,0% (0/21). O valor encontrado de p foi de $p < 0,0001$, o que torna estes dados estatisticamente significativos.

Verificamos que nos pacientes do sexo masculino que a frequência genotípica do alelo polimórfico A é 12,9 vezes mais frequente que o alelo G.

Na mesma Tabela VI foram analisados pacientes do sexo feminino em relação a esse mesmo polimorfismo (ERβ), onde foram observados a frequência genotípica de indivíduos homozigóticos (GG) 38,4% (10/26), para as pacientes heterozigóticas (AG) a frequência foi de 42,3% (11/26) e as homozigóticas (AA) foi de 19,2% (5/26). Nas pacientes do grupo controle, a frequência de homozigóticas (GG) foi de 92,0% (23/25), heterozigóticas (AG) 8,0% (2/25) e as pacientes homozigóticas (AA) a frequência encontrada foi de 0,0% (0/25). O valor encontrado de p foi p<0,0001, tornando estes dados da mesma forma estatisticamente significativos (Tabela VI).

Quando analisamos o alelo polimórfico A, no sexo feminino, verificamos que ele é 7,6 vezes mais frequente nas pacientes do grupo caso que as pacientes do grupo controle.

Tabela VI: Frequência genotípica do polimorfismo do gene ERβ (*RsaI*) em relação ao sexo nos caso e controle.

	GG		AG		AA		Total		*p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
MASCULNO									
CASO	11	37,9	12	41,4	6	20,7	29	100,0	p <0,0001
CONTROLE	18	85,7	1	4,8	0	0,0	21	100,0	
FEMININO									
CASO	10	38,4	11	42,3	5	19,2	26	100,0	p <0,0001
CONTROLE	23	92,0	2	8,0	0	0,0	25	100,0	

*Teste G.

Na Tabela VII foram relatadas as frequências dos indivíduos do grupo caso que apresentavam ou não hipertensão arterial em relação ao polimorfismo *RsaI* do gene ERβ. Os pacientes hipertensos apresentaram as seguintes frequências para o genótipo homozigótico (GG) 35,6% (16/45), para o genótipo heterozigótico (AG) 46,6% (21/45) e para o genótipo homozigótico (AA) 17,8% (8/45). Já os pacientes que não apresentam hipertensão arterial a frequência para o genótipo homozigótico (GG) foi de 44,4% (4/9), o heterozigótico (AG) foi de 22,2% (2/9), e os homozigóticos (AA) foi de 33,3% (3/9). Perfazendo um total de 54 pacientes (hipertensos e não hipertenso). O valor encontrado de p foi de p=0,3390, sendo estatisticamente não significativo.

Os pacientes hipertensos que possuem o alelo A é 5,8 vezes maior no grupo de pacientes não hipertensos. (Tabela VII).

Tabela VII: Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo do gene *RsaI* em pacientes que apresentam hipertensão arterial do grupo caso.

CASO	<i>GG</i>		<i>AG</i>		<i>AA</i>		Total		* <i>p</i>
	n	%	n	%	n	%	n	%	
HIPERTENSOS	16	35,6	21	46,6	8	17,8	45	100,0	p=0,3390
NÃO HIPERTENSOS	4	44,4	2	22,2	3	33,3	9	100,0	
TOTAL							54	100,0	

*Teste G.

Na Tabela VIII foram analisados os pacientes do grupo caso que apresentavam ou não dislipidemia em relação à frequência genotípica dos pacientes. Os valores das frequências genotípicas foram de 52,1% (12/23) para os pacientes homocigóticos (*GG*), 34,8% (8/23) para os pacientes heterocigóticos (*AG*), e 13,1% (3/23) para os pacientes homocigóticos (*AA*). Já os pacientes que não apresentavam dislipidemia a frequência foi de 22,2% (6/27) para os pacientes homocigóticos (*GG*), os pacientes heterocigóticos (*AG*) foi de 51,8% (14/27), e 26,0% (7/27) para os pacientes homocigóticos (*AA*). Perfazendo um total de 50 pacientes que apresentavam ou não dislipidemia. O valor encontrado de *p* foi de *p*=0,0812, não sendo estatisticamente significativo (Tabela VIII).

Tabela VIII: Frequência genotípica do polimorfismo do gene *RsaI* em pacientes que apresentam dislipidemia no grupo caso.

	<i>GG</i>		<i>AG</i>		<i>AA</i>		Total		* <i>p</i>
	n	%	n	%	n	%	n	%	
DISLIPIDEMIA	12	52,1	8	34,8	3	13,1	23	100,0	p=0,0812
SEM DISLIPIDEMIA	6	22,2	14	51,8	7	26,0	27	100,0	
TOTAL							50	100,0	

*Teste G.

Na Tabela IX foram descritas as frequências genotípicas do polimorfismo do gene *RsaI* em relação à pacientes do grupo caso que apresentam ou não *diabetes mellitus*.

Em relação aos pacientes que apresentam a doença *diabetes mellitus* foram observados 11 pacientes, onde a frequência de pacientes homozigóticos (GG) foi de 45,5% (5/11), os pacientes heterozigóticos (AG) foram de 36,3% (4/11), e os pacientes homozigóticos (AA) foi de 18,2% (2/11). Já os pacientes que não apresentam a doença *diabetes mellitus* totalizavam 32, e suas frequências foram de 28,1% (9/32) de pacientes com o genótipo homozigótico GG, 43,8% (14/32) para pacientes com genótipo heterozigótico AG, e 28,1% (9/32) para os pacientes que apresentavam genótipo AA. O valor de p encontrado foi $p=0,5619$, sendo não estatisticamente significativo. (Tabela XI).

Tabela IX: Frequência genotípica do polimorfismo do gene *RsaI* em pacientes do grupo caso que apresentam ou não *diabetes mellitus*.

	<i>GG</i>		<i>AG</i>		<i>AA</i>		Total		<i>*p</i>
	n	%	n	%	n	%	n	%	
DIABETES	5	45,5	4	36,3	2	18,2	11	100,0	p=0,5619
SEM DIABETES	9	28,1	14	43,8	9	28,1	32	100,0	
TOTAL							43	100,0	

*Teste G.

7. Discussão

A associação entre as variações genotípicas no RE β , apesar de ainda pouco conhecidas, vêm sendo bastante estudadas (TEMPFER et al. 2009).

Neste estudo verificamos que a frequência do polimorfismo RsaI AG do RE β é cerca de 9,5 vezes maior nos pacientes caso que nos pacientes controle. Enquanto que a frequência do polimorfismo AA nos pacientes caso foi de 20 vezes maior que no grupo controle, já que neste grupo não foram encontrados pacientes com esse tipo de polimorfismo. Observamos também que 61,9% (61,9/6,5) dos pacientes caso possuem ao menos um alelo polimórfico A.

Assim como em nosso estudo, Nikkari et al. (2008) ao estudar o polimorfismo do RE β e a espessura média da íntima carotídea como parte do estudo do risco cardiovascular em jovens estudantes finlandeses observou diferenças significativas entre os indivíduos homozigóticos GG e os heterozigóticos AG, sendo este último o mais frequente.

Nikkari et al. (2008) ao comparar os pacientes em relação ao sexo, idade e tabagismo, que apresentavam ao menos um alelo polimórfico A com aqueles que não o apresentavam observou uma diferença significativa da medida média e medida máxima da espessura da íntima carotídea. Indicando que a presença do polimorfismo pode ser responsável pelo desenvolvimento da aterosclerose.

Efstathiadou et al. (2015) ao estudarem pacientes gregos de meia idade observaram que a presença do polimorfismo AG estava associado ao aumento do tamanho da cintura abdominal, maior porcentagem de gordura corporal e níveis de colesterol LDL não muito acima dos parâmetros.

Ao compararmos a frequência do polimorfismo RsaI do RE β em outras enfermidades podemos observar que ela é aumentada quando comparamos os alelos G e A. Costa e Silva (2010) encontrou em seu estudo uma frequência de aproximadamente 9 vezes maior no polimorfismo AG deste mesmo gene em pacientes que apresentavam endometriose. Bordin (2009) por sua vez ao analisar este mesmo polimorfismo, RsaI AG do RE β , só que em pacientes masculinos com infertilidade por alteração espermática verificou que a sua frequência foi de aproximadamente 7,5 vezes maior do que nos pacientes que não apresentavam estas alterações.

Qin et al. (2014) ao fazer um estudo com mulheres menopausadas e que foram tratadas com isoflavonas, observou que o polimorfismo RsaI do RE β está associado a dislipidemia apesar da frequência não ser significativa, o que corrobora com nosso

estudo. Ele observou que as mulheres que faziam tratamento com as isoflavonas e que apresentavam o genótipo GG tiveram uma diminuição significativa dos níveis lipídicos.

Ao analisar a relação da espessura média e espessura máxima da íntima carotídea, que é um marcador pré-clínico da aterosclerose, em relação a presença do polimorfismo RsaI (alelo A) do RE β , Nikkari et al. (2008) não encontraram diferenças significativas assim como outros pesquisadores (MANSUR et al. 2005; REXRODE et al. 2007). O número de pacientes homocigóticos GG em relação aos pacientes AG e AA não foi significativo, sendo os primeiros em maior número.

Domingues-Montanari (2008) ao analisar o polimorfismo RsaI do RE β em pacientes que sofreram infarto do miocárdio e um grupo controle não encontrou diferença significativa entre os genótipos (GG, AG, AA), o que não corrobora com nosso estudo.

Mansur et al. (2005) ao analisarem pacientes com DAC prematura observaram que diferentemente do nosso estudo a presença do alelo polimórfico A em relação ao alelo G não foi estatisticamente significativo.

Em nosso estudo os resultados encontrados para as frequências genotípicas dos alelos polimórficos (AG/AA) foram maiores que as do alelo não polimórfico (GG) nos pacientes caso e controle de ambos os sexos. No entanto Shen et al. (2015) ao realizarem um estudo com mulheres chinesas da etnia Han para investigar a presença do polimorfismo do RE β e relacioná-lo ao desenvolvimento de DAC, eles observaram que a frequência genotípica desse polimorfismo RsaI do RE β não está diretamente relacionada com o desenvolvimento da aterosclerose. Os resultados encontrados por eles não corroboram com nosso estudo.

Domingues-Montanari et al. (2008) ao compararem a frequência dos diferentes genótipos em homens e mulheres não encontrou diferenças significativas. Seu estudo não corrobora com o nosso, pois tanto em pacientes do sexo masculino quanto do sexo feminino encontramos diferenças significativas entre os diferentes tipos genotípicos.

Segundo Domingues-Montanari et al. (2008) pode-se explicar a diferença do risco de desenvolvimento de DAC e infarto do miocárdio em pacientes do sexo masculino em relação ao sexo feminino, devido a uma maior expressão do RE β em mulheres que em homens. Isto também pode ocorrer de acordo com o número de cópias desse receptor que as mulheres possuem e o aumento da quantidade de proteína produzida por esse receptor, o que pode compensar o seu defeito. A atividade do RE β ,

assim como sua regulação e expressão podem influenciar a concentração de hormônios circulante nos diferentes tipos de sexo.

O polimorfismo do RE β está associado à DAC segundo Deroo; Korach (2006), devido ao aumento da espessura da parede ventricular em mulheres que são hipertensas e ao aumento da pressão arterial em homens. Domingues-Montanari et al. (2008) também afirmam que em modelos animais, ratos, o polimorfismo do RE β também está associado a hipertrofia ventricular direita e esquerda além da hipertensão. Apesar de que o 17- β -estradiol tem capacidade de proteger o coração das cobaias de desenvolvimento de hipertrofia vascular e o mesmo pode ocorrer com humanos, principalmente as do sexo feminino.

Estudos demonstram que mulheres que apresentam mutações no RE β apresentam hipertensão, e que o polimorfismo neste mesmo receptor permite que tenham um risco aumentado de desenvolvimento de doença cardiovascular (KIM et al. 2007; O'LONE et al. 2007; REXRODE et al. 2007).

Christian et al. (2006) em um estudo com mulheres na pré-menopausa e na pós-menopausa, demonstraram que o ER β é bastante expresso nas células endoteliais e do músculo liso vascular de veias e artérias, e que em caso da presença de calcificação e aterosclerose grave este receptor aumenta de forma significativa sua expressão.

Efstathiadou et al. (2015), diferentemente de nosso estudo, ao analisar os diferentes genótipos dos pacientes encontrou níveis mais altos de LDL colesterol naqueles que não apresentavam o polimorfismo (GG).

Em 2010, Zhao, et al. realizou um estudo com mulheres chinesas da etnia Han que estavam na menopausa. Eles observaram assim como nosso estudo que apesar da dislipidemia ser um fator predisponente ao desenvolvimento da aterosclerose não foram encontrados dados estatisticamente significativos que pudessem associar diretamente o fator dislipidemia à doença aterosclerose.

Mansur et al. (2005) analisando pacientes com DAC e dislipidemia observou que a frequência do polimorfismo AA é maior que a ausência do polimorfismo (GG). Diferentemente de nosso estudo que constatou que o número de pacientes com este mesmo polimorfismo (AA) foi maior nos pacientes que não apresentavam dislipidemia do que naqueles que apresentavam essa doença. E ao analisar apenas a presença da dislipidemia em pacientes com DAC Mansur et al. obteve dados significativos, diferentemente de nós.

Christian et al. (2006) em seu estudo observaram que a alteração na expressão do RE β na íntima está diretamente relacionado com a severidade da doença aterosclerótica, a calcificação da placa aterosclerótica e os depósitos de cálcio junto às células vasculares do músculo liso.

Föryst-Ludwig (2010) e Barros et al. (2006) em seus estudos com roedores e humanos observaram que o estrógeno exerce efeito positivo sobre a homeostase da glicose, fazendo com que a secreção de insulina seja aumentada e a gliconeogênese diminuída, já que as células musculares e adipócitos conseguem captar mais glicose.

Dantas et al. (2012) observaram em mulheres que apresentam diabetes que o efeito cardioprotetor do estrógeno foi perdido, e que isso pode afetar os receptores estrogênicos e a patofisiologia da doença, incluindo ainda a idade da paciente.

Bansal; Chopra (2014) ao analisarem mulheres que estão na menopausa e ratas que foram ovariectomizadas apresentam maior predisposição a desregulação do metabolismo e doenças cardiovasculares. E que o estrógeno possui efeito positivo na homeostase da glicose, pois aumenta a secreção de insulina, sua captação pelos músculos e adipócitos e também diminui a gliconeogênese no fígado.

Em nosso estudo sobre pacientes com DAC e diabetes em relação ao polimorfismo RsaI não encontramos resultados que pudessem relacionar a presença do polimorfismo A em relação ao diabetes. Efstathiadou et al. (2015) observou, diferentemente deste estudo, que este polimorfismo RsaI está ligado à resistência insulínica e desenvolvimento de diabetes.

Neste estudo observamos que alguns dos fatores que por muito tempo foram considerados como fatores predisponentes ao desenvolvimento da aterosclerose não foram diretamente relacionados com o desenvolvimento desta doença.

Alguns estudos como o de Bordin (2009) e Aschim et al. (2005) mostram que o polimorfismo RsaI (AG) do RE β está ligado a infertilidade masculina. Assim como Costa e Silva (2010) mostrou que esse mesmo polimorfismo e genótipo (AG) está relacionada a infertilidade feminina devido à endometriose.

Yu et al. (2011) relatam que os polimorfismos do receptor beta de estrógeno estão ligados ao desenvolvimento do câncer de mama, porém eles não conseguiram precisar qual haplótipo está provavelmente ligado a este tipo de câncer.

Neste estudo foi possível verificar que a presença do polimorfismo do RsaI do Re β está associada ao risco aumentado de desenvolvimento de aterosclerose, bem como a infertilidade masculina relacionadas a alterações espermáticas, a endometriose em

mulheres com infertilidade, desenvolvimento de câncer de ovário e de desordens alimentares como a anorexia e bulimia nervosas (COSTA e SILVA, 2010; SIMÕES,2009; BORDI, 2009; ROSENKRANZ et al., 1998).

8. CONCLUSÃO

- Concluímos que a frequência do polimorfismo AG/AA no grupo controle foi cerca de 9,5 vezes maior em relação a ausência do polimorfismo GG.
- A frequência do polimorfismo AG/AA, no grupo caso, em relação ao sexo masculino foi 12,9 vezes maior que o GG, sendo estatisticamente significativo.
- A frequência do polimorfismo AG/AA, no grupo caso, em relação ao sexo feminino foi 7,6 vezes maior que o GG, sendo estatisticamente significativo.
- A frequência do polimorfismo do gene RE β não foi significativa para hipertensão, diabetes ou dislipidemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALÉSSIO, A. M.; SIQUEIRA, L. H.; de CARVALHO, E. C. C.; BARINI, R.; MANSUR, A de P.; HOEHR, N. F.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. 2008. **Estrogen Receptor Alpha and Beta Gene Polymorphisms Are Not Risk Factors for Recurrent Miscarriage in a Brazilian Population.** *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*.vol.14,n.2.
- AMMIRATI, E., MORONI, F., MAGNONI, M., CAMICI, P. G. 2015. **The role of T and B cells in human atherosclerosis and atherothrombosis.** *Clin Exp Immunol*, v. 179, n. 2, p. 173-87.
- ANGHEL, A. D.; NARITA, E.; SECLAMAN, E.; POPOVICI, M.; ANGHEL, L. T.2010 **Estrogen receptor alp ha polymorphisms and the risk of malignancies.** *Pathol Oncol Res* 16(4): 485-496.
- ANTONOW, D. R. et al. 2007. **Glicorticoides: uma meta-análise.** Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 51-68, 2007. Disponível em: <http://www.periodicos.unifra.br/index.php/disciplinarumS/article/view/918/862>>.
- ASCHIM, EL.; GIWERCMAN, A.; STAHL, O.; EBERHARD, J.; CWIKIEL, M.; NORDENSKJÖLD, A.; HAUGEN, T. B.; GROTMOL, T.; GIWERCMAN, Y. L. 2005. **The RsaI Polymorphism in the Estrogen Receptor-β Gene Is Associated with Male Infertility.** *J Clin Endocrinol Metab*,90(9):5343-5348.
- BACCARELLI, A; TARANTINI, L; WRIGHT, R. O; BOLLATI, V; LITONJUA, A. A; ZANOBETTI, A; SPARROW, D; VOKONAS, P. S; SCHWARTZ, J. 2010. **Repetitive element DNA methylation and circulating endothelial and inflammation markers in the VA normative aging study.** *Epigenetics*, v. 5, n. 3, p. 222-228.
- BADIMON, L.; PADRÓ, T.; VILAHUR, G. 2012. **Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease.** *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*.;1(1): 60-74.
- BANSAL, S.; CHOPRA, K. 2014. **Distinct role of estrogen receptor –alpha and beta on postmenopausal diabetes-induced vascular dysfunction.** *General and Comparative Endocrinology*;206:51-59.
- BARBALHO, S. M.; BECHARA, M. D.; QUESADA, K.; GABALDI, M. R.; GOURART, R. de ALVARES.; TOFANO, R. J.; GASPARINI, R. G. 2015. **Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: tríade indissociável?** *J Vasc Bras*. 14(4):319-327.

BARDIN, A; BOULLE, N; LAZENNE, G; VIGNON, F; PUJOL, P. 2004. **Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression.** *Endocri Relat Cancer.* 11(3):537-51.

BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; GUSTAFSSON, J. A. 2006. **Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus.** *Trends Mol. Med.*12,425-431.

BERENSON, G. S., WATTIGNEY, W. A., TRACY, R. E., NEWMAN, W. P., SRINIVASAN, S. R., WEBBER, L. S., et al. 1992. **Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study).** *Am J Cardiol,* v. 70, n. 9, p. 851-8.

BERNASOCHI, G. B.; BELL, J. R.; SIMPSON, E. V.; DELBRIDGE, L. M. D.; BOON, W. C. 2019. **Impact of Estrogens on the Regulation of White, Beige, and Brown Adipose Tissue Depots.** *Comprehensive Physiology.* v 9. 457-475.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. **DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MEIO AMBIENTE: EFEITOS E CONSEQÜÊNCIAS.** *Quim. Nova,* Vol. 30, No. 3, 651-666. 2007.

BOPASSA, J. C, EGHBALI, M.; TORO, L.; STEFANI, E. 2010. **A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*;298:H16–23.

BOONYARATANAKORNKIT, V.; EDWARDS, D. P. 2007. **Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids.** *Semin Reprod Med.*;25(3):139-53.

BORD, S; HORNER, A; BEAVAN, S; COMPSTON, J. 2001. **Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone.** *J Clin Endocrinol Metab;*86(5):2309-14.

BORDIN, Bárbara Mariotto. *A Associação entre o Polimorfismo RsaI do Gene Receptor- β de Estrógeno com a Infertilidade masculina.* Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2009.

BOURBON, M. 2008. **Factores Genéticos e a Doença Cardiovascular [110].** *Rev Port Cardiol;*27(12):1559-1563.

BRASIL 2004. Fundação Nacional de Saúde. **100 anos de Saúde Pública: a visão da Funasa / Fundação Nacional de Saúde - Brasília:** Fundação Nacional de Saúde, 2004.

BREThERICK, K. L.; HANNA, C, W.; CURRIE, L. M.; FLUKER, M. R.; HAMMOND, G. L.; ROBINSON, W. P. 2008. **Estrogen receptor alpha gene**

polymorphisms are associated with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril*; 89(2): 318-24.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. 2015. Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2015.

BURKE, G. L.; BELL, R. A. 2000. **Trends in cardiovascular disease: incidence and risk factors.** *Preventive Cardiology*, p. 21-46.

CAMPELO, R. C. V.; COSTA, D. C. C.; SILVA, F. S.; ARAÚJO, R. V.; CAVALCANTE, M. M. A de SOUSA.; SILVA, A. R. V.; LANDIM, M. B. P. 2014. **Fatores de risco para Aterosclerose em Adolescentes Brasileiros.** *Rev. Inderd. Ciên. Saúde* v.1, n. 1, p. 20-28.

CARRUBA, G. 2007. **Estrogen and Prostate cancer: An Eclipsed Truth in an Androgen Dominated Scenario.** *Journal of Cellular Biochemistry*;102:899-911.

CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, R. G.; GALVÃO, T. G.; CHAGAS, A. C. P. 2003. **Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores.** *Rev Bras Cardiol Invas*;11(3):14-19.

CERAVOLO, G. S.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C. 2007. **Efeitos do Estrógeno no Sistema Cardiovascular.** *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão*, 10(4): 124-130.

CHANG, E. C.; FRASOR, J.; KOMM, B. et al. 2006. **Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells.** *Endocrinology*;147(10):4831e42.

CHEN, L.; KNOWLTON, A. A. 2010. **Mitochondria and heart failure: new insights into an energetic problem.** *Minerva Cardioangiol.*;58:213–29.

CHRISTIAN, R. C.; LIU, P. Y.; HARRINGTON, S.; RUAN, M.; MILLER, V. M.; FITZPATRICK, L. A. 2006. **Intimal estrogen receptor (ER) beta, but not ER alpha expression, is correlated with coronary calcification and atherosclerosis in pre- and postmenopausal women.** *J Clin Endocrinol Metab*;91:2713-2720.

CIMADON, H. M. S., GEREMIA, R., PELLANDA, L. C. 2010. **Hábitos Alimentares e Fatores de Risco para Aterosclerose em Estudantes de Bento Gonçalves (RS).** *Arq Bras Cardiol*, v. 95, n. 2, p. 166-172.

COELINGH B.; HERJAN, J. T; VERHOEVEN, C.; ZIMMERMAN, Y.; VISSER, M.; FOIDART, J-M; GEMZELL-DANIELSSON, K. **Pharmacodynamic effects of the**

fetal estrogen estetrol in postmenopausal women: results from a multiple-rising-dose study. Menopause: June 2017 - Volume 24 - Issue 6 - p 677–685.

COSTA E SILVA, Rita de Cássia Pereira. *Análise do Polimorfismo RsaI do Gene Receptor Beta Estrógeno (REβ) em Mulheres com Endometriose*. Dissertação (Mestrado em Gnética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia,2010.

CRID. CENTER FOR RESEARCH IN INFLAMMATORY DISEASES. 2014. **A Atherosclerosis**. Disponível em: <http://crid.fmrp.usp.br/site/2014/11/04/a-aterosclerose/>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

DALEN, J. E.; ALPERT, J. S.; GOLDBERG, R.J.; WEINSTEIN, R. S. 2014. **The epidemic of the 20(th) century: coronary heart disease. Am J Med**; 127: 807-812.

DÂMASO, Ana Raimunda. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. 1º edição. Editora Medsi. 2001. p. 63-87. São Paulo.

DANTAS, A. P.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; COSTA, S. G.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H. 2012. **Vascular disease in diabetic women: Why do they miss the female protection? Exp. Diabetes Res.**, 570598.

DAVIES, M. J. 1996. **Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis**. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*;94(8):2013-20.

DEROO, B. J.; KORACH, K. S. 2006. **Estrogen receptors and human disease. J Clin Invest**;116:561-570.

DOMINGUES-MANTANARI, S.; SUBIRANA, I.; TOMÁS, M.; MARRUGAT, J.; SENTI, M. 2008. **Association between ESR2 Genetic Variants and Risk of Myocardial Infarction. Clinical Chemistry**,54:7;1183-1189.

DUBEY, R. K.; IMTHURN, B.; ZACHARIA, L. C.; JACKSON, E. K. 2004. **Hormone Replacement Therapy and Cardiovascular Disease: What Went Wrong and Where do We Go From Here? Hypertension**, v. 44,p. 789-795.

EDWARDS, D. P. 2005. **Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. Annu Rev Physiol.**;67:335–376.

EFSTATHIADOU, Z. A.; SAKKA, C.; POLYZOS, S. A.; GOUTOU, M.; STAKIAS, N.; BARGIOTA, A.; KOUKOULIS, G. N. 2015. **Associations of Estrogen Receptor Alpha and Beta Gene Polymorphisms with Lipid Levels and Insulin Resistance in Men. Metabolism**.

FALK, E. 2006. **Pathogenesis of Atherosclerosis. Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 8, p. C7–C12.

FALUDI, A. A., IZAR, M. C. O., SARAIVA, J. F. K., CHACRA, A. P. M., BIANCO, H. T., AFIUNE NETO, A. et al. 2017. **Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.** *Arq Bras Cardiol*, 109(2Supl.1), p. 1-76.

FAREED, M; AFZAL, M. 2013. **Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service.** *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 14, p. 123–134.

FAVARATO, D.; LUZ, P. L. 2004. **Hipertensão e aterosclerose: Aspectos fisiopatológicos.** *Hipertensão*;6(4).

FLAUZINO, T.; ALFIERI, D. F.; KALLAUR, A. P.; de ALMEIDA, E. R. D.; REICHE, E. M. V. **Polimorfismos genéticos associados ao metabolismo lipídico envolvidos na fisiopatologia do acidente vascular encefálico isquêmico.** *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v.35, n.2, p.163-180.

FORD E. S. 2003. **C-reactive protein concentration and cardiovascular disease risk factors in children: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000.** *Circulation*, v. 108, p. 1053-8.

FORYST-LUDWIG, A.; KINTSCHER, U. 2010. **Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta.** *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*122,74-81.

FRANÇOSO, L. A.; COATES, V. 2002. **Evidências anatomopatológicas do início da aterosclerose.** *Arq Bras Cardiol*; 78: 131-6.

FU, X. D.; SIMONCINI, T. 2007. **Non-genomic sex steroid actions in the vascular system.** *Semin Reprod Med.*;25(3):178-86.

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.

GIANNINI, S. D. 2000. **História natural da aterosclerose.** *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*;10(6):677-85

GOODPASTER, B. H.; WOLF, R. R.; KELLEY, D. E. 2002. **Effects of obesity on Substrate utilization during exercise.** *Obesity Research*.vol.10. n.7. 575-584.

GOTTLIEB, M. G. V., BONARDI, G., MORIGUCHI, E. H. 2005. **Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose.** *Scientia Medica*, Porto Alegre, v. 15, n. 3, p. 203-207.

GUEDES- ALONSO, R. et al. 2014. **Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems.** *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 3–4, p. 14–27.

HAAS, E.; MEYER, M. R.; SCHUURR, U.; BHATTACHARYA, I.; MINOTTI, R.; NGUYEN, H. H. et al. 2007. **Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis.** *Hypertension*;49:1358–1363

HACKAM, G. D., ANAND, S. S. 2003. **Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence.** *JAMA*, 290, p. 932-40.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. 2012. **Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix.** *Water Research*, v. 46, p. 5813-5833.

HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. 2011. **The immune system in atherosclerosis.** *Nat. Immunol.* 12, 204–212.

HERRINGTON, W.; LACEY, B.; SHERLIKER, P.; ARMITAGE, J.; LEWINGTON. 2016. **Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease.** *Circulation Research*, february 19.

HUANG, Y.; LI, Y.; ZHENG, S.; YANG, X.; WANG, T.; ZENG, J. 2017. **Moderate alcohol consumption and atherosclerosis.** *Wiener Klinische Wochenschrift*, November, vol.129, Issue 21-22,pp 835-843.

IGNACIO, D. L.; FRANKEFELD, T. G. P.; FORTUNATO, R. S.; VAISMAN, M.; WERNECK-DE-CASTRO, J. P. S.; CARVALHO, D. P. 2009. **Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física.** *Arq Bras Endocrinol Metab.*;53/3.

INFANTE, T.; FORTE, E.; SCHIANO, C.; CAVALIERE, C.; TEDESCHI, C.; SORICELLI, A.; SALVATORE, M.; NAPOLI, C. 2017. **An integrated approach to coronary heart disease diagnosis and clinical management.** *Am J Transl Res*;9(7):3148-3166.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. 2014. **Tabagismo: dados numéricos.** *INCA*. Rio de Janeiro. Disponível em <http://www.inca.gov.br/tabagismo/dadosnum/topo.htm>. Citado em 17 de maio de 2015.

IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. 2007. *Arq. Bras. Cardiol.* vol 88 suppl.1 São Paulo Apr.

JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J-A. 2015. **Estrogen receptor alpha and beta in health and disease.** *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29:557-568.

KHALIL, R. A. 2005. **Sex Hormones as Potential Modulators of Vascular Function in Hypertension.** *Hypertension*, v. 46, n. 2, p. 249-254.

KIM, J.; KIM, J. Y.; SONG, K. S.; LEE, Y. H.; SEO, J. S.; JELINEK, J. et al. 2007. **Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence.** *Biochim Biophys Acta*;1772:72–80.

KJELDSSEN, L. S.; BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. 2013. **Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors.** *Environ Sci Pollut Res*, v. 20, p. 8031–8044.

KLINGE, C. M. 2008. **Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis.** *J Cell Biochem.*;105:1342–51.

KLINGE, C. M. 2017. **Estrogens regulate life and death in mitochondria.** *J Bioenerg Biomembr.*:1–18.

KLOS, K. L. E.; BOERWINKLE, E.; FERRELL, R. E.; TUNER, S. T.; MORRISON, A. C. 2008. **ESR1 polymorphism is associated with plasma lipid and apolipoprotein levels in Caucasians of the Rochester Family Heart Study.** *J Lipid Res.*;49(8):1701 -1706.

KUEHL, P.; ZHANG, J.; LIN, Y.; LAMBA, J.; ASSEM, M.; SCHUETZ, J.; WATKINS, P.B.; DALY, A.; WRIGHTON, S.A.; HALL, S.D.; MAUREL, P.; RELLING, M.; BRIMER, C.; YASUDA, K.; VENKATARAMANAN, R.; STROM, S.; THUMMEL, K.; BOGUSKI, M.S.; SCHUETZ, E. 2001. **Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression.** *Nature Genetics*, v. 27, n. 4, p.383-91.

KULLO, I.; DING, K. 2007. **Patterns of population differentiation of candidate genes for cardiovascular disease.** *BMC Genetics*.8 91 0:48.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., ROBBINS, C. P. 2005. **Bases Patológicas das Doenças.** Elsevier, Rio de Janeiro.

LAGARES, Magda Helena. *Análise do polimorfismo do gene p53 (códon 72) em pacientes sintomáticos para aterosclerose.* Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética. Goiânia, 2017.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. 1993. **Principles of biochemistry.** Worth. 2a ed. New York.

LI, J.; LIU, S.; CAI, G.; SUN, Y.; CHEN, W.; DONG, F.; XU, J.; ZHANG, C.; ZHANG, W. 2018. **Nicotine induces endothelial dysfunction and promotes atherosclerosis via GTPCH1.** *J Cell Mol Med.*;22:5406-5417.

- LIBBY, P. 2005. **The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction.** *J Am Coll Cardiol*;46:1225-1228.
- LIBBY, P. 2013. **Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy.** *N Engl J Med*, v. 368, n. 21, p. 2004-13.
- LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; BRETSCHER, A. et al. 2008. **Molecular cell biology.** 6th ed. New York: W.H. Freeman and Company.
- LOPPOW, H.; BUERKE, M.; WERDAN, K.; ROSE-JOHN, S. 2011. **Contribution of vascular cell-derived cytokines to innate and inflammatory pathways in atherogenesis.** *J. Cell. Mol. Med.*;115 (3): 484-500.
- LORGA, A.; CUNINGHAM, C. M.; MOAZENI, S.; RUFFENACH, G.; UMAR, S.; EGHBALI, M. 2017. **The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy.** *Biology of Sex Differences*;8:33.
- LOSCALZO, J; HANDY, D. E. 2014. **Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series).** *Pulm Circ*, v. 4, n. 2, p. 169-174.
- LUCENA. Wagner Santos. **O Fármaco 17 α -Ethinilestradiol: seus possíveis efeitos à saúde humana e animal por exposições ambientais.** Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
- LÜDICKE, F.; MAGNETTE, J.; BAKER, G.; WEITKUNAT, R. 2015. **A Japanese cross-sectional multicentre study of biomarkers associated with cardiovascular disease in smokers and non-smokers.** *Biomarkers*;20(6-7):411-21.
- MAIURE, M.; GRASSIA, G.; PLATT, A.; CARNUCCIO, R.; IALENTE, A.; MAFFIA, P. 2013. **Macrophage Autophagy in Atherosclerosis.** *Hindaw Publishing Corporation*, vol. 2013 Article ID 584715, 14 pages.
- MANSUR, A de P. et al. 2000. **Análise do Componente Genético da Doença Coronariana.** *Arq Bras Cardiol*; volume 74, nº6.
- MANSUR, A. de P.; NOGUEIRA, C. C. M.; STRUNZ, C. M. C.; ALDRIGHI, J. M.; RAMIRES, J. A. F. 2005. **Polymorphisms of Estrogen Receptors in Patients with Premature Coronary Artery Disease.** *Archives of Medical Research*; 36(5):511-517.
- MARINKOVIĆ N., PAŠALIĆ D., POTOČKI S. 2013. **Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons biotransformation and atherosclerosis.** *Biochemia Medica*;23(3):255–65.

- MARQUES E SÁ, A.C. **O papel dos polimorfismos genéticos na doença cardíaca isquêmica. Dissertação.** (Mestrado em Medicina). Universidade do Porto, Portugal, 2011.
- MARTELLI, A. 2014. **Aspectos fisiopatológicos da aterosclerose e a atividade física regular como método não farmacológico no seu controle.** *Revista Saúde e Desenvolvimento Humano*, v. 2, n. 1, p. 41-52.
- MARTOCCHIA, A.; STEFANELLI, M.; FALASCHI, G. M.; TOUSSAN, L.; FERRI, C.; FALASCHI, P. 2015. **Recent advances in the role of cortisol and metabolic syndrome in age-related degenerative diseases.** *Anging Clin Exp Res*. Epub ahead of print. PMID:25813987.
- MAYREL, C.; LUKASSER, M.; SEDIVY, R.; NIEDEREGGER, H.; SEILER, R.; WICK, G. 2006 **Atherosclerosis research from past to present- on the track of two pathologists with opposing views, Carls von Rokitansky and Rudolf Virchow.** *Virchows Arch* ; 449:96-103.
- McROBB, LS.; McGRATH, KCY.; TSATRALIS, T.; LIONG, EC.; TAN, JTM.; HUGHES, G.; HANDELSMAN, DJ.; HEATHER, AK. 2017. **Estrogen Receptor Controlo f Atherosclerotic Calcification and Smooth Muscle Cell Oestrogenic Differentiation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- MENASCE, L. P.; WHITE, G. R.; 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(1):263-5.
- MENDELSON, M. E. 2002. **Genomic and Nongenomic Effects of Estrogen in the Vasculature.** *Am. J. Cardiol.*, v. 90, p. 3F-6F.
- MEYER, MR.; BARTON, M. **ER α , ER β and gpER: novel aspects of oestrogen receptor signalling in atherosclerosis.** 2009. *Cardiovascular Research*;83,605-610.
- MEYER, M. R.; PROSSNITZ, E. R.; BARTONM, M. 2009. **Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen.** *Mol Cell Endocrinol*;308:9-16.
- MICEVYCH, P. E.; KELLY, M. J. 2012. **Membrane Estrogen Receptor Regulation of Hypothalamic Function.** *Neuroendocrinology*;96:103–110
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilatel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.120p.**

- MONTGOMERY, REX.; CONWAY, THOMAS. H.; SPECTOR, ARTHUR. A.; CHAPPELL, DAVID. 1996. **Biochemistry – a Case –oriented Approach**. 6.ed. St. Louis; Mosby, 356-388.
- MOORE, K. J.; TABAS, I. 2011. **Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis**. *Cell* 145, 341–355.
- MOZAFFARIAN, D.; BENJAMIN, E. J.; Go, A. S, et al. 2015. **Heart Disease and Stroke Statistics- 2016 Update: A Report From the American Heart Association**. *Circulation*.
- MURRAY, C. J.; VOS, T.; LOZANO, R. et al. 2012. **Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study**. *Lancet*. 2012; 380:2197–223.
- MUTCH, D. M.; CLÉMENT, K. 2006. *PLoS Genetics*.vol.2. Issue 12. e188.
- NANNI, L.; ROMUALDI, C.; MASERI, A. 2006. **Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases**. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v.41, p. 934–948.
- NIKKARI, S. T.; HENTTONEN, A.; KUNNAS, T.; KÄHÖNEN, M.; HUTRI-KÄHÖNEN, N.; JUONALA, M.; MARNIEMI, J.; VIIKARI, J.; RAITAKARI, O. T.; LEHTIMÄKI, T. 2008. **Estrogen Receptor 2 Polymorphism and Carotid Intima-Media Thickness**. *Genetic Testing*. Vol.12,n°4.
- ONBERG, M.; JAAKKOLA, M. S.; WOODWARD,A.; PERUGA,A.; PRUSS-USTUN,A. 2011. **Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries**. *Lacent*;377(9760):139-46.
- OGAWA, S.; CHAN, J.; CHESTER, A. E.; GUSTAFSSON, J. Á.; KORACH, K. S.; PFAFF, D. W. 1999. **Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice**. *Proc Natl Acad Sci USA*;22:12887-92.
- O’LONE, R.; KNORR, K.; JAFFE, I. Z.; SCHAFFER, M. E.; MARTINI, P. G.; KARAS, R. H. et al. 2007. **Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species**. *Mol Endocrinol*;21:1281–1296.
- ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. 2004. **Gender, Sex Hormones, and Vascular Tone**. *Am, J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v 286, R233-R249.

- ORTMANN, J.; VEIT, M.; ZINGG, S.; DI SANTO, S.; TRAUPE, T.; YANG, Z.; VOLZMANN, J.; DUBEY, T. K.; CHRISTEN, S.; BAUMGARTNER, I. 2011. **Estrogen receptor-alpha but not-beta or GPER inhibits high glucose-induced human VSMC proliferation: potential role of ROS and ERK.** *J Clin Endocrinol Metab*;96:220-228.
- OSAKO, K.; NAKAGAMI, H. ; KOIBUCHI, N.; SHIMIZU, H.; NAKAGAMI, F.; KORIYAMA, H.; SHIMAMURA, M.; MIYAKE, T.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. **Estrogens Inhibits Vascular Calcification via Vascular RANKL System.** 2010. *Circulation Research*.4675.
- PALMISANO, B. T.; ZHU, L.; ECKEL, R. H.; STAFFORD, J. M. 2018. **Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism.** *Mol Metab*.;15:45 -55.
- PEREIRA, E. L.; MIGUEL, A. L. R. 2017. **Produção Industrial de Hormônios Esteroides.** *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v.15, n.2, p.411-435.
- PINTO, M. T.; PICHON-RIVIERE, A.; BARDACH, A. 2015. **Estimativa da carga do tabagismo no Brasil: mortalidade, morbidade e custos.** *Cad Saude Publica*;31(6):1283-97.
- QIN, Y.; SHU, F. R.; ZENG, Y.; MENG, X. G.; WANG, B.; DIAO, L. P; WANG, L.; WAN, J.; ZHU, J. D.; WANG, J.; MI, M. T. 2013 **Daidzein Supplementation Decreases Serum Triglyceride and Uric Acid Concentrations in Hypercholesterolemic Being Greater in Those with the GA Compared with the GG Genotype of ESR – β RsaI.** *The Journal of Nutrition*;144(1):49-54.
- REXRODE, K. M.; RIDKER, P. M.; HEGENER, H. H.; BURING, J. E.; MANSON, J. E.; ZEE, R. Y. 2007. **Polymorphisms and haplotypes of the estrogen receptor-beta gene (ESR2) and cardiovascular disease in men and women.** *Clin Chem*;53:1749–1756.
- ROSENKRAZ, K.; HINNEY, A.; ZIEGLER, A.; HERMANN, H.; FICHTER, M.; MAYER, H.; SIEGFRIED, W.; YOUNG, J. K.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. 1998. **Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of diferente weight extremes: identification of several genetic variants.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.83,nº12.
- ROSS, R. 1999. **Atherosclerosis—an inflammatory disease.** *N. Engl. J. Med*, v. 340, p. 115–26.
- RUFFER, M. A. 2005. **On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 BC. 525AD).** *J Path Bact* 1911; 15: 453-62.

SABINO, Adriano de Paula. *Eventos trombóticos venosos e arteriais: Importância de fatores genéticos predisponentes e hiperhomocisteinemia*. Defesa de monografia: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2004.

SACZKO, J.; MICHEL, O.; CHWILKOSKA, A.; SAWICKA, E.; MACZYNSKA, J.; KULBACKA, J. 2017. **Transport across natural and modified biological membranes and its implications in physiology and therapy , advances in anatomy, embriology and cell biology**. *Springer International Publishing AG*.227, DOI10.1007/978-3-319-56895-9.

SAFE, S.; KIM, K.; KIM, K. 2008. **Non**

-classical genon

(ER)/specificity protein and ER/activating protein

whysignaling path

Endocrinol.;41(5):263 -275.

SALTIKI, K.; MANTZOU, E.; DOUKAS, C.; KANAKAKIS, I.; ZOTOS, P.; LAZAROS, L.; GEORGIU, I.; ALEVIZAKI, M. 2009. **Estrogen receptor beta gene variants may be associated with more favorable metabolic profile in postmenopausal women undergoing coronary angiography**. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117(10): 610-615.

SAMAVAT, H.; KURZER, M. S. 2015. **Estrogen Metabolism and Breast Cancer**. *Cancer Lett*,28;356(200):231-243.

SANTOS, R. D.; NASIR, K. 2009. **Insights into atherosclerosis from invasive and non-invasive imaging studies: should we treat subclinical atherosclerosis?** *Atherosclerosis*;205(2):349-56.

SCHULZ E.; JANSEN T.; WENZEL P.; et al. 2008. **Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension**. *Antioxid. Redox. Signal.*, v. 10, p. 1115–1126.

SEO, D., WANG, T., DRESSMAN, H.; HERDERICK, E. E.; IVERSEN, E. S.; DONG, C.; VATA, K.; MILANO, C. A.; RIGAT, MF. PITTMAN, J.; NEVINS, J. R.; WEST, M.; GOLDSCHIMIDT-CLERMONT, P. J. 2004. **Gene Expression Phenotypes of Atherosclerosis**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. October.

SHALHOUB, J.; FALCK-HANSEN, M. A.; DAVIES, A. H.; MONACO, C. 2011. **Innate immunity and monocyte-macrophage activation in atherosclerosis**. *J. Inflamm.*8, 9.

SHEN C; CHEN Z; MAHMOODURRAHMAN M; CHEN X. 2015. **Single nucleotide polymorphisms of ER β and coronary atherosclerotic disease in Chinese Han women**. *Int J Clin Exp Pathol*:8(2):2044-2050.

- SHIBATA, M. A.; SHIBATA, E.; FUJIOKA, S.; HARADA-SHIBA, M. 2015. **Atherosclerosis in Apolipoprotein E-knockout Mice as a Model of Human Disease.** *Austin J Cardiovasc Dis Atherosclerosis*, v. 2, n. 1, p. 1011-1012.
- SIDDIG, A.; MOHAMED, A. O.; AWAD, S.; HASSAN, A. H.; ZILAH, E.; AL-HAJ, M.; BERNSEN, R.; ADEM, A. 2008. **Estrogen receptor α gene polymorphism and breast cancer.** *Ann N Y Acad Sci*; 1138: 95-107.
- SIMÃO, A. F.; PRÉCOMA, D. B.; ANDRADE, J. P.; CORREA FILHO, H.; SARAIVA, J. F. K.; OLIVEIRA, G. M. M. et al. 2013. **Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular.** *Arq Bras Cardiol.*: 10196(Supl.2): 1-63.
- SIMÕES, Ana Fillipa Berbardino. **Variabilidade genética dos receptores dos estrogénios e patologia ginecológica.** FMUC Medicina – Universidade de Coimbra. Coimbra. Portugal, 2009.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO CLIMATÉRIO. *I Diretriz brasileira sobre prevenção de doenças cardiovasculares em mulheres climatéricas e a influência da terapia de reposição hormonal (TRH).* *Arq Bras Cardiol* 2008;91(Supl.1):1-23.
- SPOSITO, Aandrei C.; CARAMELLI, Bruno; FONSECA, Francisco A. H.; BERTOLAMI, Marcelo C. **IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.** *Arq. Bras. Cardiol.* Vol.88 suppl.1. São Paulo, Apr. 2007.
- STARY H. C.; CHANDLER A. B.; GLAGOV S.; et al. 1994. **A definition of initial, fatty streak, and inter- mediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.** *Circulation*, v. 89, p. 2462–78.
- SUREKHA, D.; SAILAJA, K.; RAO, D. N.; RAGHUNADHARAO, D.; VISHNUPRIYA, S. 2009. **Oestrogen receptor beta (ERbeta) polymorphism and its influence on breast cancer risk.** *J Genet*;88(2): 261-6.
- SWIRSKI, F. K.; LIBBY, P. AIKAWA, E.; ALCAIDE, P.; LUSCINSKAS, F. W.; WEISSLEDER, R.. PITEET, M. J. 2007. **Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemiaassociated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata.** *J. Clin. Invest.* 117, 195–205.
- TACKE, F.; ALVAREZ, D.; KAPLAN, T. J.; JAKUBZICK, C.; SPANBROEK, R.; LLODRA, J.; GARIN, A.; LIU, J.; MACK, M.; VAN ROOIJEN, N.; LIRA, S. A.; HABENICHT, A. J.; RANDOLPH, G. J. 2007. **Monocyte subsets differentially**

employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 117,185–194.

TAKEDA-MATSUBARA, Y.; NAKAGAMI, H.; IWAI, M.; CUI, T. X.; SHIUCHI, T.; AKISHITA, M.; NAHMIAS, C.; ITO, M.; HORIUCHI, M. 2002. **Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II.** *Hypertension*, v. 39, p. 41–45.

TEMPFER, C. B.; SIMONI, M.; DESTENAVES, B.; FAUSER, B. C. 2009. **Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis.** *Hum Reprod Update*; 15(1): 97-118.

THOMPSON, J.; KHALIL, R. A. 2003. **Gender differences in the regulation of vascular tone.** *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 30, p. 1–15.

TOLFREY K. 2010. **Intraindividual variability of children's blood, lipid and lipoprotein concentrations: a review.** *Prev Cardiol*, v. 3, p. 145-51.

TRAUPE, T.; STETTLER, C. D.; LI, H.; HAAS, E.; BHATTACHARYA, I.; MINOTTI, R. et al. 2007. **Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries.** *Hypertension*;49: 1364–1370.

TUNSTALL, P. H.; KUULASMAA, K.; AMOUYEL, P. ARVEILER, D.; RAJAKANGAS, A. M.; PAJAK, A. 1994. **Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents.** *Circulation*, v. 90, n. 1, p. 583–612.

USATEGUI-MARTÍN, R.; PÉREZ-ALONSO, M.; SOCORRO-BRIONGOS, L.; RUIZ-MAMBRILLA, M.; DeLUIS, D.; LINARES, L.; CALERO-PANIAGUA, I.; DUENÑAS-LAITA, A.; PÉREZ-CASTRILLÓN, J. L. 2019. **Estrogen receptor gene polymorphisms determine serum lipid profile in healthy postmenopausal women treated with calcium, vitamin D, and genistein.** *J Cell Biochem*;1-6.

VALONES, M. A. A.; GUIMARÃES, R. L.; BRANDÃO, L. A. C.; DE SOUZA. P. R. E.; CARVALHO, A. de A. T.; CROVELA, S. 2009. **PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN MEDICAL DIAGNOSTIC FIELDS : A REVIEW.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 1–11.

- VERA, C. S.; DE OLIVEIRA, L. C. O.; DE SÁ, M. F. S. 2007. **Hormônios femininos e hemostasia**. *Rev Bras Ginecol Obstet.*;29(10):538-47.
- VILLADÓNIGA, J. I. L. 2008. **A More Accurate Approach to Molecular Genetics Analysis in Vascular Disease**. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*,8,212-227.
- WELBOREN, W. J.; SWEEP, F. C.; SPAN, P. N.; STUNNENBERG, H. G. 2009. **Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated?***Endocr Relat Cancer.*;16(4):1073-89.
- WILLIAMS, C.; EDVARDSSON, K.; LEWANDOWSKI, S. A.; STRÖM, A.; GUSTAFSSON, J. A. 2008. **A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells**. *Oncogene*;27(7):1019e32.
- WILLIAMS, C. L; STANCEL, G. M. 1996. Estrogênios e Progestogênios. In GILMAN,A.G.(Ed). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica** 1996; 9.ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, 1045-1067.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2014. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva: WHO,. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1. Acesso em 03 jan. 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2011. **Tobacco questions for surveys: a subset of key questions from the Global Adult Tobacco Survey (GATS): global tobacco surveillance system**. 2011.Geneva: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/surveillance/gats/en/index>. Acessado em 12 nov. 2015.
- XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; ASSAD, M. H.; ROCHA, V. Z.; SPOSITO, A. C.; FONSECA, F.A.; dos SANTOS, J. E.; SANTOS, R. D.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; MARTINEZ, T. L. R.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, A.; FORTI, N. A.; MORIGUCHI, E.; CHAGAS, A. C. P.; COELHO, O. R.; RAMIRES, J. A. F. **V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose**. *Arquivo Bras Cardiol*. 2013; 101(4.1): 1-22.
- XING, D.; NOZELL, S.; CHEN, Y. F.; HAGE, F.; OPARIL, S. 2009. **Estrogen and mechanisms of vascular protection**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;29:289-295.
- YANG, X. P.; RECKELHOFF, J. F. 2011. **Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease**. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 20(2):133-8.

- YU, K. D.; RAO, N. Y.; CHEN, A. X.; FAN, L.; YANG, C.; SHAO, Z. M. 2011. **A systematic review of the relationship between polymorphic sites in the estrogen receptor-beta (ESR2) gene and breast cancer risk.** *Breast Cancer Research and Treatment*; 126(1):37-45.
- YUSUF, S.; REDDY, S.; OUNPUU, S.; ANAND, S. 2001. **Global burden of cardiovascular diseases; part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization.** *Circulation*;104:2746-2753.
- ZHAO, C.; GAO, H.; LIU, Y.; PAPOUTSI, Z.; JAFFREY, S.; GUSTAFSSON, J. A.; DAHLMAN-WRIGHT, K. 2010. **Genome-wide mapping of estrogen receptor-beta-binding regions reveals extensive cross-talk with transcription factor activator protein-1.** *Cancer Res*;70(12):5174-83.
- ZHAO, T.; ZHANG, D.; LIU, Y.; ZHOU, D.; CHEN, Z.; YANG, Y.; LI, S.; YU, L.; ZHANG, Z.; FENG, G.; HE, L.; XU, H. 2010. **Association between ESR1 and ESR2 gene polymorphisms and hyperlipidemia in Chinese Han postmenopausal women.** *J Hum Genet*;55:50-54.
- ZHANG, Y.; CLIFF, W. J.; SCHOEFL, G. I. et al. 1993. **Plasma protein insudation as an index of early coronary atherogenesis.** *Am J Pathol.*; 143: 496–506.

ANEXO I – QUESTIONÁRIO

Nº PRONTUÁRIO: _____ INICIAIS- _____ Nº TUBO _____

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ IDADE: (___)

SEXO: () M ; () F COR DA PELE: _____ (Branco, negro ou pardo)

FILHOS? () SIM () NÃO.

QUANTOS? HOMENS (___) MULHERES (___)

ABORTO: _____ QTOS _____ NATURALIDADE: _____

RESIDE EM: _____

TELEFONE: _____ TEL. CONTATO: _____

PROFISSÃO _____

1. ATUALMENTE FUMA? () SIM () NÃO

QUANTO TEMPO? () MAIS 10 ANOS () MENOS 10 ANOS INICIOU
COM _____ ANOS

2. EX-FUMANTE? () INICIOU COM QUANTOS ANOS? (___)

PAROU COM QUANTOS ANOS? (___)

QUANTOS CIGARROS? 5-10/DIA () 10-20/DIA () 20 OU
MAIS ()

CARGA TABÁGICA: _____ MAÇOS/ANOS

2. BEBE? () SIM () NÃO FREQUÊNCIA _____

VINHO () CERVEJA () CACHAÇA () OUTROS _____

1 COPO () 2-3 COPOS () 3 OU + COPOS ()

DIAGNÓSTICO: _____

INICIO DOS SINTOMAS AOS: _____ ANOS

SINTOMAS: _____

DATA DO DIAGNÓSTICO: _____. INÍCIO DO TRATAMENTO _____

TRATAMENTO CLÍNICO: SIM () NÃO ()

CO-MORBIDADES: HAS () DM () DISLIPIDEMIA ()
HIPERHOMOCISTEINEMIA () IRC () DIALÍTICO ()

D. ISQ. CORONARIANA () IAM () ___ / _____ AVE () ___ / _____

OUTRAS: _____

MEDICAMENTOS EM USO: _____

EXAMES REALIZADOS: ECO DOPPLER ARTERIAL PERIFÉRICO ()
ARTERIOGRAFIA () ANGIOTOMOGRAFIA ()

ECO CARDIOGRAMA () CATETERISMO CARDÍACO ()

REALIZOU INTERVENÇÃO CIRÚRGICA? SIM () / NÃO ()

QUAL E QUANDO? _____

COMPLICAÇÕES?

REINTERVENÇÃO? SIM () NÃO ().

QUANTAS VEZES E QUANDO? _____

FAZ USO DE CLOPIDOGREL? SIM () DOSE: _____ MG NÃO ().

POR QUANTO TEMPO? _____ PAROU? () QUANTO TEMPO? _____

INÍCIO ANTES DE INTERVENÇÃO () APÓS INTERVENÇÃO ()

OBSERVAÇÕES:

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CASO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA.**

Meu nome é JOSÉ VITOR MAGALHÃES MARTINS, sou o pesquisador (a) responsável pelo projeto. As informações e esclarecimentos a respeito da pesquisa serão repassados e caso aceite participar do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias. A primeira será de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização. Qualquer dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a coordenadora responsável **Profa. Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura**, no telefone: **62-3946-1385** ou através do e-mail kkverolli@pucgoias.edu.br.

Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512.

I. O paciente que estará sob consulta e com o diagnóstico de aterosclerose (acúmulo de placas de gordura nos vasos sanguíneos) será contatado e informado da pesquisa. Caso aceite deverá assinar o TCLE e caso se recuse ou desista no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.

II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para diferentes variações genéticas que podem estar relacionados á alterações vasculares.

III. O objetivo da pesquisa é a detecção de variações genéticas bem como a criação de um painel com estas variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue periférico coletadas serão analisadas para verificar a presença das variações genéticas. Os critérios de inclusão são: pacientes maiores de 38 anos, diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares como a angioplastia e o cateterismo, que aceitem responder à entrevista e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os de exclusão são: pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado à Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para alguma variação genética, você será informado pelo Médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses pacientes com aterosclerose. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

VII. O material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa, o material após os exames será descartado.

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue periférico, durante o período da pesquisa. É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua 9A n 160, sala 202- setor Aeroporto, Goiânia, Goiás ou pelo telefone: (62) 30912979.

IX. Está garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer momento, sem e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

X. A participação na pesquisa não acarretará custos para você, assim como não será disponibilizado nenhum ressarcimento financeiro adicional.

XI. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização requerida em termos legais.

Eu _____, RG _____, abaixo assinado, discuti com o Dr. Fábio Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do estudo, procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também

que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, ___ de _____ de 201__.

Assinatura do participante

___ / ___ / _____

Data

Assinatura do responsável pelo estudo

___ / ___ / _____

Data

**ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO -
GRUPO CONTROLE**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), deste projeto de pesquisa sob o título **POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA.**

Meu nome é JOSÉ VITOR MAGALHÃES MARTINS, sou o pesquisador (a) responsável, mestrando em genética. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias, sendo a primeira de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o (a) pesquisador (a) responsável **Profa. Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura** no telefone: **62-3946-1385** ou através do e-mail kkverolli@pucgoias.edu.br. Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512.

I. O paciente que está sob consulta sem diagnóstico de aterosclerose baseado em resultados de exames que procuraram o consultório médico para outros tipos de consulta, como varizes, onde foi informado da pesquisa e caso aceite assinará o TCLE-grupo controle. Caso não aceite, ou desista no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.

II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para análise de diferentes variações genéticas que podem estar relacionados com alterações vasculares.

III. O objetivo do estudo é a detecção de variações genéticas bem como a criação de um painel com estas variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue periférico do grupo controle coletadas serão submetidas a testes de sangue, para verificar a ausência das variações genéticas. Para o grupo controle os critérios de inclusão serão idade superior a 38 anos, e que não apresentem diagnóstico de doença aterosclerótica baseados em resultados de exames de imagem. Os de exclusão são os pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado à Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para algum polimorfismo, você será informado pelo Médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses pacientes com aterosclerose. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

VII. O material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressalvando o sigilo quanto ao meu nome,

reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa, o material após os exames será descartado.

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue periférico, durante o período da pesquisa. É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua 9A n 160, sala 202- setor Aeroporto, Goiânia, Goiás ou pelo telefone: (62) 30912979.

IX. Fica garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer momento, sem e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

X. A participação na pesquisa não acarretará custos para você, assim como não será disponibilizado nenhum ressarcimento financeiro adicional.

XI. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização requerida em termos legais.

Eu _____, RG _____, abaixo assinado, discuti com o Dr. Fábio Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos

propósitos do estudo, procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do participante

___/___/_____

Data

Assinatura do responsável pelo estudo

___/___/_____

Data

ANEXOS

ANEXO I – QUESTIONÁRIO

Nº PRONTUÁRIO: _____ INICIAIS- _____ Nº TUBO _____

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ IDADE: (___)

SEXO: ()M ; ()F COR DA PELE: _____ (Branco, negro ou pardo)

FILHOS: () SIM () NÃO.

QUANTOS: HOMENS (____) MULHERES

(____)ABORTO: _____ QTOS _____ NATURALIDADE: _____

RESIDE EM: _____

TELEFONE: _____ TEL. CONTATO: _____

PROFISSÃO _____

1. ATUALMENTE FUMA: () SIM () NÃO

QUANTO TEMPO: () MAIS 10 ANOS () MENOS 10 ANOS INICIOU COM _____ ANOS

2. EX-FUMANTE () INICIOU COM QUANTOS ANOS (___) PAROU COM QUANTOS ANOS (___)

QUANTOS CIGARROS: 5-10/DIA () 10-20/DIA () 20 OU MAIS (), CARGA

TABÁGICA: _____ MAÇOS/ANOS

2. BEBE () SIM () NÃO FREQUÊNCIA _____

VINHO () CERVEJA () CACHAÇA () OUTROS _____ 1 COPO () 2-3 COPOS ()
3 OU + COPOS ()

DIAGNÓSTICO: _____

INICIO DOS SINTOMAS AOS: _____ ANOS

SINTOMAS: _____

DATA DO DIAGNÓSTICO: _____. INÍCIO DO TRATAMENTO _____

TRATAMENTO CLÍNICO: SIM () NÃO ()

CO-MORBIDADES: HAS () DM () DISLIPIDEMIA () HIPERHOMOCISTEINEMIA ()

IRC () DIALÍTICO (___)

D. ISQ. CORONARIANA () IAM () ___/___ AVE () ___/___

OUTRAS: _____

MEDICAMENTOS EM USO: _____

EXAMES REALIZADOS: ECO DOPPLER ARTERIAL PERIFÉRICO()
ARTERIOGRAFIA () ANGIOTOMOGRAFIA() ECO CARDIOGRAMA ()
CATETERISMO CARDÍACO ()

REALIZOU INTERVENÇÃO CIRÚRGICA? SIM()/ NÃO() QUAL E
QUANDO? _____

COMPLICAÇÕES? _____

REINTERVENÇÃO? SIM () NÃO (). QUANTAS VEZES E
QUANDO? _____ -

FAZ USO DE CLOPIDOGREL? SIM () DOSE: _____ MG NÃO (). POR QUANTO
TEMPO? _____ PAROU? () QUANTO TEMPO? _____ INICÍO ANTES DE
INTERVENÇÃO () APÓS INTERVENÇÃO ()

OBSERVAÇÕES:

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CASO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA**.

Meu nome é JOSÉ VITOR MAGALHÃES MARTINS, sou o pesquisador (a) responsável pelo projeto. As informações e esclarecimentos a respeito da pesquisa serão repassados e caso aceite participar do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias. A primeira será de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização. Qualquer dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a coordenadora responsável **Profa. Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura**, no telefone: **62-3946-1385** ou através do e-mail kkverolli@pucgoias.edu.br.

Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512.

I. O paciente que estará sob consulta e com o diagnóstico de aterosclerose (acúmulo de placas de gordura nos vasos sanguíneos) será contatado e informado da pesquisa. Caso aceite deverá assinar o TCLE e caso se recuse ou desista no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.

II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para diferentes variações genéticas que podem estar relacionados á alterações vasculares.

III. O objetivo da pesquisa é a detecção de variações genéticas bem como a criação de um painel com estas variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue periférico coletadas serão analisadas para verificar a presença das variações genéticas. Os critérios de inclusão são: pacientes maiores de 38 anos,

diagnosticados com aterosclerose em tratamento medicamentoso e/ou submetidos aos procedimentos vasculares como a angioplastia e o cateterismo, que aceitem responder à entrevista e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os de exclusão são: pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado à Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para alguma variação genética, você será informado pelo Médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses pacientes com aterosclerose. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

VII. O material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa, o material após os exames será descartado.

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue periférico, durante o período da pesquisa. É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua 9A n 160, sala 202- setor Aeroporto, Goiânia, Goiás ou pelo telefone: (62) 30912979.

IX. Está garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer momento, sem e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma sem qualquer prejuízo a minha

pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

X. A participação na pesquisa não acarretará custos para você, assim como não será disponibilizado nenhum ressarcimento financeiro adicional.

XI. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização requerida em termos legais.

Eu _____, RG _____, abaixo assinado, discuti com o Dr. Fábio Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do estudo, procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, ___ de _____ de 201__.

Assinatura do participante

___/___/___

Data

Assinatura do responsável pelo estudo

____/____/____

Data

ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), deste projeto de pesquisa sob o título **POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE ATEROGÊNESE PRIMÁRIA**.

Meu nome é JOSÉ VITOR MAGALHÃES MARTINS, sou o pesquisador (a) responsável, mestrando em genética. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias, sendo a primeira de guarda e confidencialidade do Pesquisador (a) responsável e a segunda ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o (a) pesquisador (a) responsável **Profa. Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura** no telefone: **62-3946-1385** ou através do e-mail kkverolli@pucgoias.edu.br. Em caso de dúvida sobre a ética aplicada a pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512.

I. O paciente que está sob consulta sem diagnóstico de aterosclerose baseado em resultados de exames que procuraram o consultório médico para outros tipos de consulta, como varizes, onde foi informado da pesquisa e caso aceite assinará o TCLE-grupo controle. Caso não aceite, ou desista no meio da pesquisa o seu atendimento terá continuidade normal.

II. A pesquisa consiste na análise laboratorial de amostras de sangue para análise de diferentes variações genéticas que podem estar relacionados com alterações vasculares.

III. O objetivo do estudo é a detecção de variações genéticas bem como a criação de um painel com estas variações para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver a doença.

IV. As amostras de sangue periférico do grupo controle coletadas serão submetidas a testes de sangue, para verificar a ausência das variações genéticas. Para o grupo controle os critérios de

inclusão serão idade superior a 38 anos, e que não apresentem diagnóstico de doença aterosclerótica baseados em resultados de exames de imagem. Os de exclusão são os pacientes menores de 38 anos e/ou que não aceitem participar da pesquisa.

V. Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, estando relacionadas a acidentes biológicos e/ou complicações no local da coleta que poderá ficar dolorido, avermelhado ou arroxeadado. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência o paciente será encaminhado à Rede Goiana de Pesquisa de Marcadores Moleculares para Alterações Genéticas Humanas, no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GOIAS.

VI. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Caso o resultado seja positivo para algum polimorfismo, você será informado pelo Médico responsável, que já atua no diagnóstico e tratamento desses pacientes com aterosclerose. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

VII. O material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, publicação de artigos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa, o material após os exames será descartado.

VIII. É assegurada a assistência do participante durante toda pesquisa e o médico Dr. Fabio Campedelli continuará a dar todo o suporte para qualquer intercorrência que ocorra decorrente da coleta de sangue periférico, durante o período da pesquisa. É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Rua 9A n 160, sala 202- setor Aeroporto, Goiânia, Goiás ou pelo telefone: (62) 30912979.

IX. Fica garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer momento, sem e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma sem qualquer prejuízo a minha

pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

X. A participação na pesquisa não acarretará custos para você, assim como não será disponibilizado nenhum ressarcimento financeiro adicional.

XI. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização requerida em termos legais.

Eu _____, RG _____, abaixo assinado, discuti com o Dr. Fábio Campedelli, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Declaro ter recebido e compreendido todas as informações referentes aos propósitos do estudo, procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do participante

___/___/_____
Data

Assinatura do responsável pelo estudo

___/___/_____
Data