



**Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**LETICIA SONCINI DE SOUZA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS À BAIXA DENSIDADE MINERAL  
ÓSSEA: AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA E DE CONDUTA  
TERAPÊUTICA PARA OSTEOPOROSE**

**VITÓRIA  
2013**

**LETICIA SONCINI DE SOUZA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS  
À BAIXA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA: AVALIAÇÃO  
PROGNÓSTICA E DE CONDUTA TERAPÊUTICA PARA  
OSTEOPOROSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) - Ponto Focal Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Victor Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho.

**VITÓRIA  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA BIBLIOTECA CENTRAL - UFES



## **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À BAIXA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA: AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA E DE CONDOTA TERAPÊUTICA PARA OSTEOPOROSE**

Leticia Soncini de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO) – Ponto Focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ian Victor Silva - Orientador  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho – Coorientador  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Gomes Wanderley Pires  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Jean Christophe Houzel  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos ensinamentos aprendidos, pelos momentos felizes e pelos não tão felizes, mas que foram preciosas lições de vida, de perseverança, de compreensão, tolerância e paciência e que fizeram parte dessa pequena bagagem do meu crescimento no dia a dia da minha vida.

Agradeço a minha Família pela base sólida que sempre me deu força para encarar a vida de frente, por me ensinar a percorrer meu próprio caminho nessa trajetória, por levantar meu ânimo nas inúmeras vezes em que me sentia abatida, pelo amor intenso e pelo carinho sempre. Aos meus irmãos que são exemplos de estudo e força de vontade, pela força e pelos auxílios eternos.

Agradeço ao meu amor por me compreender sempre, me aceitar como sou e perdoar minhas falhas, e por compartilhar minhas dores e muitas alegrias.

Agradeço às pacientes por aceitarem participar deste estudo. Sem elas, nada poderia ter sido feito.

Agradeço ao Professor Dr. Ian Victor Silva por acreditar no meu trabalho, pelos conselhos e por ter me apresentado o tema Osteoporose.

Ao Dr. Sérgio Ragi Eis (*in memoriam*), Dr<sup>a</sup> Irani do Carmo Fim Francischetto e ao Dr. Ben Hur Albergaria, do Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES) e ao Dr. Henrique Tommasi e Bruno Tommasi, do Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento, pelos ensinamentos e por colaborarem diretamente para que esta pesquisa se tornasse realidade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leticia Batista Azevedo Rangel, Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho, Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira, Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães por todo o apoio, compreensão e carinho apresentados a mim em algum momento desta jornada.

Aos meus antigos amigos que permaneceram comigo mesmo com toda a distância... O carinho é imenso.

Agradeço também aos novos amigos que estiveram comigo, oferecendo-me suas amizades, seus incentivos, seus tempos. Suas generosidades em ações e palavras sempre tão gentis e carinhosas que muito me emocionaram.

Às agências de apoio e financiamento: FACITEC, FAPES e CNPq.

## RESUMO

Uma vez admitindo-se que o conhecimento da regulação dos mecanismos de formação e reabsorção óssea é crucial na busca de alternativas terapêuticas em doenças como a osteoporose, a biologia molecular surge como ferramenta interessante e, indispensável para alcançar tal objetivo. Dentre esses marcadores genéticos, os polimorfismos associados ao gene do receptor de estrogênio alfa (*RE $\alpha$* ) e ao gene da Apolipoproteína “E” (ApoE) têm recebido maior atenção nos últimos anos. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão dos polimorfismos PvuII (C→T nt -397) e XbaI (G→A nt -351) presentes no gene do *RE $\alpha$*  e dos polimorfismos presentes no gene da *ApoE* (HhaI -  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4) em populações de mulheres pós-menopausadas, associando estas alterações gênicas, seus perfis clínicos e bioquímicos com a osteoporose. Após análise dos resultados obtidos, o SNP PvuII, do gene do *RE $\alpha$* , está relacionado com a baixa Densidade Mineral Óssea (DMO), sendo este efeito mais observado em mulheres com idade mais avançada. O alelo P, contudo, correlaciona-se fortemente com alta DMO ( $p < 0,05$ ) em toda a população estudada, e se reproduz quando analisada a população com idade acima de 65 anos, sugerindo um papel protetor à perda de massa mineral óssea. No SNP XbaI do mesmo gene, observou-se uma associação significativa do alelo x em concentrações de triglicerídeos e de lipídios totais, além da dependência da idade dos pacientes e do Índice de Massa Corporal (IMC). Já o SNP HhaI, no gene da *APOE*, o alelo E2 pode estar relacionado como um fator de risco para a baixa DMO, e o alelo E3 pode estar relacionado como um fator protetor em relação à DMO. Esses resultados contribuem para uma melhor compreensão sobre a expressão de genes relacionados à osteoporose e podem fornecer subsídios para uma melhor determinação prognóstica da enfermidade, além de racionalização da conduta terapêutica a ser escolhida, proporcionando uma melhor qualidade de vida de pacientes já na pós-menopausa.

**Palavras-chave:** Polimorfismo; Receptor de Estrogênio alfa, Apolipoproteína E, Menopausa e Osteoporose.

## ABSTRACT

Since that assuming the knowledge of the regulatory mechanisms of bone formation and resorption is crucial in the search for alternative therapies in diseases such as osteoporosis, molecular biology emerges as interesting tool and essential to achieving this goal. Among these genetic markers, gene polymorphisms associated with estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and the gene Apolipoprotein " E" (ApoE) have received increased attention in recent years. The aim of this study was to analyze the expression of polymorphisms PvuII (C $\rightarrow$ T nt -397) and XbaI (G $\rightarrow$ A nt -351) gene present in RE $\alpha$  and polymorphisms in the gene ApoE (HhaI -  $\epsilon$ 2 ,  $\epsilon$ 3 and  $\epsilon$ 4) in populations of postmenopausal women, associating these gene alterations, and their clinical and biochemical profiles with osteoporosis. After analyzing the results obtained, the PvuII SNP in the gene of ER $\alpha$  is related to low BMD, and this effect is most noticeable in women with advanced age. The P allele, however, correlates strongly with high BMD ( $p < 0.05$ ) in the whole population studied and reproduced when analyzing the population aged over 65 years, suggesting a protective role in the loss of bone mineral. In XbaI SNP, of same gene, a significant association of allele x at concentrations of triglycerides and total lipids and dependence on patient age and Body Mass Index (BMI) was observed. On the other hand, for SNP HhaI, ApoE gene, the E2 allele may be associated as a risk factor for low BMD, and E3 allele may be associated as a protective factor in relation to BMD. These results contribute to a better understanding of the expression of genes related to osteoporosis and can provide information for better prognostic determination of the disease as well as rationalization of therapeutic conduct to be chosen, providing a better quality of life for postmenopausal patients.

**Keywords:** Polymorphism, Estrogen Receptor Alpha, Apolipoprotein E, Menopause and Osteoporosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Osso normal e osteoporótico respectivamente .....	19
Figura 2 – Diminuição da estatura com a evolução da idade e da osteoporose.....	20
Figura 3 – Homeostase óssea em adultos saudáveis.....	26
Figura 4 – Desequilíbrio entre a reabsorção e formação óssea na osteoporose.....	27
Figura 5 – Estrutura química dos estrogênios. Estrona (A) e Estradiol (B).....	28
Figura 6 – Mecanismos de ações não genômicas dependentes de receptores de estrogênio membranares em quatro tipos celulares.....	29
Figura 7 – Alguns polimorfismos descritos do gene do ESR1 humano.....	33
Figura 8 – Estrutura da ApoE.....	36
Figura 9 – O papel do HDL na redistribuição de lipídios. FC: colesterol livre; HDL-E: HDL-associado.....	37
Figura 10 – O gene da ApoE.....	39
Figura 11 – O domínio de interação da ApoE4.....	40
Figura 12 – Coleta sanguínea.....	43
Figura 13 – Aparelho de densitometria óssea localizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES).....	44
Figura 14 – Regiões analisadas em exame DXA realizada no CEDOES.....	52
Figura 15 – Resultado de exame DXA realizada no CEDOES.....	53
Figura 16 - Extração de material genômico (DNA).....	58
Figura 17 - Produto amplificado por PCR das amostras de DNA.....	59

Figura 18 – Digestão por enzima de restrição PvuII.....	60
Figura 19 – Digestão por enzima de restrição XbaI.....	60
Figura 20 – Qualificação PCR APOE.....	62
Figura 21 – Digestão por enzima de restrição HhaI.....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Regressão linear das Densidades Minerais Ósseas (DMO's) de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	54
Gráfico 2 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) da coluna de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	55
Gráfico 3 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do fêmur de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	55
Gráfico 4 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do colo do fêmur de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	56
Gráfico 5 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do rádio de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	57
Gráfico 6 – Concentração sérica do fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) em pacientes osteoporóticas e normais.....	65
Gráfico 7 – Influência da idade na concentração sérica do fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) em pacientes osteoporóticas e normais.....	66
Gráfico 8 – Concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas e normais.....	67
Gráfico 9 – Influência da idade na concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas e normais.....	67
Gráfico 10 – Influência da idade na concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas portadoras dos alelos <b>P</b> (grupos <b>PP</b> e <b>Pp</b> ) e homozigotos ancestrais ( <b>pp</b> ).....	72
Gráfico 11 – Influência da idade na concentração sérica do CTx em pacientes osteoporóticas portadoras dos alelos <b>P</b> (grupos <b>PP</b> e <b>Pp</b> ) e homozigotos ancestrais ( <b>pp</b> ).....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios Densitométricos da Organização Mundial da Saúde.....	21
Tabela 2 - <i>Primers</i> da região do íntron 1 do <i>REα</i> contendo os SNPs PvuII e XbaI utilizados neste estudo.....	46
Tabela 3 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 119 pb amplificado a partir do gene do receptor de estrogênio alfa ( <i>REα</i> ).....	47
Tabela 4 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 186 pb amplificado a partir do gene da Apolipoproteína E (ApoE).....	49
Tabela 5 - Características amostrais das pacientes analisadas no estudo.....	51
Tabela 6 - Distribuição dos genótipos da população normal e osteoporótica.	61
Tabela 7 – Perfil populacional (por genótipo do Gene da ApoE) encontrados no estudo.....	63
Tabela 8 - Perfil sérico das pacientes normais e osteoporóticas envolvidas neste estudo.....	64
Tabela 8 - Agrupamento alélico e a influência destes alelos na DMO da população estudada.....	69
Tabela 9 - Agrupamento alélico e a influência destes alelos na DMO da população estudada.....	69
Tabela 10 - Papel dos alelos <b>P</b> , <b>p</b> , <b>X</b> e <b>x</b> nas concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA), fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) e osteocalcina em todas as pacientes.....	70
Tabela 11 - Papel dos alelos <b>P</b> , <b>p</b> , <b>X</b> e <b>x</b> nas concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA), fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) e osteocalcina em pacientes osteoporóticas.....	71
Tabela 12 – Densidade mineral óssea dos sítios em relação aos genótipos encontrados .....	73

Tabela 13 - Presença e ausência dos alelos analisados com a DMO do rádio.....	74
Tabela 14 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO na coluna.....	75
Tabela 15 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO do Colo do Fêmur.....	75
Tabela 16 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO do fêmur.....	76
Tabela 17- Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO total.....	76
Tabela 18 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose na coluna.....	77
Tabela 19 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no rádio.....	78
Tabela 20 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no fêmur.....	79
Tabela 21 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no Colo do Fêmur.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

APOA	Apolipoproteína A
APOC	Apolipoproteína C
APOE	Apolipoproteína E
Arg	Arginina (aminoácido)
BMP	Proteína Morfogênica Óssea
CE	Ésteres de Colesterol
CEDOES	Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo
CIC	Canal de Cloreto
CTx	Fragmento C-Terminal de Colágeno Tipo I
Cys	Cisteína (aminoácido)
DAE	Doenças Associadas ao Envelhecimento
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXA	Absorciometria por Dupla Emissão de Raios X ( <i>Dual-energy X-ray Absorptiometry</i> )
GH	Hormônio do Crescimento
Glu	Ácido glutâmico (aminoácido)
GM-CSF	Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
Hha I	Enzima de Restrição (Gene APOE)
HSP70	Proteína Heat Shock 70
HSP90	Proteína Heat Shock 90
IGF-1	Fator de Crescimento Insulina Símile Tipo 1
IL – 1	Interleucina 1
IL – 4	Interleucina 4

IL – 6	Interleucina 6
LBCE	Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento
LCAT	Lectina Colesterol Acil-transferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
<i>mRNA</i>	Ácido Ribonucleico (Tipo: mensageiro)
pB	Pares de Bases
PTH	Hormônio Paratireoidiano
Pvu II	Enzima de Restrição (Gene RE $\alpha$ )
RE $\alpha$	Receptor de Estrogênio alfa
RVD	Receptor de Vitamina D
SERM's	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral beta
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
Xba II	Enzima de Restrição (Gene RE $\alpha$ )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1 METABOLISMO ÓSSEO.....	23
<b>2.1.1 FISIOPATOLOGIA ÓSSEA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.2 O PAPEL DO ESTROGÊNIO NO TECIDO ÓSSEO.....</b>	<b>27</b>
2.1.2.1 Estrutura e mecanismo de ação do Estrogênio.....	27
2.1.2.2 Polimorfismos do gene do receptor de estrogênio alfa ( <i>RE<math>\alpha</math></i> ).....	32
<b>2.1.3 O PAPEL DA APOLIPOPROTEÍNA “E” (APOE) NO TECIDO ÓSSEO.....</b>	<b>34</b>
2.1.3.1 Estrutura e mecanismo de ação da Apolipoproteína “E” (ApoE).....	35
2.1.3.2 Polimorfismos do gene da Apolipoproteína “E” (APOE) .....	38
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 APROVAÇÃO DO PROJETO.....	42
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	42
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	44
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	45
<b>4.4.1 RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (<i>RE<math>\alpha</math></i>).....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.2 APOLIPOPROTEÍNA E (APOE).....</b>	<b>48</b>
4.5 ANÁLISE SOROLÓGICA E IMUNOENZIMÁTICA DAS AMOSTRAS.....	49
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 CARACTERIZAÇÕES DA AMOSTRA.....	51
5.2 EXAMES DE DXA.....	52

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	57
5.4 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	58
<b>5.4.1 GENE DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (RE<math>\alpha</math>)...</b>	<b>58</b>
<b>5.4.2 GENE DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE).....</b>	<b>61</b>
5.5 RESULTADOS SOROLÓGICOS E IMUNOENZIMÁTICOS DE MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO.....	64
5.6 PAPEL DOS ALELOS EM ALGUNS DOS PARÂMETROS SOROLÓGICOS DO METABOLISMO MINERAL.....	68
<b>5.6.1 GENE DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (RE<math>\alpha</math>)...</b>	<b>68</b>
<b>5.6.2 GENE DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE).....</b>	<b>73</b>
6 DISCUSSÃO.....	80
7 CONCLUSÃO.....	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
<b>ANEXO I – Parceria do Centro de Densitometria Óssea do Espírito Santo (CEDOES).....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO II – Parceria do Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento (ITPD).....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO III – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO V – Anamnese Clínica.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO VI - ARTIGO PUBLICADO: Revista Maturitas, 2010.....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO VII - ARTIGO SUBMETIDO 1: Revista Molecular Biology Reports, 2013 - Comprovante de submissão do artigo à revista.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO VIII - ARTIGO SUBMETIDO 2: Revista Molecular Biology Reports, 2013 - Comprovante de submissão do artigo à revista.....</b>	<b>119</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo natural que ocorre em todos os seres vivos. A população humana também padece deste evento e, atualmente, apresenta uma tendência a comportar um número crescente de idosos. Em países como o Reino Unido e Suécia, o número de pessoas acima de 65 anos de idade já supera os 15% de sua população, enquanto, em países menos desenvolvidos, essa taxa fica em torno de 6% (KISNELLA, 1988). No Brasil, por exemplo, estima-se que a proporção de idosos (maior de 65 anos) saltará de 5,1% em 2000, para 14,2% em 2050, percentual comparável a países europeus (MACHADO, 1993). Entretanto, a população de idosos, no Brasil, em números absolutos, é maior que o número de idosos de alguns países desenvolvidos (JÚNIOR, 2000). A este crescimento da população idosa pode-se associar um aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, como a Doença de Alzheimer, as enfermidades do sistema cardiovascular, o câncer e a osteoporose.

A osteoporose é uma das principais Doenças Associadas ao Envelhecimento (DAE) que já atinge hoje um número considerável de indivíduos no mundo, afligindo majoritariamente mulheres após a menopausa. Devido ao envelhecimento populacional especula-se que esta mazela possa configurar uma das enfermidades mais incidentes ainda na primeira metade deste século. Portanto, a casuística da osteoporose tende a aumentar numa proporção semelhante também em nosso país. Na União Europeia, uma pessoa sofre de fraturas resultantes da osteoporose a cada 30 segundos (IOF, 2008). A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO, 1994) define a osteoporose como uma redução da Densidade Mineral Óssea (DMO) associada a uma deterioração da microarquitetura óssea, tornando o tecido ósseo enfraquecido e aumentando a susceptibilidade a fraturas e/ou microfraturas espontâneas (Figura 1). Outros fatores como a idade, o uso de alguns medicamentos, histórico familiar de fratura por fragilidade e/ou baixo índice de massa corporal também são componentes importantes para o aumento da morbimortalidade da doença (KANIS, 2001).

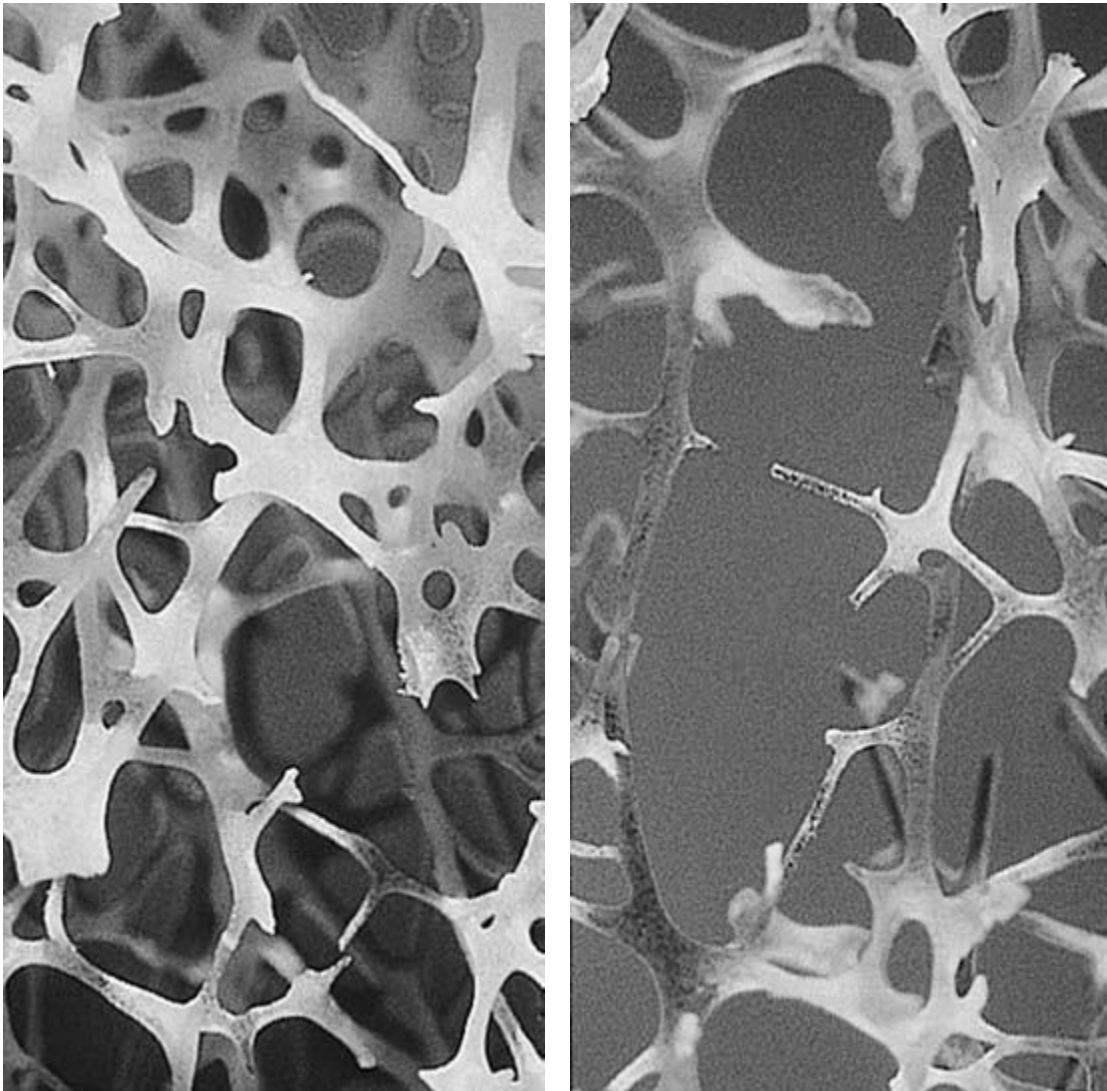


Figura 1 - Osso normal e osteoporótico respectivamente.

Fonte: International Osteoporosis Foundation - IOF, 2008.

A elevada susceptibilidade destes pacientes às fraturas é o que gera a alta morbimortalidade da osteoporose. O tipo e a localização da fratura influenciam na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes. Estima-se que, entre as mulheres osteoporóticas de idade superior a 65 anos acometidas de fraturas no fêmur ou quadril, 50% não voltem a andar e 20% evoluam para o óbito em menos de dois anos após fratura (LISCUM, 1992). As lesões do colo de fêmur são as mais graves, podendo levar ao óbito entre 10 a 20 % das mulheres pós-menopausadas durante o primeiro ano após a fratura. Dor nas costas, cifose e diminuição da estatura (Figura 2) também são possíveis conseqüências das fraturas de vértebras. A morbidade da

osteoporose é também alta, estando principalmente relacionada à incapacidade de deambulação de forma independente, resultando num impacto socioeconômico grande em uma parcela significativa da população (WANNMACHER, 2004).

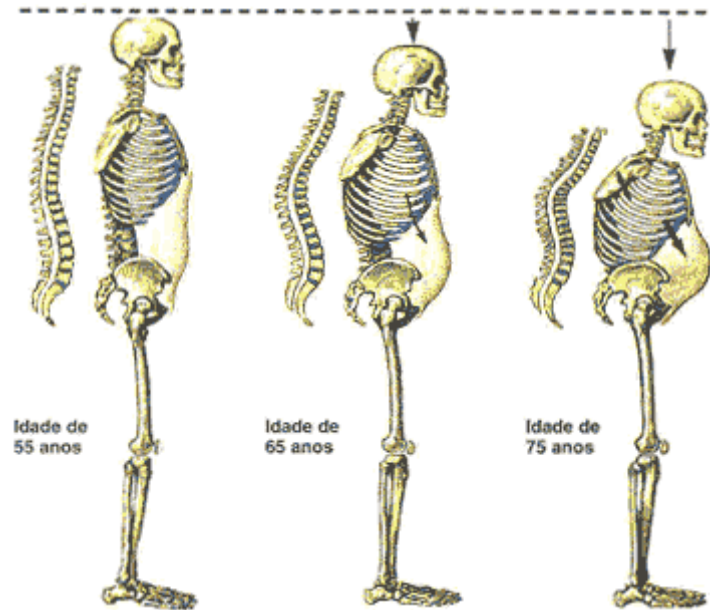


Figura 2 - Diminuição da estatura com a evolução da idade e da osteoporose.

Fonte: WANNMACHER, 2004.

O custo financeiro da osteoporose, portanto, é difícil de ser estimado com precisão, porque incluem gastos hospitalares, cuidados na residência por tempo prolongado, medicamentos e outros custos indiretos, como perda de dias de trabalho e o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas (WHO, 2000). Em um estudo pioneiro no Brasil, KOWALSKI e colaboradores (2001) acompanharam, durante um ano, os custos totais (diretos e indiretos), sob a perspectiva da sociedade, do tratamento de 100 pacientes com osteoporose pós-menopausa atendidas no ambulatório de Reumatologia / Osteoporose da Universidade Federal de São Paulo

(UNIFESP), e constataram que a média / paciente / ano foi de R\$ 908,19. De acordo com BURGE e colaboradores (2007), o custo total (direto e indireto) com sistemas de saúde associados à osteoporose foi estimado em U\$ 17 bilhões no ano de 2005 somente nos Estados Unidos da América, constituindo, portanto, uma aflição com um ônus socioeconômico.

O diagnóstico da osteoporose é feito radiologicamente ou, preferencialmente, pela medida da Densidade Mineral Óssea (DMO) pela absorciometria por dupla emissão de raios X (*Dual-energy X-ray Absorptiometry* - DXA), que mede a absorção de fótons de uma fonte de raios X, para estimar a quantidade de conteúdo de mineral no osso, de acordo com os critérios densitométricos da Organização Mundial da Saúde (1994) (Tabela 1).

No entanto, a alta sensibilidade do método para o diagnóstico da DMO não se relaciona diretamente à predição do risco de fraturas. Uma metanálise de 11 estudos com avaliação de mais de 2.000 fraturas concluiu que o DXA não é capaz de identificar, sozinho, indivíduos sob risco de fratura (GRAZIANO; MAIA, 1999). Ademais, ainda não se possui um fator fidedigno para a predição do risco de fraturas em mulheres menopausadas (WHO, 1994).

---

Tabela 1 - Critérios Densitométricos da Organização Mundial da Saúde\*:

\*Critérios estabelecidos para coluna lombar, colo do fêmur e 1/3 médio do rádio.

---

Categoria	Escore T
Normal	até -1
Osteopenia	entre -1 e -2,5
Osteoporose	< -2,5
Osteoporose estabelecida	< -2,5 associada à fratura de fragilidade

---

Fonte: World Health Organization - WHO, 1994.

Resumidamente, o rápido envelhecimento da população aliado à baixa velocidade no desenvolvimento de novos e eficientes métodos de prevenção e de tratamento da osteoporose - com alta morbi-mortalidade associada - faz com que este cenário se agrave ainda mais, configurando um sério problema de saúde pública. A identificação de marcadores que sejam capazes de determinar o risco associado à doença e de prever a ocorrência de fraturas é de suma importância para o tratamento da osteoporose, doença esta que tende a configurar uma das mais prevalentes do mundo atual.

A osteoporose é uma doença decorrente de muitos fatores. Apenas recentemente, no entanto, os mecanismos genéticos associados à osteoporose têm sido esclarecidos (LIU et al., 2003; FERRARI, 2008). Alguns destes mecanismos têm importantes implicações para a fisiopatologia e o tratamento da osteoporose. Ademais, uma importância ímpar está sendo atribuída aos fatores genéticos de baixa penetrância, como os polimorfismos genéticos, encontrados em alguns genes associados ao metabolismo ósseo e mineral, como potenciais preditores prognósticos e possíveis novos alvos terapêuticos na osteoporose. Mutações e polimorfismos em genes como os que codificam os receptores de vitamina D (RVD), o fator de crescimento insulina símile tipo 1 (IGF-1), a interleucina 6 (IL-6), a apolipoproteína E (APOE) e os receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  ( $RE\alpha$  e  $\beta$ ), mostram alta correlação com a baixa DMO durante a senescência (LIU et al., 2003). Alguns estudos têm buscado identificar as variantes genéticas que predizem o risco para osteoporose, incluindo pesquisas genômicas e candidatos gênicos. Nesta busca o gene da Apolipoproteína “E” (APOE) e o gene do receptor de estrogênio alfa ( $RE\alpha$ ) têm recebido maior atenção nos últimos anos (SCHILLING et al., 2005).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 METABOLISMO ÓSSEO

No tecido ósseo repousa a origem da osteoporose. Os ossos são tecidos extremamente ativos ao longo de toda a vida. Os mesmos cumprem não só o papel de sustentação do sistema muscular como também representam o principal estoque orgânico de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e fosfato (Pi) no organismo. Ademais, os ossos também propiciam proteção para órgãos chaves, como coração, cérebro e medula óssea. Para exercer este papel, o tecido ósseo se organiza microscopicamente num arranjo denominado microarquitetura óssea. A microarquitetura óssea é formada pela composição entre o número e espessura das trabéculas (espaços entre o tecido mineralizado) e as pontes teciduais formadas entre elas. A integridade da microarquitetura influi sobre a resistência óssea, e sua deterioração pode atuar como importante fator de risco, independente da densidade mineral óssea, de fraturas (JÚNIOR, 2000).

#### 2.1.1 FISIOPATOLOGIA ÓSSEA

Ao longo da vida a microarquitetura tecidual óssea é constantemente mudada, apresentando intensa atividade de formação e destruição – dependendo das necessidades do organismo – num equilíbrio que se denomina remodelamento ósseo. Este mecanismo é regulado majoritariamente pelo sistema endócrino – ressaltando-se o papel dos hormônios da tireóide ( $\text{T}_3$  e  $\text{T}_4$ ), do hormônio do crescimento (do inglês *Growth Hormone*, ou GH) e hormônios sexuais femininos e masculinos – e também por interações restritas ao próprio tecido ósseo, através de

fatores de crescimento de ação parácrina e autócrina (SZEJNFELD, 2000). No esqueleto em desenvolvimento, a atividade anabólica do tecido ósseo (formação) é primariamente voltada para o crescimento e o modelamento ósseo, processos pelos quais os ossos atingem suas formas e tamanhos maduros. Nesta fase, tanto os fatores endócrinos quanto teciduais exercem um papel importante nesta formação. No esqueleto adulto, o crescimento e modelamento são reservados apenas para reparar fraturas e microfraturas decorrentes de traumas ou para suprir necessidades dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e Pi disponíveis neste tecido, passando então a orquestração deste processo a uma interação entre as células que formam e destroem o tecido ósseo (SZEJNFELD, 2000). O remodelamento ósseo, entretanto, está presente durante toda a vida de indivíduos saudáveis.

O remodelamento ósseo no indivíduo maduro é conseqüentemente, um processo contínuo de destruição e renovação do tecido, primariamente relacionado à homeostase de cálcio e fósforo, mas também que permite a remoção de osso “velho” e a troca por osso “novo”. O processo dá-se em unidades de remodelamento ósseo - denominado ósteon - e caracteriza-se por acoplamento das funções dos osteoblastos (células formadoras de osso) e osteoclastos (células destruidoras de tecido ósseo) (MARIE et al., 2001; PARFITT et al., 1993; POGODA et al., 2005). O ciclo completo de remodelamento ósseo, do início da reabsorção até a mineralização da nova matriz formada no ósteon, completa-se, geralmente, dentro de 8 a 12 semanas (SHANE; BILEZIKIAN, 1995).

Os osteoblastos são células formadoras da matriz e indutoras de mineralização, e diferenciam-se a partir de células mesenquimais pluripotentes, que também é a precursora de células musculares, adipócitos e fibroblastos. Este evento é controlado por fatores de crescimento e de transcrição específicos dos osteoblastos, através de mecanismos ainda pouco conhecidos. Contudo, já é sabido que existem genes específicos de osteoblastos que modulam a diferenciação de sua progênie mesenquimal. Um destes genes é denominado *Cbfa1/Runx2*, um membro da família dos fatores de ligação central, que codifica um fator de transcrição que induz a diferenciação dos osteoblastos. O fator de transcrição *Cbfa1/Runx2* é o mais precoce e específico indicador de osteogênese, e sua expressão é induzida pela

proteína morfogenética óssea 7 (BMP-7), seguida da expressão de osteocalcina e de osteopontina, proteínas estas que constituem o molde para a mineralização chamado de osteóide (KIERZENBAUM, 2008). Os osteoblastos, então, depositam o osteóide ao longo do espaço existente entre estas células e o osso já formado. Ademais, os osteoblastos iniciam e controlam o processo de deposição dos íons cálcio ao longo do osteóide orgânico, o que culmina na impregnação de um sal composto de cálcio, fosfato e magnésio (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000) denominado hidroxiapatita -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  - (MAVROPOULOS, 1999). A esta matriz mineralizada, portanto, atribui-se a dureza física dos ossos e influenciando também as propriedades elásticas deste tecido (SIMÕES; BARACAT, 2000).

Os osteoclastos, por sua vez, são células multinucleadas formadas da fusão de progenitores mononucleares (oriundos da linhagem monocítica-macrofágica) que infiltram no tecido ósseo por diapedese. Após aderirem à matriz óssea mineralizada, os osteoclastos geram um ambiente ácido isolado, porém contínuo às especializações de sua membrana plasmática (denominada *ruffled border*). Acredita-se que a aderência do osteoclasto à superfície óssea seja mediada por receptores de membrana denominados integrinas, capazes de interagir com proteínas extracelulares presentes na matriz (HYNES, 1992).

A reabsorção óssea, feita pelos osteoclastos, envolve primeiramente o transporte ativo de prótons e íons cloreto para a superfície do tecido mineralizado através de uma  $\text{H}^+$ -ATPase do tipo V e de um canal de cloreto denominado CIC-7 (KORNAK, 2001), propiciando um ambiente ácido necessário para a solubilização da hidroxiapatita e atividades enzimáticas. Concomitantemente, ocorre também a fusão de vesículas lisossomais intracelulares contendo enzimas proteolíticas – principalmente a cisteína proteinase catepsina K - e fosfatases ácidas levando, assim, à dissolução completa dos componentes inorgânicos e orgânicos (colágeno do tipo I e proteínas não colagênicas) do tecido ósseo. Ao longo da vida adulta dos indivíduos as células originadas da linhagem osteoblástica secretam moléculas que controlam a ativação e diferenciação dos osteoclastos (TEITELBAUM, 2000), estas moléculas são fatores de crescimento (como a proteína morfogenética óssea 2 – BMP 2), moléculas de matriz (como a osteocalcina) e fatores inibidores da atividade

osteoclástica (como a osteoprotegerina), caracterizando que a interação destes dois tipos celulares é essencial para o remodelamento ósseo adequado.

Em indivíduos jovens e saudáveis, o ciclo de remodelamento – através da interação entre osteoblastos e osteoclastos supracitada (Figura 3) - é efetivo, restando ao sistema endócrino apenas um papel permissivo nas homeostases óssea e mineral. Com o envelhecimento, contudo, ocorre uma queda numa série de hormônios anabólicos (como hormônio do crescimento - GH, por exemplo) e sexuais (como o estrogênio na menopausa e a testosterona na andropausa) que interfere gradativamente com o processo de remodelamento ósseo. Em particular, a insuficiência ovariana - que caracteriza a menopausa - acarreta em profundas alterações na atividade osteoblástica - logo na formação óssea - levando a uma perda gradual da matriz mineral óssea, uma das características da osteoporose (Figura 4) (KIERZENBAUM, 2008; RODAN; MARTIN, 2000).

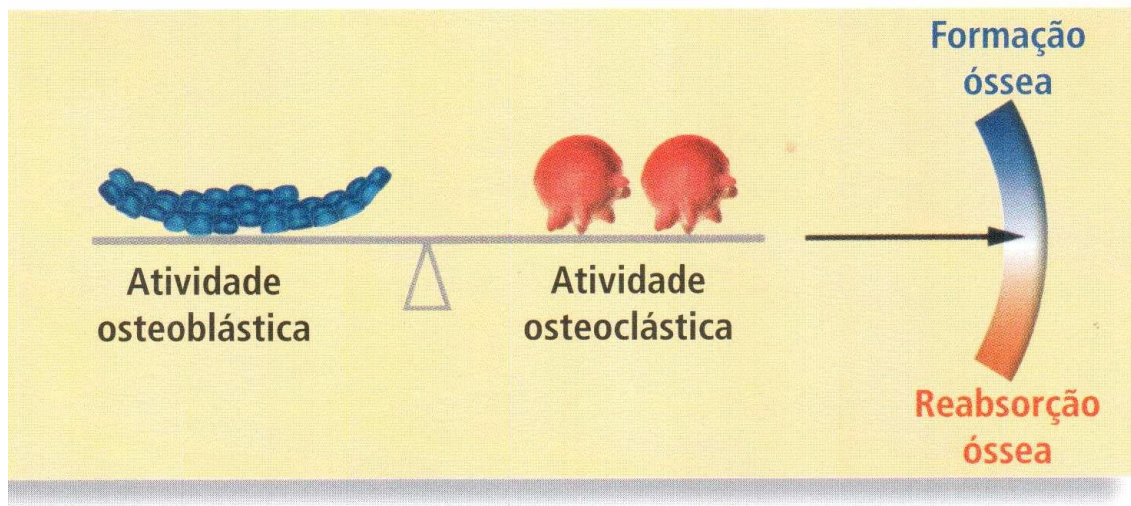


Figura 3 – Homeostase óssea em adultos saudáveis.

Fonte: MARIE (2001).

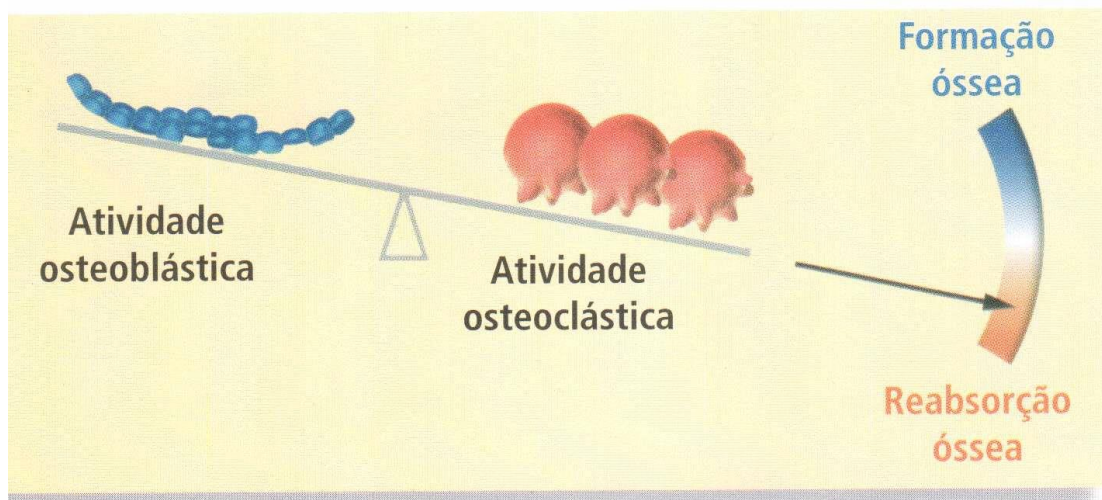


Figura 4 - Desequilíbrio entre a reabsorção e formação óssea na osteoporose.

Fonte: MARIE (2001).

## 2.1.2 O PAPEL DO ESTROGÊNIO NO TECIDO ÓSSEO

### 2.1.2.1 Estrutura e mecanismo de ação do Estrogênio

Os estrogênios são hormônios esteróides (Figura 5) reconhecidos como reguladores chave do crescimento, diferenciação e metabolismo em humanos. Esses hormônios influenciam muitos processos fisiológicos, que incluem não somente a reprodução, a saúde cardiovascular e a integridade óssea (Figura 6), mas também as funções cognitivas e comportamentais (JAKIMIUK et al., 2007).

Os hormônios esteróides são muito hidrofóbicos para se dissolverem no sangue, sendo transportados por proteínas carreadoras específicas desde o local de sua síntese até o seu tecido alvo. Nestes, os hormônios passam através da membrana

plasmática por difusão passiva, e, para exercer a sua ação, o estrogênio liga-se a receptores nucleares (LEHNINGER, 1995).

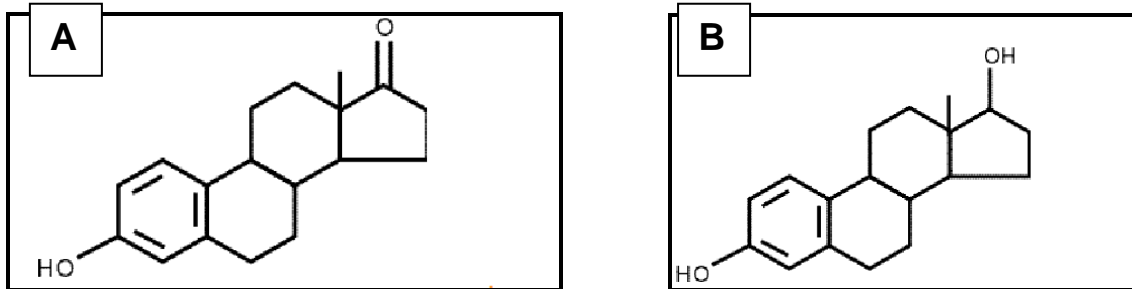


Figura 5 - Estrutura química dos estrogênios. Estrona (A) e Estradiol (B).

Fonte: [www.hormone.org](http://www.hormone.org)

O receptor esteróide não-ligado mantém-se em estado inativo, como parte de um complexo heteroligodimérico que também inclui a proteína “heat shock 90” (HSP90), a proteína “heat shock 70” (HSP70) e outras proteínas não tão bem caracterizadas. Parece que o domínio de ligação do DNA não é capaz de se ligar aos elementos de ligação do hormônio, por estar oculto por esse complexo protéico. Acredita-se que a forma ativa do receptor seja homodimérica, contendo duas moléculas de ligação (TRUSS, 1993). Uma vez ligada ao receptor, o complexo hormônio-receptor interage com uma sequência específica do DNA próxima ao gene alvo, ativando ou reprimindo a transcrição gênica. As funções específicas dos diversos esteróides dependem dos genes, isto é, da informação que eles regulam. Parte da especificidade da regulação gênica refere-se ao reconhecimento dos elementos de resposta de DNA (EVANS, 1988; ZILLIACUS, 1995).

Os esteróides ovarianos controlam o momento e a magnitude da expressão gênica no tecido-alvo. A sequência específica do DNA, amplificadora (*enhancer*), denominada elemento de resposta do hormônio, apresenta importante papel na ação do esteróide (RORIES, 1989).

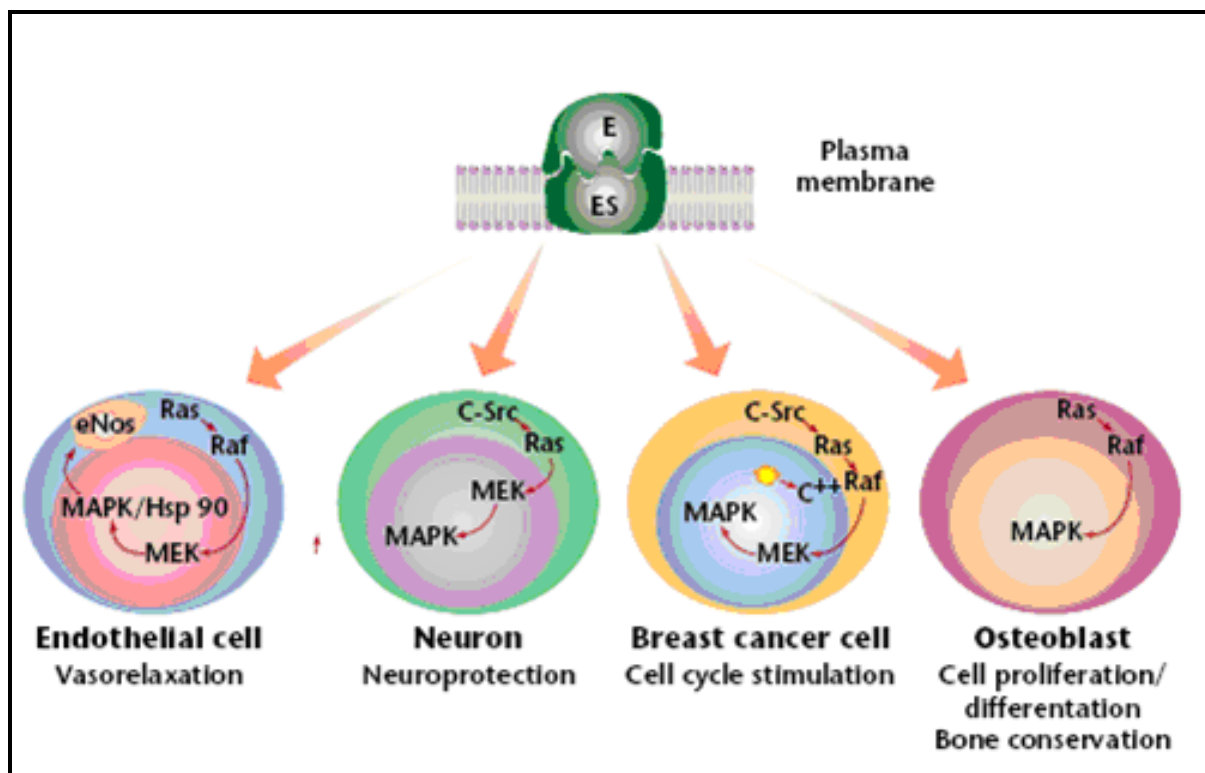


Figura 6 - Mecanismos de ações não genômicas dependentes de Receptores de Estrogênio membranares em quatro tipos celulares.

Fonte: COLLIS, WEBB ,1999.

É sabido que o estrogênio apresenta um importante papel no metabolismo ósseo e que sua perda – decorrente da menopausa – leva a profundas alterações no metabolismo ósseo, muitas das vezes evoluindo para osteoporose (SCHUIT et al., 2004). A associação entre osteoporose e deficiência estrogênica baseia-se no trabalho original de Albright e colaboradores (1940). A grande quantidade de informação a respeito de tal relação assegura a importância do estrogênio na homeostasia do tecido ósseo, tanto em seres humanos como em várias outras espécies animais.

Embora tenha decorrido mais de 50 anos desde a publicação de Albright, ainda é controverso o mecanismo exato de ação dos estrogênios no osso. Eles atuam em nível de osteoblastos, onde foram identificados seus receptores (COLSTON, 1989), modulam a secreção endógena de calcitonina (WILLIAMS, 1996) e incrementam o

número dos seus receptores ósseos (BODY, 1993). Os estrógenos também podem reduzir a perda óssea, inibindo a síntese de prostaglandinas, principalmente as da série E, reduzem em cerca de 50% a produção do fator de necrose tumoral (TNF) e das interleucinas, potentes estimuladores da reabsorção óssea. Aumentam também os fatores de crescimento "*insulin-like*" e de fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), poderoso inibidor dos osteoclastos e estimulador da função osteoformadora dos osteoblastos (HUGHES, 1998).

Aparentemente, todas essas modificações provocadas pelos estrógenos não são efeitos mediados pelo Hormônio Paratireoideo (PTH) nem pela calcitonina. Como ação indireta no metabolismo ósseo atribui-se aos estrógenos uma diminuição da sensibilidade óssea ao PTH, incremento da reabsorção tubular de cálcio, aumento do número de receptores para a forma ativa da vitamina D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) em osteoblastos humanos, bem como incremento dos níveis de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (CHEEMA, 1998).

Inicialmente, acreditava-se que o estrogênio atuasse sobre o osso de forma indireta, mediante a ação de hormônios calcitropicos, tais como calcitonina, paratormônio e  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ou de alguns outros fatores de crescimento não identificados (RORIES; SPELSBERG, 1989; GRONEMEYER, 1991; CLARK; SCHRADER; O'MALLEY, 1992). Estudos atuais sugerem que a principal influência do estrogênio e de seus análogos sobre a remodelação óssea seria mediante o controle da síntese de citocinas pelos osteoblastos e osteoclastos, de forma autócrina ou parácrina (PACIFICI, 1991).

O mais importante efeito do estrogênio sobre a remodelação óssea, em seres humanos adultos, é mais bem representado pela diminuição da reabsorção comparativamente à formação. Apesar da existência de receptor de estrogênio em osteoclastos, é provável que a ligação do estrogênio ao osteoblasto regule indiretamente a função osteoclástica. Possivelmente, a ligação das citocinas aos osteoblastos acarreta a liberação de fatores solúveis capazes de modular o recrutamento e a atividade dos osteoclastos (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994). Entre as citocinas com propriedades de reabsorção, moduladas pelo

estrogênio, que merecem atenção especial, realçam as IL-1. Estas apresentam potente poder de reabsorção (HOROWITZ, 1993).

Sabe-se que fortes indutores da reabsorção, tais como a IL-1 e o TNF, são secretados, em grande quantidade, por monócitos do sangue periférico, em mulheres ooforectomizadas na pré-menopausa, com baixos níveis de estrogênio, comparativamente a outro grupo de não-ooforectomizadas, na mesma faixa etária. A concentração desses fatores de crescimento se inverte com a estrogenoterapia (PACIFICI, 1991). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a IL-1, por sua vez, agem sobre os osteoblastos para induzir a produção e a secreção de fator estimulante da colônia de macrófagos (GM-CSF) e de IL-6, os quais aumentam a população de macrófagos, bem como sua diferenciação (MANOLAGAS, 1995). Outro possível mecanismo intermediário da ação estrogênica faz-se pela intervenção da interleucina-4 (IL-4), que inibe a diferenciação dos osteoclastos (MANOLAGAS, 1995). O maior candidato para a atividade do estrogênio é o fator de crescimento beta. É produzido por muitas células, inclusive os osteoblastos. Na maior parte dos sistemas biológicos, seus efeitos são inibitórios na proliferação celular, mas, para os osteoblastos, constitui potente agente mitótico e, sobre os osteoclastos, diminui o recrutamento e a atividade reabsortiva (MUNDY, 1995).

Sabe-se também que várias substâncias químicas atuam como moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs) em diversos tecidos, com perfil agonista e antagonista; Eles constituem alternativas para a estrogenoterapia em pacientes com câncer, por apresentarem ação antagonista sobre a mama e o útero. Estas drogas, todavia, seriam agonistas sobre o metabolismo ósseo (COSMAN, 1996), pois desempenham efeitos diretos sobre a proliferação osteoblástica e a síntese de enzimas e proteínas da matriz osteóide. Tanto o estrogênio quanto o tamoxifeno interagem com o domínio de ligação do receptor nuclear. Há duas regiões distintas de transativação: a região de transativação 1 (TAF1), localizada na porção aminoterminal, e a região de transativação 2 (TAF2), confinada na parte carboxiterminal. Experimentos em células *Hela* e em fibroblastos de embrião de galinha sugerem que as atividades das regiões TAF1 e TAF2 são mediadas da forma célula-promotor transcricional específicos (TZUKERMAN, 1994). O estrogênio

promove a transcrição gênica ativando essas duas funções (TAF1 e TAF2). Sabe-se que a ativação do receptor é causada por uma mudança conformacional induzida pelo estrogênio, que permite a ligação das duas funções de transcrição a uma série de outros fatores intermediários do processo transcricional. Quando o tamoxifeno se liga ao receptor de estrogênio, ativa a TAF1 e inibe a TAF2. Dessa forma, pode ser antagonista estrogênico em células, cuja região TAF2 seja o principal ativador de transcrição gênica, como por exemplo, na mama. Ao contrário, pode ser agonista estrogênico em células cuja região TAF1 seja o ativador predominante do processo transcricional, como no osso (BERRY; METZGER; CHAMBON, 1990; GREEN, 1990; HOWELL, 1996). Tais resultados, conjuntamente, corroboraram o papel da região promotora do RE na expressão dos vários genes controlados pelo estrogênio.

#### **2.1.2.2 Polimorfismos do gene do receptor de estrogênio alfa (RE $\alpha$ )**

Devido ao grande avanço que vem ocorrendo nas técnicas diagnósticas e estratégias efetivas para a prevenção e o tratamento da osteoporose, houve um aumento abrupto do interesse público, médico e da indústria farmacêutica nessa área, na última década. Estes novos métodos de estudo da biologia celular e molecular do tecido ósseo têm contribuído para melhor compreensão do desenvolvimento do esqueleto, bem como de suas diversificadas funções. Têm proporcionado, também, importantes avanços para o conhecimento da fisiologia normal do tecido ósseo, levando a novas possibilidades de intervenção farmacológica mais adequada nas doenças ósseas (CASTRO, 2000).

Dentre os estudos, a genética da osteoporose representa uma das ativas áreas de pesquisa na biologia óssea. Especificamente os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) PvuII (detecta a substituição C→T - rs2234693 - na posição -397 anterior ao éxon 2) e XbaI (detecta a substituição G→A - rs9340799 - na posição -351 anterior

ao éxon 2) localizados no íntron 1 do gene do *REα*, (Figura 7) localizado no cromossomo 6q25-27 (SZEJNFELD, 2000) por despertarem curiosidade e pela possível ligação com as doenças associadas ao envelhecimento da mulher (Van MEURS, 2003). Isto se deve ao fato que estes elementos se localizam em regiões não codificantes, mas que podem interferir na modulação da transcrição desse gene, pois o primeiro íntron do gene contém, usualmente, um largo número de seqüências regulatórias (JAKIMIUK, 2007). Essa regulação, então, pode aumentar ou diminuir o risco de doenças de grande impacto como a osteoporose.

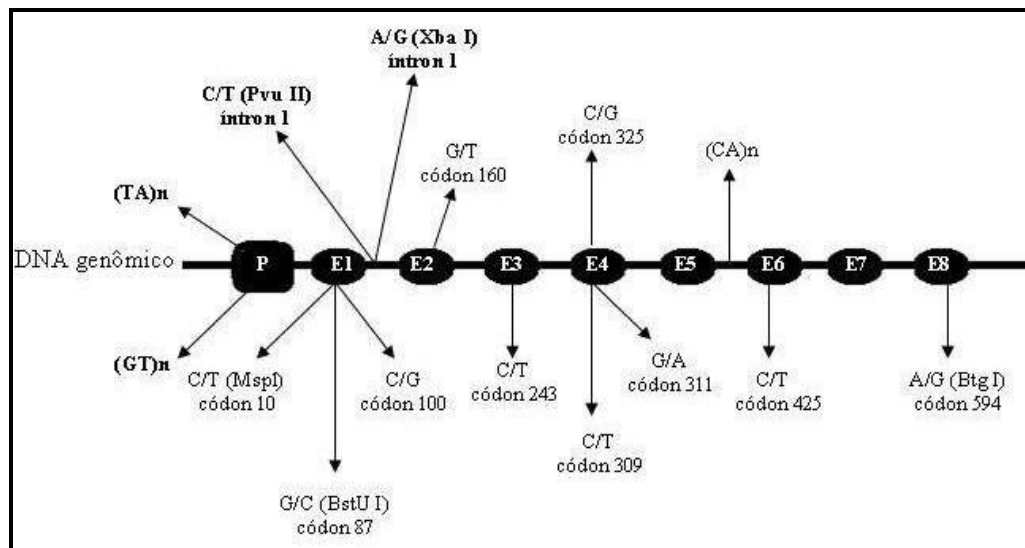


Figura 7 - Alguns polimorfismos descritos do gene do ESR1 humano.

Fonte: LBCE (arquivo interno).

A ausência do sítio de restrição da enzima PvuII é representada pelo alelo **P** (alelo ancestral), enquanto que a ausência do sítio de restrição da enzima XbaI é representada pelo alelo **X** (alelo variante). A presença do sítio de restrição da enzima PvuII é representada pelo alelo **p** (alelo variante), enquanto que a presença do sítio de restrição da enzima XbaI é representada pelo alelo **x** (alelo ancestral).

Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) PvuII e XbaI do gene do *RE $\alpha$*  são estudados extensivamente com associação à DMO, mas existem resultados conflitantes. Contudo, vários dos elementos polimórficos existentes no gene do receptor de estrogênio alfa (*RE $\alpha$* ) ainda não foram analisados na osteoporose (GENNARI et al., 2005).

### **2.1.3 O PAPEL DA APOLIPOPROTEÍNA “E” (APOE) NO TECIDO ÓSSEO**

A apolipoproteína E (ApoE) foi primeiramente descrita por SHORE e SHORE em 1973 como uma parte da partícula de VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) sintetizadas principalmente no fígado (BLUE et al., 1983) e em macrófagos (MAZZONE, 1996) e que atuam no transporte de triglicérides do fígado para os tecidos periféricos. A ApoE possui um papel importante também na distribuição e no metabolismo de colesterol e triglicérides entre muitos organismos e tipos celulares no corpo humano (MAHLEY et al., 2006).

No contexto da patogênese no tecido ósseo, alguns estudos sugerem que o polimorfismo no gene está relacionado à osteoporose pós-menopausa e ao aumento do risco de fraturas de punho, vértebras, cabeça do fêmur e quadril, e baixa DMO em diferentes estudos (PLUIJIN et al., 2002; LONG et al., 2004; SCHOFFS et al., 2004; SALAMONE et al., 2000; SHIRAKI et al., 1997; CAULEY et al., 1999; KOHLMEIER et al., 1998; JOHNSTON, 1999).

### 2.1.3.1 Estrutura e mecanismo de ação da Apolipoproteína “E” (ApoE)

A ApoE é uma proteína com peso molecular de 34 kDa composta de 299 aminoácidos (UTERMANN et al., 1979). Também se integra a uma subclasse de lipoproteínas de alta densidade (HDL) que atua no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. A apoE possui um papel chave no metabolismo desses lipídios e lipoproteínas (TAVINTHARAN et al., 2007) mantendo a integridade estrutural das mesmas, bem como a mediação do transporte lipídico através da interação com receptores lipoproteicos (CHAN, 2006).

Baseado em dados de cristalografia de raios X, a ApoE apresenta-se em duas bandas circulares do tipo “ferradura” em torno de uma partícula esférica de fosfolípido. De acordo com a figura 8, o núcleo amarelado no centro representa o núcleo fosfolipídico hidrofóbico contendo cadeias de ácido graxo; o círculo externo (rosado) representa grupos das cabeças polares do fosfolípido e a direita observa-se o corte de uma região da partícula mostrando a relação das duas hélices da ApoE. Há interação com as cabeças polares do fosfolípido destes grupos e não com o núcleo de ácido graxo. Desta maneira, a ApoE nesta partícula possui a capacidade única de facilitar a expansão do núcleo e acomodar o conteúdo aumentado de colesterol livre seguido da atividade da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) (CURTISS, L.K., 2000).

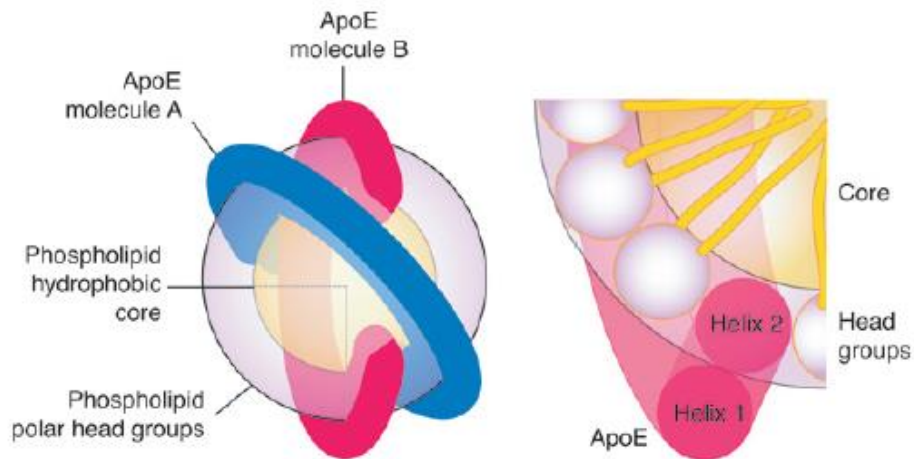


Figura 8 – Estrutura da ApoE.

Fonte: CURTISS, L.K., 2000.

O HDL atua na redistribuição de lipídios de células com excesso de colesterol (macrófagos) para células requerentes de colesterol ou para o fígado e para excreção. Na figura 11 observa-se que os precursores de HDL (pré- $\beta$  HDL) são produzidos pelo fígado e intestino. O Pré- $\beta$  HDL, HDL3 e HDL2 podem aceitar colesterol para o transporte reverso de colesterol. A ApoE permite que as partículas de HDL2 expandam pelo enriquecimento com ésteres de colesterol (CE) do núcleo após a conversão do colesterol livre para CE pela LCAT. Grandes quantidades de HDL associados com ApoE (HDL1 e HDL2) podem disponibilizar colesterol para o fígado diretamente via receptor LDL (CURTISS, L.K., 2000).



Entre os genes que apresentam maior controvérsia nos dados de correlação com baixa DMO em mulheres osteoporóticas está o gene ApoE (PLUIJM et al., 2002; ZAJICKOVA et al., 2003). As combinações de ApoE 2/2, 2/3, 2/4, 3/3, 3/4 e 4/4 são encontradas com diferentes distribuições nas populações humanas (PLUIJM et al., 2002).

Indivíduos com o alelo ApoE4 exibem uma aceleração no *clearance* hepático da vitamina K em lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Desta forma, estes indivíduos podem apresentar uma concentração muito baixa de vitamina K disponível no soro para a absorção pelas células ósseas (KOHLMEIER et al., 1996). Outros estudos relatam que os níveis de LDL em pessoas com o alelo 4 estão aumentados e a acumulação de lipídios oxidados no espaço subendotelial dos vasos localizados no osso pode levar à inibição da diferenciação dos osteoblastos (PARHAMI et al., 2000; PARHAMI et al., 1997).

### **2.1.3.2 Polimorfismos do gene da Apolipoproteína “E” (ApoE)**

A organização genômica da ApoE é similar aos genes das famílias da ApoA (apolipoproteína A) e da ApoC (apolipoproteína C), sugerindo que estes genes advêm de um ancestral comum através de duplicação gênica (HAGBERG et al., 2000). O polimorfismo da ApoE apresentado nos humanos é único e tem sido proposto como resultado de mudanças adaptativas frente à evolução (FINCH, 1999).

O gene da apolipoproteína E (ApoE) humano está localizado dentro do loco RELB no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2) (OLAISEN et al., 1982; DAS et al., 1985; PAIK et al., 1985) possuindo 4 éxons (HAGBERG et al., 2000) distribuídos ao longo de 6740 nucleotídeos no genoma humano. Retirando-se os *íntrons* sobram apenas 1156 pares de bases que compõem o *mRNA* que será transcrito,

responsável pela tradução de 3 isoformas da proteína (OJOPI et al., 2004). Em humanos existem três alelos principais do gene ApoE, chamados de  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ . As isoformas proteicas produzidas por esses alelos diferem na composição de aminoácidos nas posições 112 e/ou 158 e, deste modo, tem-se  $\epsilon 2$  (ApoE2: Cys 112, Cys 158),  $\epsilon 3$  (ApoE3: Cys 112, Arg 158), a qual é a forma mais comum, e  $\epsilon 4$  (ApoE4: Arg 112, Arg 158) (Figura 10).

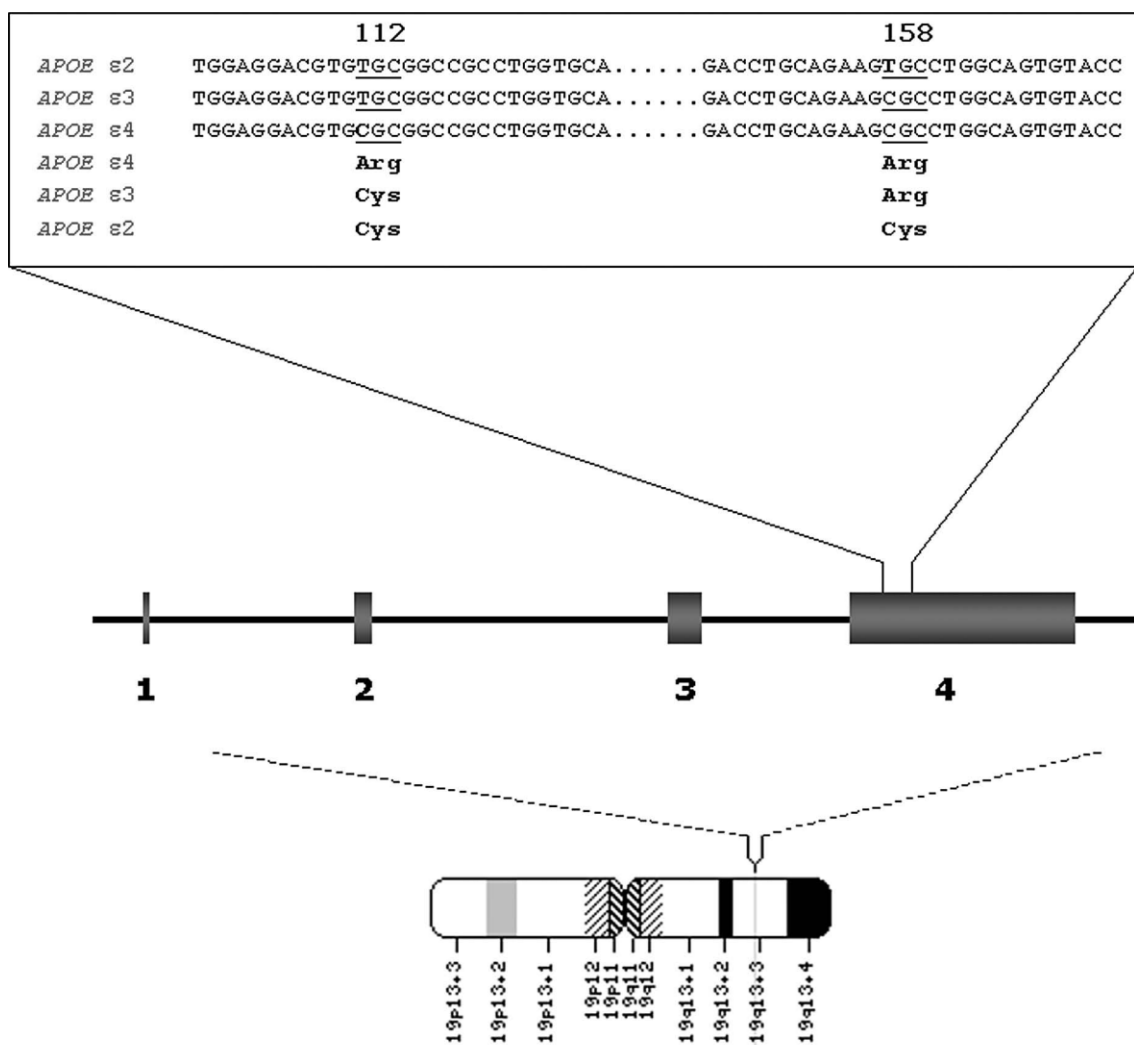


Figura 10 – O gene da ApoE.

Fonte: OJOPI, E.P., 2004.

A substituição destes aminoácidos afeta a estrutura tridimensional da ApoE e a propriedade de ligação à lipídios entre as isoformas. Na ApoE4, a substituição do aminoácido resulta em uma mudança estrutural com a formação de pontes salinas entre a arginina na posição 61 e o ácido glutâmico na posição 255, o que causa a esta isoforma uma preferência maior à VLDL. ApoE3 e ApoE2 ligam-se preferencialmente a lipoproteínas de alta densidade (HDL) (MAHLEY et al., 2006).

O domínio de interação da ApoE4 pode ser desfeito por pequenas moléculas (representadas pelos símbolos em amarelo na figura 11).

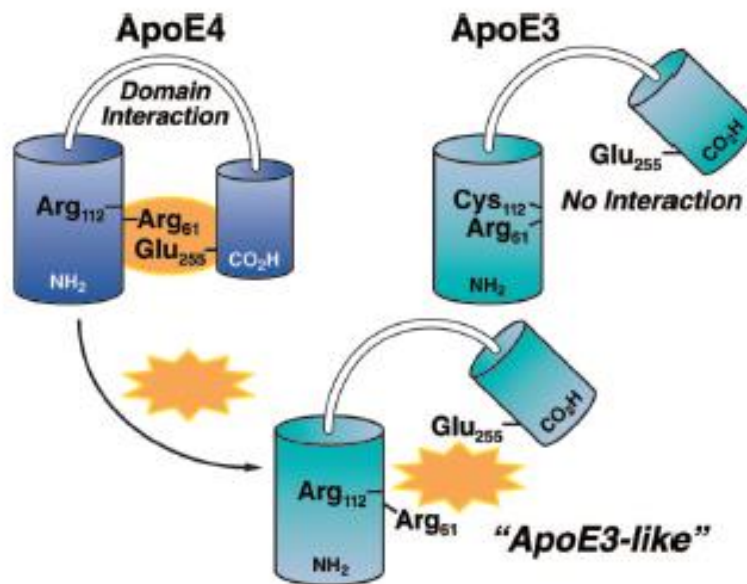


Figura 11 – O domínio de interação da ApoE4.

Fonte: CURTISS, L.K., 2000

Na ApoE4, a Arg-61 no domínio N-terminal interage com a Glu-255 no domínio C-terminal. Pequenas moléculas que são pré-indicadas por interagir com ApoE4 na região da Arg-61 podem romper o domínio de interação e converter ApoE4 em uma molécula ApoE3-like (MAHLEY et al., 2006).

### 3 OBJETIVO GERAL

Em face ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi investigar o papel de alguns polimorfismos presentes no gene receptor de estrogênio alfa - RE $\alpha$  (Pvu II e Xba I) e do gene da Apolipoproteína E – APOE (Hha I) em mulheres na pós-menopausa com suas densidades minerais ósseas de perfis normais e osteoporóticas, estabelecendo relações entre estas alterações gênicas e seus parâmetros clínicos e bioquímicos com a osteoporose.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de fornecer subsídios para a melhor determinação prognóstica da enfermidade, além de racionalização da conduta terapêutica a ser escolhida e poder proporcionar uma melhor qualidade de vida de pacientes já na pós-menopausa, foram delineados os objetivos específicos:

- 1 Verificar se a expressão dos genes é diferente entre mulheres com Densidade Mineral Óssea (DMO) normal daquelas com DMO alterada;

- 2 Verificar se há correlação entre a expressão dos genes com os parâmetros clínicos e bioquímicos/imunoenzimáticos das mulheres com DMO normal e aquelas com DMO alterada.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 APROVAÇÃO DO PROJETO**

O Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento (LBCE), localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em parceria com o Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES - Vitória, ES) (ANEXO I) e o Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento (ITPD - Vila Velha, ES) (ANEXO II), solicitaram a aprovação do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), que avaliou e aprovou o referido estudo no dia 28 de março de 2007 (ANEXO III) assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO IV) e a Anamnese Clínica (ANEXO V) aplicados neste trabalho.

### **4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

O Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento (LBCE), o Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES) e o Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento (ITPD), convidaram 600 mulheres, com idade igual ou superior a 50 anos e já na pós-menopausa a participarem da pesquisa. Após a Leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), 547 mulheres concordaram em participar do referido trabalho.

Após a assinatura do TCLE, cada paciente passou por uma anamnese clínica para conhecermos o histórico de fraturas, idade, peso, dentre outros. Posteriormente, cada paciente foi encaminhada a uma sala de coleta, para realização de coleta sanguínea (7 mL de amostra colhida em tubo à vácuo contendo heparina sódica), a fim de extrair seu material genético, e fazer ensaios sorológicos e imunoenzimáticos no LBCE (Figura 12).



Figura 12 – Coleta sanguínea.

Fonte: CEDOES – arquivo interno.

Todas as pacientes também foram submetidas ao exame de absorciometria por dupla emissão de raios X (*Dual-energy X-ray Absorptiometry - DXA*) em uma sala específica de exames do CEDOES (Figura 13) para averiguação de suas densidades minerais ósseas que, por sua vez, eram classificadas de acordo com os critérios densitométricos da Organização Mundial da Saúde.



Figura 13 - Aparelho de densitometria óssea localizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES).

Fonte: CEDOES – arquivo interno.

Das amostras sanguíneas colhidas, 2 mL foram divididos em 2 mini tubos de polipropileno e congelados em um freezer  $-80^{\circ}$  para posterior extração. Os 5 mL restantes foram centrifugados e a parte sorológica foi retirada e armazenada também em mini tubos de polipropileno e congelados em freezer  $-80^{\circ}$  para análises sorológicas e imunoenzimáticas posteriores.

### 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Foi utilizado somente 1 mL de sangue periférico colhido de cada paciente em tubos a vácuo contendo heparina sódica para extração de DNA e para tal, foi utilizado o Protocolo de GOELZ, et al., 1985 com modificações, de acordo com as seguintes etapas: Centrifugação do tubo por 5 minutos a 4800 G a  $4^{\circ}\text{C}$ , descarte do

sobrenadante e adição 1mL de TM gelado, homogeneizando. Nova centrifugação do tubo por 5 minutos a 4800 G a 4°C e descarte do sobrenadante. Adição de 1mL de TM gelado novamente, homogeneizando em seguida de centrifugação do tubo por 5 minutos a 4800 G a 4°C. Novo descarte do sobrenadante. Ressuspensão do precipitado em 405µl de TE9, homogeneizando. Adição de 45µl de SDS - proteinase K, homogeneização leve e incubação em banho-maria a 48°C por 2 horas. Adição de 450µl de PC9 e homogeneização por 1 minuto. Centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. Transferência do sobrenadante aquoso para um novo tubo e a um volume prévio de 400µl, adição de 100µl de 10M NH<sub>4</sub>OH. Precipitação do DNA com 1mL de etanol 100% gelado. Centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Descarte de todo o líquido e lavagem com etanol 70%. Centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos e, novamente, descarte de todo o líquido. Secagem dos tubos por 15 minutos e ressuspensão do DNA em 100µl de água livre de DNA, RNA e DNase. Incubação em banho-maria a 37°C por 15 minutos para eluir o DNA e armazenamento a -20°C.

Os DNAs obtidos foram visualizados em gel de agarose 1% depois de percorrerem 40 minutos em uma cuba de eletroforese horizontal a 120 volts para estimar a qualidade e quantidade de DNA.

#### **4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)**

##### **4.4.1 RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (RE $\alpha$ )**

Os *primers* da região do íntron 1 do RE $\alpha$  contendo os SNPs PvuII e XbaI foram feitos com o auxílio do programa BIOEDIT™ (versão 7.0.9.0) e do serviço BLAST do

site do *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)) de acordo com a Tabela 2.

---

Tabela 2 - *Primers* da região do íntron 1 do *REα* contendo os SNPs PvuII e XbaI utilizados neste estudo.

---

Foward	5`CTGTGTTGTCCATCAGTTCATC3`
Reverse	5`CCATTAGAGACCAATGCTCATC3`

---

Fonte: LBCE.

Com a utilização de um termociclador (Techne, Brasil) foram amplificados fragmentos de 119pb pela técnica de PCR de acordo com o ciclo: Primeiros 10 minutos a 95°C; seguidos por 30 ciclos de: 95° C por 60 segundos, 52° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, respectivamente; e por fim 5 minutos a 72° C.

Para cada reação de PCR foram utilizados tampão 1X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen), 0,4 μM de cada *primer*, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 50 ng de DNA. Os produtos de PCR amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 10% depois de percorridos 40 minutos a 120 volts em uma cuba de eletroforese vertical (BIO-RAD, EUA) e os tamanhos estimados com marcador de peso molecular de 50pb (Ludwing, Brasil). Em todas as reações de amplificação havia um controle negativo para assegurar a não contaminação de reagentes.

Para utilização da técnica de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) foram utilizadas duas enzimas de restrições PvuII e XbaI

amplamente utilizadas em estudos de polimorfismos do gene do receptor de estrogênio alfa ( $RE\alpha$ ).

As “digestões” foram feitas seguindo as especificações dos fabricantes e os fragmentos de restrição foram aplicados em gel de poliacrilamida 10% e na cuba de eletroforese vertical “correram” por 1 hora e trinta minutos a 120 volts. Após fixação por 6 minutos em solução de etanol a 10% e ácido acético 0,5%, corado em solução de nitrato de prata 0,1% por 10 minutos e colocado em uma solução de hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,5%, era nítido o aparecimento de fragmentos específicos (Tabela 3) que possibilitaram a interpretação dos resultados.

---

Tabela 3 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 119 pb amplificado a partir do gene do receptor de estrogênio alfa ( $RE\alpha$ ).

↓: Sítio de restrição reconhecido pelas enzimas.

---

Enzimas de restrição	Sequência dos alelos	Tamanho dos fragmentos (pb)
PvuII	5`CAGCCG3`	119
	5`CAG↓CTG3`	78 e 41
XbaI	5`TCTGGA3`	119
	5`T↓CTAGA3`	88 e 31

---

Fonte: pontos de corte descritos pelo fabricante.

#### 4.4.2 APOLIPOPROTEÍNA E (APOE)

Os *primers* utilizados foram (5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3') e (5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3') descrito por EMI et al., em 1988 – modificado com o auxílio do programa BIOEDIT™ (versão 7.0.9.0) e do serviço BLAST do site do *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)).

As amostras de DNA total foram amplificadas em termociclador (Techne, Brasil) pela técnica de PCR gerando fragmentos de 186 pb. Os ciclos da reação foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; seguido por 35 ciclos de 95° C por 30 segundos; 68° C por 30 segundos; 72° C por 30 segundos, respectivamente; finalmente 7 minutos a 72° C.

Para cada reação de PCR foram utilizados tampão 1X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen), 0,4 µM de cada *primer*, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Ludwing, Brasil) e cerca de 5µL de DNA. Os produtos de PCR amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 10% depois de percorridos 40 minutos a 120 volts em uma cuba de eletroforese vertical (BIO-RAD, EUA) e os tamanhos estimados com marcador de peso molecular de 50pb (Ludwing, Brasil). Em todas as reações de amplificação havia um controle negativo para assegurar a não contaminação de reagentes.

Para utilização da técnica de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) foi utilizada a enzima de restrição *HhaI* (Invitrogen) amplamente utilizada em estudos de polimorfismos do gene da ApoE.

As “digestões” foram feitas seguindo as especificações dos fabricantes e utilizando-se 20µL de produto de PCR, os fragmentos de restrição foram visualizados em gel de poliacrilamida 10%, na cuba de eletroforese vertical (BIO-RAD) onde percorreram no gel por 1 hora e trinta minutos a 120 volts. Após fixação por 6 minutos em solução de etanol a 10% e ácido acético 0,5%, corado em solução de nitrato de prata 0,1%

por 10 minutos e colocado em uma solução de hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,5%, era nítido o aparecimento de fragmentos específicos que possibilitaram a interpretação dos resultados sendo que os tamanhos dos fragmentos foram estimados utilizando marcadores de peso molecular de 25pb (Ludwing, Brasil) (Tabela 4).

---

Tabela 4 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 186 pb amplificado a partir do gene da Apolipoproteína E (ApoE)

---

Enzima de restrição	Sequência dos genótipos	Tamanho dos fragmentos (pb)
HhaI	E2E2	91, 70, 18 e 7
	E2E3	91, 70, 48, 22, 18 e 7
	E2E4	91, 72, 70, 48, 22, 19, 18 e 7
	E3E3	91, 48, 22, 18 e 7
	E3E4	91, 72, 48, 22, 19, 18 e 7
	E4E4	72, 48, 22, 19, 18 e 7

---

Fonte: pontos de corte descritos pelo fabricante.

#### 4.5 ANÁLISE SOROLÓGICA E IMUNOENZIMÁTICA DAS AMOSTRAS

A análise da atividade da fosfatase alcalina (FA) foi determinada espectrofotometricamente através de reação padrão (Bioclin, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. As concentrações de cálcio, fósforo e creatinina foram determinados colorimetricamente com kits da Bioclin Brasil, seguindo o protocolo do fabricante. Todo o lipidograma foi mensurado pelo Instituto Tommasi de Pesquisa e

Desenvolvimento através do Laboratório Tommasi. Já a análise do telepeptídeo c-terminal de colágeno tipo I (CTx) e de osteocalcina no soro dos dois diferentes grupos experimentais foram determinadas por teste de ELISA (Metra Bioscience, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste estatístico utilizado para este estudo foi o teste *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) de tendência para avaliar a relação existente entre a formação e reabsorção óssea com os genótipos encontrados no estudo. Para a análise da presença de osteoporose segundo os alelos foi realizado o teste exato de Fisher, assim como a Regressão linear para verificar o coeficiente de determinação, teste de estatística F, ANOVA e Post-hoc de Bonferroni. A significância utilizada para esses testes foi de 5%. O risco associado com os genótipos encontrados foi calculado através do teste *Odds Ratio* (OR) com 95% de intervalo de confiança (CI). O programa utilizado para os cálculos estatísticos foi o *GraphPad Prima 5* para Windows (versão 5.00.288) e Bioestat (5.0). A população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÕES DA AMOSTRA

As pacientes que concordaram em participar do estudo apresentam mediana da idade de  $66 \pm 1,02$  anos. Quando separadas em normais ( $DMO = 0,808 \pm 0,016$  g/cm<sup>3</sup>) ou osteoporóticas ( $DMO = 0,645 \pm 0,014$  g/cm<sup>3</sup>,  $P < 0,05$ ) encontrou-se uma mediana de idade de  $62,39 \pm 0,71$  anos para as normais e  $68,02 \pm 0,90$  anos para as osteoporóticas. A ocorrência de fraturas foi observada em 31,7% das mulheres osteoporóticas e em 18,3% das mulheres normais. Como descrito na tabela 5, o uso de Terapia Hormonal foi observado em 51,5% das pacientes normais e em 32,39% em pacientes osteoporóticas. Vale ressaltar que a Terapia Hormonal utilizada pelas pacientes foi administrada antes da menopausa ou em até 5 anos antes do início deste estudo.

---

Tabela 5 - Características amostrais das pacientes analisadas no estudo.

\*Dados expressos em mediana e desvio padrão.

---

	Normal	Osteoporótica
Idade (anos) *	$62,39 \pm 0,71$	$68,02 \pm 0,90$
Uso de Terapia Hormonal (TH)	51,50%	32,39%
Ocorrência de Fraturas	18,3%	31,7%

---

Fonte: LBCE, 2008.

## 5.2 EXAMES DE DXA

Os exames de DXA foram realizados em três pontos, sabidamente afetados pela perda de DMO – fêmur, espinha dorsal e rádio distal (LISCUM, 1998). Cumpre ressaltar que todos os laudos dos resultados de exames foram analisados por dois médicos especialistas em metabolismo ósseo - Dr. Sérgio Ragi Eis (*in memorium*) e Dr. Ben Hur Albergaria – do CEDOES. (Figura 14 e 15). Os resultados dos exames foram disponibilizados às pacientes para tomarem conhecimento de suas densidades minerais ósseas e para posterior orientação clínica apropriada. Vale ressaltar também que a maioria das pacientes nunca havia feito um teste de densitometria. Quando o resultado do exame acusasse osteoporose, em qualquer um dos três locais estudados (coluna, fêmur ou rádio distal), a paciente era encaminhada ao CEDOES para uma consulta de direcionamento com o Dr. Sérgio Ragi Eis.

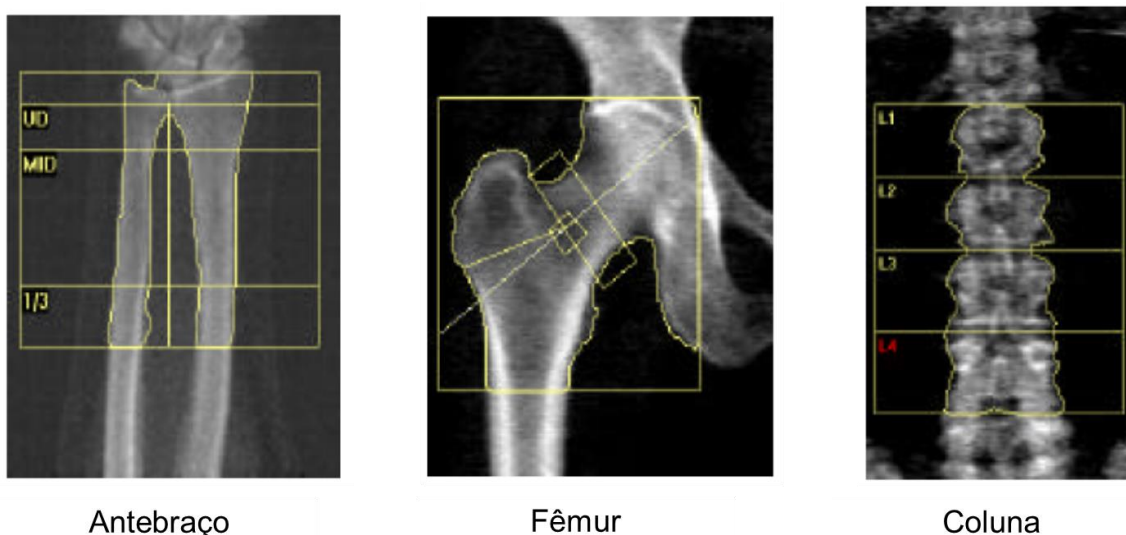


Figura 14 – Regiões analisadas em exame DXA realizada no CEDOES.

Fonte: CEDOES – arquivo interno.

**CEDOES - Diagnóstico e Pesquisa**  
 Rua João da Silva Abreu 78 - Vitória (ES) CEP 29055.450  
 www.cedoes.com.br

Telephone: (27) 21252083

E-Mail: cedoes@cedoes.com.br

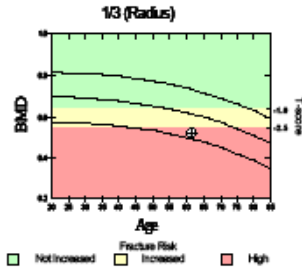
Fax: (27) 21250227

Name: CHAGAS, ALDY B	Sex: Female	Height: 162.0 cm
Patient ID: 33622	Ethnicity: White	Weight: 76.0 kg
DOB: 26 November 1945		Age: 61

Referring Physician: SERGIO RAGI EIS



Image not for diagnostic use  
228 x 91



Scan Date: 20 August 2007 - H0820071H

**DXA Results Summary:**

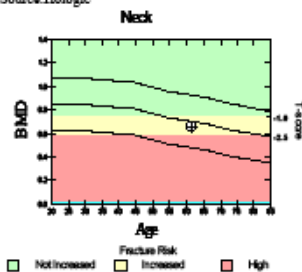
Radius	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	T-score	Z-score
1/3	0.516	-3.0	-1.6

Total BMD CV 1.0%

T-score vs. White Female; Z-score vs. White Female.  
Source:Hologic



Image not for diagnostic use  
106 x 105  
NECK: 47 x 15



Scan Date: 20 August 2007 - H0820071G

Region	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	T-score	Z-score
Neck	0.654	-1.8	-0.4
Total	0.786	-1.3	-0.2

Total BMD CV 1.0%

WHO Classification: Osteopenia  
Fracture Risk: Increased

T-score vs. White Female; Z-score vs. White Female.  
Source:NHANES

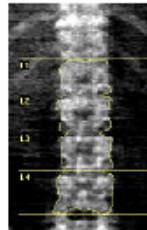
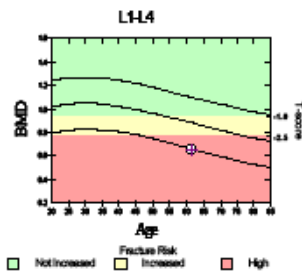


Image not for diagnostic use  
116 x 138



Scan Date: 20 August 2007 - H0820071F

Region	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	T-score	Z-score
L1-L4	0.650	-3.6	-2.1

Total BMD CV 1.0%

WHO Classification: Osteoporosis  
Fracture Risk: High

T-score vs. White Female; Z-score vs. White Female.  
Source:Hologic



Figura 15 – Resultado de exame DXA realizada no CEDOES.

Fonte: CEDOES – arquivo interno (2008).

De posse dos resultados de DMO, as pacientes foram divididas em dois grupos: normais e osteoporóticas. Em se tratando de diferenças significativas nas idades das duas populações procedemos com a regressão linear das DMO's em toda a população (Gráfico 1). Foi verificado que na idade de 68 anos a maior parte da população ainda apresenta DMOs de cerca de  $0,700 \text{ g/cm}^3$ , um ponto médio entre os valores de DMO das pacientes normais e osteoporóticas, o que torna possível nossas comparações.

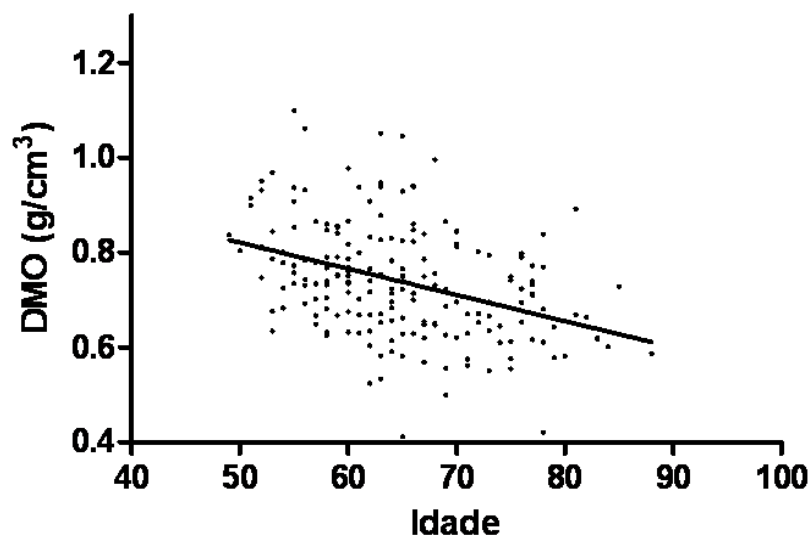


Gráfico 1 - Regressão linear das Densidades Minerais Ósseas (DMO's) de todas as pacientes envolvidas no estudo.

Fonte: LBCE (2012).

Ao analisarmos a idade das pacientes em relação à DMO em cada sítio estudado, encontramos uma relação negativa da idade sobre a DMO em todos os quatro sítios, no qual diminui à medida que a paciente se encontra numa idade mais avançada. O teste do Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) ajustado indica o quanto a variação da idade influencia na DMO, 19,3% da variação da DMO no rádio pode ser explicada pela idade, no colo do fêmur 14,78%, no fêmur 17,7% e na coluna 3% como verificado nos gráficos 2, 3, 4 e 5.

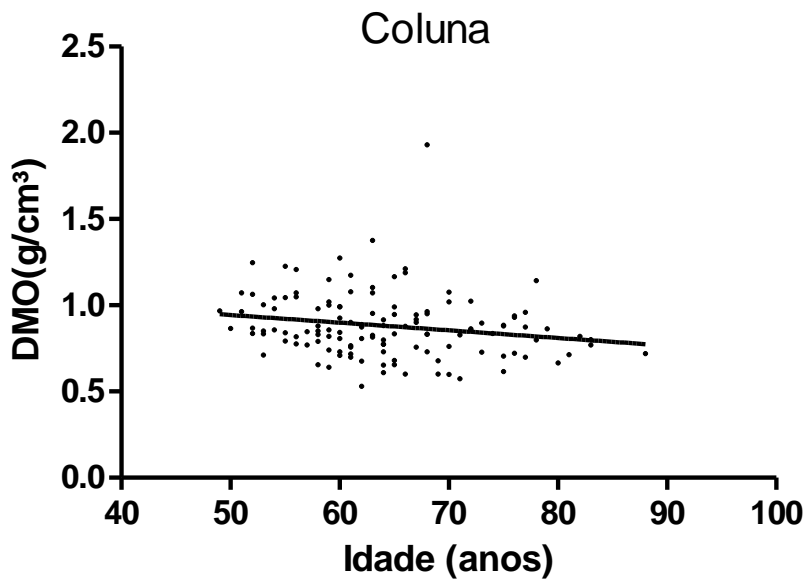


Gráfico 2 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) da coluna de todas as pacientes envolvidas no estudo. Teste estatístico F valor de  $p=0.0275$  e Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) ajustado (0,03)

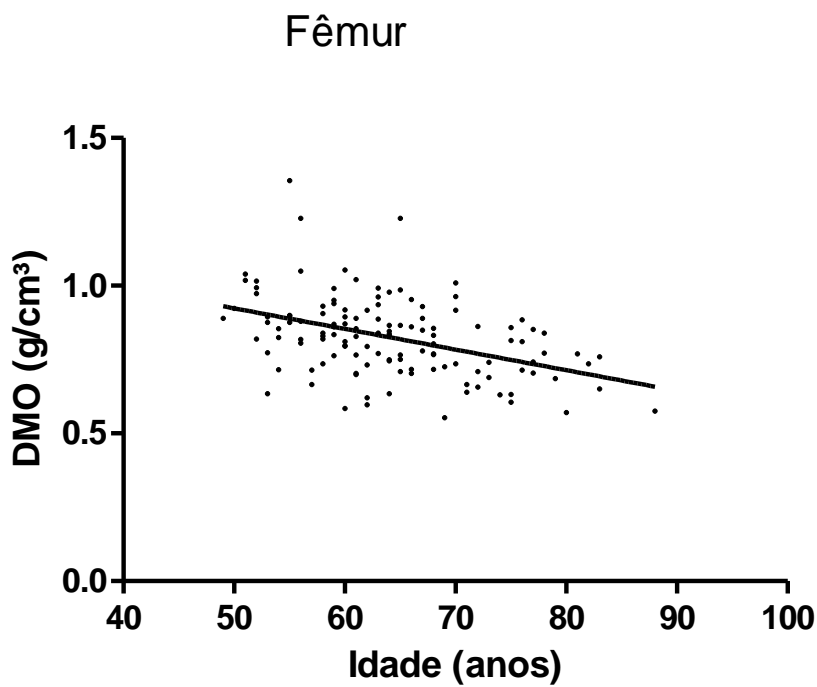


Gráfico 3 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do fêmur de todas as pacientes envolvidas no estudo. Teste estatístico F valor de  $p < 0.0001$  e Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) ajustado (0,177).

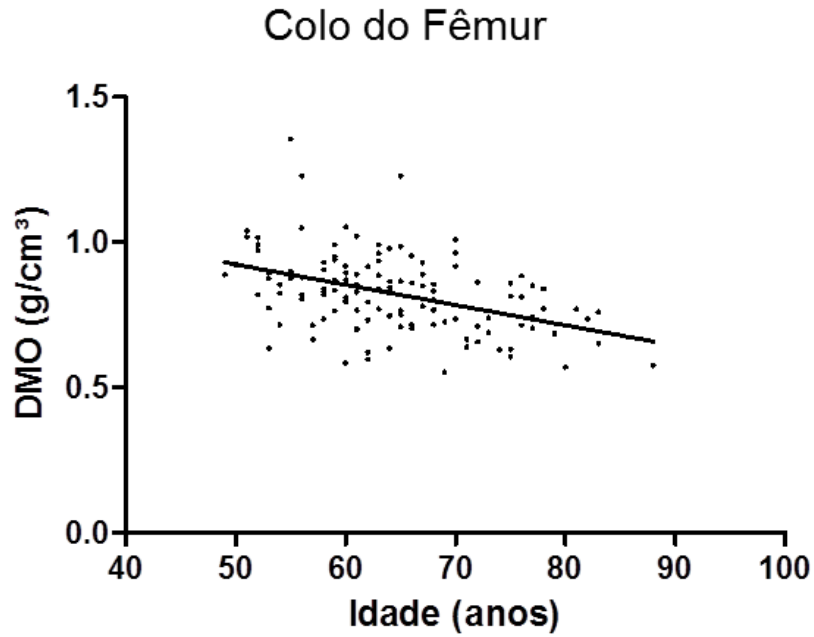


Gráfico 4 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do colo do fêmur de todas as pacientes envolvidas no estudo. Teste estatístico F valor de  $p < 0.0001$  e Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) ajustado (0,1478).

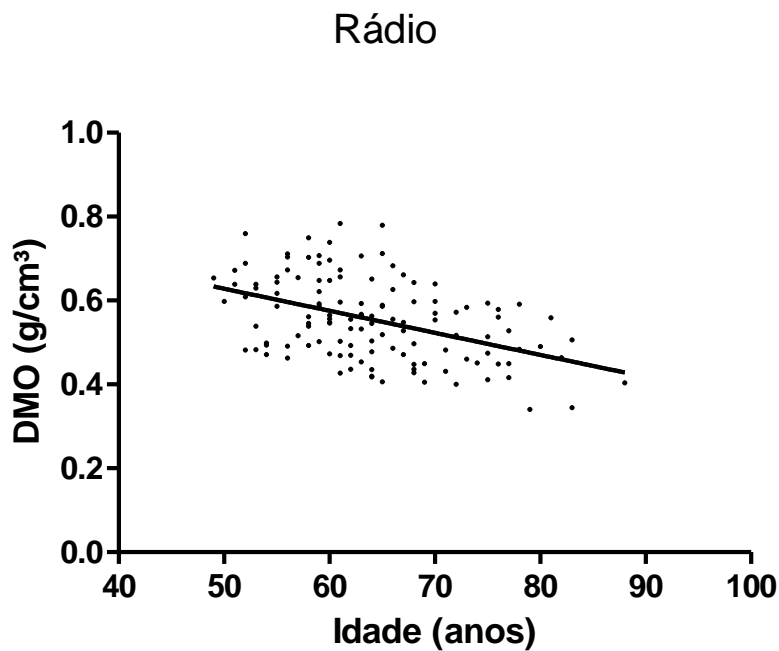


Gráfico 5 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do rádio de todas as pacientes envolvidas no estudo. Teste estatístico F valor de  $p < 0.0001$  e Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) ajustado (0,1932).

Registrou-se 25% de redução da DMO nos raios; 28% de redução da DMO na espinha dorsal; 26% de redução da DMO na cabeça do fêmur das pacientes osteoporóticas quando comparadas as normais (medidas individuais de cada sítio,  $p < 0,001$ ). Observou-se também que há um decréscimo de cerca 24% na DMO com o aumento da idade das pacientes de 48 a 98 anos. Portanto, pode-se afirmar que a amostra se trata de mulheres menopausadas, osteoporóticas ou não e sem nenhuma intervenção terapêutica até o momento da pesquisa.

### **5.3 EXTRAÇÃO DE DNA**

As extrações de DNA a partir de sangue periférico das pacientes foram realizadas com sucesso em todas as amostras utilizando o protocolo anteriormente descrito. A integridade do material genômico foi corrida em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado por equipamento de emissão de luz ultravioleta. (Figura 16).

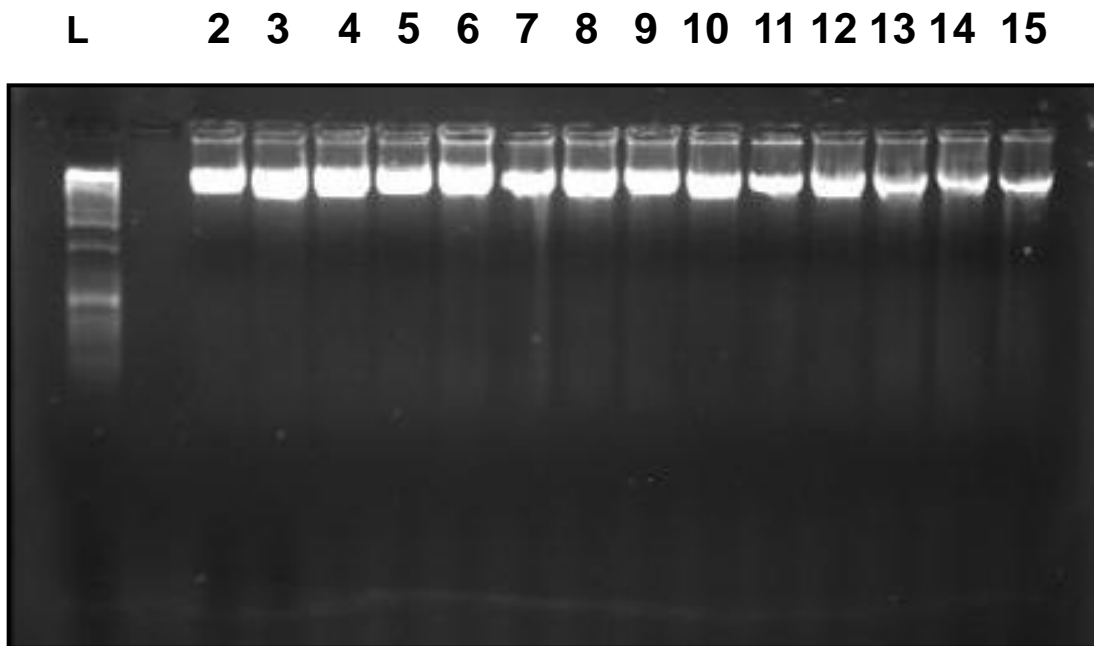


Figura 16 - Extração de material genômico (DNA): integridade e qualidade do DNA obtido em gel de agarose 1%. L - Padrão de peso molecular 1Kb. 2 a 15 - Amostras de DNA em gel de agarose 1% coradas com brometo de etídeo.

Fonte: LBCE.

#### **5.4 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)**

##### **5.4.1 GENE DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (RE $\alpha$ )**

As amplificações do fragmento de 119 pb foram feitas a partir de 0,5  $\mu$ L do DNA extraído das pacientes e puderam ser visualizados em gel de poliácridamida 10% e corados com nitrato de prata 1% (Figura 17). Após as amplificações, 2,5  $\mu$ L do volume total do produto de PCR foram “digeridos” por duas enzimas de restrição -

PvuII (Figura 18) e XbaI (Figura 19) - para análise dos polimorfismos existentes e determinação dos genótipos das pacientes.

Os perfis visualizados foram: PP (C/C): homozigoto para a ausência do sítio de restrição da enzima PvuII, Pp (C/T): heterozigoto para o sítio de restrição da enzima PvuII, pp (T/T): homozigoto para a presença o sítio de restrição da enzima PvuII, XX (G/G): homozigoto para a ausência do sítio de restrição da enzima XbaI, Xx (G/A): heterozigoto para o sítio de restrição da enzima XbaI. Não houve presença do perfil xx (A/A): homozigoto para a presença o sítio de restrição da enzima XbaI em nenhuma das pacientes do estudo. As “digestões” foram visualizadas em gel de poliacrilamida 10% e coradas com nitrato de prata 1%.

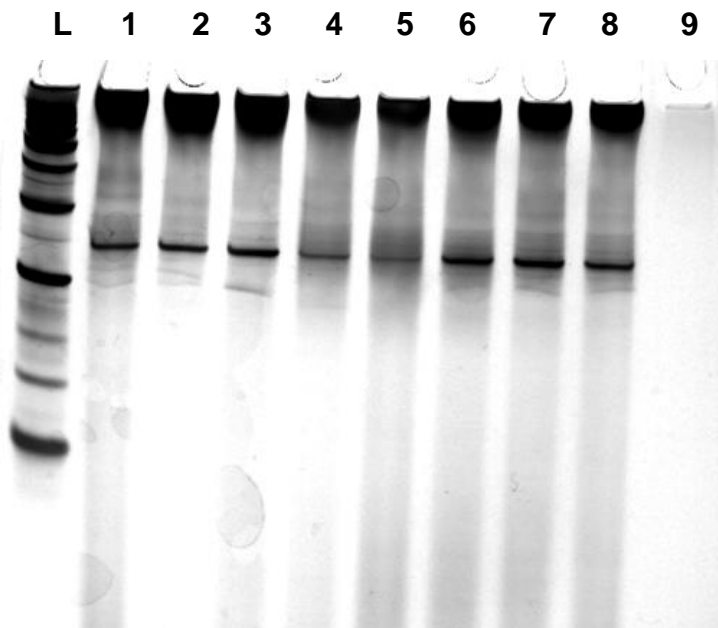


Figura 17 - Produto amplificado por PCR das amostras de DNA em gel de poliacrilamida 10%. L: Ladder de 50pb, 1-8: Produto amplificado PCR com fragmentos de 119pb e 9: Controle negativo.

Fonte: LBCE.

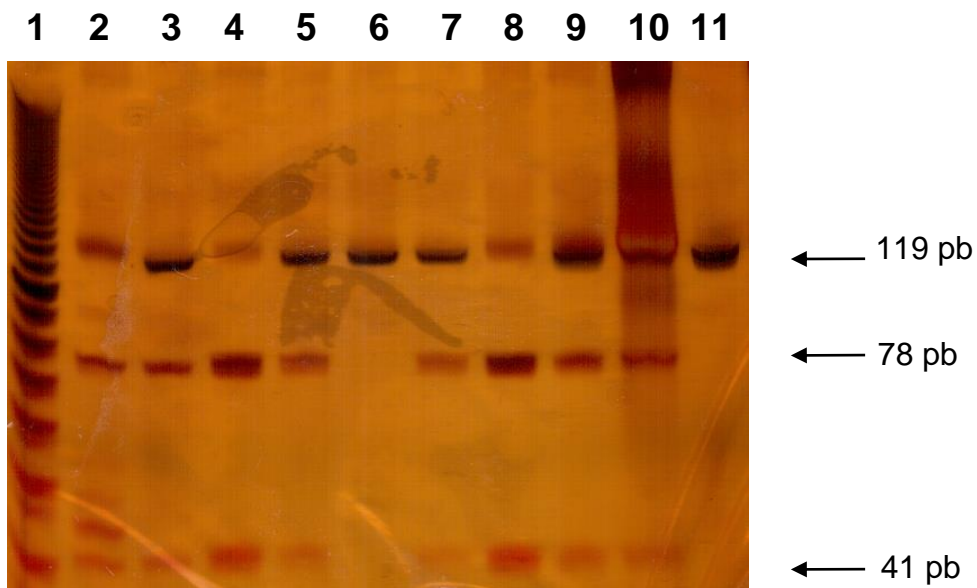


Figura 18 – Digestão por enzima de restrição PvuII. 1- Padrão de peso molecular 10 pb. 2 a 10 - Amostras de digestão pela enzima de restrição PvuII coradas por nitrato de prata 1%. 11 - Fragmento íntegro de PCR de REα.

Fonte: LBCE.

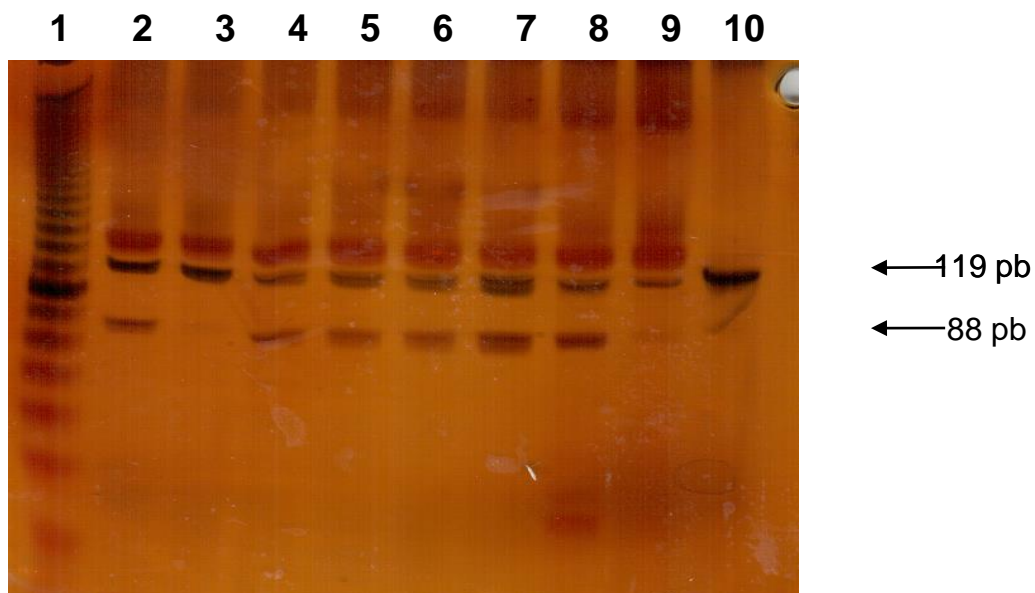


Figura 19 - Digestão por enzima de restrição XbaI. 1- Padrão de peso molecular 10 pb. 2 a 9 - Amostras de digestão pela enzima de restrição XbaI coradas por nitrato de prata 1%. 10 - Fragmento íntegro de PCR de REα.

Fonte: LBCE (2008).

Os genótipos encontrados (PP, Pp, pp, XX e Xx) apresentaram uma distribuição normal sem nenhum desvio para qualquer grupo (Tabela 6). Entretanto, o alelo P (presente em 73,0% das pacientes normais VS. 57,8% das pacientes osteoporóticas) está presente na maior parte das pacientes com DMO alta. O alelo ancestral p, todavia, está mais distribuído igualmente na mesma população (presente em 78,6% das pacientes normais VS. 75,4% das pacientes osteoporóticas).

---

Tabela 6 - Distribuição dos genótipos da população normal e osteoporótica.

\* Não foram encontrados genótipos xx na população estudada.

---

	Normal	Osteoporótica
PP	18,4%	17,6%
Pp	54,6%	40,2%
pp	24,0%	35,2%
XX	15,0%	15,3%
Xx	75,0%	64,7%
xx	----*	----*

---

Fonte: LBCE (2008).

#### 5.4.2 GENE DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE)

As amplificações do fragmento de 186 pb foram feitas a partir de 0,5 µL do DNA extraído das pacientes e puderam ser visualizados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio 10% (Figura 20).

Os perfis encontrados foram: E2E2, E3E3, E4E4, E2E3, E2E4, E3E4 como visto na (Figura 21). As “digestões” foram visualizadas em gel de poliacrilamida 10% e coradas com nitrato de prata. Após as amplificações, 2,5  $\mu$ L do volume total do produto de PCR foram “digeridos” pela enzima de restrição HhaI (Figura 22) - para análise dos polimorfismos existentes e determinação dos genótipos das pacientes. As “digestões” foram visualizadas em gel de poliacrilamida 10% e coradas com nitrato de prata 1%.

Na tabela 7 pode-se observar o perfil populacional (por genótipo) encontrados no estudo.

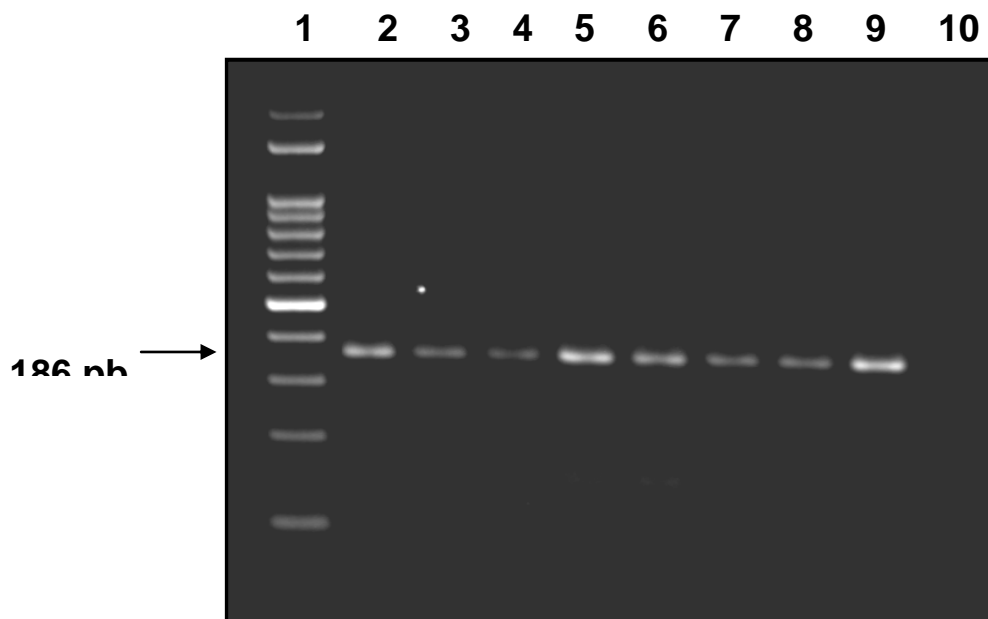


Figura 20 - Qualificação PCR APOE. 1- Padrão de peso molecular 50 pb. 2 a 9 - Amostras de DNA em gel de agarose 1% coradas com brometo de etídio.10 – Controle negativo

Fonte: LBCE.

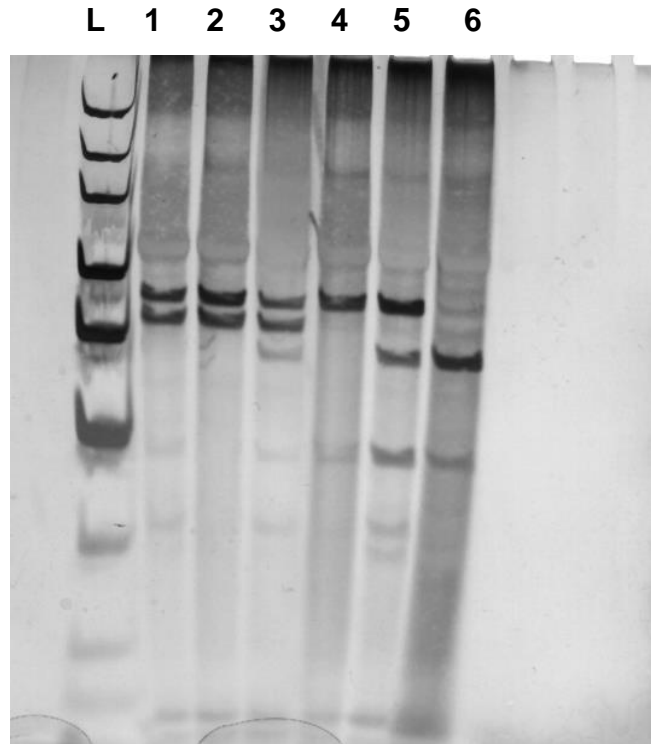


Figura 21 – Digestão por enzima de restrição HhaI. L: Padrão de peso molecular 25 pb; 1, 2, 3, 4, 5, 6: Amostras de digestão pela enzima de restrição HhaI coradas por nitrato de prata 1% (E2E2, E2E3, E2E4, E3E3, E3E4, E4E4).

Fonte: LBCE.

Tabela 7 – Perfil populacional (por genótipo do Gene da ApoE) encontrados no estudo.

\*Dados expressos em mediana e desvio padrão.

	E2E2	E2E3	E2E4	E3E3	E3E4	E4E4
<b>n (%)</b>	3,1%	13,1%	6,2%	62%	14,7%	0,7%
<b>Altura (cm)</b>	146,45±3,59	154,97±5,38	153,56±5,92	153,79±12,65	152,34±5,53	151
<b>Peso (kg)</b>	59,7±9,04	65,46±16,32	66,86±10,145	66,7±13,14	62,26±9,21	58,5
<b>Idade (anos)</b>	70,5±5,74	66,82±9,71	61,37±4,86	63,64±8,35	63,7±8,13	64

Fonte: LBCE.

## 5.5 RESULTADOS SOROLÓGICOS E IMUNOENZIMÁTICOS DE MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO

Para entender-se o metabolismo mineral, analisaram-se os elementos minerais, marcadores de formação e de reabsorção óssea, como a osteocalcina e o CTx e outros parâmetros bioquímicos. Não foi verificada nenhuma alteração significativa nos parâmetros bioquímicos séricos como cálcio, fósforo, creatinina, magnésio e outros analisados e descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Perfil sérico das pacientes normais e osteoporóticas envolvidas neste estudo. \*Dados expressos em mediana e desvio padrão.

	Normal	Osteoporótica
Cálcio (mg/dL)	9,256±0,14	9,135±0,21
Creatinina (mg/dL)	1,095±0,03	1,067±0,03
Fosfatase Alcalina (U/L)	64,37±1,96	61,15±2,12
Fósforo (mg/dL)	3,857±0,07	3,678±0,07
Magnésio (mg/dL)	2,30±0,2	2,26±0,05
Proteína C Reativa (mg/dL)	7,64±0,51	7,34±0,80
Lipídeos Totais (mg/dL)	730,46±18,05	666,51±19,00
Colesterol Total (mg/dL)	230,07±4,61	218,28±5,64
HDL Colesterol (mg/dL)	63,7±1,5	62,4±2,1
Triglicérides (mg/dL)	221,25±12,65	192,98±10,47
Fosfolipídeos (mg/dL)	274,33±5,98	262,07±6,76

Fonte: LBCE.

Ademais, não foram observadas alterações no CTx sérico entre todas as pacientes (osteoporóticas e normais) além de nenhum efeito da idade neste parâmetro (Gráficos 6 e 7).

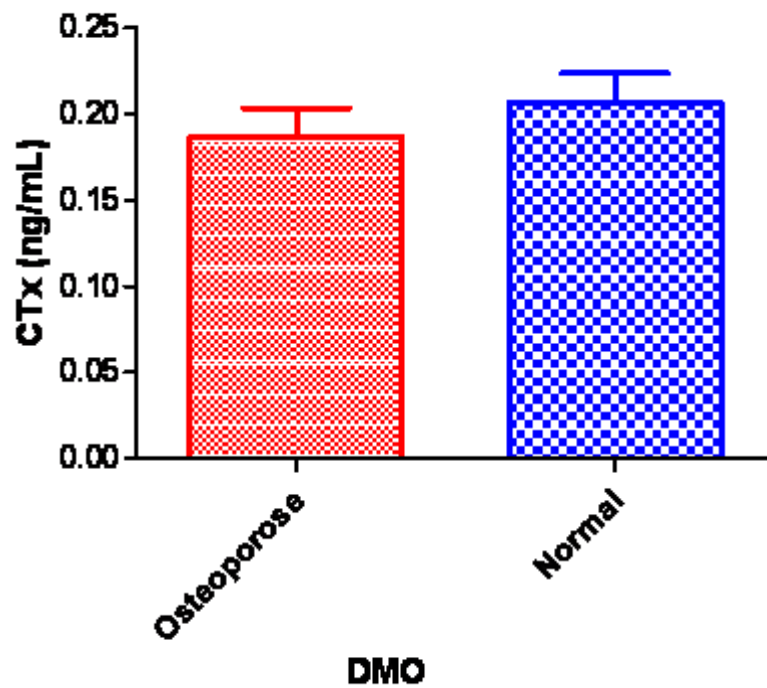


Gráfico 6 – Concentração sérica do fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) em pacientes osteoporóticas e normais. Não há diferenças significativas entre os dois grupos de pacientes.

Fonte: LBCE.

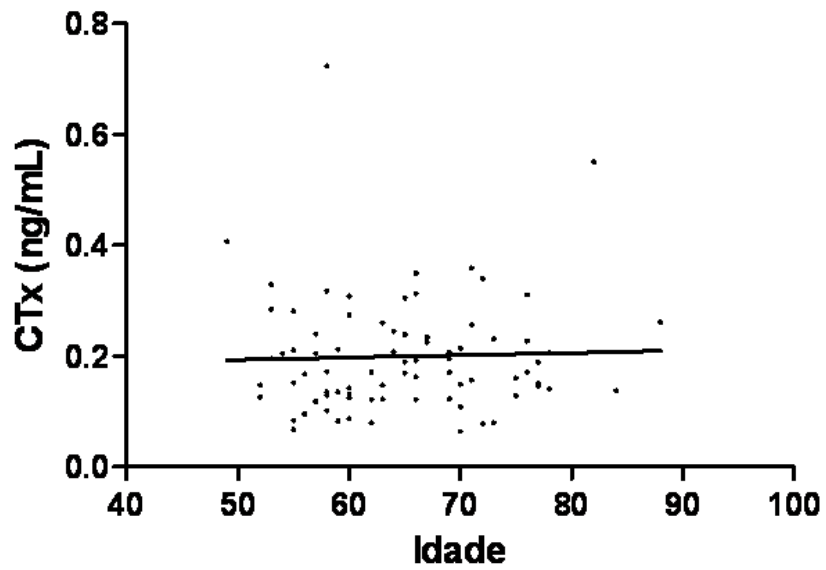


Gráfico 7 – Influência da idade na concentração sérica do fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) em pacientes osteoporóticas e normais.

Não há diferenças significativas neste parâmetro com o envelhecimento.

Fonte: LBCE.

Contudo, foi observado um aumento significativo da osteocalcina circulante nas pacientes osteoporóticas que parece, também, ser influenciado pela idade das pacientes (Gráficos 8 e 9).

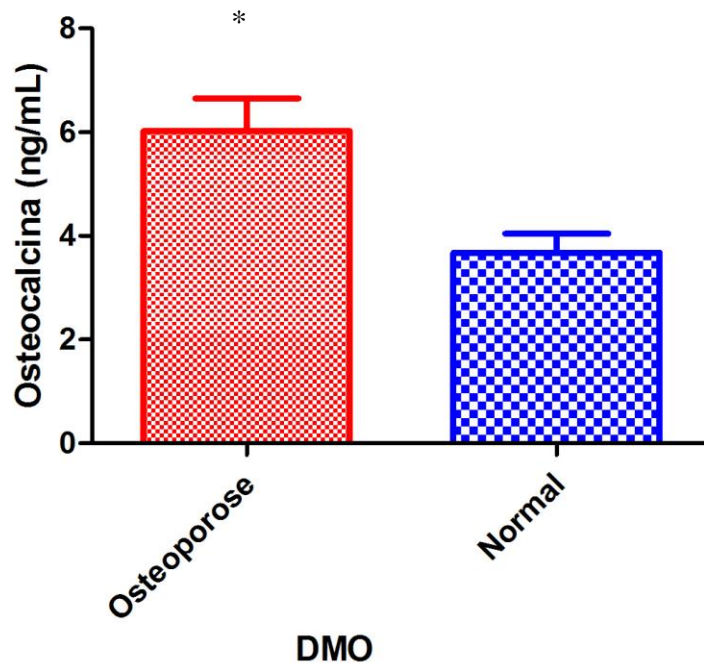


Gráfico 8 – Concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas e normais. Observa-se um aumento significativo da osteocalcina nas pacientes osteoporóticas (6,025 ng/mL) em relação às normais (3,678 ng/mL)  $p < 0,05$ .

Fonte: LBCE.

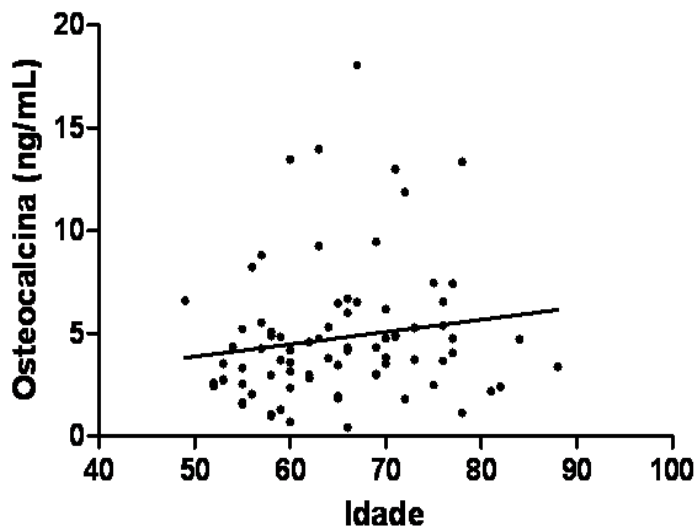


Gráfico 9 – Influência da idade na concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas e normais.

Há diferenças significativas neste parâmetro com o envelhecimento.

Fonte: LBCE, 2008.

## 5.6 PAPEL DOS ALELOS EM ALGUNS DOS PARÂMETROS SOROLÓGICOS DO METABOLISMO MINERAL

### 5.6.1 GENE DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (RE $\alpha$ )

Para entender o papel de cada um dos alelos nos parâmetros sorológicos do metabolismo ósseo, analisou-se a influência dos alelos **P**, **p**, **X** e **x** na DMO, na concentração do fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTX), osteocalcina e fosfatase alcalina (FA) em todas as pacientes e nos grupos separadamente (osteoporóticas e normais).

Conforme explicitado na Tabela 6, encontrou-se em nossa amostra uma prevalência do alelo **P** em relação ao seu alelo ancestral **p**. Na Tabela 8 pode-se verificar que o alelo **P** correlaciona-se fortemente com alta DMO ( $p < 0,05$ ) em toda a população estudada e se reproduz quando analisada a população com idade acima de 65 anos. Contudo, quando analisadas apenas as pacientes com idade menor que 65 anos, não foi obtida tal significância. Também não foi observado significância estatística quando relacionados aos alelos **X** e **x** (Tabela 9).

Tabela 8 - Agrupamento alélico e a influência destes alelos na DMO da população estudada.

\*Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Genótipos	População	$p$ valor
(PP+Pp) X (pp)	Todas as pacientes	0,0398*
(PP+Pp) X (pp)	Idade > 65 anos	0,0082*
(PP+Pp) X (pp)	Idade < 65 anos	0,6999
(PP) X (Pp + pp)	Todas as pacientes	0,8936
(PP) X (Pp + pp)	Idade > 65 anos	0,5215
(PP) X (Pp + pp)	Idade < 65 anos	0,6030

Fonte: LBCE.

Tabela 9 - Agrupamento alélico e a influência destes alelos na DMO da população estudada.

\* Não foram encontrados genótipos xx na população estudada.

Genótipos	População	$p$ valor
(XX+Xx) X (xx)	Todas as pacientes	----*
(XX+Xx) X (xx)	Idade > 65 anos	----*
(XX+Xx) X (xx)	Idade < 65 anos	----*
(XX) X (Xx+xx)	Todas as pacientes	0,7155
(XX) X (Xx+xx)	Idade > 65 anos	0,7260
(XX) X (Xx+xx)	Idade < 65 anos	0,8209

Fonte: LBCE.

De acordo com a Tabela 10, pode-se verificar que em toda população estudada, a presença do alelo **p** apresenta significativa diminuição de CTx e aumento de osteocalcina sem, contudo, alterar a concentração sérica de FA. Já a heterozigose **Xx** promove um aumento significativo de CTx e osteocalcina circulantes sem alterar também as concentrações de FA.

---

Tabela 10 - Papel dos alelos **P**, **p**, **X** e **x** nas concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA), fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) e osteocalcina em todas as pacientes.

\* estatisticamente significante,  $p < 0,05$ .

\*\*Não foram encontrados genótipos xx na população estudada.

---

	Fosfatase Alcalina (mg/dL)	CTx (ng/mL)	Osteocalcina (ng/mL)
PP	65,2±3,758	0,229±0,021	3,613±0,584
Pp	63,4±2,041	0,183±0,019*	5,397±0,633*
pp	62,0±2,544	0,191±0,019*	4,914±0,644*
XX	62,9±3,850	0,175±0,017	3,825±0,688
Xx	63,5±1,495	0,201±0,014*	5,056±0,434*
xx	----**	----**	----**

---

Fonte: LBCE.

Quando analisadas as pacientes osteoporóticas nota-se que a presença dos alelos **pp** representam significativo aumento da osteocalcina em relação ao homozigoto **PP**, sem, contudo, alterar a concentração sérica de CTx e FA. Já a heterozigose **Pp** promove uma diminuição significativa de FA sérica concomitante com aumento da osteocalcina circulante, sem, contudo, alterar as concentrações de CTx quando comparados com o homozigoto **PP**. A heterozigose **Xx** leva a uma diminuição

significativa de FA e CTx sem alteração na osteocalcina circulante quando comparado com o homozigoto **XX** (Tabela 11).

---

Tabela 11 - Papel dos alelos **P**, **p**, **X** e **x** nas concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA), fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) e osteocalcina em pacientes osteoporóticas.

\* estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).

\*\* Não foram encontrados genótipos xx na população estudada.

---

	Fosfatase Alcalina (mg/dL)	CTX (ng/mL)	Osteocalcina (ng/mL)
PP	65,84±4,90	1,17±0,09	4,47±0,95
Pp	55,71±3,75*	1,13±0,06	7,05±1,10*
pp	62,00±3,28	1,23±0,07	5,89±1,01*
XX	67,96±5,18	1,12±0,05	5,35±1,01
Xx	59,33±2,53*	0,94±0,03*	6,21±0,49
xx	----**	----**	----**

---

Fonte: LBCE.

Quando analisadas a influência da idade nas concentrações séricas de osteocalcina e CTx em pacientes osteoporóticas portadoras dos alelos **P** (grupos **PP** e **Pp**) e homozigotos ancestrais (**pp**) observamos diferenças significativas ao aumento da osteocalcina e à diminuição de CTx séricos nos grupos estudados (Gráficos 10 e 11).

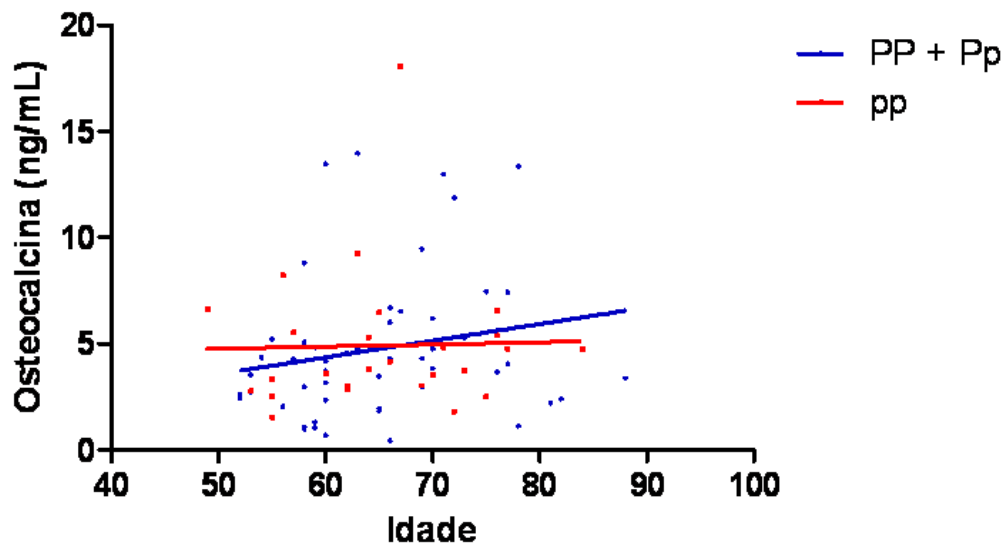


Gráfico 10 – Influência da idade na concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas portadoras dos alelos **P** (grupos **PP** e **Pp**) e homocigotos ancestrais (**pp**). Há diferenças significativas no aumento da osteocalcina sérica nestes grupos.

Fonte: LBCE.

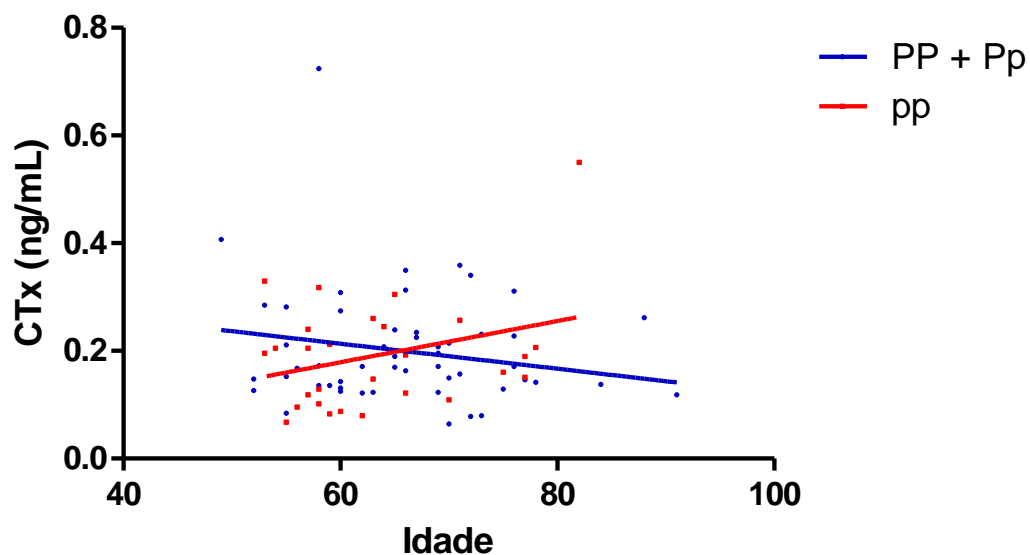


Gráfico 11 – Influência da idade na concentração sérica do CTx em pacientes osteoporóticas portadoras dos alelos **P** (grupos **PP** e **Pp**) e homocigotos ancestrais (**pp**). Há diferenças significativas na diminuição do CTx sérico nestes grupos.

Fonte: LBCE.

### 5.6.2 GENE DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE)

Ao observar a média da Densidade Mineral Óssea (DMO) de cada sítio em relação aos genótipos encontrados, verificou-se relevância significativa no colo do fêmur ( $p < 0,05$ ), indicando que existe uma diferença entre os genótipos encontrados e a DMO, segundo o teste de ANOVA. É importante ressaltar que o genótipo E2E2 apresenta uma baixa DMO em todos os sítios observados em relação aos outros genótipos. Para verificar entre quais genótipos encontra-se esta diferença, foi feito o teste de Post-hoc de Bonferroni que indicou uma diferença significativa entre os genótipos E2E2 x E3E3 e E2E2 x E3E4 ( $p < 0,05$ ) no colo do fêmur, como visto na tabela 12. É importante observar que o genótipo E4E4 foi excluído deste teste uma vez que só dispúnhamos de uma amostra.

Tabela 12 – Densidade mineral óssea dos sítios em relação aos genótipos encontrados.

Perfil ApoE	Rádio	Colo do Fêmur *	Fêmur	Coluna
E2E2	0,471±0,082	0,539±0,087	0,681±0,172	0,687±0,103
E2E3	0,549±0,110	0,722±0,146	0,838±0,180	0,887±0,174
E2E4	0,54±0,077	0,708±0,114	0,834±0,134	0,944±0,243
E3E3	0,558±0,094	0,734±0,119	0,826±0,116	0,865±0,151
E3E4	0,569±0,108	0,742±0,125	0,832±0,152	0,947±0,285
E4E4	0,435	0,671	0,746	0,774
Valor de p	0.450	0.045 <sup>a</sup>	0.316	0.093

Teste estatístico utilizado: Anova(\*).

<sup>a</sup>Post-hoc de Bonferroni: E2E2 x E3E3 e E2E2 x E3E4  $p < 0,05$ .

Para verificar a relação da presença e ausência dos alelos encontrados a DMO foi subdividida em osteoporose e normal. Foi feito o teste do *Qui-Quadrado* de tendência para todos os sítios, sendo verificada uma significância do alelo E2 no rádio, uma vez que, na sua ausência há uma maior incidência das pacientes normais do que osteoporóticas, já a presença do alelo relaciona-se a um aumento no número de casos de pacientes com osteoporose e diminuição no número de casos de pacientes normais, como indicado na tabela 13.

Tabela 13- Presença e ausência dos alelos analisados com a DMO do rádio.

Rádio	E2*		E3		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	57,7%	42,3%	23,1%	76,9%	84,6%	15,4%
Normal	85,1%	14,9%	4,2%	95,7%	72,3%	27,6%
Valor de p	0,0502		0,3193		0,19	

Teste Qui-Quadrado de tendência.

\* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 14, encontramos uma correlação entre alelo E3 e a DMO na coluna, sendo que, a presença deste alelo indica um número maior de pacientes normais e uma redução do número de osteoporóticos. Já a ausência do alelo indica um aumento no número de pacientes com osteoporose e uma diminuição no número de normais.

Tabela 14 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO na coluna.

Coluna	E2		E3*		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	76,3%	23,1%	15,4%	84,2%	71,1%	28,2%
Normal	78,5%	20,9%	4,6%	95,3%	76,2%	23,3%
Valor de p	0,4764		0,0529		0,4747	

Teste estatístico utilizado: Qui-quadrado de tendência.

\*Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Não houve correlação entre a ausência e a presença do alelo no colo do fêmur e no fêmur como visto nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO do Colo do Fêmur.

Colo do Fêmur	E2		E3		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	70%	30%	20%	80%	75%	25%
Normal	85%	14,3%	4,7%	95%	80%	19,1%
Valor de p	0,0758		0,7195		0,8581	

Teste estatístico utilizado: Qui-quadrado de tendência

Tabela 16 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO do fêmur.

Fêmur	E2		E3		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	71,4%	28,6%	19,1%	80,9%	76,2%	23,8%
Normal	83,3%	16,7%	8,3%	91,7%	79,2%	20,8%
Valor de p	0,1391		0,3285		0,5229	

Teste estatístico utilizado: Qui-quadrado de tendência.

A comparação da DMO total subdividida em pessoas com osteoporose e sem osteoporose, com a presença e a ausência dos alelos encontrados não foi verificada relevância significativa como observada na Tabela 17.

Tabela 17- Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO total.

DMO total	E2		E3		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	74,1%	25,9%	14,8%	11,1%	75,9%	24,1%
Sem Osteoporose	78,6%	21,3%	20%	80%	74,6%	25,3%

Teste estatístico utilizado: Qui-quadrado de tendência.

Em relação aos alelos analisados, segundo o teste de Fisher, foi encontrada relevância na coluna do alelo E3 ( $p < 0,05$ ), indicando que a sua presença relaciona-se com o aumento do número de pacientes sem osteoporose, já sua ausência está relacionada com o aumento do número de casos com osteoporose, como visto na tabela 18. Além disso, uma correlação do alelo E2 no rádio mostra que a sua presença implica em um aumento do número de pacientes com osteoporose e a sua ausência indica um aumento de pacientes sem osteoporose, visto na tabela 19.

Tabela 18 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose na coluna.

Coluna	E2		E3*		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	71,8%	28,2%	20,5%	79,5%	69,2%	30,8%
Sem Osteoporose	80%	20%	5,5%	94,5%	82,2%	17,8%
Valor de p	0,2417		0,0211		0,1619	

Teste utilizado: Fisher.

\*Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 19 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no rádio.

Rádio	E2*		E3		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	60%	40%	20%	80%	84%	16%
Sem Osteoporose	81,7%	18,3%	7,7%	92,3%	76,9%	23,1%
Valor de p	0,0309		0,1296		0,5919	

Teste utilizado: Fisher.

\*Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Não foi encontrada relevância significativa entre a presença e ausência dos alelos encontrados e a DMO no fêmur e no neck, segundo o teste estatístico de Fisher, como visto nas tabelas 20 e 21.

Tabela 20 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no fêmur.

Fêmur	E2		E3		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	66,7%	33,3%	22,3%	77,7%	77,7%	23,3%
Sem Osteoporose	79,3%	20,7%	8,1%	91,9%	78,4%	21,6%
Valor de p	0,3602		0,0848		0,996	

Teste utilizado: Fisher.

Tabela 21 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no Colo do Fêmur.

Colo do Fêmur	E2		E3		E4	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
Osteoporose	64,7%	35,3%	23,5%	76,5%	76,5%	23,5%
Sem Osteoporose	78,5%	20,7%	8,1%	91,9%	78,5%	20,7%
Valor de p	0,2146		0,0719		0,9982	

Teste utilizado: Fisher.

## 6 DISCUSSÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população brasileira propiciado pelos avanços científicos e descobertas de novos e mais eficientes tratamentos de várias doenças, observa-se um aumento do número de pessoas com idade acima dos 65 anos, o que, conseqüentemente, vem acompanhado de várias alterações intrínsecas da senescência. Essas enfermidades estão sendo bem mais estudadas com a finalidade de proporcionar melhor qualidade de vida a esta faixa etária da população. Entre estas alterações nos deparamos com doenças crônicas, como diabetes, hipertensão, problemas vasculares, artrite e a osteoporose. A osteoporose é definida como um distúrbio osteometabólico caracterizado por redução na massa óssea, associado à deterioração da microarquitetura óssea, levando a um aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas (SHAW; WITZKE, 1998). Atinge majoritariamente mulheres após menopausa, e a sua prevalência vem crescendo significativamente devido, principalmente, ao rápido envelhecimento da população, e atualmente constitui-se em importante problema de saúde pública, com repercussões econômicas e sociais relevantes (RODRIGUES, 2002).

O conhecimento sobre múltiplos mecanismos ósseos regulatórios deve tanto auxiliar o entendimento sobre o remodelamento ósseo quanto oferecer explicações para as alterações que ocorrem em várias enfermidades (HILL, 1998). Nos últimos anos tem-se descoberto a grande complexidade dos mecanismos que influenciam a atividade celular óssea, e a vasta expansão de pesquisas sobre o assunto vem ganhando êxito, em parte devido ao reconhecimento da osteoporose como importante doença que acomete os idosos (ARNETT, 1990). KHOURY (1998), através de meta-análise, encontrou evidências fortes sugerindo que a interação entre genes e ambiente desempenha um papel importante na Densidade Mineral Óssea (DMO). Sendo a DMO considerada o principal indicador de maior risco à osteoporose, vários estudos foram realizados no sentido de estabelecer fatores de risco associados à perda de massa óssea. A idade avançada, o baixo peso corporal e a ausência de terapias contendo estrógenos foram observados (HOGDISON, 2003). A coexistência de

determinadas condições ou uso de certos fármacos também podem contribuir para a perda óssea (WADE, 2001).

Existem grandes lacunas nos dados epidemiológicos internacionais sobre a prevalência de osteoporose e identificação prospectiva sobre os riscos de fratura. No entanto, mesmo sem um sistema de vigilância efetivo, pode-se inferir que a modificação da pirâmide etária conferirá importância ainda maior à osteoporose em um futuro próximo (MARQUES; LEDERMAN, 1995). Indiscutivelmente, no desfecho da osteoporose, a idade tem efeito marcante sobre a DMO.

O risco de osteoporose depende tanto da massa óssea máxima alcançada nos anos da idade adulta jovem quanto do índice de perda de massa óssea nas épocas posteriores (LANZILLOTI, 2003). Na menopausa ocorre um aumento da renovação e diminuição da formação óssea em cada unidade de remodelação, o que conduz também a uma perda de massa óssea - fator determinante e responsável pela gênese da osteoporose - sendo a perda óssea mais intensa nos cinco anos que se seguem a ela (CONSENSUS, 1993; GENANT et al., 1989). Por isso, essa condição é mais frequente e mais dramática nas mulheres, que chegam a perder cerca de 40 a 50% da massa óssea (AIRES et al., 1991), o que corresponde a aproximadamente metade do seu osso trabecular e 35% de seu osso cortical até o final da vida. (RIGGS; MELTON, 1986).

Recentemente a pesquisa genética tem apontado várias moléculas como potenciais preditores prognósticos e terapêuticos da osteoporose. Mutações e polimorfismos em genes como os que codificam os receptores de vitamina D (RVD), a apolipoproteína "E", os receptores de Estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  (RE $\alpha$  e  $\beta$ ), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de crescimento insulina símile tipo 1 (IGF-1), mostram alta correlação com a baixa DMO durante a senescência (LIU et al., 2003).

Entre os genes que apresentam mais forte correlação com baixa DMO em mulheres está o gene do Receptor de Estrogênio (RE) e, mais recentemente, o gene da Apolipoproteína "E" (ApoE) (PLUJIM et al., 2002; SNELLS et al., 2003; ZAJICKOVA et al., 2003). Já no gene da Apolipoproteína "E", a hipótese é que a variação

genética em *locus* da ApoE pode modular a DMO através de seus efeitos sobre as lipoproteínas e o transporte de vitamina K. É sabido que a ApoE medeia o transporte de vitamina K, a qual é essencial para a carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico da osteocalcina, uma importante proteína óssea, que faz a ligação do cálcio na matriz óssea (KOHLMEIER et al., 1996; KNAPEN et al., 1989).

Neste trabalho, em parceria com o Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES - Vitória, ES) e o Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento (ITPD - Vila Velha, ES), foram estabelecidos um *cohort* de 547 pacientes através do recrutamento e da seleção aleatória de mulheres (já na pós-menopausa) estabelecidas na Região da Grande Vitória (ES) com idade igual ou superior a 50 anos.

É sabido que elementos polimórficos presentes no RE $\alpha$  estão relacionados com uma menor DMO em mulheres menopausadas (VAN MEURS, 2003). Recentemente, JAKIMIUK e colaboradores (2007) estabeleceram a prevalência dos sítios polimórficos Pvu II e Xba I em uma população de mulheres menopausadas, sem, contudo, estabelecer uma relação com a osteoporose. Os resultados aqui mostrados, por outro lado, obtiveram algumas associações. Vale lembrar que a ausência do sítio de restrição da enzima PvuII é representada pelo alelo **P** (alelo ancestral), enquanto que a ausência do sítio de restrição da enzima XbaI é representada pelo alelo **X** (alelo variante) (IOANNIDIS, et al., 2004). A presença do sítio de restrição da enzima PvuII é representada pelo alelo **p** (alelo variante), enquanto que a presença do sítio de restrição da enzima XbaI é representada pelo alelo **x** (alelo ancestral).

Através das análises de PCR-RFLP realizadas, foi demonstrado que os genótipos encontrados (PP, Pp, pp, XX e Xx) apresentaram uma distribuição normal sem nenhum desvio para qualquer grupo destacando a importância da homogeneidade das amostras em relação aos genótipos. Encontrou-se em nosso estudo uma prevalência do alelo **P** em relação ao seu alelo variante **p**. Pode-se verificar também que o alelo **P** correlaciona-se fortemente com alta DMO ( $p < 0,05$ ) em toda a população estudada e se reproduz quando analisada a população com idade acima

de 65 anos. De acordo com alguns estudos como os de GENNARI e colaboradores (1998) e KOBAYASHI e colaboradores (1996), o perfil genético **pp** foi associado com uma baixa densidade mineral óssea em mulheres japonesas e italianas, contudo outros autores associam a baixa densidade mineral óssea ao perfil **PP** em mulheres norte americanas e finlandesas (LANGDAHI, et al., 1997; MAHONEN, et al., 1997). Vale ressaltar que quando analisadas apenas as pacientes com idade menor que 65 anos, não foi obtida tal significância. Também não foi obtida significância entre os alelos **X** e **x**. Estes dados tornam-se relevantes, pois vão de encontro ao descrito na literatura científica (WANG, 2007).

Durante a formação do osso, a produção da matriz colágena precede a mineralização. A fase de produção de matriz colágena coincide com uma maior produção de fosfatase alcalina - FA, enquanto a mineralização coincide com uma maior produção de osteocalcina (STEIN, 1993). A FA é uma enzima codificada pelo gene A1P, localizado no cromossomo 1, expressa em vários órgãos e tecidos. A isoenzima óssea é um peptídeo de 507 amino ácidos, está localizada na superfície externa da célula onde exerce sua atividade. No caso da isoenzima óssea, a atividade e a importância da enzima na formação e mineralização da matriz óssea ainda é mal definida. As alterações encontradas na hipofosfatasia, doença devida a uma mutação no gene codificador da enzima, predominantemente osteomalácia, sugerem fortemente que a enzima tenha papel fundamental na mineralização (VIEIRA, 1999).

Os resultados aqui apresentados não mostraram nenhuma modificação nos níveis séricos da FA nos pacientes com fenótipos **PP**, **pp** e **XX**. Apenas os genótipos heterozigotos **Pp** e **Xx** apresentaram decréscimo de Fosfatase Alcalina circulante quando comparado com os genótipos **PP** e **XX** respectivamente. A presença do alelo **x** na região 351G-A sobre a expressão do próprio RE é ainda controverso (GENNARI, 2005). Assumindo que este elemento polimórfico associa-se a uma diminuição do RE $\alpha$  no tecido ósseo (GENNARI, 2005) é plausível que haja diminuição dos genes regulados por estrogênio, entre eles a FA.

A osteocalcina é um polipeptídeo secretado pelos osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos. Apesar de ser depositada em quantidades significativas na matriz óssea, sendo uma das proteínas não-colágenas mais abundantes, não é um marcador de reabsorção óssea, pois é totalmente destruída quando da reabsorção promovida pelos osteoclastos (VIEIRA, 1999). As funções da osteocalcina são ainda mal definidas, apesar de sua estrutura indicar interação com cálcio e com cristais de hidroxiapatita. Adicionalmente, estudos indicam que o aparecimento e aumento de produção da proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização sugerindo que a osteocalcina possa constituir um marcador de formação óssea (OWEN, 1990). Os resultados obtidos ao longo deste trabalho mostraram que a osteocalcina está elevada nas mulheres osteoporóticas. Foi também aqui demonstrado que ocorre um aumento considerável da osteocalcina sérica em mulheres mais velhas, que apresentam menor DMO.

Ademais, foi mostrado que o alelo **p** está associado com uma significativa elevação desta molécula no soro destas pacientes, enquanto que o alelo **P** repercute em apenas uma ligeira elevação da osteocalcina sérica dependente da idade. Acreditamos, portanto, que estes dados reforcem o papel da osteocalcina como agente ativador de osteoclastos ou mesmo que estes valores séricos elevados reflitam uma tentativa do organismo de aumentar a taxa de formação óssea para compensar a perda de matriz mineral.

É sabido, entretanto, que a principal proteína da matriz óssea é o colágeno tipo I produzida também pelos osteoblastos (NIMNI, 1983). Durante a maturação do colágeno, as fibrilas colágenas recém depositadas na matriz extracelular são estabilizadas pela interligação entre os radicais lisina e hidroxilisina de diferentes cadeias. Assim, por ação da enzima lisil oxidase, moléculas de lisina e hidroxilisina da porção terminal (telopeptídeos c-terminais de colágeno ou CTx), das moléculas de colágeno, formam aldeídos e se condensam com o resíduo de molécula adjacente formando uma estrutura interligadora composta de três radicais hidroxilisina (piridinolina) ou uma lisina e duas hidroxilinas (deoxipiridinolina). As piridinolinas atuam como interligadores (*cross-links*) nos colágenos tipo I, II e III, os principais de todos os tecidos com exceção da pele. Estes *cross-links* são, hoje, os

principais métodos de avaliação bioquímica da reabsorção da matriz óssea (EYRE, 1987).

Neste trabalho, foi observado um aumento de cerca de 10 vezes a concentração sérica de Ctx nas mulheres osteoporóticas. Verificou-se também que a presença do alelo **p** representa significativa diminuição de CTx independente de osteoporose instaurada. Quando analisadas apenas as pacientes osteoporóticas, contudo, nota-se que a presença dos alelos **pp** - quando comparadas ao homozigoto **PP** - não alteraram a concentração sérica de CTx. Interessantemente, a presença do alelo **P** (genótipos **PP** e **Pp**) relaciona-se a um decréscimo progressivo e inversamente proporcional a idade do paciente das concentrações séricas de CTx enquanto que a ausência do alelo **P** (genótipo **pp**) apresenta um perfil oposto, com aumento significativo do CTx ao longo do envelhecimento. HERRINGTON e colaboradores (2002) notaram que o alelo **P** resulta em um potencial sítio de ligação para o fator de transcrição *myb*, que na presença de *B-myb*, é capaz de aumentar 10 vezes a transcrição *in vitro* de um gene repórter clonado posterior ao polimorfismo. Em algumas ocasiões, então, a presença do alelo **P** pode amplificar a transcrição do *RE $\alpha$*  (GENNARI et al., 2005). É sabido que o estrogênio é capaz de aumentar a taxa de renovação do colágeno, com concomitante elevação da síntese e degradação desta proteína pelos osteoblastos (REF). Portanto, é razoável supor que a presença do alelo **P** possa levar a um aumento da expressão do RE, maior síntese e degradação de colágeno e, conseqüentemente, uma maior concentração de CTx no soro.

Em relação ao polimorfismo do gene da Apolipoproteína “E”, foi possível observar que existe uma correlação entre a redução da DMO e o aumento da idade em todos os sítios analisados, e através da regressão linear podemos verificar uma influência maior da idade no rádio com (19,32%), fêmur (17,7%), colo do fêmur (14,8%) e na coluna, que apresenta a menor correlação, (3%), indicando que existe uma diferenciação nos padrões de redução da DMO, em relação à idade, dependendo dos sítios analisados.

A média da Densidade Mineral Óssea (DMO) indicou uma redução da mesma em todos os sítios analisados para o genótipo E2E2, mas a relevância significativa foi encontrada no colo do fêmur, quando comparados entre os genótipos E2E2 x E3E3 e E2E2 x E3E4, sendo que o genótipo E2E2 possui o menor valor DMO, e os genótipos E3E3 e E3E4 os maiores valores de DMO no colo do fêmur, demonstrando que o alelo E2E2 está ligado a uma redução da DMO nesta região.

Devido à baixa prevalência do alelo E4, não foi possível detectar qualquer correlação significativa com a DMO, como as observadas por VON MÜHLEN e colaboradores (2001), que associam o alelo E4 com um maior índice de fraturas e uma baixa densidade mineral óssea. O alelo E3, quando analisado a DMO na coluna, indica que na sua presença há uma diminuição no número de pacientes com osteoporose, e a sua ausência relaciona-se a um aumento da incidência de osteoporose, verificando assim que o alelo E3 apresenta um perfil protetor em relação à DMO. O alelo E3 teve uma alta frequência em nossa população, corroborando com estudos feitos anteriormente por VON MÜHLEN e colaboradores (2001).

Na coluna e no fêmur não foi encontrada correlação significativa entre os sítios analisados e os alelos encontrados, diferindo de outros estudos como o de WONG e colaboradores (2005) que relaciona o alelo E2 à baixa DMO no colo do fêmur. De um modo geral, quando comparamos a presença e ausência dos alelos e o número de sítios afetados com pela osteoporose, verificou-se novamente a tendência do alelo E3 como um fator de proteção em relação à DMO. Podemos dizer que essa diferença de correlação pode estar ligada a fatores ambientais, diferenças nos padrões alimentares ou ligadas às diferenças de idade das pacientes nos estudos analisados.

## 7 CONCLUSÃO

Devido ao grande avanço que vem ocorrendo nas técnicas diagnósticas e estratégias efetivas para a prevenção e tratamento da osteoporose, houve um aumento abrupto do interesse público, médico e da indústria farmacêutica nessa área, na última década.

Dentre os estudos, a genética da osteoporose, especificamente os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP's) do gene do *Reα* e o do gene da APOE têm despertado curiosidade, por parecerem regular os efeitos e possível ligação com as doenças associadas ao envelhecimento da mulher (Van MEURS, 2003; OJOPI et al., 2004).

Diante do exposto, conclui-se que somente o SNP Pvull (presença do alelo p), no gene do *REα*, está relacionado com a baixa DMO, sendo este efeito observado em mulheres com idade mais avançada. Já no SNP Hhal (alelo E2), no gene da APOE, pode estar relacionado como um fator de risco para a baixa DMO, e no SNP Hhal (alelo E3) pode estar relacionado como um fator protetor em relação à DMO, proporcionando assim, um aumento das chances de racionalização da conduta terapêutica utilizada na osteoporose pós-menopausa.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIRES, M.M. et al. **Fisiologia**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v. 1, p. 795-796. 1991.
2. ALBRIGHT, F.; SMITH, P.H.; RICHARDSON, A.M. Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. **Journal American Medicine Association**, v. 116, p. 2465-2474. 1940.
3. ARNETT, T.R. Update on bone cell biology. **European Journal of Orthodontics**, v. 12, p. 81-90. 1990.
4. BARRET-CONNOR, E.; BUSH, T. L. Estrogen and coronary heart disease in women. **Journal of the American Medical Association**, v. 265, p. 1861-1867. 1991.
5. BERRY, M.; METZGER, D.; CHAMBON P. Role of the two activating domains of the estrogen receptor in cell type and promoter context dependent agonist activity of the anti-estrogen4-hidroxitamoxifen. **The EMBO Journal**, v. 9(9), p. 2811-2818. 1990.
6. BLUE, M-L.; WILLIAMS, D.L.; ZUCKER, S.; KHAN, S.A.; BLUM, C.B. **Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 80, p. 283–287. 1983.
7. BODY, J.J. Calcitonin: from the determination of circulating levels in various physiological and pathological conditions to the demonstration of lymphocyte receptors. **Hormone Research**, v. 39, p. 166-170. 1993.
8. BURGE, R.T. et al. Incidence and economic burden of osteoporotic fractures in the United States, 2005-2025. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 22(3), p. 465-475. 2007.

9. CALLE, E. E. et al. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p. 517-523. 1995.
10. CASTRO, C.H.M. **Biologia molecular no estudo das doenças ósseas**. Ed. Sarvier, São Paulo, v. 1, p. 54-59. 2000.
11. CAULEY, J.A.; ZMUDA, J.M.; YAFFE, K.; KULLER, L.H.; FERRELL, R.E.; WISNIEWSKI, S.R.; CUMMINGS, S.R. Apolipoprotein E polymorphism: A new genetic marker of hip fracture risk—The Study of Osteoporotic Fractures. **J Bone Miner Res**, v. 14, p. 1175–1181. 1999.
12. CHAN, W.M.; HO, Y.Y. Inhibition of cell proliferation by apolipoprotein E isoform expression. **ARCH Biochem Biophys**, v. 451(2), p. 97-102. 2006.
13. CHEEMA, C.H; GRANT, B.F.; MARCUS, R. Effect of estrogen on circulating "free" and total 1,25-dihydroxyvitamin D and on the parathyroid-vitamin D axis in postmenopausal women. **The Journal Clinic Investigation**, v. 83, p. 537-542. 1989.
14. CLARK, J.H.; SCHRADER, W.T.; O'MALLEY, B.W. Mechanisms of action of steroid hormones. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. (eds). **Textbook of Endocrinology**. Philadelphia, WB Saunders, v. 1, p. 35-90. 1992.
15. CLARK, K. & SOWERS, M.R. Alcohol dependence, smoking status. Reproductive characteristics, and bone mineral density in pre menopause women. **Res Nurs Health**, v. 19 (5), p. 399. 1996.
16. COLLIER, F.M. et al. Osteoclast from human giant cell tumors of bone lack estrogen receptors. **Endocrinology**, v. 139, p. 1258-1266. 1996.
17. COLLINS, P.; WEBB, C. Estrogen hits the surface. **Nature Medicine**, v. 5(10), p. 1130-131. 1999.

18. COLSTON, K.W. et al. Estrogen receptors and human bone cells: immunocytochemical studies. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 4, p. 625-631. 1989.
19. CONSENSUS - Development Conference: diagnostic, prophylaxis and treatment of osteoporosis. **American Journal Medicine**, v. 94, p. 646-650. 1993.
20. COSMAN, F. et al. Comparative effects of tissue selective estrogens and estrogen on bone mineral density and bone turnover. **American Society for Bone and Mineral Research, Annual Meeting**, Seattle, 1996.
21. CUNHA, S. Factores de risco de osteoporose feminina: avaliação do risco segundo ORAI e realização de DEXA. **Revista Portuguesa de Clinica Geral**, v. 21, p. 537-543. 2005.
22. CURTISS, L.K. ApoE in atherosclerosis: a protein with multiple hats. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p.1852–1853. 2000.
23. DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, p. 1501-1504. 2000.
24. EFSTHATIADOU, Z.; KOUKOULIS, G.; STAKIAS, N.; CHALLA, A.; TSATSOULIS, A. Apoprotein E polymorphisms is not associated with spinal bone mineral density in peri and postmenopausal Greek women. **Maturitas**, v. 48, p. 259 – 264. 2004.
25. EMI, M.L.L. et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. **Genomics**, v. 3, p. 373-379. 1988.
26. ERIKSEN, E.F. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, v. 41, p. 84-86. 1988.

27. EVANS, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, p. 889-895. 1988.
28. EYRE, D. Collagen cross-linking amino acids. **Methods in Enzymology**, v. 144, p. 115-136. 1987.
29. FERRARI, S. Human genetics of osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22(5), p.723-735. 2008.
30. FINCH, C.E.; SAPOLSKY, R.M. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoe isoforms. **The Neurobiology of Aging**, v. 20, p. 407:428. 1999.
31. FRATZL-ZELMAN, N. et al. The expression of matrix metalloproteinase-13 and osteocalcin in mouse osteoblasts is related to osteoblastic differentiation and is modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and thyroid hormones. **Cell Biology International**, v. 27(6), p.459-468. 2003.
32. GARCIA-SEGURA, L. M. et al. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. **Journal of Neurobiology**, v. 40, p. 574-584. 1999.
33. GENANT, H.K. et al. Interium report and recommendations of the World Health Organization task-force for osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 10, p. 259-264, 1999.
34. GENNARI, L. et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HUGE Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 161(4), p. 307-320. 2005.
35. GENNARI, L. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. **Journal Clinic of Endocrinology Metabolic**, v. 83, p. 939-944. 1998.

36. GRAZIANO, K.U.; MAIA, F.O.M. Principais acidentes de causa externa no idoso. **Gerontologia (Basel)**, v. 7, p. 133-139. 1999.
37. GREEN, S. Modulation of estrogen receptor activity by estrogens and anti-estrogens. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 747-751. 1990.
38. GRONEMEYER, H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. **Annual Review of Genetics**, v. 25, p. 89-123. 1991.
39. GRUBER, C.J. et al. Production and actions of estrogens. **The New England Journal of Medicine**, v. 346(5), p. 340-352. 2002.
40. GUEGUEN, R.; JOUANNY, P.; GUILLEMIN, F.; KUNTZ, C.; POUREL, J.; SIEST, G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. **J Bone Miner Res**, v. 10, p. 2017-2022. 1995.
41. HAGBERG, J.M.; WILUND, K.R.; FERRELL, R.E. Gene and gene-environment interactive effects of APO E genotype on plasma lipoprotein lipids. **Physiological Genomics**, v. 4, p. 101-108. 2000.
42. HILL, P.A.; ORTH, M. Bone remodeling. **Brazilian Journal of Orthodontics**, v. 25(2), p. 101-107. 1998.
43. HODGSON, S.F. American association of clinical endocrinologists medical guidelines for clinical practice in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **Endocrinology Practice**, v. 9(6), p. 45-50. 2003.
44. HOROWITZ, M.C. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. **Science**, v. 260, p. 626-627. 1993.

45. HOWELL, A. New endocrine treatments for breast cancer: biological and clinical aspects. **The Breast**, v. 5, p. 170-174. 1996.
46. HUGHES, D.E.; BOYCE, B.F. Estrogen, transforming growth factor beta, and the regulation of Bone metabolism in health and disease. **The Endocrinologist**, v. 8, p. 55-61. 1998.
47. HYNES, R. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25. 1992.
48. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=207](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=207)>. Acesso em: 30 ago. 2010
49. INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION – IOF. Osteoporosis in the European Union in 2008: Ten years of progress and ongoing challenges. **IOF**. 2008.
50. IOANNIDIS, J.P.A. et al. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. **Journal American Medical Association**, v. 292(17), p. 2105-2114. 2004.
51. JAKIMIUK, A.J. et al. Prevalence of estrogen receptor  $\alpha$  *PvuII* and *XbaI* polymorphism in population of Polish postmenopausal women. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 45(4), p. 331-338. 2007.
52. JOHNSTON, J.M.; CAULEY, J.A.; GANGULI, M. APOE 4 and hip fracture risk in a community-based study of older adults. **J Am Geriatr Soc**, v. 47, p. 1342–1345. 1997.
53. JÚNIOR, A.F. Osteoporose no idoso. In: SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose, diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Ed. SARVIER, 2000.

54. KANIS, J.A. et al. Ten year risk of osteoporotic fracture and the effect of risk factors on screening strategies. **Bone**, v. 30, p. 251-258. 2001.
55. KELLY, P.J.; HARRIS, M. Genetic regulation of peak bone mass. **Acta Paediatr**, Suppl 411, p. 24-30. 1995.
56. KHOURY, M.J. Genetic and epidemiological approaches to the search for gene-environment interaction: the case of osteoporosis. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, p. 1-2. 1998.
57. KIERZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. Elsevier Mosby, 2ª edição, Rio de Janeiro, 2008.
58. KISNELLA, K. Aging in the third world. US Dept. of Commerce, Bureau of the Census. **US Government Printing Office**, Washington DC, 1988.
59. KNAPEN, M.H.; HAMULYAK, K.; VERMEER, C. The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone Gla protein) and urinary calcium excretion. **Ann Intern Med**, v. 111, p. 1001-1005. 1989.
60. KOBAYASHI, S. et al. Association of bone mineral density with polymorphisms of the estrogen receptor gene. **Journal Bone and Mineral Research**, 11, p. 306-311. 1996.
61. KOHLMEIER, M.; SALOMON, A.; SAUPE, J.; SHEARER, M.J. Transport of vitamin K to bone in humans. **J Nutr**, v. 126, p. 1192S-1196S. 1996
62. KOHLMEIER, M.; SAUPE, J.; SCHAEFER, K.; ASMUS, G. Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. **Calcif Tissue Int**, v. 62, p. 278-281. 1996.

63. KORNAK, U. Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. **Cell**, v. 104(2), p. 205-215. 2001.
64. KOWALSKI, S.C.; SJENZFELD, V.L.; FERRAZ, M.B. Utilização de recursos e custos em osteoporose. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47(4), p. 352-357. 2001.
65. LABORATÓRIOS SERVIER DO BRASIL LTDA. Um grande avanço terapêutico para a osteoporose na pós-menopausa. **Guia Clínico PROTOS (Ranelato de Estrôncio)**, 2007.
66. LANGDAHL, B.L. et al. Polymorphisms in the estrogen receptor gene show different distributions in osteoporotic patients and normal controls. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 12, p. S255. 1997.
67. LANZILLOTTI, H.S. et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. **Revista de Nutrição**, v. 16(2), p. 181-193. 2003.
68. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Integração e regulação hormonal do metabolismo dos mamíferos. **Princípios de bioquímica**. 2ª edição. São Paulo: Ed. SARVIER, 1995.
69. LISCUM, B. Osteoporosis: the silent disease. **Orthopedic Nursing**, v. 11(4), p. 21. 1992.
70. LIU, Y.Z. et al. Review: Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. **Journal of Endocrinology**, v. 177, p. 147-196. 2003.
71. LONG, J.; LIU, P.; LIU, Y.; LU, Y.; SHEN, H.; ZHAO, L.; XIONG, D.; DENG, H. APOE haplotypes influence bone mineral density in caucasian males but not females. **Calcif Tissue**, v.75,p.299- 304. 2004.

72. MACHADO, C.C. Projeções multirregionais da população: o caso brasileiro (1980-2020) [tese]. Belo Horizonte: **Universidade Federal de Minas Gerais**, 1993.
73. MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, v. 240, p. 622–630. 1988.
74. MAHLEY, R.W.; HUANG, Y.; WEISGRABER, K.H. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1226:1229. 2006.
75. MAHONEN A. et al. Estrogen receptor gene polymorphisms is associated with bone mineral density in perimenopausal Finnish women. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 12, p. T614. 1997.
76. MANOLAGAS, S.C. Role of cytokines in bone resorption. **Bone**, v. 17, p. 63S-67S. 1995.
77. MARIE, P.J. et al. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Calcified Tissue International**, v. 69, p. 121-129. 2001.
78. MARQUES NETO, J.F.; LEDERMAN, R. **Osteoporose no Brasil: ano 2000**. Ed. Limay: São Paulo, v.1, p. 137. 1995.
79. MAVROPOULOS, E. A Hidroxiapatita como Removedora de Chumbo. [Dissertação] Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, 1999.
80. MAZZONE, T. Apolipoprotein E secretion by macrophages—its potential physiological functions. **Curr. Opin. Lipidol**, v. 7, p.303–307. 1996.
81. MEINHARDT, U.; MULLIS, P. E. The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact. **Hormone Research**, v. 57(5-6), p. 145-152. 2002.

82. MUNDY, G.R. et al. The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. **Bone**, v. 17, p. 71S-75S. 1995.
83. NAKASHIMA, A. et al. Bone mineral density may be related to atherosclerosis in hemodialysis patients. **Osteoporosis International**, v. 14, p. 369 – 373. 2003.
84. NIEVES, J.W. et al. Calcitonin potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: review and analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 18-24. 1998.
85. NIMNI, M.E. Collagen: structure, function and metabolism in normal and fibrotic tissues. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 13, p. 1-86. 1983.
86. OJOPI, E.P.; BERTONCINI, A.B.; DIAS NETO, E. Apolipoproteína-E e a Doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31 (1), p. 26-33. 2004.
87. OLAISEN, B.; TEISBERG, P.; GEDDE-DAHL, T. JR. - The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. **Hum Genet**, v. 62, p. 233-6. 1982.
88. OWEN, T.A. et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the one extracellular matrix. **Journal Cell Physiology**, v. 143, p. 420-430. 1990.
89. PACIFICI, R. et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cell. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA - PNAS**, v. 88, p. 5134-5138. 1991.
90. PARFITT, A.M. Calcium homeostasis. In: MUNDY, G.R.; MARTIN, J.J. **Physiology and Pharmacology of Bone**. Heidelberg, Ed. Springer-Verlag, 1992.

91. PARHAMI, F.; GARFINKEL, A.; DEMER, L.L. Role of lipids in osteoporosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p.2346–2348.2000.
92. PLUIJM, S.M.F. Effects of gender and age on the association of apolipoprotein E4 with bone mineral density, bone turnover and the risk of fractures in older people. **Osteoporosis International**, v. 13, p. 701-709. 2002.
93. POCOCK, N.A.; EISMAN, J.A.; HOPPER, J.L.; YEATES, M.G.; SAMBROOK, P.N.; EBERL, S. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. **J Clin Invest**, v. 80, p. 706–710. 1987.
94. POGODA, P.; PRIEMEL, M.; RUEGER, J.M.; AMLING, M. Review: Bone remodeling: new aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair. **Osteoporosis International**, v. 16, p. S18-S24. 2005.
95. RABER, J.; HUANG, Y.; ASHDORF, J.W. APOE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. **New Ageing**, v. 25, p.641 – 650. 2004.
96. RAMALHO, A.C.; CASTRO, M.L. Revisão: Fisiopatologia da osteoporose involutiva. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 43, p. 409-414. 1999.
97. RECKER, R. et al. Bone gain in young adult women. **JAMA**, v. 268 (17), p. 2403. 1992.
98. RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. Involutional osteoporosis. **New England Journal Medicine**. v. 314, p. 676-686. 1986.
99. RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**, v. 289(5484), p. 1508-1514. 2000.

100. RODRIGUES, H.L. Ainda há lugar para cálcio e vitamina D na terapêutica da osteoporose pós-menopausa. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 7(1), p. 15-27. 2002.
101. RORIES, C.; SPELSBERG, T.C. Ovarian steroid action on gene expression: mechanisms and models. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 653-681. 1989.
102. SALAMONE, L.M.; CAULEY, J.A.; ZMUDA, J.; PASAGIAN-MACAULAY, A.; EPSTEIN, R.S.; FERRELL, R.E.; BLACK, D.M.; KULLER, L.H. Apolipoprotein E gene polymorphism and bone loss: Estrogen status modifies the influence of apolipoprotein E on bone loss. **J Bone Miner Res**, v. 15, p. 308–314. 2000.
103. SCHILLING, A.F. et al. Increased bone formation in mice lacking apolipoproteína E. **Journal of Bone and Mineral Research**; v. 20, p. 274-282. 2005.
104. SCHMIDT, J. B. A. et al. Treatment of skin aging with tropical estrogens. **International Journal of Dermatology**, v. 35, p. 669-674. 1996.
105. SCHOFS, M.W.C.J.; KLIFT, M.; HOFMAN, A.; VAN DUIJIN, C.M.; STRICKER, B.H.C.H. POLS, H.A.P.; UITTERLINDEN, A.G. ApoE gene polymorphisms, BMD, and fracture risk in elderly men and women: the Rotterdam Study. **J Bone Mine Res**, v. 19 (9), p.1490 – 1499. 2004.
106. SCHUIT, S.C.E. et al. Height in pre- and postmenopausal women is influenced by estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphisms. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89(1), p. 303-309. 2004.
107. SERVIÇO: SNPs do ESR1 em humanos. Disponível em: < [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)>. Acesso em: 11 mar 2008.

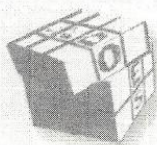
108. SHANE, E.; BILEZIKIAN, J.P. Normal bone and mineral homeostasis. In: BIJIVOET, O. et al. Bisphosphonate on bone. **Elsevier Science Ltd**, v. 1, p. 3-21. 1995.
109. SHAW, J.M.; WITZKE, K.A. Exercise for skeletal health and osteoporosis prevention. In: Manual for guidelines for exercise testing and prescription. **ACSM'S RESOURCE**, v. 1, p. 238-239. 1998.
110. SHIRAKI, M.; SHIRAKI, Y.; AOKI, C.; HOSOI, T.; INOUE, S.; KANEKI, M.; OUCHI, Y. Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. **J Bone Miner Res**, v. 12, p. 1438–1445. 1997.
111. SIMÕES, R.D.; BARACAT, E.C. Terapia de reposição hormonal e análogos. In: SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose, diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Ed. SARVIER, 2000.
112. SNNELS, H.P. Association between polymorphisms of apolipoprotein E, bone mineral density of the lower forearm, quantitative ultrasound of the calcaneus and osteoporotic fractures in postmenopausal women with hip or lower forearm fracture. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 63(4), p. 247-58. 2003.
113. STEIN, G.S.; LIAN J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. **Endocrine Review**, v. 14, p. 424-442. 1993.
114. STEVENSON, F.C. New treatments for osteoporosis. **J Endocrinol**, v. 135(suppl), p. 9. 1992.
115. SZEJNFELD, V.L. Remodelação óssea. **Osteoporose, diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Ed. SARVIER, 2000.

116. SZULC, P. et al. Serum under – carboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: a three year follow – up study. **Bone**, v. 18, p. 487-8.1996.
117. TABB, M.M. Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. **Journal Biology of Chemistry**, v. 278(45), p. 43919-43927. 2003.
118. TAVINTHARAN, S.; LIM, S.C.; CHAN, Y.H.; SUM, C.F. Apolipoprotein E genotype affects the response to lipid-lowering therapy in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Obesity and Metabolism**, v. 9(1), p. 81-86. 2007.
119. TEITELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, p. 1504-1508. 2000.
120. TRUSS, M.; BEATO, M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. **Endocrine Review**, v. 14, p. 459-478. 1993.
121. TURNER, R.T.; RIGGS, L.B.; SPELSBERG, T.C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine Review**, v. 15, p. 275-300. 1994.
122. TZUKERMAN, M.T. et al. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. **Molecular Endocrinology**, v. 8, p. 21-30. 1994.
123. ULRICH, C.M. et al. Bone mineral density in mother-daughter pairs: relations to lifetime exercise, lifetime milk consumption and calcium supplements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 72-79. 1996.
124. UTERMANN, G.; PRUIN, N.; STEINMETZ, A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. **Clin Genet**, v. 15(1), p. 63–72. 1979.

125. VAN MEURS, J.B. et al. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. **Human Molecular Genetics**, v. 12, p. 1745-1754. 2003.
126. VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 43(6), p. 415-422. 1999.
127. VON MÜHLEN, D.G.; BARRET – CONNOR, E.; SCHNEIDER, D.L.; MORIN, P.A.; PARRY, P. Osteoporosis and apolipoprotein E genotype in older adults: the Rancho Bernardo study. **Osteoporosis International**, v. 12, p. 332 – 335. 2001.
128. WANG, C.L. et al. Association of estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese women: a meta-analysis. **Osteoporosis International**, v. 18, p. 295-305. 2007.
129. WANNMACHER, L. Manejo racional da osteoporose: onde está o real benefício? In: **Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde - Brasil. Terapia de reposição hormonal na menopausa: Evidências atuais**, v. 1(7), p. 1-5. 2004. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/HSE\\_URM\\_OS T\\_0604. pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/HSE_URM_OS_T_0604.pdf) >. Acesso em: 22 jan 2009.
130. WHITE, R. E.; DARKOW, D. J.; LANG, J. L. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. **Circulation Research**, v. 77, p. 936-342. 1995.
131. WILLIAMS, G.A.; KUKREGA, S.C.; BOWSER, E.N. Prolonged effect of estradiol on calcitonin secretion. **Journal Bone and Mineral Research**, v. 1, p. 415-420. 1996.

132. WILSON, P.W.; SCHAEFER, E.J.; LARSON, M.G.; ORDOVAS, J.M. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. a metaanalysis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 16, p.1250–1255.1996.
133. WONG, S.Y.S. et al.The prevalence of ApoE4 genotype and its relationship to bone mineral density in Hong Kong Chinese.**J Bone Miner Metab**, v. 23, p.261-265.2005.
134. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. **Technical Report Series, 843**. Geneva, 1994.
135. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group. **Technical Report Series, 921**.Geneva, 2000.
136. ZAJICKOVA, K. et al. Apolipoprotein E 4 allele is associated with low bone density in postmenopausal women. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26(4), p. 312-315. 2003.
137. ZHANG, R.W. et al. Expression of selected osteogenic markers in the fibroblast like cells of rat marrow stroma. **Calcified Tissue International**, v. 56, p. 283-291. 1995.
138. ZILLIACUS, J. et al. Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 9, p. 389-400. 1995.
139. ZMUDA, J.M.; CAULEY, J.A.; FERREL, R.E. Recent progress in understanding the genetic susceptibility to osteoporosis. **Genetic Epidemiology**, v. 16, p. 356-367. 1999.

## ANEXO I - Parceria do Centro de Densitometria Óssea do Espírito Santo (CEDOES)



**CEDOES**  
diagnóstico e pesquisa

Vitória, 5 de junho de 2006

**A quem interessar possa,**

Venho por meio desta, atestar nossa colaboração nas linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento, liderado pelo Prof. Dr. Ian Victor Silva, localizado no Dept. de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Dentre estas linhas, possuo maior interação com aquelas relacionadas ao projeto **"Estudos dos efeitos do estrogênio, da vitamina K e da APOE sobre o metabolismo ósseo"** nos quais presto assistência técnico-científica tanto na parte clínica e quanto metodológica envolvendo análises de densidade mineral óssea, realizadas nas dependências do Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES), sob minha direção.

Coloco-me a disposição para quaisquer esclarecimentos,

Sérgio Ragi Eis, M.D., C.C.D.  
Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES)  
R. João Silva Abreu, 78  
Praia do Canto - Vitória, ES – CEP: 29055.450  
Tel: (27)2125-0202 e-mail: [seragi@cedoes.com.br](mailto:seragi@cedoes.com.br)

## Anexo II - Parceria do Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento (ITPD)



### TERMO DE COLABORAÇÃO

Este documento serve para orientar o processo de colaboração técnica entre o Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento (ITPD) e o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano.

#### Qualificação das Partes

**Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento (ITPD)**, entidade sem fim lucrativo, com titulação de OSCIP, foi fundado em Julho de 2003 objetivando o desenvolvimento científico e humano nas áreas de genética humana e biologia molecular humana, animal e vegetal. Desde sua fundação o Instituto prima pela qualificação de seus funcionários e pesquisadores desenvolvendo projetos científicos e sociais que beneficiam a população mais carente do Estado do Espírito Santo. O Instituto está representado neste documento pelo seu Secretário Executivo o sr. Bruno Ottoni Tommasi.

**Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento** é parte integrante do Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo. O Laboratório está representado neste documento pelo seu coordenador o Dr. Ian Victor Silva.

#### Da Colaboração

##### Por parte do ITPD

O ITPD se compromete a colaborar nas pesquisas realizadas pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano colocando à disposição deste, a estrutura física, equipamentos e profissionais do ITPD.

##### Equipamentos disponíveis:

- Sequenciador Genético ABI 310
- Termociclador
- PCR em Tempo Real ABI 7300
- Equipamento Fotográfico
- Cubas para eletroforese
- Equipamento para imunoenaios
- Equipamento para dosagens bioquímicas utilizando a tecnologia de química seca.

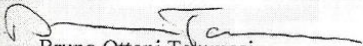


**Por parte do Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento**

O Laboratório se compromete a colaborar nas pesquisas realizadas pelo ITPD com o conhecimento científico de seus pesquisadores.

**Validade do Acordo**

Este termo de colaboração é válido por tempo indeterminado, sendo necessário apenas uma comunicação por escrito com um prazo de 30 dias para rescindi-lo.

  
Bruno Ottoni Tommasi  
Secretário Executivo ITPD

Ian Victor Silva  
Coordenador  
Laboratório de Biologia Celular do  
Envelhecimento

Rua Araribóia, 322  
Centro - Vila Velha  
ES - Cep: 29100-340  
Tel: (27) 3139-9899  
instituto@tommasi.com.br

**ANEXO III - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos****UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Vitória-ES, 28 de março de 2007

Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof. Ian Victor Silva  
Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Efeitos do Estrogênio, da ApoE e da Vitamina K sobre o Metabolismo Ósseo”**

Senhor Pesquisador,

Informamos à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Protocolo de Pesquisa, No. de Registro no **CEP-018/07**, intitulado: **“Efeitos do Estrogênio, da ApoE e da Vitamina K sobre o Metabolismo Ósseo”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 28 de março de 2007.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fausto Edmundo Lima Pereira".

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Centro Biomédico / UFES

## ANEXO IV - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Departamento de Morfologia - CBM**

**Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento**

**Projeto de pesquisa:** “Efeitos do estrogênio, da vitamina K e da ApoE sobre o metabolismo ósseo”.

**Área de conhecimento:** Biotecnologia.

**Patrocinador e Colaboradores da pesquisa:** Prefeitura Municipal de Vitória – FACITEC, Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento e Centro de Densitometria Óssea do Espírito Santo – CEDOES.

**Nome dos pesquisadores e colaboradores da pesquisa:** Prof. Dr. Ian Victor Silva, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Batista Azevedo Rangel, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana dos Santos Meyrelles, Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez, Dr. Sérgio Ragi Eis, Bruno Tommasi, Breno Valentin Nogueira, Leticia Soncini de Souza, Guilherme Henrique de Souza Campos, Frederico Ledig, Bruna Ferreira Macedo, Livia S. Borgo, Karine L. de Araújo, Klesia P. Madeira, Renata Dalmaschio Daltoé.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Folha de informação:

Você foi convidado para participar de um estudo. O estudo está sendo conduzido pelo Prof. Dr. Ian Victor Silva, do Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento, da Universidade Federal do Espírito Santo. Você terá que decidir se deseja ou não participar.

Este documento possui dois objetivos. Primeiro, dar informações específicas sobre o estudo que está sendo desenvolvido e sobre os potenciais benefícios e riscos envolvidos na participação para que você possa dar seu consentimento informado para participar. Em segundo lugar, este documento descreve quais informações serão obtidas sobre você durante o estudo, como estas informações serão utilizadas e quem terá acesso a elas.

Por favor, use o tempo necessário para decidir. Leia este termo de consentimento com atenção e pergunte ao Coordenador do estudo, ou a alguém de sua equipe, qualquer dúvida que você possa ter. Caso você concorde em participar do estudo e autorize o uso e divulgação das informações referentes à participação e que a identifiquem, você será convidado a assinar este termo na última página.

#### 1. Porque este estudo está sendo realizado?

Vários aspectos e características humanas estão associados à maior ou menor chance de desenvolver osteoporose e, ainda, ao seu prognóstico. Um desses aspectos, que vem sendo identificado na literatura científica, é a associação tanto de níveis sanguíneos de vitamina K quanto um tipo de proteína que está associada à síntese de colesterol, a Apolipoproteína E (ApoE), com o metabolismo ósseo. Este estudo pretende obter uma melhor compreensão dos mecanismos deste metabolismo para que, no futuro possamos intervir de maneira mais eficaz em seu tratamento, assim como uma melhor avaliação prognóstica em cada caso. Nenhum medicamento novo ou teste diagnóstico em pesquisa serão administrados ou utilizados neste estudo.

#### 2. Quem deve participar deste estudo?

Você poderá participar do estudo se apresentar as seguintes condições:

- Ser mulher já na pós-menopausa;
- Tiver idade igual ou superior a 50 anos;
- Se você consentir em participar; e
- Se você for autônoma habulatorial e cognitivamente.

Podem existir razões pelas quais você não possa participar deste estudo. Como exemplo:

- Se você utilizou nos últimos seis meses Terapia de Reposição Hormonal Estro-Progestagênica – TH (Estrógenos, progestágenos ou Tibolona);
- Se você utilizou nos últimos seis meses medicamentos a base de corticóides, citostáticos ou inibidores da aromatase; e
- Se você participou, nos últimos doze meses, de algum estudo clínico com medicamento em investigação.

### **3. O que deverei fazer?**

O Coordenador do estudo, ou sua equipe, irão lhe perguntar sobre sua história médica. Você não receberá nenhum medicamento no estudo nem produto experimental. Somente será necessário realizar uma visita para o estudo. Nesta visita, que será no Centro de Densitometria Óssea do Espírito Santo – CEDOES, o Coordenador do estudo ou alguém de sua equipe, poderá realizar algumas ou todas as atividades descritas a seguir:

- Revisar junto com você este termo de consentimento e pedir que você o assinasse caso queira participar do estudo;
- Medir sua altura e peso;
- Coletar amostras de sangue para exames laboratoriais (10 a 30 ml, o que corresponde até duas colheres de sopa);
- Examinar a última densitometria óssea realizada para avaliação da composição corporal.

As amostras biológicas coletadas serão usadas apenas para este estudo e para os exames laboratoriais descritos neste projeto. Este material não será utilizado para outros objetivos.

### **4. Por quanto tempo eu participarei do estudo?**

Você estará envolvido no estudo, de apenas uma visita, por algumas horas.

### **5. Quantas pessoas irão participar do estudo?**

Aproximadamente 200 (duzentas) mulheres deverão participar deste estudo, sendo 100 (cem) mulheres participando do grupo controle.

### **6. Que efeitos indesejáveis (ruins) podem ocorrer comigo por participar deste estudo?**

A coleta de sangue a ser realizada neste estudo é idêntica à realizada de praxe em exames médicos rotineiros. Assim, sabe-se que pode causar algum desconforto. Os possíveis efeitos indesejáveis (ruins) da coleta de sangue incluem desmaios, inflamação da veia, dor, hematoma ou sangramento no local da picada da agulha. O Coordenador do estudo, ou alguém de sua equipe poderá conversar e esclarecer melhor sobre o risco deste procedimento do estudo com você.

### **7. Que benefícios posso esperar por participar deste estudo?**

Como este estudo não irá oferecer tratamento, nenhum benefício direto é esperado. No entanto, a ciência pode se beneficiar das informações que serão obtidas.

### **8. Quais informações que me identifiquem serão coletadas pelo Coordenador do estudo e/ou alguém de sua equipe?**

As informações são:

- Data de nascimento;
- Datas relativas ao tratamento médico;
- Histórico médico e de saúde, incluindo anotações de médicos e registros hospitalares;
- Informações obtidas através dos procedimentos usados para determinar se você pode entrar no estudo, incluindo exames laboratoriais para diagnóstico ou informações sobre medicamentos prescritos para você, por seu médico;
- Quando você entrou na menopausa;

- Altura e peso;
- Coleta de sangue para realização de exames como parte do estudo.

**9. A quem o Coordenador do estudo e sua equipe fornecerão estas informações e o que eles farão com elas?**

O Coordenador do estudo e sua equipe não fornecerão suas informações pessoais para outros. Pode ocorrer a necessidade de compartilhar algumas informações com o Comitê de Ética ou com Agências Regulatórias Nacionais, Estaduais ou Municipais. Nesses casos, seus dados serão codificados e incluirão apenas:

- As iniciais de seu nome;
- Data de seu nascimento; e
- Datas do seu tratamento.

**10. Eu receberei informações relativas a mim, obtidas a partir deste estudo?**

Sim. Quando os resultados dos exames estiverem prontos, eles estarão disponíveis para que você possa recebê-los quando assim desejar.

**11. Eu serei paga?**

Você não terá despesas com relação ao estudo (com exames e demais procedimentos) e também não receberá pagamento pela participação neste estudo.

**12. A quem devo procurar se tiver dúvidas?**

Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas com o Pesquisador Responsável, Prof. Dr. Ian Victor Silva, na Universidade Federal do Espírito Santo – Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento, ou através do telefone (27) 3335-7369. Além disso, informações adicionais poderão ser fornecidas com o Dr. Sérgio Ragi Eis, no Centro de Densitometria Óssea do Espírito Santo – CEDOES, ou através do telefone (27) 2125-0202, ou ainda pelo presidente da Comissão de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, através do telefone (27) 3335-7210.

**13. Eu posso me recusar a participar do estudo?**

Sim. Sua participação no estudo é voluntária. Você pode decidir não participar dele. Você também pode desistir de participar a qualquer momento avisando ao Coordenador do estudo e/ou a sua equipe.

**14. Posso participar deste estudo se eu não assinar este termo?**

Não. Se decidir não assinar este termo de consentimento, você não poderá participar do estudo. Você receberá uma cópia assinada deste formulário de consentimento se for participar da pesquisa.

Eu li e entendi este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todas as minhas dúvidas foram respondidas. Decidi participar deste estudo voluntariamente.

Nome da paciente: \_\_\_\_\_  
Assinatura da paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome da testemunha\*: \_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha\*: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome da pessoa que conduziu a revisão do consentimento: \_\_\_\_\_  
Assinatura da pessoa que conduziu a revisão do consentimento: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\* A assinatura da testemunha só se fará necessária, se o paciente tiver um responsável legal e/ou for incapaz de ler e/ou fornecer consentimento por escrito.

## ANEXO V - Anamnese Clínica



### Anamnese Clínica do Estudo:

“Efeitos do estrogênio, da vitamina K e da ApoE sobre o metabolismo ósseo”.

Registro:	_____	Iniciais:	_____	Data de Nascimento:	_____								
Data da coleta de sangue:	_____												
PA:	_____	x	_____	mmHg	Pulso:	_____	Bpm	Peso:	_____	Kg	Altura:	_____	cm

#### 1. Critérios de Inclusão

⇒ Idade $\geq$ 50 anos	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Pós- menopausada	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Paciente Capaz de deambular livremente	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Assinado	<input type="checkbox"/> SIM em	<input type="checkbox"/> NÃO

#### 2. Critérios de Exclusão

Evidências em exames, história médica, DXA ou RX de: <i>(alguns exames serão realizados na fase de screening)</i>		
⇒ Doença/Condição Médica <u>Significativa</u>	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Doença Maligna Diagnosticada nos últimos 10 anos anteriores (ou câncer de mama nos últimos 20 anos) ao TCLE (exceto Basalioma removido)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Hipersensibilidade aos Bisfosfonatos ou seus componentes	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Contra-indicações ao tratamento com Cálcio e Vitamina D	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ WBC (Leucopenia) $<$ 2.500/mL	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ TGO ou TGP acima do normal (aumentada $>$ 2 vezes o valor normal)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Albumina Sérica $<$ 3.0 g/dL	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Clearance de Creatinina $<$ 35 mL/min, calculo segundo equação de Cockcroft & Gault	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ História de Sangramento Digestivo alto nos últimos 12 meses tendo requerido hospitalização ou internação hospitalar	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Úlcera péptica recorrente documentada por radiografia ou endoscopia	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Dispepsia ou refluxo gastro-esofágico não controlado com medicação	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Úlceras gástricas e duodenais ativas	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Doença Hepática Crônica (ou gástrica) ou Síndromes Disabsortivas Severas	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Alcoolismo Crônico	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Hiperparatireoidismo Primário (exceto quando cirurgicamente tratado com Cálcio e PTH normais)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Doença de Paget ou Osteomalácia Documentada	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Em uso de bisfosfonatos orais nos últimos 6 meses, por mais de 1 mês no último ano ou por mais de 3 meses nos últimos 2 anos ou, ainda, uso de bisfosfonatos intravenosos a qualquer tempo	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Uso de qualquer produto sob investigação durante 30 dias anteriores à primeira dose do IBN ou ALN	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Uso de fluoreto ou Estrôncio nos últimos 12 meses ou passado de tratamento por mais de 2 anos	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Uso de teriparatida (PTH 1,34) dentro de 2 anos	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO
⇒ Nos últimos 6 meses: Corticosteróide oral, parenteral ou inalatório (altas doses), Ciclosporina, metotrexato, tacrolimus (exceto tópico), Estrógenos, Progestágenos, Calcitriol ou Calcitonina	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO







## Evaluation of PvuII and XbaI polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene (ESR1) in relation to menstrual cycle timing and reproductive parameters in post-menopausal women

Ian Victor Silva<sup>a,b</sup>, Lucas Cunha Dias Rezende<sup>a,b</sup>, Sylvania Pereira Lanes<sup>a,b,e</sup>,  
 Letícia Soncini Souza<sup>a,c</sup>, Klesia Pirola Madeira<sup>a,b</sup>, Murilo Fanchiotti Cerri<sup>a,b</sup>,  
 Marcela Ferreira Paes<sup>a,b</sup>, Renata Dalmaschio Daltoé<sup>a,b</sup>, Antônio Chambô-Filho<sup>d</sup>,  
 Marco César Cunegundes Guimarães<sup>a,b,c</sup>, Jones Bernardes Graceli<sup>c</sup>,  
 Leticia Batista Azevedo Rangel<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/RENORBIO, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

<sup>d</sup> Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), Vitória, Espírito Santo, Brazil

<sup>e</sup> Criobanco Inc., Vitória, Espírito Santo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 February 2010

Received in revised form 19 July 2010

Accepted 19 August 2010

#### Keywords:

Estrogen receptor  
 Menarche  
 Menopause  
 Polymorphism  
 Reproduction

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the association of –397T>C and –351A>G single nucleotide polymorphisms (SNPs) – also called PvuII and XbaI, respectively – located on estrogen receptor alpha (ESR1) gene with age at menarche, menopause onset, fertility and miscarriage in a population of post-menopausal women. **Study design:** Cross-sectional study with 273 healthy, high miscegenated, post-menopausal women (mean age of 63.1 ± 9.7 years old). Subjects were genotyped for PvuII and XbaI SNPs by PCR-RFLP and confirmed by automatic sequencing. Reproduction informations (age at menarche, age at menopause, number of pregnancies, fertility rate and miscarriages) were obtained by retrospective study using a questionnaire. **Result(s):** Age at menarche, menopause onset, number of pregnancies, total fertility rate, and parity did not seem to be influenced by any of the studied genotypes (chi-square,  $p > 0.05$ ). However, women carrying the xx genotype showed a 44% higher chance of miscarriage, whereas this value did not trespass 16% for any other genotype analyzed. It has been also observed a higher occurrence of miscarriage in association with combined xxpp genotype of ESR1 gene (chi-square,  $p < 0.01$ ). **Conclusion(s):** The present data indicate that the studied SNPs on ESR1 gene do not influence the menstrual cycle timing and parity but there is a strong relationship between the xx ESR1 SNP genotype and the incidence of miscarriage in the post-menopausal population analyzed.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Menarche and menopause are milestone events in determining women fertility lifespan. In this context, ages at menarche and menopause are noteworthy parameters of female reproduction capacity, so that it is clinically important to identify factors influencing menstrual cycle timing [1,2]. Epidemiological studies have already demonstrated that an early onset of menopause is related with higher risks of cardiovascular diseases [3], osteoporosis [4], obesity [5], depression [6], and ovarian cancer [7]. On the

other hand, it is known that delayed menopause increases the risk of endometrial and breast cancer [8].

Human fertility and menstrual cycle timing are determined by interactions between genetic and environmental factors. Studies conducted in identical twins have revealed that genetic factors represent the most significant component of human fertility [1,2]. In these studies, some of the most important aspects of women's fertility, such as the age at first conception, waiting time to first pregnancy, and number of offspring were used to establish the preponderance of genetic factors in this matter [1,2]. Nonetheless, genetic factors were shown to contribute greatly to the timing of both onset and cessation of the menstrual cycle [9,10], and also it was stated that the genetic contribution may be more important than environmental effects, but the specific genes involved in this event are not well defined [11–13].

\* Corresponding author at: Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Zip code: 29040-090, Vitória, Espírito Santo, Brazil.  
 E-mail address: lbarangel@yahoo.com (L.B.A. Rangel).

## ANEXO VII - ARTIGO SUBMETIDO 1: Revista Molecular Biology Reports, 2013 - Comprovante de submissão do artigo à revista

Editorial Manager® - Mozilla Firefox  
Arquivo Editar Exibir Histórico Favoritos Ferramentas Ajuda  
Fvdi MOLE - Submission Confirmation... - Editorial Manager®  
www.editorialmanager.com/mole/default.asp  
Molecular Biology Reports  
HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS  
Role: Author Username: iasilva@pq.cnpq.br

**Submissions Being Processed for Author Ian Victor Silva, Phrmd, PhD**

Page: 1 of 1 (3 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Reference Checking Results</a> <a href="#">Send Email</a>	MOLE-7100	Effects of SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) of estrogen receptor alpha (ESR1) gene to serum lipid profile depends on age and BMI in elderly women.	Apr 16, 2013	Apr 27, 2013	Under Review
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Reference Checking Results</a> <a href="#">Send Email</a>	MOLE-6940	APOE genotypes are differentially associated to Bone Mineral Density and Fractures in Brazilian Post Menopausal women	Mar 22, 2013	Apr 13, 2013	Under Review
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Reference Checking Results</a> <a href="#">Send Email</a>	MOLE-6820	Estrogen Receptor Alpha (ERS1) SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) are Risk Biomarkers for Breast Cancer Development.	Mar 05, 2013	Mar 06, 2013	Under Review

Page: 1 of 1 (3 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

PT 12:45 26/08/2013

## Molecular Biology Reports

### Effects of SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) of estrogen receptor alpha (ESR1) gene to serum lipid profile depends on age and BMI in elderly women.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	MOLE-7100
<b>Full Title:</b>	Effects of SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) of estrogen receptor alpha (ESR1) gene to serum lipid profile depends on age and BMI in elderly women.
<b>Article Type:</b>	Manuscript
<b>Keywords:</b>	Estrogen receptor, polymorphism, lipid profile, body mass index, aging.
<b>Corresponding Author:</b>	Ian Victor Silva, PhmD, PhD Universidade Federal do Espirito Santo Vitoria, Espirito Santo BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Espirito Santo
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Leticia Soncini De Souza, Msc
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Leticia Soncini De Souza, Msc Leticia Batista Azevedo Rangel, PharmD, PhD Teodiano Bastos Freire Filho, PhD Fernando Luiz Herkenhoff Vieira, MD, PhD Bruno Ottoni Tommasi, PharmD, Msc Sergio Ragi Eis, MD Jones Bernardes Graceli, PhD Ian Victor Silva, PhmD, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Suggested Reviewers:</b>	Patrice J Morin, PhD Professor, National Institutes on Aging pmorin@nia.nih.gov.br Expert in Genetics and Molecular Biology  Steven Austad, PhD Professor, University of Texas Health Science Center at San Antonio austad@uthscsa.edu Expert in Aging Biology  Celso Caruso-Neves, PhD Associate Professor, Universidade Federal Do Rio de Janeiro carusoneves@biof.ufrj.br Expert in Physiology  William B Guggino, PhD Associate Professor, The Johns Hopkins University wguggino@jhu.edu Expert in Physiology and Molecular Biology  Doris Rosenthal, MD, PhD Professor, Universidade Federal Do Rio de Janeiro doris@biof.ufrj.br

	Expert in Endocrinology
	Denelle Hensley, MD Professor, East Tennessee State University jcdeditor@etsu.edu Expert in Human Aging and DXA

## Title page

[Click here to download Manuscript: Title Page ER MBR.doc](#)

[Click here to view linked References](#)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Effects of SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) of estrogen receptor alpha (ESR1) gene to serum lipid profile changes in elderly women depends on age and BMI.

Leticia S Souza<sup>1,2\*</sup>, Leticia BA Rangel<sup>1,2\*</sup>, Teodiano F Bastos Filho<sup>2,3</sup>, Fernando Luiz H Vieira<sup>1,4</sup>, Bruno O Tommasi<sup>5</sup>, SergioR Eis<sup>6\*\*</sup>, Jones B Graceli<sup>1,2</sup>, and Ian V Silva<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup> Ageing Cell Biology Laboratory, Department of Morphology, Health Sciences Center, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Health Sciences Center, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

<sup>3</sup> Intelligent Automatization Laboratory, Dep. Electric Engineering, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

<sup>4</sup> Physiological Sciences Department, Health Sciences Center, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

<sup>5</sup> Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento, Vila Velha, Espírito Santo, Brazil.

<sup>6</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo – CEDOES, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

*\* In memoriam of our beloved friend and co-worker, Dr. Sergio Ragi Eis;*

Running Title: Effects of ESR1 polymorphisms on serum lipid profile in elderly women.

**Key Words: Estrogen receptor alpha gene (ESR1), SNPs, lipid metabolism, ageing, BMI.**

Word Count: 4583 words.

Research grants: FACITEC n°017/2006 and n°036/2006, DECIT-SUS n°31614990/2005, FAPES n°172.1/2005, CNPq n° 480807/2006 and CAPES.

Disclosure Statement: Authors state there is not any competing financial interest.

## ANEXO VIII - ARTIGO SUBMETIDO 2: Revista Molecular Biology Reports, 2013 - Comprovante de submissão do artigo à revista

Editorial Manager® - Mozilla Firefox  
Arquivo Editar Eybir Histórico Favoritos Ferramentas Ajuda  
Fwd: MOLE - Submission Confirmati... x Editorial Manager®  
www.editorialmanager.com/mole/default.asp  
Molecular Biology Reports  
HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS  
Role: Author Username: iasilva@pq.cnpq.br

**Submissions Being Processed for Author Ian Victor Silva, PhrMD, PhD**

Page: 1 of 1 (3 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Reference Checking Results</a> <a href="#">Send E-mail</a>	MOLE-7100	Effects of SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) of estrogen receptor alpha (ESR1) gene to serum lipid profile depends on age and BMI in elderly women.	Apr 16, 2013	Apr 27, 2013	Under Review
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Reference Checking Results</a> <a href="#">Send E-mail</a>	MOLE-6940	APOE genotypes are differentially associated to Bone Mineral Density and fractures in Brazilian Post-Menopausal women	Mar 22, 2013	Apr 13, 2013	Under Review
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View Reference Checking Results</a> <a href="#">Send E-mail</a>	MOLE-6820	Estrogen Receptor Alpha (ERS1) SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) are Risk Biomarkers for Breast Cancer Development.	Mar 05, 2013	Mar 08, 2013	Under Review

Page: 1 of 1 (3 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

PT 12:45 26/08/2013

**Molecular Biology Reports**  
**APOE genotypes are differentially associated to Bone Mineral Density and fractures in  
Brazilian Post Menopausal women**  
--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	MOLE-6940
<b>Full Title:</b>	APOE genotypes are differentially associated to Bone Mineral Density and fractures in Brazilian Post Menopausal women
<b>Article Type:</b>	Manuscript
<b>Keywords:</b>	Osteoporosis, APOE, isoforms, menopause, Bone Mineral Density.
<b>Corresponding Author:</b>	Ian Victor Silva, PhrMD, PhD Universidade Federal do Espirito Santo Vitoria, Espirito Santo BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Espirito Santo
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Leticia Soncini De Souza, Msc
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Leticia Soncini De Souza, Msc Leticia Batista Azevedo Rangel, PharmD, PhD Teodiano Bastos Freire Filho, PhD Fernando Luiz Herkenhoff Vieira, MD, PhD Sergio Ragi Eis, MD Diego Franca Pedrosa, PhysD, Msc Rafaella Papalino Lopes Magnano, PhysD, Msc Jones Bernardes Graceli, PhD Ian Victor Silva, PhrMD, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Suggested Reviewers:</b>	Patrice J Morin, PhD Scientist, National Institutes on Aging MorinP@grc.nia.nih.gov Expert in molecular genetics  Steven Austad, PhD Professor, University of Texas Health Science Center at San Antonio austad@uthscsa.edu Expert in aging  William Guggino, PhD Professor, The Johns Hopkins University wguggino@jhu.edu Expert in Physiology  Celso Caruso-Neves, PhD Associate Professor, Universidade Federal Do Rio de Janeiro carusoneves@biof.ufrj.br Expert in Physiology  Gary Stein, PhD

	Professor, University of Massachusetts Medical Center, gary.stein@banyan.ummed.edu Editor MBR
	Will D Leslie, MD Professor, University of Manitoba bleslie@sbgh.mb.ca Osteoporosis expert

Manuscript

[Click here to download Manuscript: Paper APOE BMD.doc](#)

[Click here to view linked References](#)

1 APOE genotypes are differentially associated to Bone Mineral Density and fractures in Brazilian  
2 Post Menopausal women

3  
4 Leticia S. Souza<sup>1,2\*</sup>, Leticia B. A. Rangel<sup>1,2,3\*</sup>, Teodiano B. Freire Filho<sup>1,2,4</sup>, Fernando Luiz H.  
5 Viera<sup>2,5</sup>, Sergio R. Eis<sup>6\*\*</sup>, Diego F. Pedrosa<sup>1,2</sup>, Rafaella P. Lopes Magnano<sup>1,2</sup>, Jones B. Graceli<sup>1,2</sup>,  
6 Ian V. Silva<sup>1,2#</sup>  
7

8  
9 <sup>1</sup> Ageing Cell Biology Laboratory, Department of Morphology, Health Sciences Center, Universidade  
10 Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

11  
12 <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Health Sciences Center, Universidade Federal do  
13 Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

14  
15 <sup>3</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Biology of Cancer, Department of Pharmaceutical Sciences,  
16 Health Sciences Center, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

17  
18 <sup>4</sup> Laboratory of Artificial Intelligence, Electrical Engineering Department, Universidade Federal do  
19 Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

20  
21 <sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Health Sciences Center, Universidade Federal do  
22 Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

23  
24 <sup>6</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo – CEDOES, Vitória, Espírito Santo,  
25 Brazil.

26  
27 \* Both authors contributed equally for this paper.

28  
29 \*\* *In memoriam*.

30  
31 # Corresponding Author.

32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45 **RUNNING TITLE: Role of isoforms of apolipoproteina E (ApoE) in postmenopausal osteoporosis.**

46  
47  
48  
49  
50  
51 Key words: Osteoporosis, APOE, isoforms, menopause, Bone Mineral Density.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65