CLAUDIO LERA ORSATTI

Avaliação do polimorfismo genético da lecitina ligante de manose (MBL2) e da expressão gênica dos receptores Toll-Like (TLR) como bio-marcadores do risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: PROFA. ELIANA AGUIAR PETRI NAHAS

CO-ORIENTADOR: PROF. STEVEN WITKINS

BOTUCATU

2014

CLAUDIO LERA ORSATTI

Avaliação do polimorfismo genético da lecitina ligante de manose (MBL2) e da expressão gênica dos receptores Toll-Like (TLR) como bio-marcadores do risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", para obtenção do Título de Doutor.

BOTUCATU

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Orsatti, Claudio Lera.
Avaliação do polimorfismo genético da lecitina ligante de manose (MBL) e da expressão gênica dos receptores Toll-Like (TLR) como bio-marcadores do risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa / Claudio Lera Orsatti. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Eliana Aguiar Petri Náhas
Coorientador: Steven S Witkin
Capes: 40101150

1. Polimorfismo (Genética). 2. Citocinas. 3. Expressão gênica. 4. Menopausa. 5. Sistema cardiovascular - Doenças.

Palavras-chave: Citocinas; Doença Cardiovascular; Lectina Ligante de Manose; Menopausa; Receptores Toll Like.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê"

(Arthur Schopenhauer)

A Deus,

Que por sua presença, luz e força sempre me abençoando e capacitando para tudo aquilo que Ele me destina, pois, nada pode impedir nosso brilho quando temos as mãos de Deus para acender a luz de nossa vitória.

DEDICATÓRIA

*A **Débora M. Orsatti**, minha maravilhosa esposa,*

Muito obrigado pelo amor, dedicação, paciência, confiança, segurança, humildade e por reconhecer meus limites.

Um dia me disseram que o sorriso é a melhor forma de mostrarmos o quanto amamos alguém e hoje me perguntam se eu amo minha esposa... Eu sorrio...

*A minha mãe **Marcia Orsatti** e avó **Inês Lera**,*

Pelo amor incondicional, por terem ficado ao meu lado sempre me auxiliando em todos os momentos. Sem essa presença e força de vocês eu jamais conseguiria alcançar esse caminho. Amo vocês!

"Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado."

(Roberto Shinyashiki)

A amável saudade do meu pai Dr. Massimo Orsatti...

Naquela mesa ele sentava sempre
E me dizia sempre, o que é viver melhor.
Naquela mesa ele contava histórias,
Que hoje na memória eu guardo e sei de cor.

Naquela mesa ele juntava gente
E contava contente o que fez de manhã.
E nos seus olhos era tanto brilho,
Que mais que seu filho, eu fiquei seu fã.

Eu não sabia que doía tanto
Uma mesa no canto, uma casa e um jardim.
Se eu soubesse o quanto dói a vida,
Essa dor tão doída não doía assim.

Agora resta uma mesa na sala
E hoje ninguém mais fala no seu bandolim.
Naquela mesa tá faltando ele
E a saudade dele tá doendo em mim.
(Sérgio Bittencourt)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor e irmão Fábio Lera Orsatti,

Obrigado, por às vezes só "jogar conversa fora". Gosto tanto disso! Por estar sempre comigo seja no choro ou no riso; por dizer-me não somente o que quero ouvir, mas principalmente o que é preciso ouvir! Obrigado pela mão amiga, pela cumplicidade e pela sua amizade tão sincera. Obrigado por estar sempre disposto e por ter se tornado o primeiro nome que me vem a mente quando preciso de ajuda!

Obrigado irmão!

AGRADECIMENTOS

A Professora **Eliana Aguiar Petri Náhas**,

Pelo aceite, por ser tão paciente, pela sua maravilhosa ajuda em meu cresimento em pesquisa e pelas oportunidades proporcionadas ao meu crescimento científico.

Ao Professor **Steven S Witkin**, mentor e colaborador desta pesquisa, meu muito obrigado.

Por melhor que nos tornemos, sempre precisaremos, em algum momento, dar as mãos para alcançarmos uma meta. Assim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À família **Lera e Orsatti**, pelo amor, apoio, compreensão e dedicaçãoem toda a minha vida, obrigado por sempre acreditarem em mim.

A **todos os Docentes do Departamento de Ginecologiae Obstetrícia,** pela valiosa contribuição.

Ao Professor **Jorge Náhas Neto**, por sempre me ajudar nas duvidas e esclarecimentos da pesquisa.

À Professora **Maria Terezinha Serrão Peraçoli**, no qual abriu as porta de seu laboratório, muito obrigado pela confiança, ensinamento, com muita competência, ética e seriedade.

Ao Professor **Gilberto Uemura**, muito obrigado pela ajuda, atenção, dedicação no desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os **meus amigos**, pela amizade e consideração. E em especial, ao **Eduardo Amando de Barros Filho**, meu irmão de coração**"... quem tem um irmão de coração tem um tesouro."** Pela valiosa amizade, alegrias, conversas.

Ao **Grupo de Apoio a Pesquisa** (GAP), pela importante acolhida e auxílio, consideração, clareando os caminhos estatísticos.

Aos **funcionários** da Secretaria do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, e do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, pela sempre prontidão e apoio profissional.

Agradeço **a todas as pacientes** que participaram desta pesquisa.

Esta pesquisa contou com o apoio financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Auxílio à Pesquisa- Processo nº 2009/14884-2

Bolsa de Doutorado- Processo nº 2009/18256-6

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	**xx**
1. Introdução	**01**
1.1. Fatores de risco cardiovascular	**01**
1.2. Obesidade e Síndrome metabólica	**04**
1.3. Marcadores imuno-inflamatórios da doença cardiovascular	**06**
1.3.1. Citocinas	**07**
1.3.2. Receptores *Toll-like* (TLRs)	**09**
1.3.3. Lecitina Ligante de Manose (MBL)	**10**
1.4. Justificativa	**12**
2. Publicações	
2.1. Artigo Original I	
Associação do polimorfismo genético da lectina ligante de manose (MBL2) com os fatores de risco para doença cardiovascular em mulheres na pós-menopausa.	**21**
2.2. Artigo Original II	
Avaliação da expressão de receptores Toll-Like 2 e 4 e do perfil de citocinas em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica	**47**
3. Anexos	
3.1. Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB.	**74**
3.2. Anexo II- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	**75**
3.3. Anexo III- Escore de Risco de Framinghan (ERF) para mulheres.	**76**

Lista de Abreviaturas

Acidente Vascular Cerebral	AVC
Circunferência da Cintura	CC
Domínio de Reconhecimento De Carboidrato	CRD
Colesterol Total	CT
Doença Arterial Coronariana	DAC
Doença Cardiovascular	DCV
Enzime-Linked immuno sorbent assay	ELISA
Escore de Risco de Framinghan	ERF
Faculdade de Medicina de Botucatu	FMB
Fator de Crescimento Tumoral Beta	TGF-β
Fator de Necrose Tumoral Alfa	TNF-α
Fatores de Risco	FR
Hipertensão Arterial Sistêmica	HAS
Homeostasis Model Assessment- Insulin Resistant	HOMA-IR
Índice De Massa Corpórea	IMC
Infarto Agudo Do Miocárdio	IAM
Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística	IBGE
Interleucinas	IL
Intervalo De Confiança	IC

International Diabetes Federation	IDF
Lecitina Ligante De Manose	MBL
Metabolic Syndrome	MetS
National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel	NCEP/ATP III
Pesquisa De Orçamentos Familiares	POF
Pressão Arterial	PA
Pressão Arterial Sistólica E Diastólica	PAS e PAD
Proteína C-Reativa	PCR
Reação de Cadeia de Polimerase	PCR
Receptores Toll-Like	TLRs
Relação Cintura/Quadril	RCQ
Resistência Insulínica	RI
Síndrome Metabólica	SM
Terapia Hormonal	TH
Termo De Consentimento Livre E Esclarecido	TCLE
Triglicerídeos	TG
Woman On The Move Through Activity And Nutrition	WOMAN
World Health Organization	WHO

1. Introdução

Com a crescente elevação na expectativa de vida das mulheres, maior atenção é dada à menopausa e às suas consequências. A doença cardiovascular (DCV) apresenta risco que aumenta ao longo de toda a vida, com especial incremento em mulheres na pós-menopausa (1). No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC) são as principais causas de morte em mulheres acima de 50 anos de idade. Em 2011, IAM e AVC foram responsáveis por 174.951 mortes, destas 80.620 ocorreram em mulheres. Apesar do risco de câncer de mama ser a principal preocupação das mulheres, a maior incidência de morte se refere a DCV, um índice de 53% comparado aos 4% do câncer de mama (2). Em consonância a estas evidências epidemiológicas, a deficiência estrogênica é considerada fator relevante na etiopatogenia da doença arterial coronariana (DAC). Nas mulheres, as manifestações clínicas da DAC aparecem em média cerca de 10 anos mais tardiamente que em homens, possivelmente explicado pela proteção cardiovascular dos estrogênios (3, 4). A DAC é decorrente de processo multifatorial de evolução progressiva, que estão envolvidos vários fatores de risco como hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes, estresse, sedentarismo e obesidade (5).

1.1. Fatores de risco cardiovascular

O conceito de fatores de risco (FR) cardiovascular constitui-se de importância no desenvolvimento de estratégias para prevenção da DAC (6). A estimativa do risco de doença aterosclerótica resulta do somatório de cada um dos FR mais a potenciação causada por sinergismos entre alguns desses fatores (7). O Escore de Risco de Framinghan (ERF) é recomendado para avaliação global do risco cardiovascular na

prevenção primária. O ERF estima o risco absoluto de um indivíduo desenvolver DAC (angina, infarto agudo do miocárdio ou morte), clinicamente manifesta em 10 anos, em ambos os sexos (8). O sistema de escore utilizado para estimativa de risco, criado pelos investigadores do *Framingham Heart Study,* considera as seguintes variáveis: sexo, idade, colesterol total, HDL, pressão arterial, tabagismo e diabetes. O ERF é utilizado para pessoas sem DAC conhecida e por um período não superior a 10 anos. Esse escore faz a triagem de pacientes dentro de três categorias: alto risco (probabilidade >20% de desenvolver DAC), risco intermediário (probabilidade entre 10-20%) e baixo risco (probabilidade <10%). No caso de diabetes, o estudo de *Framingham* mostrou que tem papel significativo como FR para mulheres, classificando-as em alto risco independentemente da presença ou não de outros FR. Indivíduos com manifestações clínicas da DAC são identificados como de alto risco para apresentar novos eventos cardiovasculares em 10 anos (8). Um evento coronariano agudo é a primeira manifestação da doença aterosclerótica, em pelo menos metade das pessoas. Em mulheres, a DAC é frequentemente fatal, sendo que mais da metade não apresentam sintomas prévios (1). A identificação dos indivíduos assintomáticos, que estão mais predispostos é crucial na prevenção efetiva com a correta definição de metas terapêuticas.

Em pesquisa epidemiológica, *InterHeart Study* procurou identificar os fatores de risco para o IAM em diferentes populações (52 países), total de 15.152 casos e 14.820 controles. Os investigadores observaram nove FR facilmente mensuráveis: tabagismo, dislipidemia, HAS, diabetes, obesidade, dieta, atividade física, consumo de álcool e fatores psicossociais. Estes foram os mesmos em todas as regiões, nos diferentes grupos étnicos, sendo consistentes em ambos os sexos. Interessante ressaltar que fatores de risco modificáveis representaram 90% do risco de IAM na população de homens e

mulheres. Contudo, o impacto da HAS ou diabetes é maior para mulheres, assim como o efeito protetor do exercício físico é mais evidente. A média de idade para o primeiro infarto foi de 8-10 anos inferior para homens em relação às mulheres (7). Posteriormente, outra pesquisa objetivou determinar se existiram diferenças na distribuição dos FR entre homens e mulheres no *InterHeart Study,* na tentativa de explicar a diferença na idade de ocorrência do primeiro infarto. Os autores não encontraram diferenças entre os sexos. Contudo, observaram que a ocorrência dos principais FR foi mais precoce em homens quando comparados às mulheres (3).

O risco absoluto para DAC aumenta com a idade, resultado do progressivo acúmulo da aterosclerose coronariana (3). O reconhecimento dos indicadores do risco pode ser utilizado pelos médicos para avaliar o risco individual das pacientes em desenvolver a DAC (9). A idade tem grande poder determinante de risco para DAC em curto prazo na população moderna, pois 90% dos óbitos ocorrem em indivíduos com idade de 55 anos ou mais (10). Todavia, FR modificáveis merecem especial atenção:

1- O tabagismo é importante FR para o IAM (11), provavelmente desestabilizando placas ateromatosas coronarianas e promovendo ruptura e trombose (6). A porcentagem de risco atribuído ao tabagismo atual (5 cigarros/dia) é de 40%, com aumento progressivo de acordo com o número de cigarros (7);

2- Mulheres com dislipidemia apresentam risco aumentado para DAC, especialmente entre 50-69 anos. Segundo o *National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel (NCEP/ATP* III), valores de triglicerídeos ≥ 150 mg/dl e HDL < 50 mg/dl apresentam maior impacto na incidência da DAC em mulheres do que em homens (12);

3- Diabetes confere risco 3-7 vezes maior risco de DAC para mulheres quando comparadas a não diabéticas. A intolerância a glicose, com resistência insulínica (RI) e hiperinsulinemia aumentam a ocorrência, sendo o valor sérico de insulina identificado

como fator independente de risco para DAC (13);

4- HAS contribui aproximadamente em 35% de todos os eventos cardiovasculares em mulheres, elevando o risco de DAC em quatro vezes quando comparadas a normotensas (7);

5- O risco de DAC relacionado ao sedentarismo é de 1,5-2,4 vezes maior, comparado a dislipidemia e tabagismo. Atividade física aeróbica de intensidade moderada quando realizada de forma regular (30 min/5dias/sem) atinge impacto na redução do risco cardiovascular na ordem de 30-40% (14);

6- A prevalência de sobrepeso e obesidade em mulheres na pós-menopausa é superior a 80% em países desenvolvidos (15). Segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008-2009, realizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o excesso de peso entre mulheres brasileiras subiu de 28,7% em 1975 para 48% em 2009. E a obesidade cresceu de 8% para 16,9% (16). O excesso de peso e o acúmulo de gordura abdominal estão associados o maior risco de DAC (17). *Nurses' Health Study* demonstrou que elevada medida da circunferência da cintura esteve significantemente associada com aumento na mortalidade por DAC em mulheres com peso normal (18).

1.2. Obesidade e Síndrome metabólica

Na atualidade, grande parte das mulheres das sociedades urbanas apresenta fatores de risco para DCV. Esta "epidemia" deve-se ao aumento na proporção de mulheres acima dos 50 anos, na obesidade abdominal, no sedentarismo e no padrão alimentar moderno, caracterizado pelo elevado consumo de alimentos de maior densidade energética com baixos índices de alimentação saudável (19-21). Em 2010, Tardivo *et al.*, avaliando a qualidade da dieta em 173 mulheres na pós-menopausa

atendidas no Ambulatório de Climatério da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), demonstraram que apenas 3% apresentaram dieta de boa qualidade, 49% necessitando melhorar e 48% dieta de pobre qualidade, sendo que 75,7% eram sobrepeso ou obesas e 73,2% com deposição abdominal de gordura (22). A obesidade abdominal contribui para o desenvolvimento da RI, diabetes, dislipidemia, e consequentemente a síndrome metabólica (23, 24).

A síndrome metabólica (SM) é definida por um conjunto de fatores de riscos metabólicos que incluem obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial e disglicemia (25). Primeiramente, essa síndrome foi descrita por Gerald Reaven em 1988, e denominada de síndrome X, depois de quarteto da morte, síndrome plurimetabólica e síndrome dismetabólica. Acomete aproximadamente 30% da população de mulheres acima dos 50 anos, com aumento de três vezes o risco de morbimortalidade por DCV (17, 26-28). Essa síndrome associa-se a desordem metabólica denominada RI em que a ação normal da insulina está prejudicada. Fatores ambientais, particularmente dieta inadequada e inatividade física, estão amplamente implicados, mas alguns indivíduos são geneticamente predispostos à RI (12, 17, 29).

Várias organizações têm proposto classificações e definindo critérios para o diagnóstico da SM (30). Em 1999, a *World Health Organization (WHO) Diabetes Group* propôs a primeira definição para a SM, considerando o conjunto de fatores de risco para DCV, entre três ou mais dos seguintes critérios: elevação da pressão arterial (PA), aumento de triglicerídeos, redução do HDL, obesidade (índice de massa corpórea, IMC$\geq$ 30kg/m^2) ou aumento da relação cintura/quadril (RCQ) e RI definida pela presença de diabetes ou intolerância a glicose ou hiperinsulinemia (31). Em 2001, *NCEP/ATP* III desenvolveu outra definição diagnóstica, que incluiu alguns dos critérios propostos pela WHO e excluiu o IMC e a RCQ (29). A identificação clínica da SM

proposta pelo NCEP/ATP III considera três dos seguintes critérios diagnósticos: obesidade abdominal (aumento da circunferência da cintura), elevação da PA (pressão arterial), redução de HDL-colesterol, aumento de triglicerídeos e intolerância a glicose (12). A *International Diabetes Federation (IDF)* propôs nova definição em 2006 tendo a obesidade abdominal como essencial, associada a mais dois critérios como aumento dos triglicerídeos, redução do HDL, elevação da PA ou aumento da glicemia de jejum (32). Apesar das várias classificações propostas, alguns consideram o critério utilizado pela NCEP/ATPIII mais útil e de fácil aplicação clínica (24). É fundamental salientar que todos os critérios têm como foco o papel da RI no aumento de risco para DCV(33).

A obesidade abdominal reconhecidamente é uma característica importante no diagnóstico da SM (23). Em 2009, Nahas *et al.*, avaliando 368 mulheres na pós-menopausa acompanhadas no Ambulatório de Climatério da FMB com idade entre 45-75 anos, observaram a ocorrência de SM em 39,6% das participantes, sendo a obesidade abdominal (cintura ≥ 88cm) o principal critério diagnóstico, encontrado em 62,5% dos casos (34). A obesidade é um estado pro-inflamatório que contribui para RI, condição sugerida como fator causal da dislipidemia, da intolerância à glicose e aumento da PA (35). Os fatores inflamatórios produzidos pelo tecido adiposo (adipocitocinas) induzem a RI por interferirem com o sinal de transcrição da insulina e, portanto o transporte de glicose (36). O acúmulo central de gordura está associado ao aparecimento de outras alterações envolvidas com a SM: aumento da concentração de triglicerídeos e redução dos valores de HDL, além da elevação da glicemia e da insulinemia (6, 37). A SM sabidamente associa-se com o aumento no risco de desenvolvimento de DCV em mulheres na pós-menopausa (38).

1.3. Marcadores imuno-inflamatórios da doença cardiovascular

Apesar de décadas de estudos epidemiológicos e experimentais, o conhecimento dos FR é capaz de rastrear a DAC em apenas um terço dos casos. A detecção de marcadores precoces possibilitaria o reconhecimento da doença aterosclerótica subclínica com a intervenção precoce sobre os FR modificáveis (39). Como fator determinante no desenvolvimento da DAC está presença de aterosclerose. Esta é definida como processo crônico, progressivo e sistêmico, consequente à resposta inflamatória e fibroproliferativa causada por agressão a superfície endotelial das artérias (40). Essas alterações ocorrem lentamente e processam-se por meio de disfunção endotelial, inflamação, proliferação celular e alteração da matriz celular (41). A aterosclerose é, portanto, doença generalizada da parede arterial, caracterizada por remodelamento que pode permanecer silenciosa por muito tempo, ou manifestar-se como evento vascular agudo, tornando-se clinicamente aparente. Por ser processo degenerativo, tem incidência aumentada com a idade, sendo difícil reconhecê-la em seu estágio inicial (42). Na DAC, convencionais fatores de risco – dislipidemia, HAS, diabetes, obesidade – permanecem importantes (7), mas diferenças individuais no perfil inflamatório podem modular a severidade do processo (43, 44). A inflamação desempenha papel fundamental no início, progressão e instalação da doença aterosclerótica (45).

1.3.1. Citocinas

Os principais mecanismos na instalação e evolução da resposta inflamatória sistêmica são compostos pela cascata do sistema complemento, pela ativação das células imunológicas, pela liberação de citocinas e pela disfunção endotelial (44). Ambos componentes do sistema imunológico, celular e humoral, têm sido implicados na

aterogênese. A interação entre a parede arterial e as células sanguíneas circulantes como os monócitos e os linfócitos T mediados pelas moléculas de adesão celular, é passo importante no processo inflamatório. A expressão das moléculas de adesão é estimulada pelos fatores de risco e estão sobre o controle de citocinas inflamatórias, fatores hemodinâmicos e endotoxinas bacterianas (44).

A aterosclerose pode ser desencadeada por injúria ao endotélio arterial atribuído a fatores como hipertensão, hiperinsulinemia, dislipidemia, e principalmente, pela deposição de moléculas oxidadas de LDL (39). Após agressão inicial, monócitos e células T são recrutados do sangue periférico para a parede arterial, e penetram na íntima dos vasos e fagocitam o LDL oxidado, promovendo dessa maneira, a liberação de citocinas inflamatórias (44). A identificação de macrófagos, células T, e citocinas pro-inflamatórias na lesão aterosclerótica suporta a hipótese que a resposta imunológica inata participa do mecanismo da aterogênese (44, 46). O macrófago é a principal fonte de citocinas na placa ateromatosa. Essas incluem as citocinas pro-inflamatórias como as interleucinas (IL) 1, 6, 12, 15, 18 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α); assim como as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, IL-32 e fator de crescimento tumoral beta (TGF-β) (47).

A IL-1 e o TNF-α têm o papel de perpetuar a resposta inflamatória e, modificar a superfície endotelial anticoagulante para um estado pró-trombótico. A IL-6 por sua vez estimula a produção hepática da proteína C-reativa (PCR), sendo esta última reconhecida proteína da fase aguda de processos inflamatórios (48). A elevação sérica da PCR é considerada fator de risco independente para aterosclerose, particularmente em mulheres na pós-menopausa (49), além de ser fator de predição para IAM, AVC, doença arterial periférica e morte súbita (50, 51). O estudo *Woman On the Move through Activity and Nutrition* (WOMAN) tratou de ensaio clínico randomizado que

investigou a variação laboratorial de um painelde citocinas e suas relações com fatores de risco para a DAC em 290 mulheres norte-americanas na pós-menopausa com excesso de peso. A maioria das citocinas foi detectável nas amostras, mas com grande variação biológica individual. Os tradicionais FR para DAC, como idade, dislipidemia, circunferência da cintura e RI estiveram associados com valores de IL-1, IL-6 e TNF-α. A perda de peso foi associada à diminuiçãodos valores de IL-1, IL-6 e PCR. Para os autores, existe grande e inexplicada variabilidade nos valores de citocinas, provavelmente devido às associações genética-ambientais (51).

Enquanto a deposição lipídica ateromatosa e o acúmulo de células espumosas (macrófagos ricos em LDL-oxidado) na íntima das artérias sejam a principal marca morfológica da aterosclerose, as alterações subliminares na parede arterial, estimulando o influxo de células inflamatórias e a produção local de citocinas e outros mediadores inflamatórios são atualmente reconhecidos como fatores fundamentais da aterogênese (52, 53). Como existem evidências crescentes que as moléculas inflamatórias circulantes são marcadores biológicos para aterosclerose progressiva, a detecção e monitoramento da inflamação vascular têm papel de destaque no diagnóstico precoce desta entidade (54).

1.3.2. Receptores *Toll-like* (TLRs)

A expressão das citocinas pró-inflamatórias ocorre pela ativação dos receptores *Toll-like* (TLRs), em especial TLR-2 e TLR-4 (54). Os TLRs são uma família de proteínas transmembrânicas caracterizadas por um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio intracelular Toll/IL-1R (55). Estes receptores podem ser divididos de acordo com a sua localização na célula; os TLR-1/2/4/5/6/10 são expressos na superfície celular, enquanto que TLRs-3/7/8/9 em compartimentos

endosomais intracelulares (56). Os TLRs são amplamente expressos por células imunológicas, epiteliais e endoteliais (57). Uma vez ativados resultam na indução de citocinas pró-inflamatórias, fagocitose e *burst* oxidativo. Como resultado desta ativação, os TLRs regulam positivamente moléculas co-estimulatóras, secretam citocinas imunomodulatórias, aumentam o processamento de antígenos e a apresentação destes aos linfócitos T e B. Esses receptores funcionam como ponte entre o sistema inato e o adaptativo (58). TLRs podem ser ativados por células do aparelho cardiovascular, apresentando um elo entre o desenvolvimento de DCV e o sistema imunológico, embora o papel individual dos membros da família TLR na fisiopatologia desta doença e na prática clínica ainda mereçam maiores investigações (59). Podem ser expressos dentro de células vasculares e do miocárdio. Segundo Shishido *et al.*, a ativação de TLR-2 tem papel central na regulação da inflamação vascular em camundongos, sugerindo que o TLR-2 induz aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, e IL-6) e diminuição da formação do tecido vascular, sendo estes resultados contrários ao que ocorre nos camundongos deficientes em TLR-4 (60). Evidências consideráveis associam a aterosclerose com a sinalização do TLRs. Contudo, alterações genéticas como polimorfismo dos TLRs demonstram resultados contraditórios. Estudos apontam que há alteração no polimorfismo dos receptores TLR-4 em aterosclerose (61, 62) e em doenças coronarianas (63, 64). Por outro lado, outros pesquisadores relatam que o polimorfismo do TLR-4 não apresenta significância em relação à aterosclerose ou em outras doenças coronarianas (65, 66). Em outro estudo, foi observado que o polimorfismo do TLR-2 esteve associado a DCV e não do TLR-4 (67).

1.3.3. Lecitina Ligante de Manose (MBL)

Nas últimas décadas, houve grande interesse em investigar os receptores de superfície para lecitina ligante de manose (MBL), em parte devido seu papel central como molécula de reconhecimento no sistema imune inato, mas também por causa das implicações clínicas potenciais das diferenças genéticas (68). Estudos epidemiológicos sugeriram que variações geneticamente determinadas de concentrações do MBL no soro influenciem a suscetibilidade para o curso de diferentes infecções, autoimunidade, neoplasia, doenças metabólicas e cardiovasculares. A MBL pertence a uma subfamília de proteínas conhecidas como colectinas, cujos membros apresentam domínios de reconhecimento de carboidratos associados a estruturas colagenosas (69). A MBL humana é composta por polímeros de até seis subunidades, tendo sido relatada a presença de dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmetros (70). A subunidade estrutural é um homotrímero com cadeias polipeptídicas idênticas de 32 kDa, onde cada cadeia é caracterizada por quatro regiões, sítio e domínios: região C-terminal que apresenta o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), região do pescoço hidrofóbica, a região similar ao colágeno e a região N-terminal, rica em cisteína (71). Entretanto, para atividade funcional completa da MBL, é necessário que se apresente, no mínimo, na forma tetrâmera (72). É codificada pelo gene de MBL2 no cromossomo 10 (71). MBL2 tem quatro exons, interrompidos por três introns. O exon 1 codifica a região N-terminal, e uma parte da região similar ao colágeno. O exon 2 codifica o restante da região similar ao colágeno e o exon 3 codifica a região do pescoço. A região promotora do gene MBL2 apresenta elementos regulatórios, reconhecidos por proteínas da fase aguda, que afetam a transcrição da proteína (72). Tipos variantes descritos no gene de MBL2 acarretam alterações na atividade funcional e, variações na concentração plasmática e polimerização da proteína, resultando em distúrbios imunológicos (68). O

sequenciamento do gene MBL2 revelou a existência de três polimorfismos presentes no exon 1 nos códons 52, 54, 57, denominados respectivamente alelos D, B e C (68, 72). Em estudos epidemiológicos, a presença de qualquer uma destas mutações, B, C ou D é representada pela letra "O" e o alelo normal para o exon 1 é denominado de "A". Indivíduos homozigotos *AA* apresentam níveis mais altos de MBL, heterozigotos *A/O* demonstram níveis intermediários e os homozigotos *OO*, suas concentrações de MBL são relativamente baixas (68, 73).

Uma relação que intriga os pesquisadores é a correlação entre o sistema imunológico e a DCV, principalmente a relação entre MBL do sistema complemento (74). A MBL provavelmente modula a gravidade da infecção por *Chlamydia pneumoniae*, patógeno ligado a várias linhas de experimentação para a iniciação e propagação da aterosclerose (69, 75). Isto poderia explicar a associação da variação genética em MBL com aterosclerose grave (74). Embora controversos, estudos indiquem associação entre infecção de *C. pneumoniae* e DCV (75-77). Foram descobertos antígenos de *C. Pneumoniae*, ou organismos intactos em ateroma humano. Porém, a presença de anticorpo não prediz subsequentes eventos da DCV. Além disso, trabalhos demonstraram a relação entre alelos variantes de MBL associados com desenvolvimento acelerado de aterosclerose (74, 78), em que a infecção por *C. pneumoniae* pode conduzir ao desenvolvimento de doença coronariana severa em indivíduos geneticamente predispostos. Estes achados são consistentes e indicam que alelos variantes de MBL estão associados com doença coronariana e com aumento de placas na carótida (74, 78, 79). Contudo, a deficiência de MBL não é fator de risco independente para doença coronária. A conexão entre alelos de MBL e aterosclerose com fatores de risco ambiental e do sistema imune, deveriam ter seus estudos aprofundados (80).

1.4. Justificativa

A DCV, mormente a DAC, compreende a principal causa de mortalidade em mulheres na pós-menopausa. Na atualidade, grande parte das mulheres das sociedades urbanas apresenta fatores de risco para DCV. Esta "epidemia" deve-se ao aumento na proporção de mulheres acima dos 50 anos e na obesidade, sedentarismo, HAS e fatores de risco metabólicos (dislipidemia, disglicemia) na população. A DAC é decorrente de processo aterosclerótico de evolução progressiva, que estão envolvidos vários fatores de risco que não podem ser ignorados na abordagem da mulher climatérica. Por meio da estimativa de risco, pode-se sugerir prioridade na instituição de medidas de prevenção primária, pontuando os fatores de risco que necessitam de maior ou menor atenção. A intervenção precoce sobre esses fatores oferece melhor oportunidade para efetiva redução na ocorrência da DAC. Contudo, estudos anteriores avaliam populações de alto risco para DAC, quando a realidade é totalmente diferente, pois a maioria dos eventos ocorre em populações de médio e baixo risco, sem evidência da doença. Assim, a detecção de bio-marcadores precoces possibilitaria o reconhecimento da doença aterosclerótica subclínica com a intervenção sobre os fatores de risco modificáveis, importante no seguimento de mulheres na pós-menopausa.

A aterosclerose é doença da parede arterial, caracterizada por inflamação e remodelamento silencioso que pode manifestar-se como evento vascular agudo, tornando-se clinicamente aparente. Na DAC, convencionais fatores de risco permanecem importantes, mas diferenças individuais no perfil imuno-inflamatório podem modular a severidade do processo. O significado dos bio-marcadores inflamatórios em mulheres na pós-menopausa e o risco de doença aterosclerótica é uma área de estudo importante. Todo o conhecimento sobre a doença aterosclerótica em

mulheres na pós-menopausa, advindo de pesquisas torna-se importante como base para o adequado dimensionamento e direcionamento de ações de saúde, sobretudo o estabelecimento de medidas de prevenção primárias e secundárias, com reflexos nos custos socioeconômicos produzidos pelos elevados índices globais de morbidade e mortalidade pela DCV.

1.5. Referências Bibliográficas

1. Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. Circulation 2007;115(11):1481-501.
2. Datasus. In http://www.datasus.gov.br. Acessado em 24 de outubro de 2013.
3. Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. Eur Heart J 2008;29(7):932-40.
4. Stevenson JC. HRT and the primary prevention of cardiovascular disease. Maturitas 2007;57(1):31-4.
5. Kannel WB, D'Agostino RB, Sullivan L, Wilson PW. Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles. Am Heart J 2004;148(1):16-26.
6. Grund F, Sommerschild HT, Kirkeboen KA, Ilebekk A. A new approach to normalize myocardial temperature in the open-chest pig model. J Applied Physiol 1998;84(6):2190-7.
7. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet 2004;364(9438):937-52.
8. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation 1998;97(18):1837-47.
9. D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. Circulation 2008;117(6):743-53.
10. Law MR, Wald NJ. Risk factor thresholds: their existence under scrutiny. BMJ 2002;324(7353):1570-6.
11. Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, et al. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. Lancet 2006;368(9536):647-58.
12. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285(19):2486-97.
13. Cho E, Manson JE, Stampfer MJ, Solomon CG, Colditz GA, Speizer FE, et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease among diabetic women. Diabetes Care 2002;25(7):1142-8.
14. Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. Med Science Sports Exercise 2007;39(8):1423-34.

15. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. Diabetes Care 2004;27(10):2444-9.

16. IBGE. (2008-2009). POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares. http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/ Acessado 26 de outubro de 2013.

17. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. Lancet 2005;366(9497):1640-9.

18. Zhang C, Rexrode KM, van Dam RM, Li TY, Hu FB. Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: sixteen years of follow-up in US women. Circulation 2008;117(13):1658-67.

19. Drewnowski A. Nutrition transition and global dietary trends. Nutrition 2000;16(7-8):486-7.

20. De Caterina R, Zampolli A, Del Turco S, Madonna R, Massaro M. Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2006;83(2):421S-6S.

21. Pines A. Lifestyle and diet in postmenopausal women. Climacteric 2009;12: Suppl 1:62-5.

22. Tardivo AP, Nahas-Neto J, Nahas EA, Maesta N, Rodrigues MA, Orsatti FL. Associations between healthy eating patterns and indicators of metabolic risk in postmenopausal women. Nutr J 2010;9:64.

23. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, American Heart A, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Circulation 2004;109(3):433-8.

24. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. Lancet 2005;365(9468):1415-28.

25. Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, Mora S. The metabolic syndrome in women. Cardiol Rev 2006;14(6):286-91.

26. Meigs JB. Epidemiology of the metabolic syndrome, 2002. Am J Managed Care 2002;8(11 Suppl):S283-92.

27. Janssen I, Powell LH, Crawford S, Lasley B, Sutton-Tyrrell K. Menopause and the metabolic syndrome: the Study of Women's Health Across the Nation. Arch Intern Med 2008;168(14):1568-75.

28. Nahas EA, Andrade AM, Jorge MC, Orsatti CL, Dias FB, Nahas-Neto J. Different tools for estimating cardiovascular risk in Brazilian postmenopausal women. Gynecol Endocrinol 2013;29(10):921-5.

29. Millen BE, Pencina MJ, Kimokoti RW, Zhu L, Meigs JB, Ordovas JM, et al. Nutritional risk and the metabolic syndrome in women: opportunities for preventive intervention from the Framingham Nutrition Study. Am J Clin Nutr 2006;84(2):434-41.

30. Olufadi R, Byrne CD. Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. J Clin Pathol 2008;61(6):697-706.

31. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabetic Med 1998;15(7):539-53.

32. Saely CH, Koch L, Schmid F, Marte T, Aczel S, Langer P, et al. Adult Treatment Panel III 2001 but not International Diabetes Federation 2005 criteria of the metabolic syndrome predict clinical cardiovascular events in subjects who underwent coronary angiography. Diabetes Care 2006;29(4):901-7.

33. Reaven GM. The metabolic syndrome: requiescat in pace. Clin Chem 2005;51(6):931-8.

34. Petri Nahas EA, Padoani NP, Nahas-Neto J, Orsatti FL, Tardivo AP, Dias R. Metabolic syndrome and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. Climacteric 2009;12(5):431-8.

35. Sell H, Eckel J. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2010;13(4):366-70.

36. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. Circulation 2005;111(11):1448-54.

37. Berg G, Mesch V, Boero L, Sayegh F, Prada M, Royer M, et al. Lipid and lipoprotein profile in menopausal transition. Effects of hormones, age and fat distribution. Hormone Metab Res 2004;36(4):215-20.

38. Vannice GK. n-3s from fish and the risk of metabolic syndrome. J Am Diet Ass 2010;110(7):1014-7.

39. Burke GL, Bertoni AG, Shea S, Tracy R, Watson KE, Blumenthal RS, et al. The impact of obesity on cardiovascular disease risk factors and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Arch Intern Med 2008;168(9):928-35.

40. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. Stroke 2006;37(7):1923-32.

41. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. Nature Med 2002;8(11):1249-56.

42. Orlandi A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Spagnoli LG. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. Atherosclerosis 2006;188(2):221-30.

43. Olivieri F, Antonicelli R, Cardelli M, Marchegiani F, Cavallone L, Mocchegiani E, et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and myocardial infarction in the elderly. Mech Ageing Develop 2006;127(6):552-9.

44. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 2002;420(6917):868-74.

45. Lu X, Kakkar V. The role of heat shock protein (HSP) in atherosclerosis: Pathophysiology and clinical opportunities. Curr Med Chem2010;17(10):957-73.

46. Rose N, Afanasyeva M. Autoimmunity: busting the atherosclerotic plaque. Nature Med 2003;9(6):641-2.

47. Sommer G, Kralisch S, Stangl V, Vietzke A, Kohler U, Stepan H, et al. Secretory products from human adipocytes stimulate proinflammatory cytokine secretion from human endothelial cells. J Cell Biochem 2009;106(4):729-37.

48. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. Am J Cardiol 2006;98(1):121-8.

49. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. Circulation 2003;107(3):363-9.

50. Wilson AM, Ryan MC, Boyle AJ. The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease: risk marker or pathogen. Intern J Cardiol 2006;106(3):291-7.

51. Wong E, Freiberg M, Tracy R, Kuller L. Epidemiology of cytokines: the Women On the Move through Activity and Nutrition (WOMAN) Study. Am J Epidemiol 2008;168(4):443-53.

52. Jawien J. New insights into immunological aspects of atherosclerosis. Pol Arch Med Wewn 2008;118(3):127-31.

53. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. Clin Chem 2008;54(1):24-38.

54. Vabulas RM, Wagner H, Schild H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. Curr Top Microbiol Immunol 2002;270:169-84.

55. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nature Rev Immunol 2001;1(2):135-45.

56. Akira S. Toll receptor families: structure and function. Semin Immunol 2004;16(1):1-2.

57. Sutmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. J Clin Invest 2006;116(2):485-94.

58. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. Adv Exp Med Biol 2005;560:11-8.

59. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. Nature clinical practice Cardiovascular Med 2007;4(8):444-54.

60. Shishido T, Nozaki N, Takahashi H, Arimoto T, Niizeki T, Koyama Y, et al. Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury. Biochem Biophysical Res Comm 2006;345(4):1446-53.

61. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. N Eng J Med 2002;347(3):185-92.

62. Lin YC, Chang YM, Yu JM, Yen JH, Chang JG, Hu CJ. Toll-like receptor 4 gene C119A but not Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. Atherosclerosis 2005;180(2):305-9.

63. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. Arter Throm Vasc Biol 2003;23(12):e61-4.

64. Koch W, Hoppmann P, Pfeufer A, Schomig A, Kastrati A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. Eur Heart J 2006;27(21):2524-9.

65. Yang IA, Holloway JW, Ye S, Southampton Atherosclerosis Study G. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. Atherosclerosis 2003;170(1):187-90.

66. Netea MG, Hijmans A, van Wissen S, Smilde TJ, Trip MD, Kullberg BJ, et al. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. Eur J Clin Invest 2004;34(2):94-9.

67. Hamann L, Gomma A, Schroder NW, Stamme C, Glaeser C, Schulz S, et al. A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. J Mol Med 2005;83(6):478-85.

68. Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. Biochem Soc Transactions 2008;36(Pt 6):1461-6.

69. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. Mol Immunol 2003;40(7):423-9.

70. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. Transfusion Med 2002;12(6):335-52.

71. Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan E, Bruns G, Morton CC, et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. J Experim Med 1989;170(4):1175-89.

72. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. Gen Immunity 2006;7(2):85-94.

73. Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. Inter Med J 2005;35(9):548-55.

74. Madsen HO, Videm V, Svejgaard A, Svennevig JL, Garred P. Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. Lancet 1998;352(9132):959-60.

75. Grayston JT. What is needed to prove that Chlamydia pneumoniae does, or does not, play an etiologic role in atherosclerosis? J Infectious Diseases 2000;181 Suppl 3:S585-6.

76. Wald NJ, Law MR, Morris JK, Zhou X, Wong Y, Ward ME. Chlamydia pneumoniae infection and mortality from ischaemic heart disease: large prospective study. BMJ 2000;321(7255):204-7.

77. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. Chlamydia pneumoniae IgG titres and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. BMJ 2000;321(7255):208-13.

78. Hegele RA, Ban MR, Anderson CM, Spence JD. Infection-susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area. J Invest Med 2000;48(3):198-202.

79. Rugonfalvi-Kiss S, Endresz V, Madsen HO, Burian K, Duba J, Prohaszka Z, et al. Association of Chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. Circulation 2002;106(9):1071-6.

80. Aittoniemi J, Fan YM, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, et al. The effect of mannan-binding lectin variant alleles on coronary artery reactivity in healthy young men. Intern J Cardiol 2004;97(2):317-8.

2. Publicações

2.1. Artigo Original I

Associação do polimorfismo genético da lecitina ligante de manose (MBL2) com os fatores de risco para doença cardiovascular em mulheres na pós-menopausa

Cláudio Lera Orsatti[1], Eliana Aguiar Petri Nahás[1], Jorge Nahás Neto[1],

Steven S. Witkin[2]

[1]Setor de Climatério & Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

[2] Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Immunology and Infectious Diseases, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

Resumo

Objetivo: avaliar a associação do polimorfismo genético da lecitina ligante de manose (MBL2) sobre os fatores de risco para doença cardiovascular (DCV) em mulheres na pós-menopausa.

Métodos: Estudo clínico, transversal, envolvendo 311 mulheres na pós-menopausa (idade ≥45 anos e amenorréia ≥ 12 meses) acompanhadas no Ambulatório de Climatério & Menopausa, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), de fevereiro de 2011 a junho de 2012. Critérios de exclusão: presença de DCV prévia ou atual, diabetes insulinodependente, doença renal crônica, doenças autoimunes e neoplasia maligna. Foram realizadas avaliações clínicas, antropométricas e bioquímicas para avaliar os fatores de risco cardiovasculares. O DNA foi extraído de amostras de células bucais e o polimorfismo da MBL2 (Códons 54 e 57) foi realizado pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Para análise estatística foram empregados o teste do Qui-Quadrado e a regressão logística (odds ratio, OR).

Resultados: A presença do alelo polimórfico para o códon 54 foi encontrada em 25,7% das mulheres (AB = 22,5%; BB = 3,2%) e para o códon 57 em 11,6% (AC = 9,6%; CC = 2,0%). Para o polimorfismo do códon 54 foi encontrado associação significativa com a presença de hipertensão (OR 0,55, IC95% 0,31-0,99; p=0.044) e a resistência à insulina avaliada pelo HOMA-IR (OR 0,46, IC 95% 0,24-0,91; p=0.025). Não foram observadas associações significativas entre o polimorfismo para o códon 57 com fatores de risco para DCV.

Conclusão: Neste estudo em mulheres na pós-menopausa, o polimorfismo do códon 54 da MBL2 associou-se com menor risco para hipertensão arterial e resistência à insulina, importantes fatores de risco para doença cardiovascular. Por outro lado, o polimorfismo para o códon 57 não se associou aos fatores de risco cardiovasculares.

Abstract

Objective: To evaluate the association of genetic polymorphism of mannose binding lectin (MBL2) on risk factors for cardiovascular disease (CVD) in postmenopausal women.

Methods: In this cross-sectional study, 311 women (age ≥45 years and amenorrhea ≥ 12 months) seeking healthcare at a public outpatient center in southeastern Brazil, from February 2011 to June 2012, were included. Exclusion criteria: presence of previous or current CVD, insulin dependent diabetes, chronic kidney disease, autoimmune diseases and cancer. Clinical, anthropometric and biochemical assessments were performed to evaluate the cardiovascular risk factors. DNA was extracted from buccal cell samples and MBL2 polymorphism (codons 54 and 57) was performed by polymerase chain reaction (PCR). For statistical analysis, the chi-square and logistic regression (odds ratio, OR) were used.

Results: The presence of the polymorphic allele for codon 54 was found in 25.7% of women (AB = 22.5%, BB = 3.2%) and codon 57 in 11.6% (AC = 9.6%, dc = 2.0%). For the polymorphism at codon 54 was found significantly associated with the presence of hypertension (OR 0.55, 95% CI 0.31 to 0.99, p = 0.044) and insulin resistance assessed by HOMA-IR (OR 0.46, 95% CI 0.24-0.91, p = 0.025). No significant associations were observed between the polymorphism in codon 57 with risk factors for CVD.

Conclusion: In this study, the polymorphism at codon 54 of the MBL2 was associated with lower risk for hypertension and insulin resistance that are important risk factors for cardiovascular disease in postmenopausal women. On the other hand, the codon 57 polymorphism was not associated with cardiovascular risk factors.

Introdução

Com a crescente elevação na expectativa de vida das mulheres, maior atenção é dada à menopausa e às suas consequências. A doença cardiovascular (DCV) apresenta risco que aumenta ao longo de toda a vida, com especial incremento em mulheres na pós-menopausa (1). No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC) são as principais causas de morte em mulheres acima de 50 anos de idade. Apesar do risco de câncer de mama ser a principal preocupação das mulheres, a maior incidência de morte se refere a DCV, um índice de 53% comparado aos 4% do câncer de mama (2). Em consonância a estas evidências epidemiológicas, a deficiência estrogênica é considerada fator relevante na etiopatogenia da doença arterial coronariana (DAC). Nas mulheres, as manifestações clínicas da DAC aparecem em média cerca de 10 anos mais tardiamente que em homens, possivelmente explicado pela proteção cardiovascular dos estrogênios (3, 4).

A DAC é decorrente de processo multifatorial de evolução progressiva, que estão envolvidos vários fatores de risco como hipercolesterolemia, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes, estresse, sedentarismo e obesidade (5, 6). Entretanto, apesar de décadas de estudos epidemiológicos e experimentais, o conhecimento do risco é capaz de rastrear a DAC em apenas um terço dos casos. Um evento coronariano agudo é a primeira manifestação da doença aterosclerótica, em pelo menos metade das pessoas. Em mulheres, a DAC é frequentemente fatal, sendo que mais da metade não apresentam sintomas prévios (1). A identificação dos indivíduos assintomáticos, que estão mais predispostos é crucial na prevenção efetiva com a correta definição de metas terapêuticas.

Na DAC, diferenças individuais no perfil imunológico podem modular a severidade do processo (7). A inflamação desempenha papel fundamental no início,

progressão e instalação da doença aterosclerótica (8). Esta é definida como processo crônico, progressivo e sistêmico, consequente à resposta inflamatória e fibroproliferativa causada pela agressão a superfície endotelial das artérias (9). Nos últimos anos foram identificados vários genes pró-inflamatórios que desempenham importante papel na aterosclerose (10). Um desses é a deficiência gênica da lecitina ligante de manose (MBL). Esta é uma proteína da defesa imunitária inata envolvida na ativação da via das lecitinas do sistema complemento (11-13). Evidências sugerem que sendo a aterosclerose uma doença inflamatória crônica, a deficiência na imunidade inata possa contribuir na patogênese (14).

Deficiência na concentração sérica da MBL pode ser explicada pelo polimorfismo no gene da MBL2 (11). Variações genéticas da MBL são relativamente comuns, com ocorrência de 12 a 25% em populações caucasianas (11). O sequenciamento do gene MBL2 revelou a existência de três polimorfismos presentes no exon1 nos códons 52, 54, 57, denominados respectivamente alelos *D*, *B* e *C* (11, 13). Ocorrem mudanças no códon 54 (variante B) causando substituição da glicina por ácido aspártico (GGC para GAC) e da glicina por ácido glutâmico no códon 57 (variante C) (GGA para GAA). As variantes *B* e *C* determinam a troca de uma guanina por adenina A e variante *D*, troca uma citosina por uma timina (CGT para TGT), levando à substituição de arginina por cisteína no códon 52 (13). A presença de qualquer uma destas mutações (B, C ou D) é representada pela letra "B" e o alelo normal para o exon1 é denominado de "A" (15, 16). O genótipo normal (homozigose A/A*)* está associado a elevadas concentrações séricas de MBL. Por outro, a heterozigose (B/A) para MBL2 provoca redução significativa na MBL funcionante e homozigose (B/B) são desprovidos de MBL funcionante (13).

Há grande interesse em investigar o polimorfismo da MBL2, em parte devido seu papel central como molécula de reconhecimento do sistema imune inato, mas também por causa das implicações clínicas potenciais das diferenças genéticas (11). Estudos epidemiológicos sugeriram que variações geneticamente determinadas da MBL sérica influenciem a evolução de doenças infecciosas, auto-imunes, metabólicas e cardiovasculares (17-20). Assim, um possível determinante genético para o risco cardiovascular poderia ser a variação da sequência de codificação comum no gene MBL2, que codifica a MBL sérica (13). Em estudo pioneiro, Madsen *et al* demonstraram que o polimorfismo no gene da MBL2 estava associado com aumento do risco de aterosclerose (21).

Durante a última década, a MBL recebeu atenção como potencial marcador da doença aterosclerótica (22). Polimorfismos na MBL2 têm sido relacionados à DCV em diferentes populações (22-29). Entretanto, a maioria desses estudos associando o polimorfismo da MBL2 à DCV foi realizada em população predominantemente masculina, demonstrando a falta de estudos em mulheres, principalmente na pós-menopausa. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do polimorfismo genético da MBL2 sobre os fatores de risco para DCV em mulheres na pós-menopausa.

Métodos

Desenho do Estudo e Seleção da Amostra

Foi realizado estudo clínico, analítico e transversal. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Ambulatório de Climatério & Menopausa, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), de fevereiro de 2011 a junho de 2012. O cálculo do tamanho amostral foi embasado no estudo de Garred *et al* (11) que

demonstraram o polimorfismo do MBL (homozigose e heterozigose) em 25% da população avaliada. Considerando essa frequência, com nível de significância de 5% e um erro tipo II de 10% (poder do teste de 90%), foi estimada a necessidade de avaliar, no mínimo, 292 participantes. Foram incluídas no estudo 311 mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade ≥ 45 anos; com os seguintes critérios de exclusão: (1) presença de DAC manifesta atual ou prévia; (2) doença arterial cerebrovascular; (3) doença aneurismática; (4) doença arterial periférica; (5) doença renal crônica; (6) diabete insulinodependente; (7) doença hepatica; (8) doenças autoimunes; (9) neoplasia maligna; (10) etilista ou drogaditas (Figura 1). Foram esclarecidos, para as pacientes selecionadas, os objetivos e procedimentos a que seriam submetidas, e solicitadas à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), exigência da resolução nº 196/outubro/1996 do Conselho Nacional de Saúde, após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Botucatu – UNESP.

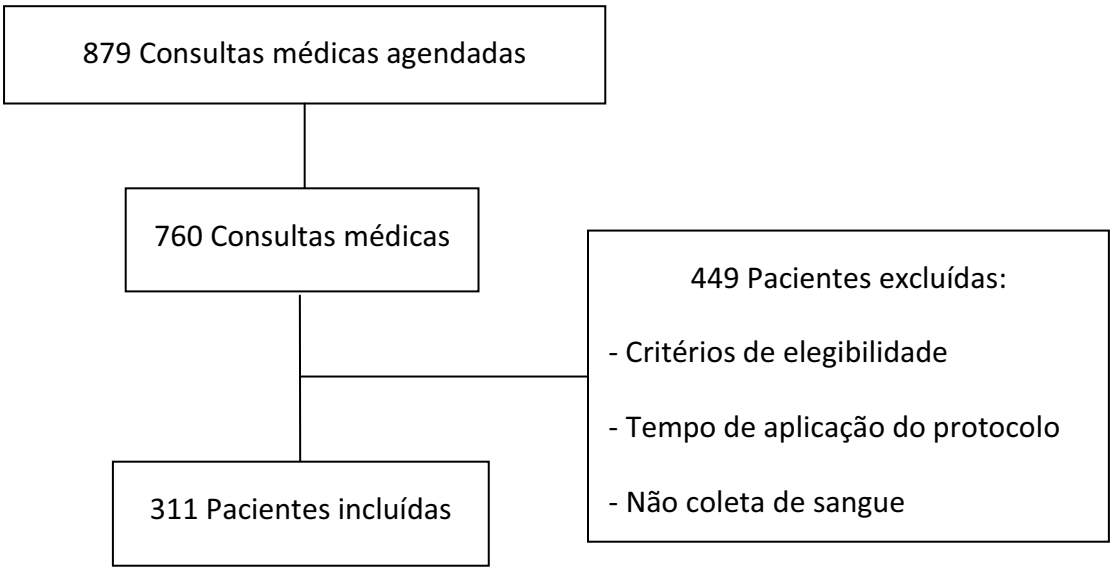

Figura 1- Fluxograma das pacientes incluídas nos estudo.

Definição das variáveis

A variável independente foi à presença do polimorfismo da MBL (AB/BB). As variáveis mediadoras foram os seguintes fatores de risco para DCV, categorizados: faixa etária (anos), idade na menopausa (anos), tempo de menopausa (anos), índice de massa corpórea (IMC, kg/m2), circunferência da cintura (cm), tabagismo, hipertensão, síndrome metabólica, resistência a insulina (RI), antecedentes familiares de DAC, e valores séricos de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose e proteína C reativa (PCR).

Metodologia

Inicialmente, no dia da consulta foram coletados, por meio de entrevista, os seguintes dados: idade, idade e tempo de menopausa, tabagismo, uso de terapia hormonal (TH), história pessoal de hipertensão e/ou diabetes, atividade física, e antecedente familiar de DAC (infarto agudo do miocárdio em parente de 1º grau masculino com idade < 55 anos e em parente de 1º grau feminino com idade < 65 anos). Após a entrevista, a pressão arterial foi aferida no braço direito, com a paciente sentada e o antebraço apoiado no nível do precórdio, palma da mão para cima, com uso de esfigmomanômetro aneróide padrão. Foram definidas como tabagistas, as pacientes com o hábito de fumar diariamente, não importando o número de cigarros fumados. Foram consideradas ativas as mulheres que praticavam exercícios físicos aeróbicos de intensidade moderada, pelo menos 30 minutos, cinco vezes na semana (150/min/sem) ou exercícios de resistência três dias por semana (30). Foram consideradas com síndrome metabólica (SM) as mulheres que apresentaram três ou mais critérios diagnósticos propostos pelo *US National Cholesterol Education Program(NCEP)/ Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) (31): circunferência da cintura > 88 cm;

triglicerídeos ≥ 150 mg/dL; HDL colesterol < 50 mg/dL; pressão arterial sanguínea ≥ 135/85 mmHg; glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL ou sob terapia.

Foram obtidos os seguintes dados para avaliação antropométrica: peso, altura, índice de massa corpórea (IMC=peso/ altura^2) e circunferência da cintura (CC). Para mensuração do peso, utilizou-se balança antropométrica eletrônica, tipo plataforma da marca Filizola®, graduada a cada 100g, capacidade até 150 kg, com precisão de 0,1 kg, com a paciente descalça e mínimo de roupa. A estatura foi determinada em estadiômetro vertical afixado a balança, com precisão de 0,1cm, sendo a paciente orientada a manter-se em posição ortostática, com braços ao lado do corpo, cabeça orientada a frente, descalça, mantendo os pés juntos e em inspiração profunda. Foram empregados os critérios da *World Health Organization* de 2002 para classificação das pacientes, conforme o IMC: menor que 24,9kg/m^2 normal, de 25-29,9kg/m^2 sobrepeso, e maior ou igual a 30,0kg/m^2 obesidade. Para a medida da CC foi empregado o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, por meio de fita métrica inextensível com escala de 0,5cm, da marca Lange®, com a paciente em posição ortostática, na expiração; sendo considerada aumentada para mulheres, acima de 88 cm (31).

Para a realização dos exames laboratoriais, as pacientes foram orientadas a realizar jejum de 12 horas. Por meio de punção venosa, em sistema fechado a vácuo, o sangue para as dosagens laboratoriais foi coletado em tubo com gel separador e centrifugado a 3000rpm por dez minutos, para obtenção do soro, com amostra seguida de análise bioquímica imediata. As avaliações bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Na análise bioquímica imediata foram dosados: glicose, colesterol total (CT), HDL, triglicerídeos (TG), proteína C-reativa (PCR) e insulina. As mensurações de TG, CT, HDL, glicose e PCR foram processadas pelo analisador bioquímico automático, modelo Vitros 950®

pelo método colorimétrico de química seca (*Johnson & Johnson®, Rochester, New York, USA*). O LDL foi calculado subtraindo-se o valor do CT, da soma do HDL e do TG dividido por cinco. Os valores considerados ótimos foram: CT <200 mg/dL, HDL >50mg/dL, LDL <100 mg/dL, TG <150 mg/dL, glicose <100mg/dL e PCR< 1,0 mg/dl. A insulina foi quantificada pelo Sistema Immulite® (*DPC®,USA*), que emprega imunoensaio, em fase sólida, por quimioluminescência, para uso em analisador automático, designado para leitura quantitativa. A taxa de normalidade segundo o método empregado foi de 6,0 a 27,0 µIU/ml. Para a avaliação da resistência insulínica (RI) foi utilizado método baseado em medida estática com dois constituintes plasmáticos (insulina e glicose de jejum). O HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment- Insulin Resistant*) foi calculado pela fórmula: Insulina (mU/ml) x glicose (mg/dl) / 405. Valores que indicam RI foi definido como Homa-IR >2,7 (32)

A avaliação do polimorfismo da MBL foi realizada em amostras de células bucais coletadas no dia da entrevista com *swabs* bucais de algodão, depois de adequada limpeza bucal, e estocadas (-80°C) para posterior análise. As avaliações foram realizadas no *Laboratory of Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Immunology and Infectious Disease, Weill Cornell Medical College, New York, USA*. O DNA foi extraído a partir das células coletadas e testado o polimorfismo para MBL2 códon do gene 54 e 57 pela reação de cadeia de polimerase (PCR). Células epiteliais bucais foram centrifugadas e re-suspendidas por agitação em solução de detergente não-iônico, contendo proteinase K. A lise foi induzida por incubação e posteriormente inativada pela proteinase K em condição de incubação pré-estabelecida. Os extratos foram diluídos 1:5, e unidades de Taq DNA polimerase e 30 pmol de oligonucleótidos amplificam os códons da região polimórfica do gene MBL2 (54 e 57). Para os códons do polimorfismo, o produto final da PCR foram digeridos com endonucleases *BanI* e os

resultados da amplificação dos fragmentos foram analisados em gel de agarose a 2% após coloração com brometo de etídio, conforme descrição prévia (15). Os desenhos dos primers (IDT®) utilizados no experimento do polimorfismo da MBL2 códon 54 e 57 (15) são:

Primer 1. MBP-1 (5'-AGAATTCGTAGGACAGAGGGCATGCTC–3')

Primer 2. MBP-2 (5'-AGGATCCAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG –3')

Análise Estatística

O modelo de relacionamento sob teste supõe que alterações polimórficas do gene MBL2 podem influenciar as variáveis clínicas e, consequentemente, o aumento do risco cardiovascular. Na associação entre a frequência das variáveis clínicas categorizadas foi empregado o Teste do Qui-quadrado (χ^2). Foi realizada análise multivariada por regressão logística binária, considerando-se nível de significância $p<0,05$ e intervalo de confiança (IC) de 95%, com cálculo da respectiva odds ratio (OR), considerando o grupo de mulheres com polimorfismo como resposta comparada a mulheres sem o polimorfismo como base, para se observarem as possíveis associações existentes entre o polimorfismo (variável dependente) e as variáveis influentes do risco para DCV (variáveis independentes). Foram testadas todas as variáveis através do ajuste do modelo de regressão logística múltipla utilizando procedimento "stepwise" para as variáveis que apresentaram diferença significativa, sendo ajustada para idade, idade da menopausa e tempo de menopausa (variáveis confundidoras). Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Package for Social*

Science for Windows (*SPSS*), versão 15.0, pelo Escritório de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Resultados

As características descritivas clínicas e laboratoriais das 311 mulheres avaliadas estão apresentadas na Tabela 1. Observa-se que a mediana de idade das pacientes incluídas foi de 54 anos, com tempo de menopausa de cinco anos. Quanto aos indicadores da composição corporal, 37,6% das pacientes foram classificadas como obesas (IMC ≥ 30 kg/m2) e 62% com aumento da CC (>88 cm), demonstrando distribuição central de gordura corporal. A porcentagem de mulheres sedentárias foi de 83,9%; apenas 16,1% relatavam a prática de caminhadas regulares pelo menos cinco vezes na semana. Encontrou-se que 16,4% eram tabagistas, 39,5% hipertensas e, 12,5% diabéticas. Apenas 6,4% referiram antecedentes de IAM. De acordo com o NCEP/ATP III, 25,4% das mulheres foram classificadas como portadoras da SM, e em 25,7% observou-se resistência a insulina pelo HOMA-IR. A população mostrou-se dislipidêmica com valores acima dos desejáveis de colesterol total em 43,4%, de LDL em 73%, de triglicerídeos em 35,7%, e com HDL abaixo do desejável em 35,4% (Tabela 1).

Na Tabela 2 são observadas as características genotípicas dos polimorfismos MBL2 para o Códon-54 e o Códon-57. A presença do alelo polimórfico para o códon 54 foi encontrada em 25,7% das mulheres (AB = 22,5%; BB = 3,2%) e para o códon 57 em 11,6% (AC = 9,6%; CC = 2,0%). Nas Tabelas 3 e 4 foram demonstradas as associações entre a presença do polimorfismo dos Códon 54 e 57, respectivamente, e os fatores de risco para DCV. Para o polimorfismo do códon 54 (Tabela 3) foi encontrado associação significativa com a presença de hipertensão (OR 0,55, IC95% 0,31 - 0,99) e a

resistência à insulina avaliada pelo HOMA-IR (OR 0,46, IC 95% 0,24 - 0,91). Não foram observadas associações significativas entre o polimorfismo para o códon 57 com fatores de risco para DCV.

Tabela 1. Características descritivas das 311 mulheres na pós-menopausa.

Variáveis	**Valores**
Idade (anos) (mediana, interquartil)	54 (49 - 58)
Idade menopausa (anos) (mediana, interquartil)	48 (45 - 50)
Tempo menopausa (anos) (mediana, interquartil)	5 (2 - 10)
IMC ≥ 30kg/m^2 (n, %)	117 (37,6)
Cintura ≥ 88cm (n, %)	166 (53,4)
Tabagista (n, %)	51 (16,4)
Sedentárias (n, %)	261 (83,9)
Hipertensão (n, %)	123 (39,5)
Diabetes (n, %)	39 (12,5)
Antecedente familiar de IAM (n, %)	20 (6,4)
Síndrome Metabólica (n, %)	79 (25,4)
HOMA -IR> 2,7 (n, %)	80 (25,7)
Colesterol Total ≥ 200mg/dL (n, %)	135 (43,4)
HDL < 50mg/dL (n, %)	110 (35,4)
LDL > 100mg/dL (n, %)	227 (73,0)
Triglicérides ≥ 150mg/dL (n, %)	111 (35,7)
Glicose ≥ 100mg/dL (n, %)	56 (18,0)
PCR > 1,0 mg/dL (n, %)	38 (12,1)

IMC, índice de massa corpórea; IAM, infarto agudo do miocárdio; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment-InsulinResistant;* PCR, proteína C-reativa; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 2. Características genotípicas dos polimorfismos da MBL2 do Códon-54 e Códon-57, nas 311 mulheres na pós-menopausa.

Polimorfismos do MBL códon 54			**Polimorfismos do MBL códon 57**		
Genótipo	Frequência (n)	Porcentagem (%)	**Genótipo**	Frequência (n)	Porcentagem (%)
AA	207	74,19	**AA**	247	88,53
AB	63	22,58	**AC**	27	9,68
BB	9	3,23	**CC**	5	1,79

MBL, lecitina ligante de manose

Tabela 3. Associação entre a presença do polimorfismo da MBL2 do Códon-54 e os fatores de risco para doença cardiovascular (DCV) entre as 311 mulheres na pós-menopausa.

	Gene MBL2 Códon 54				
Fator de risco DCV	**Normal n=207**	**Polimórfico n=72**	**OR**	**IC (95%)**	**p***
Tabagismo	18	23	1,36	0,69-2,67	0,375
IMC ≥ 30kg/m^2	46	37	0,75	0,43-1,33	0,327
CC > 88cm	64	55	0,70	0,40-1,23	0,210
CT ≥ 200mg/dL	51	58	0,88	0,50-1,52	0,635
HOMA-IR > 2,7	36	19	0,46	0,24-0,91	**0,025**
PCR > 1,0	15	13	0,86	0,38-1,94	0,720
HDL < 50mg/Dl	43	36	0,76	0,43-1,34	0,340
Triglicérides ≥ 150 mg/dL	43	36	0,73	0,41-1,29	0,276
Glicemia ≥ 100mg/dL	22	17	0,79	0,39-1,62	0,521
Presença de SM	33	20	0,53	0,27-1,04	0,063
Atividade física	18	18	1,05	0,52-2,12	0,903
Hipertensão	50	35	0,55	0,31-0,99	**0,044**
História familiar IAM	07	07	0,95	0,33-2,78	0,938

IMC, índice de massa corpórea; CC, circunferência da cintura; CT, Colesterol Total; HOMA-IR, *HomeostasisModelAssessment- InsulinResistant*; PCR, proteína C-reativa; HDL, lipoproteína de alta densidade; SM, Sindrome metabólica; IAM, infarto agudo do Miocárdio.
*Diferença significativa se p<0,05 (Teste do Qui-Quadrado e Regressão logística, ajustado para idade, idade na menopausa e tempo de menopausa).

Tabela 4. Associação entre a presença do polimorfismo da MBL2 do Códon-57 e os fatores de risco para doença cardiovascular (DCV) entre as 311 mulheres na pós-menopausa.

	Gene MBL2 Códon 57				
Fator de risco DCV	**Normal n=247**	**Polimórfico n=32**	**OR**	**IC (95%)**	**p***
Tabagismo	19	20	1,128	0,43-2,95	0,807
IMC ≥ 30kg/m2	42	53	1,539	0,71-3,31	0,271
CC > 88cm	61	66	1,195	0,53-2,69	0,667
CT ≥ 200mg/dL	49	57	1,339	0,62-2,89	0,457
HOMA-IR > 2,7	29	30	0,992	0,43-2,28	0,984
PCR > 1,0	14	17	1,300	0,46-3,65	0,619
HDL < 50mg/Dl	41	37	0,775	0,35-1,72	0,532
Triglicérides ≥ 150 mg/dL	40	50	1,494	0,69-3,21	0,304
Glicemia ≥ 100mg/dL	22	13	0,509	0,17-1,55	0,234
Presença de SM	29	33	1,165	0,51-2,65	0,716
Atividade física	18	23	1,390	0,56-3,46	0,48
Hipertensão	49	53	1,313	0,60-2,85	0,491
História familiar IAM	07	10	1,028	0,64-1,65	0,910

IMC, índice de massa corpórea; CC, circunferência da cintura; CT, Colesterol Total; HOMA-IR, *HomeostasisModelAssessment- InsulinResistant*; PCR, proteína C-reativa; HDL, lipoproteína de alta densidade; SM, Sindrome metabólica; IAM, infarto agudo do Miocárdio.
*Diferença significativa se p<0,05 (Teste do Qui-Quadrado e Regressão logística, ajustado para idade, idade na menopausa e tempo de menopausa).

Discussão

No presente estudo, mulheres na pós-menopausa com a presença do polimorfismo do códon 54 da MBL2 apresentaram menor risco para hipertensão arterial e resistência à insulina (RI), em relação ao grupo de mulheres sem a presença do polimorfismo. Por outro lado, o polimorfismo para o códon 57 não se associou aos fatores de risco cardiovasculares. Na atualidade grande parte das mulheres das sociedades urbanas apresenta fatores de risco para DCV (33). Esta "epidemia" deve-se ao aumento na proporção de mulheres acima dos 50 anos, e a obesidade, sedentarismo, e fatores de risco metabólico (dislipidemia, disglicemia) na população. A DCV é decorrente de processo aterosclerótico de evolução progressiva, que envolve vários fatores de risco que não podem ser ignorados na abordagem da mulher climatérica (11).

Nesta pesquisa, o polimorfismo do códon 54 da MBL2 foi detectado em 25,7% das mulheres, sendo que em 22,5% heterozigose (A/B) e em 3,2% homozigose (B/B); e para o códon 57 em 9,6% heterozigose (A/C) e em 2,0% homozigose (C/C). Estes resultados estão de acordo com a literatura, em que aproximadamente 5% dos caucasianos têm uma deficiência hereditária de MBL2 na forma de homozigose (20, 34). O polimorfismo da MBL2 em 20-25% da população tem incidência relativamente alta comparada a outras deficiências do sistema do complemento (35). Tipos variantes descritos no gene da MBL2 podem acarretar alterações na atividade funcional, variações na concentração plasmática e polimerização da proteína, resultando em distúrbios imunológicos (13, 36). Os três alelos variantes de MBL2 aparecem com diferentes frequências em diferentes populações ao redor do mundo (11). O alelo B é praticamente inexistente na África, mas é bastante comum entre os caucasianos e asiáticos. Pelo contrário, o alelo C é muito comum nos africanos, raro entre os caucasianos e ausentes

entre os asiáticos e índios americanos. O alelo D é menos frequente que os outros dois e, parece ser confinado aos caucasianos e populações da África (11).

Neste estudo, 78,2% das mulheres participantes eram brancas, maioria euro-brasileiros, e apenas 21,8% afro-descendentes. A frequência de polimorfismo do MBL2 é variável entre diferentes etnias, e este aspecto deve ser considerado nos estudos genéticos (37). Poucos estudos têm investigado o polimorfismo da MBL2 na população brasileira. A frequência de homozigose (B/B) foi de 5,7% em 529 crianças saudáveis de Pernambuco (nordeste do Brasil) (38), de 6,8% em 147 paranaenses (Sul do Brasil) (39), e de 5% em 281 paulistanos (Sudeste do Brasil) (40). Boldt *et al* avaliaram a MBL2 em diferentes grupos populacionais brasileiros, incluindo 152 Índios Guarani (B/B=20%), 202 euro-brasileiros (B/B=2%), 32 afro-brasileiros (B/B=9%) e 107 brasileiros miscigenados (B/B=8%) (41). Em população do Rio de Janeiro, Ferraroni *et al* determinaram a frequência de polimorfismo da MBL2 em 294 amostras de doadores de sangue. A frequência do alelo C foi de 39%, intermediário entre 14% reportado em europeus e 90% em africanos subsarianos, refletindo a composição étnica da população do Rio de Janeiro, composta da mistura de caucasianos (31%), africanos (34%) e populações nativas americanas (33%) (37).

MBL é um importante fator de ativação da via das lecitinas do sistema complemento (12), possivelmente envolvido na inflamação vascular (24). A deficiência na imunidade inata parece contribuir na patogênese de estados inflamatórios crônicos como a aterosclerose (14). A MBL provavelmente modula a gravidade da infecção por *Chlamydia (C.) pneumoniae*, patógeno ligado a várias linhas de experimentação como iniciação e propagação da aterosclerose (12, 21). Isto poderia explicar a associação da variação genética da MBL2 com aterosclerose grave (13). Embora controversos alguns estudos indicaram associação entre infecção de *C. pneumoniae* e a DCV (15, 21, 31).

Foram descobertos antígenos de *C. pneumoniae* no ateroma humano, contudo, a presença de anticorpo não prediz subsequentes eventos coronarianos (25, 42, 43). Além disso, estudos demonstraram a relação entre alelos variantes de MBL2 associados com desenvolvimento acelerado de aterosclerose, em que a infecção por *C. pneumoniae* poderia conduzir ao desenvolvimento de doença coronariana em indivíduos geneticamente predispostos (11, 13, 44).

No presente estudo, avaliando o polimorfismo da MBL2 em mulheres na pós-menopausa, foi observado diferença significativa em relação à hipertensão arterial e RI. Mulheres com polimorfismo da MBL2 para o códon 54 apresentaram menor frequência de hipertensão e RI quando comparadas ao grupo de mulheres sem a presença do polimorfismo, demonstrando uma associação do polimorfismo da MBL2 com dois importantes fatores de risco cardiovascular. Contudo, não há estudos nesse grupo específico de população para comparação dos nossos resultados. Polimorfismos da MBL2 têm sido relacionados à DCV em diferentes populações como índios norte-americanos (29); e em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (23), com diabetes (24), e com DAC estabelecida (22, 25-28). Essas pesquisas foram realizadas em população predominantemente masculina e com reconhecidos fatores de risco cardiovascular, diferentemente do presente estudo. Neste, foram avaliadas mulheres na pós-menopausa de baixo risco cardiovascular, com mediana de 54 anos de idade e cinco anos de pós-menopausa, sem a presença de diabetes insulinodependente ou DCV manifesta atual ou prévia, o que pode ter influenciado nossos resultados.

A MBL quando acumulada *in vitro* demonstra que é capaz de modular as respostas inflamatórias (45), sugerindo que pode atuar como importante modulador natural de vias imunológicas humanas (36, 46). Estudo pioneiro, desenvolvido em 1998, observou que a deficiência de MBL está associada à maior risco de aterosclerose grave

em pacientes relativamente jovens (21). Troelsen *et al*, avaliando 41 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, observaram correlação negativa entre os genótipos de baixa expressão da MBL2 e baixos níveis séricos de MBL com a espessura da íntima das artérias carótidas, independentemente dos fatores de risco cardiovascular (23). Estudo realizado na Noruega, com 370 pacientes com DCV, demonstrou que o polimorfismo da MBL2 e deficiência de MBL esteve associado a risco duas vezes maior de infarto do miocárdio (OR 2,04, IC 95% 1,29-3,24), independentemente dos convencionais fatores de risco cardiovasculares. Os autores sugerem que a deficiência de MBL pode conduzir a aumento da aterosclerose ou ao desenvolvimento de placas instáveis (22). Outro estudo relatou que a MBL pode estar envolvida na patogênese das complicações vasculares no diabetes insulinodependente, e que a determinação das concentrações séricas da MBL poderia identificar pacientes de risco aumentado evitando assim o desenvolvimento de futuras doenças como DAC (47).

Corroborando com nossos resultados, pesquisadores demonstraram que a MBL é molécula de reconhecimento padrão que desempenha duplo papel na modificação de respostas pró-inflamatórias (46, 47). Uma pesquisa observou que animais desprovidos da ativação da via da lecitina MBL-dependente e da via clássica, são protegidos de lesão de reperfusão cardíaca com a preservação da função cardíaca (48). Em estudo transversal com 114 pacientes com artrite reumatóide foi avaliado a associação de genótipos da MBL2 com a espessura da intima de artéria coronariana e relacionada com fatores de risco cardiovasculares. Os pesquisadores observaram que os genótipos de MBL2 não foram associados com a espessura da íntima e não se correlacionaram com fatores de risco cardiovasculares (23). Outra pesquisa com 398 homens com DAC comprovada, o polimorfismo da MBL2 não se associou com a taxa de progressão da aterosclerose coronariana (10). Em recente estudo, Strack *et al.* investigaram a

associação da MBL com características de síndrome metabólica (SM) e aterosclerose precoce em 96 indivíduos obesos, antes e após redução acentuada de peso. Valores plasmáticos de MBL não diferiram entre os indivíduos obesos e controles não obesos. Assim como, não afetou os fatores de risco cardiovascular, o smarcadores da SM ou a aterosclerose precoce (49). O polimorfismo da MBL2 não é fator de risco independente para aterosclerose, sendo que estudos entre o polimorfismo de MBL2 e os fatores de risco para DCV deveriam ser aprofundados (28).

Os dados desta pesquisa podem ser limitados, por tratar-se de estudo de corte transversal com amostragem de mulheres atendidas em Ambulatório Especializado de Assistência ao Climatério. Neste estudo 78,9% das mulheres avaliadas estava abaixo dos 60 anos de idade, característica da população de mulheres com sintomas climatéricos que procuram nosso atendimento. Contudo, essa população estudada é inédita na literatura, uma vez que, os trabalhos citados no texto não avaliaram mulheres na pós-menopausa. O hipoestrogenismo no período da pós-menopausa é considerado fator relevante na patogênese da DAC, principal causa de morte em mulheres acima dos 50 anos. Assim, mesmo com o reconhecimento de marcadores genéticos, é importante a melhora da qualidade de vida desta população, estimulando a perda de peso, a prática de atividade física e mudança para hábitos alimentares mais saudáveis, com conseqüente redução do risco da DCV.

Conclusão

Neste estudo de mulheres na pós-menopausa, o polimorfismo do códon 54 da MBL2 associou-se com menor risco para hipertensão arterial e resistência à insulina (RI), importantes fatores de risco para doença cardiovascular. Por outro lado, o polimorfismo para o códon 57 não se associou aos fatores de risco cardiovasculares.

Entretanto, é importante o desenvolvimento de futuros estudos polimórficos da MBL2 e sua associação com a DCV.

Referências

1. Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. Circulation 2007;115(11):1481-501.
2. Datasus. In http://www.datasus.gov.br. Acessado em 24 de outubro de 2013.
3. Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. Eur Heart J 2008;29(7):932-40.
4. Stevenson JC. HRT and the primary prevention of cardiovascular disease. Maturitas 2007;57(1):31-4.
5. Kannel WB, D'Agostino RB, Sullivan L, Wilson PW. Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles. Am Heart J 2004;148(1):16-26.
6. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet 2004;364(9438):937-52.
7. Olivieri F, Antonicelli R, Cardelli M, Marchegiani F, Cavallone L, Mocchegiani E, et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and myocardial infarction in the elderly. Mech Ageing Develop 2006;127(6):552-9.
8. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 2002;420(6917):868-74.
9. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. Stroke 2006;37(7):1923-32.
10. Alipour A, Cabezas MC, Elte JW, Vallve JC, Ribalta J, Zwinderman AH, et al. Mannose binding lectin 2 haplotypes do not affect the progression of coronary atherosclerosis in men with proven coronary artery disease treated with pravastatin. Atherosclerosis 2011;215(1):125-9.
11. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. Gen Immun 2006;7(2):85-94.
12. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. Mol Immunol 2003;40(7):423-9.
13. Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. Biochem Soc Trans 2008;36(Pt 6):1461-6.
14. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. Ann Rev Pathol 2006;1:297-329.

15. Donders GG, Babula O, Bellen G, Linhares IM, Witkin SS. Mannose-binding lectin gene polymorphism and resistance to therapy in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. BJOG 2008;115(10):1225-31.

16. Worthley DL, Walsh MD, Barker M, Ruszkiewicz A, Bennett G, Phillips K, et al. Familial mutations in PMS2 can cause autosomal dominant hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gastroenterol 2005;128(5):1431-6..

17. Munthe-Fog L, Madsen HO, Garred P. Genotyping of FCN and MBL2 Polymorphisms Using Pyrosequencing. Meth Mol Biol 2014;1100:123-30.

18. Schoos MM, Munthe-Fog L, Skjoedt MO, Ripa RS, Lonborg J, Kastrup J, et al. Association between lectin complement pathway initiators, C-reactive protein and left ventricular remodeling in myocardial infarction-a magnetic resonance study. Mol Immunol 2013 Jul;54(3-4):408-14.

19. Garred P. Innate immunity creates hope for new strategies in treatment of infections. Immunol Today 2000;21(11):531.

20. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. Mol Immunol 2003;40(2-4):73-84.

21. Madsen HO, Videm V, Svejgaard A, Svennevig JL, Garred P. Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. Lancet 1998;352(9132):959-60.

22. Vengen IT, Madsen HO, Garred P, Platou C, Vatten L, Videm V. Mannose-binding lectin deficiency is associated with myocardial infarction: the HUNT2 study in Norway. PloS One 2012;7(7):e42113.

23. Troelsen LN, Garred P, Christiansen B, Torp-Pedersen C, Christensen IJ, Narvestad E, et al. Double role of mannose-binding lectin in relation to carotid intima-media thickness in patients with rheumatoid arthritis. Mol Immunol 2010 Jan;47(4):713-8.

24. Siezenga MA, Shaw PK, Daha MR, Rabelink TJ, Berger SP. Low Mannose-Binding Lectin (MBL) genotype is associated with future cardiovascular events in type 2 diabetic South Asians. A prospective cohort study. Cardiovascular Diabetol 2011;10:60.

25. Hegele RA, Ban MR, Anderson CM, Spence JD. Infection-susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area. J Invest Med 2000;48(3):198-202.

26. Rugonfalvi-Kiss S, Endresz V, Madsen HO, Burian K, Duba J, Prohaszka Z, et al. Association of Chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. Circulation 2002;106(9):1071-6.

27. Keller TT, van Leuven SI, Meuwese MC, Wareham NJ, Luben R, Stroes ES, et al. Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. Arter Thromb Vasc Biol 2006;26(10):2345-50.

28. Aittoniemi J, Fan YM, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, et al. The effect of mannan-binding lectin variant alleles on coronary artery reactivity in healthy young men. Intern J Cardiol 2004;97(2):317-8.

29. Best LG, Davidson M, North KE, MacCluer JW, Zhang Y, Lee ET, et al. Prospective analysis of mannose-binding lectin genotypes and coronary artery disease in American Indians: the Strong Heart Study. Circulation 2004;109(4):471-5.

30. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. Med Sci Sports Exerc 2011;43(7):1334-59.

31. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285(19):2486-97.

32. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixtured population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. Diabetes Res Clin Pract 2006;72(2):219-20.

33. Nahas EA, Andrade AM, Jorge MC, Orsatti CL, Dias FB, Nahas-Neto J. Different tools for estimating cardiovascular risk in Brazilian postmenopausal women. Gynecol Endocrinol 2013;29(10):921-5.

34. Terai I, Kobayashi K, Matsushita M, Miyakawa H, Mafune N, Kikuta H. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. Eur J Immunol 2003;33(10):2755-63.

35. Colodner R, Nitzan O, Chazan B, Edelstein H, Raz R. Mannose-binding lectin in pre-menopausal women with recurrent urinary tract infections. Clin Microbiol Infect 2010;16(9):1394-8.

36. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. Immunol Rev 2009;230(1):9-21.

37. Ferraroni NR, Segat L, Guimaraes RL, Brandao LA, Crovella S, Constantino-Silva RN, et al. Mannose-binding lectin and MBL-associated serine protease-2 gene polymorphisms in a Brazilian population from Rio de Janeiro. Intern J Immunogenetics 2012;39(1):32-8.

38. Brandao LA, Guimaraes RL, Araujo J, Arraes LC, Segat L, Crovella S. Association between MBL2 polymorphism and T1D: does ethnicity play a role in the susceptibility of this multifactorial disease? Human Immunol 2008;69(9):577-9.

39. Schafranski MD, Pereira Ferrari L, Scherner D, Torres R, Jensenius JC, de Messias-Reason IJ. High-producing MBL2 genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. Mol Immunol 2008;45(14):3827-31.

40. Ramasawmy R, Spina GS, Fae KC, Pereira AC, Nisihara R, Messias Reason IJ, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. CVI 2008;15(6):932-6.

41. Boldt AB, Culpi L, Tsuneto LT, de Souza IR, Kun JF, Petzl-Erler ML. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. Human Immunol 2006;67(9):722-34.

42. Grayston JT. What is needed to prove that Chlamydia pneumoniae does, or does not, play an etiologic role in atherosclerosis? J Infectious Diseas 2000;181 Suppl 3:S585-6.

43. Wald NJ, Law MR, Morris JK, Zhou X, Wong Y, Ward ME. Chlamydia pneumoniae infection and mortality from ischaemic heart disease: large prospective study. BMJ 2000;321(7255):204-7.

44. Garred P, J JS, Quist L, Taaning E, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. J Infectious Diseas 2003;188(9):1394-403.

45. Santos IK, Costa CH, Krieger H, Feitosa MF, Zurakowski D, Fardin B, et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. Infec Immunity 2001;69(8):5212-5.

46. Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. Tissue Antigens 2006;68(3):193-209.

47. Hansen TK, Tarnow L, Thiel S, Steffensen R, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, et al. Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. Diabetes 2004;53(6):1570-6.

48. Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K, Shi L, Busche MN, Rother RP, et al. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. J Immunol 2005;175(1):541-6.

49. Strack C, Baessler A, Wagner F, Bruxmeier J, Yaroslavskii O, Rousseva E, et al. Mannose-binding lectin in obesity with different degrees of metabolic syndrome abnormalities: association with atherogenic and metabolic traits. J Atherosclerosis Thromb 2012;19(6):539-51.

2.2. Artigo Original II

Avaliação da expressão de receptores *Toll-Like* 2 e 4 e do perfil de citocinas em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica

Cláudio Lera Orsatti[1], Eliana Aguiar Petri Nahás[1], Jorge Nahás Neto[1],

Steven S. Witkin[2]

[1]Setor de Climatério & Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

[2] Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Immunology and Infectious Diseases, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

Resumo

Objetivo: avaliar a expressão gênica dos receptores *Toll-Like* (TLR-2 e TLR-4) e o perfil de citocinas em mulheres na pós-menopausa com ou sem síndrome metabólica (SM).

Métodos: Estudo clínico, transversal, envolvendo 311 mulheres na pós-menopausa (idade ≥45 anos e amenorréia ≥ 12 meses) acompanhadas em Ambulatório de Climatério & Menopausa, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), de fevereiro de 2011 a junho de 2012. Critérios de exclusão: presença de doença cardiovascular manifesta, diabetes insulinodependente, doença renal crônica, doenças autoimunes e neoplasia maligna. A expressão do TLR-2 e TLR-4 foram realizadas a partir da extração do RNA e posterior PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. O perfil de citocinas incluiu o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucinas (IL-1β, IL-6, IL-10). Para análise estatística foram empregados os testes do Qui-Quadrado, de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, e a correlação de Spearman.

Resultados: De acordo com o NCEP/ATP III, 27,6% (86/311) das mulheres foram classificadas como portadoras da SM. A expressão do TLR-2 foi demonstrada em 32,5% (101/311) e do TLR-4 em 20,6% (64/311). Não houve associação entre a expressão dos TRL-2 e TRL4 com a presença ou ausência da SM ($p>0.05$). Observou-se maior produção de IL-6 ($p=0,044$) e de TNF-α ($p=0,048$) entre as pacientes com TRL-2 expresso, quando comparadas aquelas que não expressaram. Houve correlação positiva entre a IL-6 e a pressão arterial elevada ($r=0,12$, $p=0,036$) e a hiperglicemia ($r=0,11$, $p=0,47$). Não foi observada associação entre a expressão de TRL-2 e TRL-4 com os marcadores da SM.

Conclusão: No presente estudo, a expressão do TRL-2 associou-se com aumento de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF-α, que apresentaram correlação positiva com a elevação da pressão arterial e a hiperglicemia, marcadores da SM.

Abstract

Objective: To evaluate the gene expression of Toll-Like (TLR-2 and TLR-4) receptors and cytokine profile in postmenopausal women with or without metabolic syndrome (MetS).

Methods: In this cross-sectional study, 311 women (age ≥45 years and amenorrhea ≥ 12 months) seeking healthcare at a public outpatient center in southeastern Brazil, from February 2011 to June 2012, were included. Exclusion criteria: presence of cardiovascular disease manifests, insulin dependent diabetes, chronic kidney disease, autoimmune diseases and cancer. The expression of TLR-2 and TLR-4 were performed from RNA extraction and subsequent PCR (polymerase chain reaction) in real time. The profile of cytokines included tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and interleukin (IL-1β, IL-6, IL-10). Statistical analysis using the chi-square test, Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test and Spearman correlation were used.

Results: According to the NCEP/ATP III, 27.6% (86/311) of women were classified as having MetS. The expression of TLR-2 has been demonstrated in 32.5 % (101/311) and TLR-4 in 20.6% (64/311). There was no association between the expression of TLR-2 and TRL-4 with the presence or absence of MetS ($p > 0.05$). We observed greater production of IL-6 ($p=0.044$) and TNF-α ($p=0.048$) between patients with TRL-2 expressed compared those who did not express. There was a positive correlation between IL-6 and high blood pressure ($r = 0.12$, $p = 0.036$) and hyperglycemia ($r = 0.11$, $p = 0.47$). No association was observed between the expression of TRL-2 and TRL-4 with markers of MetS.

Conclusion: In this study, the expression of TRL-2 was associated with increased pro-inflammatory cytokines, IL-6 and TNF-α, which were positively correlated with elevated blood pressure and hyperglycemia, biomarkers of MetS.

Introdução

A síndrome metabólica (SM) é definida por um conjunto de fatores de riscos metabólicos que incluem obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial e disglicemia (1). Acomete aproximadamente 30% da população de mulheres acima dos 50 anos, com aumento de três vezes o risco de morbimortalidade por doença cardiovascular (DCV) (2-4). Essa síndrome associa-se a desordem metabólica denominada resistência a insulina (RI) em que a ação normal da insulina está prejudicada. A obesidade abdominal é um estado pro-inflamatório que contribui para RI, condição sugerida como fator causal da dislipidemia, da intolerância a glicose e aumento da pressão arterial (5, 6). A SM sabidamente associa-se com o aumento no risco de desenvolvimento de doença arterial coronária (DAC) em mulheres na pós-menopausa (7).

Na DAC, convencionais fatores de risco metabólicos presentes na SM, como dislipidemia, hipertensão, diabetes, obesidade – permanecem importantes (8), mas diferenças individuais no perfil inflamatório podem modular a severidade do processo aterosclerótico (9). A aterosclerose é definida como processo crônico, progressivo e sistêmico, consequente à resposta inflamatória e fibroproliferativa causada por agressão a superfície endotelial das artérias (10). Pode ser desencadeada por injúria ao endotélio arterial atribuído a fatores como hipertensão, hiperinsulinemia, dislipidemia, e principalmente, pela deposição de moléculas oxidadas de LDL (11). Após agressão inicial, monócitos e células T são recrutados do sangue periférico para a parede arterial, e penetram na íntima dos vasos e fagocitam o LDL oxidado, promovendo dessa maneira, a liberação de citocinas inflamatórias (10). Entre estas, as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) têm papel de perpetuar a resposta inflamatória e modificar a superfície endotelial anticoagulante para um estado

pró-trombótico. A IL-6 por sua vez estimula a produção hepática da proteína C reativa (PCR), sendo esta última reconhecida proteína da fase aguda de processos inflamatórios (12, 13). A elevação dos valores séricos da PCR é considerada fator de risco independente para aterosclerose, particularmente em mulheres (12), além de ser fator de predisposição para infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC), doença arterial periférica e morte súbita (14).

A expressão das citocinas pró-inflamatórias ocorre pela ativação dos receptores *Toll-like* (TLRs), em especial TLR-2 e TLR-4 (15-17). Os TLRs são proteínas transmembrânicas caracterizadas por um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio intracelular Toll/IL-1R (18, 19). São divididos de acordo com a sua localização na célula: os TLR-1/2/4/5/6/10 são expressos na superfície celular, e os TLRs-3/7/8/9 em compartimentos endosomais intracelulares (19, 20). Os TLRs são amplamente expressos por células imunológicas, e por células epiteliais e endoteliais (21-25). Uma vez ativados resultam na indução de citocinas pró-inflamatórias, fagocitose e *burst* oxidativo (26, 27). TLRs podem ser ativados por células do sistema cardiovascular, representando elo entre o desenvolvimento de DCV e o sistema imunológico, embora o papel individual dos membros da família TLR na fisiopatologia desta doença ainda mereçam maiores investigações (2).

Em pesquisas prévias, pesquisadores observaram a expressão celular de TLRs na lesão aterosclerótica (16, 26, 28, 29). A ativação de TLR-2 tem papel central na regulação da inflamação vascular em camundongos, sugerindo que o TLR-2 induz ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, e IL-6) e diminuição da formação do tecido vascular, sendo estes resultados contrários ao que ocorre nos camundongos deficientes em TLR-4 (30). Evidência considerável associa a aterosclerose com a sinalização do TLR. Contudo, alterações genéticas como

polimorfismo destes receptores demonstraram resultados contraditórios. Estudos apontaram que há alteração no polimorfismo dos receptores TLR-4 na aterosclerose (31, 32) e em doença coronariana (33, 34). Entretanto, outros pesquisadores relataram que o polimorfismo do TLR-4 não apresenta significância em relação à aterosclerose ou DCV (35, 36). Em outro estudo, foi observado que o polimorfismo do TLR-2 esteve associado a DCV e não o polimorfismo do TLR-4 (37).

Há poucos dados sobre a expressão de TLRs em mulheres na pós-menopausa. Alguns estudos avaliaram a expressão desses receptores na regulação da inflamação no endométrio (25) ou no câncer (38), além de identificar mulheres com aterosclerose, mesmo entre aquelas com baixo risco cardiovascular (39). Recente estudo demonstrou que a expressão e atividade dos TLR2 e TLR4 estão aumentadas em monócitos de pacientes com SM e os mesmos contribuem para o aumento do risco de DAC (40). Entretanto a literatura é escassa quanto à via de inflamação em pacientes com SM.

Pelas evidências crescentes que a expressão de TLR e as moléculas inflamatórias circulantes influenciam no risco da DAC, a detecção e monitoramento da inflamação têm papel de destaque no diagnóstico precoce, em especial em mulheres na pós-menopausa com SM. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão gênica dos TLRs (TLR-2 e TLR-4) e o perfil de citocinas (IL-1β, IL-6, TNFα, IL-10) em mulheres na pós-menopausa com ou sem SM.

Métodos

Desenho do Estudo e Seleção da Amostra

Foi realizado estudo clínico e transversal. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Ambulatório de Climatério & Menopausa, da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), de fevereiro de 2011 a junho de 2012. O cálculo do

tamanho amostral foi embasado no estudo de Yasui *et al* (41) que demonstraram valores médios de IL-6 na pré-menopausa de 1,6 pg/mL e na pós-menopausa de 2,7 pg/mL. Considerando a diferença entre esses valores, para um coeficiente de confiança de 95% e uma margem de erro de 5%, o tamanho amostral obtido foi de no mínimo 85 participantes. Foram incluídas no estudo 311 mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade ≥ 45 anos; com os seguintes critérios de exclusão: (1) presença de DAC manifesta atual ou prévia; (2) doença arterial cerebrovascular; (3) doença aneurismática; (4) doença arterial periférica; (5) doença renal crônica; (6) diabete insulinodependente; (7) doença hepática; (8) doenças autoimunes; (9) neoplasia maligna; (10) etilista ou drogaditas (Figura 1). Foram esclarecidos, para as pacientes selecionadas, os objetivos e procedimentos a que seriam submetidas, e solicitadas à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), exigência da resolução nº 196/outubro/1996 do Conselho Nacional de Saúde, após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Botucatu – UNESP.

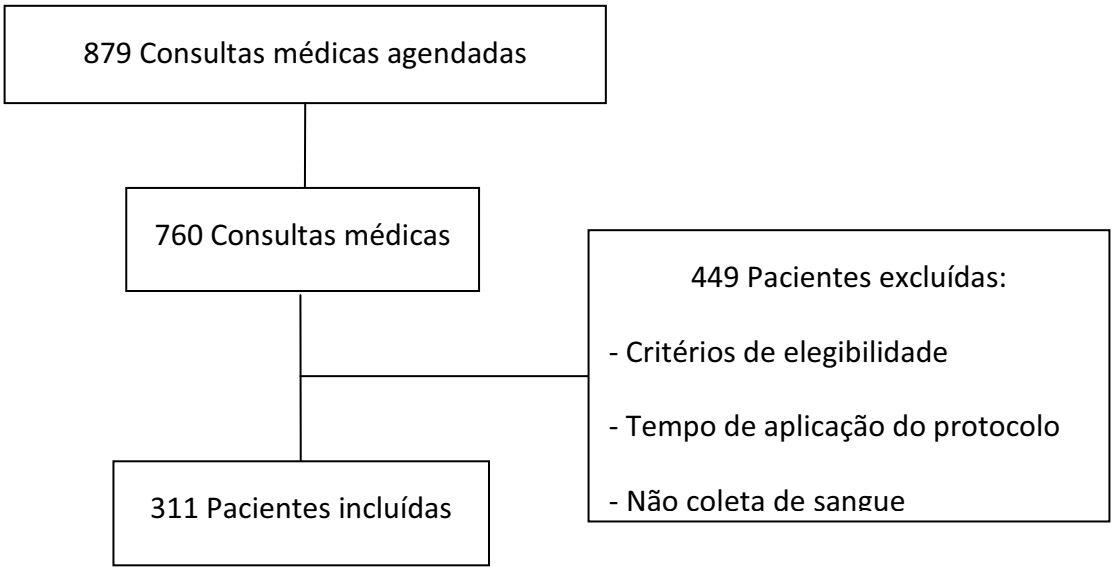

Figura 1- Fluxograma das pacientes incluídas nos estudo.

Definição das variáveis

As variáveis independentes foram expressão dos TRL-2 e TRL-4 e a produção de citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α e IL10. As variáveis dependentes foram os marcadores diagnósticos da SM: circunferência da cintura (CC), pressão arterial sistólica e diastólica (PAS e PAD), glicemia, resistência a insulina (RI), triglicerídeos, HDL e a presença da síndrome metabólica.

Metodologia

Inicialmente, no dia da consulta foram coletados, por meio de entrevista, os seguintes dados: idade, tempo de menopausa, tabagismo, uso de terapia hormonal (TH), história pessoal de hipertensão arterial e/ou diabetes, atividade física, e antecedente familiar de infarto agudo do miocárdio em parente de 1º grau masculino com idade < 55 anos e em parente de 1º grau feminino com idade < 65 anos. Após a entrevista, a pressão arterial foi aferida no braço direito, com a paciente sentada e o antebraço apoiado no nível do precórdio, palma da mão para cima, com uso de esfigmomanômetroaneróide padrão. Foram definidas como tabagistas as pacientes com o hábito de fumar diariamente, não importando o número de cigarros fumados. Foram consideradas ativas as mulheres que praticavam exercícios físicos aeróbicos de intensidade moderada, pelo menos 30 minutos, cinco vezes na semana (150/min/sem) ou exercícios de resistência três dias por semana (CDC). Foram consideradas com síndrome metabólica as mulheres que apresentaram três ou mais critérios diagnósticos propostos pelo *US National Cholesterol Education Program (NCEP)/ Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) (42): circunferência da cintura > 88 cm; triglicerídeos ≥ 150 mg/dL; HDL colesterol < 50 mg/dL; pressão arterial sanguínea ≥ 135/85 mmHg; glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL ou sob terapia.

Foram obtidos os seguintes dados para avaliação antropométrica: peso, altura, índice de massa corpórea (IMC=peso/ altura^2) e circunferência da cintura (CC). Para mensuração do peso, utilizou-se balança antropométrica eletrônica, tipo plataforma da marca Filizola®, graduada a cada 100g, capacidade até 150 kg, com precisão de 0,1 kg, com a paciente descalça e mínimo de roupa. A estatura foi determinada em estadiômetrovertical afixado a balança, com precisão de 0,1cm, sendo a paciente orientada a manter-se em posição ortostática, com braços ao lado do corpo, cabeça orientada a frente, descalça, mantendo os pés juntos e em inspiração profunda. Foram empregados os critérios da *World Health Organization* de 2002 para classificação das pacientes, conforme o IMC: menor que 24,9kg/m^2 normal, de 25-29,9kg/m^2 sobrepeso, e maior ou igual a 30,0kg/m^2 obesidade. Para a medida da CC foi empregado o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, por meio de fita métrica inextensível milimetrada e com escala de 0,5cm, da marca Lange®, com a paciente em posição ortostática, na expiração; sendo considerada aumentada para mulheres, acima de 88 cm (42).

Para a realização dos exames laboratoriais, as pacientes foram orientadas a realizar jejum de 12 horas. Por meio de punção venosa, em sistema fechado a vácuo, foi coletadosangue em tubo seco com gel separador e centrifugado a 3000rpm por dez minutos, para obtenção do soro, com uma amostra seguida de análise bioquímica imediata e outra alíquota congelada a -80°C até a leitura do perfil de citocinas. Outra amostra sanguínea foi coletada em tubo heparinizado (EDTA 6%) para extração de RNA e congelada a -80°C até a leitura do TRL 2 e 4. Na análise bioquímica imediata foram dosados: glicose, colesterol total (CT), HDL, triglicerídeos (TG), e insulina. As mensurações de TG, CT, HDL e glicose foram processadas pelo analisador bioquímico automático, modelo Vitros 950® pelo método colorimétrico de química seca (*Johnson &*

Johnson®, Rochester, New York, USA). O LDL foi calculado subtraindo-se o valor do CT, da soma do HDL e do TG dividido por cinco. Os valores considerados ótimos foram: CT <200 mg/dL, HDL >50mg/dL, LDL <100 mg/dL, TG <150 mg/dL e glicose<100mg/dL. A insulina foi quantificada pelo Sistema Immulite® (*DPC®,USA*), que emprega imunoensaio, em fase sólida, por quimioluminescência, para uso em analisador automático, designado para leitura quantitativa. A taxa de normalidade segundo o método empregado foi de 6,0 a 27,0 µIU/ml. Para a avaliação da resistência insulínica (RI) foi utilizado método baseado em medida estática com dois constituintes plasmáticos (insulina e glicemia de jejum). O HOMA-IR (*HOmeostasis Model Assessment- Insulin Resistant*) foi calculado pela fórmula: Insulina mU/ml x glicemia de jejum, mg/dl / 405. Valores que indicam RI foi definido como Homa-IR > 2,7 (Geloneze, Repetto *et al.*, 2006).

Para determinação plasmáticas das citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10) aplicaram-se imunoensaios (*Human TNF, High Sensitivity Human IL-6*, *Human IL-10Human IL*-1β,quantikines Kits, R&D® Systems, Minneapolis, USA), pela técnica de ELISA (*Enzime-LinkedImmunoSorbentAssay*), em fase sólida, com duração de 5 horas, obedecendo às recomendações do fabricante dos Kits. Todas as dosagens foram realizadas em único momento, para evitar variação inter-ensaio, por único pesquisador especializado. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram inferiores a 7%. E as sensibilidades analíticas segundo fabricante dos Kits são: TNF-α de 0,5-5,5 pg/ml; IL-1β ≤1,0 pg/ml; IL-6 de 0,016-0,111 pg/ml, IL-10 ≥3.9 pg/mL.

A expressão do TLR-2 e TLR-4 foram realizadas a partir da extração do RNA e posterior PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. O RNA total foi purificado do sangue periférico da amostra de sangue heparinizado, em sistema fechado a vácuo e extraído com Trizol. Posteriormente foi tratado com DNAse para impedir

resultados falso positivos devido à amplificação de DNA genômico contaminante. Concentrações de RNA total foram determinadas a partir dos valores da absorbância das amostras a 260nm. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μg de RNA total, utilizando kits e primers para iniciar a síntese de cDNA (Tabela 1). O cDNA foi submetido a PCR em tempo real quantitativo, utilizando ABI Prism 7000. Sondas e primers específicos para TLR-2 e TLR-4 humanos foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante (Integrated DNA Technologies, Inc, EUA).

Tabela 1. – Sequência de primers utilizadas na Reação em Cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Gene	Sense (5´- 3´) – Forward	Anti-Sense (3´- 5´) – Reverse
TLR-2	GCCAAAGTCTTGATTGATTGG	TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG
TLR-4	TGGATACGTTTCCTTATAAG	GAAATGGAGGCACCCCTT

TLR, *Toll-Like Receptor*.

Análise Estatística

O modelo de relacionamento sob teste supõe que a expressão dos TLR-2 e TLR-4 e a produção das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 apresentem relação com os marcadores da SM. Foram analisadas a distribuição das variáveis por meio dos testes Shapiro-Wilk e a homogeneidade por teste de Levene. A associação entre a expressão de TRL-2 e TRL-4 quanto à presença ou ausência da SM foi analisada pelo teste do Qui-quadrado. A comparação entre os valores de citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α e IL10 quanto à presença ou ausência da SM foi realizada pelo teste de Teste de Kruskal-Wallis. A relação entre os receptores TLR-2 e TLR-4 com a produção de citocinas foi

realizada pelo teste de Mann-Whitney. Foi empregado o coeficiente de correlação de Spearman, para dados quantitativos. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Package for Social Science for Windows* (*SPSS*), versão 15.0, pelo Escritório de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Resultados

As características descritivas clínicas e laboratoriais das 311 mulheres avaliadas estão apresentadas na Tabela 1. Observa-se que a mediana de idade das pacientes incluídas foi de 54 anos, com tempo de menopausa de cinco anos. Quanto aos indicadores da composição corporal, 37,6% das pacientes foram classificadas como obesas (IMC ≥ 30 kg/m2) e 62% com aumento da circunferência da cintura (>88 cm), demonstrando distribuição central de gordura corporal. A porcentagem de mulheres sedentárias foi de 83,9%; apenas 16,1% relatavam a prática de caminhadas regulares pelo menos cinco vezes na semana. Encontrou-se que 16,4% eram tabagistas, 39,5% hipertensas e, 12,5% diabéticas. De acordo com o NCEP/ATP III, 27,6% das mulheres foram classificadas como portadoras da SM, e em 25,7% observou-se resistência a insulina pelo HOMA-IR. Observou-se que entre as citocinas avaliadas, a IL-10 apresentou valores mais elevados. A expressão do TLR-2 foi demonstrada em 32,5% (101/311) e do TLR-4 em 20,6% (64/311) entre as participantes (Tabela 2). Quando analisado a associação entre a expressão dos TRL-2 e TRL4 com a presença ou ausência da SM, não foi observada diferença significativa (Tabela 3). Não foi observada

diferença nos valores de citocinas entre as mulheres com ou sem diagnóstico de SM (Tabela 4).

Na associação entre a expressão de TLR-2 e TLR-4 e a produção de citocinas, houve maior produção de IL-6 (p=0,044) e de TNF-α (p=0,048) entre as pacientes com TRL-2 expresso, quando comparadas aquelas que não expressaram (Tabela 5). Não foi observada associação entre a expressão de TLR-4 e a produção de citocinas (dados não demonstrados).

A correlação entre as citocinas e os marcadores da SM está demonstrada na Tabela 6. Houve correlação positiva entre a IL-6 e a pressão arterial elevada (r=0,12, p=0,036) e a hiperglicemia (r=0,11, p=0,47). Por outro lado observou-se correlação negativa entre a IL-10 e a pressão arterial elevada (r=-0,12, p=0,035). Não foi observada associação entre a expressão de TRL-2 e TRL-4 com os marcadores da SM (dados não demonstrados).

Tabela 2. Características descritivas das 311 mulheres na pós-menopausa.

Variáveis	**Valores**
Idade (anos) (mediana, interquartil)	54 (49 - 58)
Idade menopausa (anos) (mediana, interquartil)	48 (45 - 50)
Tempo menopausa (anos) (mediana, interquartil)	5 (2 - 10)
IMC ≥ 30kg/m^2 (n, %)	117 (37,6)
Cintura ≥ 88cm (n, %)	166 (53,4)
Tabagista (n, %)	51 (16,4)
Sedentárias (n, %)	261 (83,9)
Hipertensão (n, %)	123 (39,5)
Diabetes (n, %)	39 (12,5)
Presença de Síndrome Metabólica (n, %)	86 (27,6)
HOMA –IR > 2,7 (n, %)	80 (25,7)
Colesterol Total ≥ 200mg/dL (n, %)	135 (43,4)
HDL < 50mg/dL (n, %)	110 (35,4)
LDL > 100mg/dL (n, %)	227 (73)
Triglicérides ≥ 150mg/dL (n, %)	111 (35,7)
Glicose ≥ 100mg/dL (n, %)	56 (18,0)
IL-1ß (pg/mL) (mediana, interquartil)	0,47 (0,21 – 0,91)
IL-6 (pg/mL) (mediana, interquartil)	0,43 (0,26 – 0,71)
TNF-a (pg/mL) (mediana, interquartil)	1,27 (0,49 – 2,80)
IL-10 (pg/mL) (mediana, interquartil)	3,35 (2,23 – 5,18)
TLR-2 expresso (n,%)	94 (32,7)
TLR-4 expresso (n,%)	59 (20,6)

IMC, índice de massa corpórea; IAM, infarto agudo do Miocárdio; HOMA-IR, *HomeostasisModelAssessment- InsulinResistant*; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; PCR, proteína C-reativa; IL, Interleucina; TNF, Fator de Necrose Tumoral; TLR, TollLike Receptor.

Tabela 3. Associação entre a expressão dos receptores Toll-Like 2 e 4 entre as mulheres na pós-menopausa com (presente, n=86) e sem (ausente, n=225) síndrome metabólica.

Receptores	Síndrome Metabólica		Valor de p*
	Ausente	**Presente**	
TLR-2			0,480
Expresso (n=101)	75 (74,2)	26 (25,7)	
Não Expresso (n=201)	141 (70,1)	60 (39,9)	
TLR-4			0,576
Expresso (n=64)	49 (76,6)	15 (23,4)	
Não Expresso (n=247)	175 (70,8)	72 (29,2)	

Valores expressos em número e porcentagem entre parênteses.

TLR, *Toll Like* Receptor 2 e 4.

*Diferença significativa p<0,05 (Teste do Qui-Quadrado).

Tabela 4. Comparação dos valores de citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α) entre as mulheres da pós-menopausa com (presente, n=86) e sem (ausente, n=225) síndrome metabólica.

Citocinas	**Síndrome Metabólica**				**Valor de p***
	Ausente		**Presente**		
	Mediana	IC 95%	Mediana	IC 95%	
IL-1β	0.54	0.48-0.63	0.53	0.35-0.66	0,323
IL-6	0.51	0.46-0.62	0.42	0.29-0.65	0,277
IL-10	4.12	3.66-4.65	3.98	2.98-4.88	0,288
TNF-α	1.75	1.35-2.11	1.96	1.38-2.40	0,911

Os dados são apresentados em mediana e intervalo de confiança (IC 95%)

IL, Interleucinas; TNF, Fator de necrose tumoral

* Diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$; Teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 5. Associação entre a expressão do TRL-2 com a produção de citocinas nas 311 mulheres na pós-menopausa.

	TRL-2 não expresso (n=201)			TRL-2 expresso (n=101)			
Citocina	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
IL-1β	0,48	0,03	7,32	0,51	0,01	7,15	0,666
IL-6	0,47	0,14	4,91	0,62	0,13	5,34	**0,044**
TNF-α	1,52	0,00	16,41	1,91	0,02	33,60	**0,048**
IL-10	3,59	1,41	32,56	4,61	1,34	95,65	0,132

IL, Interleucinas; TNF, Fator de necrose tumoral (pg/mL); TLR, TollLike Receptor.

* Diferença significativa entre os grupos ($p < 0.05$; Teste de Mann-Whitney para amostras independentes).

Tabela 6– Correlação (r) entre as citocinas e os marcadores da síndrome metabólica nas 311 mulheres na pós-menopausa.

Citocinas					
	Cintura	**PA**	**Glicose**	**HDL**	**TG**
	> 88 cm	≥ 135/85 mmHg	≥ 100 mg/dL	< 50 mg/dL	≥ 150 mg/dL
IL-1β	-0,05	-0,08	-0,02	-0,06	0,01
	(0,435)	(0,220)	(0,713)	(0,374)	(0,886)
IL-6	-0,08	0,12	0,11	-0,02	0,02
	(0,155)	(0,036*)	(0,047*)	(0,741)	(0,746)
TNF-α	0,07	-0,03	-0,04	0,07	-0,07
	(0,253)	(0,548)	(0,487)	(0,223)	(0,240)
IL-10	-0,07	-0,12	-0,09	-0,02	0,02
	(0,190)	(0,035*)	(0,108)	(0,670)	(0,746)

Dados apresentados pelo valor de *r* e valor de *p* entre parênteses.

PA, pressão arterial, HDL, lipoproteína de alta densidade, TG, triglicerídeos; IL, Interleucinas; TNF, Fator de necrose tumoral.

* p<0,05 (Correlação de Spearman)

Discussão

No presente estudo, a expressão do TRL-2 associou-se com aumento de citocinas pró-inflamtórias, IL-6 e TNF-α, que apresentaram correlação positiva com a pressão arterial e a glicemia, bio-marcadores da SM. A expressão de TLR parece ser o precursor inicial para ativação de mediadores inflamatórios, como as citocinas em mulheres na pós-menopausa, desencadeando uma resposta inflamatória. O início da inflamação ocorre pela ativação de receptores celulares (43). Estes receptores estão bem descritos quanto à sua associação com risco de DAC, principalmente os receptores *Toll-like* (10, 26, 29).

Estudos em modelos animais demonstraram que ambos receptores, TLR-2 e TLR-4, estão relacionados com a aterosclerose, a resistência à insulina e diabetes (2, 28, 44, 45), características presentes na SM. Quando analisado uma subpopulação celular (monócitos) foi observado aumento da expressão de TLR2 e TLR4 em pacientes com angina e síndrome coronária aguda (46, 47). No presente estudo observou-se em sangue periférico, maior número de mulheres que não expressavam os receptores *Toll-Like*. Entretanto, denotou-se associação significativa entre TRL-2 expresso com a produção de citocinas IL-6 e TNFα, demonstrando que mulheres que expressavam mais o TLR-2 produziram maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias. Em relação ao TRL-4 não foi observada nenhuma associação com a produção de citocinas.

Em concordância com os resultados do presente estudo, dados da literatura indicam que a ativação de TLR-2 tem papel central na regulação da inflamação vascular, sugerindo que induz aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, e IL-6) (16). Os TLRs uma vez ativados regulam positivamente ou negativamente a indução de citocinas pró-inflamatórias e burst oxidativo, em especial

TLR-2 e TLR-4 (2, 30). Contudo não há dados específicos em mulheres na pós-menopausa com ou sem SM, para compararmos nossos resultados.

A SM é definida por um conjunto de fatores de risco que incluem obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial e disglicemia (1). A SM tem elevada prevalência na pós-menopausa e confere risco aumentado para a DCV e diabetes (40, 48). Enquanto a SM é considerada um estado pró-inflamatório, há poucos dados sobre a inflamação celular nesse grupo de pacientes. E pouco se sabe sobre a via de sinalização da inflamação em mulheres na pós-menopausa. Em 2012, Jialal *et al*. examinaram a expressão do TRL2 e TRL-4 em 81 pacientes com ou sem SM, de ambos os sexos com idade entre 21 a 71 anos. Os autores constataram aumento da atividade de expressão dos receptores celulares em pacientes com SM, associados com HOMA-IR e marcadores inflamatórios como IL-6, IL-1, e IL-8, o que poderia contribuir para o aumento do risco de diabetes e DCV em pacientes com SM (40).

Ghanim *et al.*, analisando 16 pacientes obesos comparados com controles, demonstraram estado pró-inflamatório na obesidade com aumento da atividade do fator nuclear kappa B (NF-kB) e nos valores de IL-6 e TNF-α (49). Esses dados reforçam a via de sinalização de citocinas, uma vez que a ativação dos TLRs induz a via de sinalização por NF-kB para a transcrição de genes envolvidos na produção de citocinas (50-52). Na presente pesquisa não foi demonstrada diferenças na expressão de TRL-2 e TRL-4 e na produção de citocinas entre mulheres com ou sem SM. Esse fato pode decorrer da baixa ocorrência de SM (27,6%) na população estudada, composta de mulheres saudáveis, com mediana de idade de 54 anos e cinco anos de pós-menopausa, e apenas 37,6% obesas. Embora exista grande quantidade de dados sobre inflamação e obesidade, fenótipo presente na SM, nem todos os pacientes com obesidade têm risco

metabólico elevado; 31,7% das pessoas obesas apresentam fenótipo metabólico de baixo risco (53).

O estudo *Woman On the Move through Activity and Nutrition* (WOMAN) tratou de ensaio clínico randomizado que investigou a variação laboratorial de painel de citocinas e suas relações com fatores de risco para a DAC em 290 mulheres norte-americanas na pós-menopausa com excesso de peso. A maioria das citocinas foram detectáveis nas amostras, mas com grande variação biológica individual. Os tradicionais fatores de risco para DAC, como idade, dislipidemia, circunferência da cintura e RI estiveram associados com valores de IL-1, IL-6 e TNF-α. A perda de peso foi associada a diminuiçãodos valores de IL-1, IL-6 e PCR. Para os autores, existe grande e inexplicada variabilidade nos valores de citocinas, provavelmente devido à associações genética-ambientais (54).

Nesta pesquisa demonstrou-se fraca correlação entre a IL-6, importante citocina pró-inflamatória com a elevação da pressão arterial (r=0,12) e a hiperglicemia (r=0,11), bio-marcadores da SM. Esses dados estão em concordância com estudos prévios (55). Estudo que comparou 82 mulheres, divididas em dois grupos, mulheres em idade fértil (n=34) e mulheres na pós-menopausa (n=48), observou que não houve diferença significativa entre IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN-γ. Entretanto, a IL-6, TNF-α e IL-18 foram significativamente maiores em mulheres na pós-menopausa, principalmente aquelas com componentes para a SM (55). Em estudo de caso-controle, pesquisadores investigando a relação entre citocinas e hipertensão arterial em 800 mulheres hipertensas e 800 controles pareados, verificaram associação entre os valores de IL-6 com hipertensão, que não se manteve após ajuste para medidas de adiposidade (IMC e CC) (56). Em outro estudo não foi demonstrada diferenças nos valores de citocinas entre as mulheres na pós-menopausa com ou sem SM. No entanto, aquelas

com obesidade abdominal e hipertensão exibiram um aumento significativo dos valores de IL-6, independentemente da SM (57). Contudo, novos estudos com o grupo específico de mulheres na pós-menopausa para avaliar a associação de TLRs e citocinas influenciando nos marcadores de risco para SM, são importantes, uma vez que a literatura ainda é controversa.

Os dados desta pesquisa podem ser limitados, por tratar-se de estudo de corte transversal com amostragem de mulheres atendidas em Ambulatório Especializado de Assistência ao Climatério. Neste estudo 78,9% das mulheres avaliadas estava abaixo dos 60 anos de idade, característica da população de mulheres com sintomas climatéricos que procuram nosso atendimento. Contudo, essa população estudada é inédita na literatura, uma vez que, os trabalhos citados neste estudo não avaliaram mulheres na pós-menopausa.

Conclusão

No presente estudo, em mulheres na pós-menopausa, a expressão do TRL-2 associou-se com aumento de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF-α, correlacionadas com a elevação da pressão arterial e hiperglicemia, bio-marcadores da síndrome metabólica. A expressão de TLR parece ser precursor inicial para ativação de mediadores inflamatórios, como as citocinas em mulheres na pós-menopausa, desencadeando uma resposta inflamatória correlacionada com os fatores para síndrome metabólica como hipertensão e diabetes.

Referências Bibliográficas

1. Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, Mora S. The metabolic syndrome in women. Cardiol Rev 2006;14(6):286-91.

2. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. Nature Clin Practice Cardiovascular Med 2007;4(8):444-54.

3. Janssen I, Powell LH, Crawford S, Lasley B, Sutton-Tyrrell K. Menopause and the metabolic syndrome: the Study of Women's Health Across the Nation. Arch Intern Med 2008;168(14):1568-75.

4. Petri Nahas EA, Padoani NP, Nahas-Neto J, Orsatti FL, Tardivo AP, Dias R. Metabolic syndrome and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. Climacteric 2009;12(5):431-8.

5. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. Circulation 2005;111(11):1448-54.

6. Sell H, Eckel J. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. Curr Opinion Clin Nutr Metab Care 2010;13(4):366-70.

7. Zhang C, Rexrode KM, van Dam RM, Li TY, Hu FB. Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: sixteen years of follow-up in US women. Circulation 2008;117(13):1658-67.

8. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet 2004;364(9438):937-52.

9. Olivieri F, Antonicelli R, Cardelli M, Marchegiani F, Cavallone L, Mocchegiani E, et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and myocardial infarction in the elderly. Mechan Ageing Develop 2006;127(6):552-9.

10. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 2002;420(6917):868-74.

11. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. Stroke 2006;37(7):1923-32.

12. Ridker PM, Morrow DA. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. Cardiol Clin 2003;21(3):315-25.

13. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. Am J Cardiol 2006;98(1):121-8.

14. Wilson AM, Ryan MC, Boyle AJ. The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease: risk marker or pathogen. Intern J Cardiol 2006;106(3):291-7.

15. Vabulas RM, Wagner H, Schild H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. Current topics in microbiology and immunology. 2002;270:169-84.

16. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. Circulation 2002;105(10):1158-61.

17. Kim TH, Choi SE, Ha ES, Jung JG, Han SJ, Kim HJ, et al. IL-6 induction of TLR-4 gene expression via STAT3 has an effect on insulin resistance in human skeletal muscle. Acta Diabetol 2013;50(2):189-200.

18. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nature Rev Immunol 2001;1(2):135-45.

19. Akira S. Toll receptor families: structure and function. Sem Immunol 2004;16(1):1-2.

20. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Semin Immunol 2004;16(1):3-9.

21. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nature Immunol 2001;2(8):675-80.

22. Sutmuller RP, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. Trends Immunol 2006;27(8):387-93.

23. Sutmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. J Clin Invest 2006;116(2):485-94.

24. Krikun G, Trezza J, Shaw J, Rahman M, Guller S, Abrahams VM, et al. Lipopolysaccharide appears to activate human endometrial endothelial cells through TLR-4-dependent and TLR-4-independent mechanisms. Am J Reprod Immunol 2012;68(3):233-7.

25. Allhorn S, Boing C, Koch AA, Kimmig R, Gashaw I. TLR3 and TLR4 expression in healthy and diseased human endometrium. Reprod Biol Endocrinol 2008;6:40.

26. Spirig R, Tsui J, Shaw S. The Emerging Role of TLR and Innate Immunity in Cardiovascular Disease. Cardiol Res Practice 2012;2012:181394.

27. Wang H, Brown J, Gao S, Liang S, Jotwani R, Zhou H, et al. The role of JAK-3 in regulating TLR-mediated inflammatory cytokine production in innate immune cells. J Immunol 2013;191(3):1164-74.

28. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. Circulation 2001;104(25):3103-8.

29. Tobias PS, Curtiss LK. TLR2 in murine atherosclerosis. Semin Immunopathol 2008;30(1):23-7.

30. Shishido T, Nozaki N, Takahashi H, Arimoto T, Niizeki T, Koyama Y, et al. Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury. Biochem Biophysical Res Commun 2006;345(4):1446-53.

31. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. N Engl J Med 2002;347(3):185-92.

32. Lin YC, Chang YM, Yu JM, Yen JH, Chang JG, Hu CJ. Toll-like receptor 4 gene C119A but not Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. Atherosclerosis 2005;180(2):305-9.

33. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, Chollet-Martin S, Aumont MC, Seknadji P, et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. Arteriosclerosis Thromb Vascular Biol 2003;23(12):e61-4.

34. Koch W, Hoppmann P, Pfeufer A, Schomig A, Kastrati A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. Eur Heart J 2006;27(21):2524-9.

35. Yang IA, Holloway JW, Ye S, Southampton Atherosclerosis Study G. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. Atherosclerosis 2003;170(1):187-90.

36. Netea MG, Hijmans A, van Wissen S, Smilde TJ, Trip MD, Kullberg BJ, et al. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. Eur J Clin Invest 2004;34(2):94-9.

37. Hamann L, Gomma A, Schroder NW, Stamme C, Glaeser C, Schulz S, et al. A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis. J Mol Med 2005;83(6):478-85.

38. Muccioli M, Sprague L, Nandigam H, Pate M, Benencia F. Toll-like receptors as novel therapeutic targets for ovarian cancer. ISRN Oncol 2012;2012:642141.

39. Huang CC, Liu K, Pope RM, Du P, Lin S, Rajamannan NM, et al. Activated TLR signaling in atherosclerosis among women with lower Framingham risk score: the multi-ethnic study of atherosclerosis. PloS One 2011;6(6):e21067.

40. Jialal I, Huet BA, Kaur H, Chien A, Devaraj S. Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. Diabetes Care 2012;35(4):900-4.

41. Yasui T, Maegawa M, Tomita J, Miyatani Y, Yamada M, Uemura H, et al. Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition. Maturitas 2007;56(4):396-403.

42. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285(19):2486-97.

43. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. Ann Rev Pathol 2006;1:297-329.

44. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes 2007;56(8):1986-98.

45. Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, Tsukumo DM, Velloso LA, Carvalheira JB, et al. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. J Endocrinol 2008;199(3):399-406.

46. Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. Circulation 2005;111(20):2654-61.

47. Ashida K, Miyazaki K, Takayama E, Tsujimoto H, Ayaori M, Yakushiji T, et al. Characterization of the expression of TLR2 (toll-like receptor 2) and TLR4 on circulating monocytes in coronary artery disease. J Atherosclerosis Thromb 2005;12(1):53-60.

48. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, National Heart L, et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Arteriosclerosis Thromb Vascular Biol 2004;24(2):e13-8.

49. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. Circulation 2004;110(12):1564-71.

50. Lepper PM, Triantafilou M, O'Neill LA, Novak N, Wagner H, Parker AE, et al. Modulation of toll-like receptor signalling as a new therapeutic principle. Mediators Inflamm 2010;2010:705612.

51. Cole JE, Georgiou E, Monaco C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. Mediators Inflamm 2010;2010:393946.

52. Poulain-Godefroy O, Le Bacquer O, Plancq P, Lecoeur C, Pattou F, Fruhbeck G, et al. Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue. Mediators Inflamm 2010;2010:823486.

53. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, McGinn AP, Rajpathak S, Wylie-Rosett J, et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). Arch Intern Med 2008;168(15):1617-24.

54. Wong E, Freiberg M, Tracy R, Kuller L. Epidemiology of cytokines: the Women On the Move through Activity and Nutrition (WOMAN) Study. Am J Epidemiol 2008;168(4):443-53.

55. Cioffi M, Esposito K, Vietri MT, Gazzerro P, D'Auria A, Ardovino I, et al. Cytokine pattern in postmenopause. Maturitas 20025;41(3):187-92.

56. Wang L, Manson JE, Gaziano JM, Liu S, Cochrane B, Cook NR, et al. Circulating inflammatory and endothelial markers and risk of hypertension in white and black postmenopausal women. Clin Chem 2011;57(5):729-36.

57. Chedraui P, Jaramillo W, Perez-Lopez FR, Escobar GS, Morocho N, Hidalgo L. Pro-inflammatory cytokine levels in postmenopausal women with the metabolic syndrome. Gynecol Endocrinol 2011;27(9):685-91.

3. Anexos

3.1. Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB.

unesp Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de outubro de 2.009 OF. 399/2009-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Eliana Aguiar Petri Nahas
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Drª Eliana,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, **(Protocolo CEP 3362-2009)**, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 05/10/09, na seguinte conformidade:

(Projeto Maior) "Avaliação dos biomarcadores precoces da doença cardiovascular (clínicos, inflamatórios e ecográficos) em mulheres pós menopausa"

Sub-estudo 1 - "Avaliação do risco de doença arterial coronariana em mulheres na pós menopausa" Aluna: Aline Maia de Andrade (iniciação cientifica).

Sub-estudo 2 - "Relação entre *heat shock proteins (hsp)* e marcadores ecográficos da doença aterosclerótica em mulehres na pós menopausa" Livre Docência da Profª Drª Eliana Aguiar Petri Nahas.

Sub-estudo 3 - "Avaliação do polimorfismo genético da lecitina ligante de manose (MBL) e da expressão gênica dos receptores *Toll-Like* (TLR) como biomarcadores do risco cardiovascular em mulheres na pós menopausa." Cláudio Lera Orsatti (autor) Projeto Doutorado.

Subprojeto 4 - "Impacto da adequação dietética e da suplementação de Omega 3 sobre marcadores metabólicos e inflamatórios do risco cardiovascular em mulheres na pós menopausa". Ana Paula Tardivo (autora) - Projeto Doutorado.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

3.2. Anexo II- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Você está sendo convidada a participar do estudo "Avaliação dos Marcadores Precoces da Doença Cardiovascular em Mulheres na Pós-Menopausa" que será realizado sob a responsabilidade da Dra. Eliana Aguiar Petri Nahás e do biomédico Claudio Lera Orsatti. O objetivo da pesquisa será verificar os riscos de desenvolver doenças do coração em mulheres na pós-menopausa por meio da avaliação de indicadores no sangue e pelo ultrassom das artérias carótidas ("do pescoço"). Sua participação será responder um questionário, com duração de 10 minutos, e passar por uma avaliação clínica com medidas de pressão arterial, peso, altura e medida da cintura. No dia da consulta serão coletados 20 ml de sangue para dosagens de alguns exames, assim como será agendado um exame de ultrassom das artérias de seu pescoço, com duração de 15 minutos. Suas respostas são confidencias e apenas dados coletivos serão divulgados nas publicações em revistas científicas, sem identificação da sua pessoa. Os pesquisadores responsáveis estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. Sua participação é voluntária e você tem o direito de receber informações adicionais sobre o estudo. Você pode retirar-se deste estudo, sem prejuízos de cuidados médicos. Caso não se sinta satisfeita pode entrar em contato com o médico responsável pela pesquisa ou com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone 14-38801608.

Eu.....tendo sido informada, concordo em participar do estudo. Declaro ter lido e compreendido este consentimento, na qual me informaram os dados importantes sobre este estudo. Foi me oferecida ampla oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram totalmente. Estou ciente de que este consentimento será produzido em duas vias de igual teor, de forma que uma será entregue a mim e outra será arquivada pelo pesquisador.

Botucatu, _____/_____/_____.

_____ _____

Assinatura da Participante Assinatura do Pesquisador

Eliana A. P. Nahas- **e-mail:**epetri@fmb.unesp.br

Rua Prefeito Tonico de Barros, 694- Botucatu - SP – Fone: (14) 38801377

3.3. Anexo III- Escore de Risco de Framinghan (ERF) para mulheres.

Idade	pontos	Colesterol	Total			Pontos		
20-34	-7	mg/dl	Idades	20-39	40-49	50-59	60-69	70-79
35-39	-3	<160		0	0	0	0	0
30-44	0	160-199		4	3	2	1	1
45-49	3	200-239		8	6	4	2	1
50-54	6	240-279		11	8	5	3	2
55-59	8	>=280		13	10	7	4	2
60-64	10	**Tabagismo**				**Pontos**		
65-69	12		Idades	20-39	40-49	50-59	60-69	70-79
70-74	14	Não		0	0	0	0	0
75-79	16	Fumente		9	7	4	2	1

HDL	pontos	PA	sistólica	Pontos	
mg/dl			mmHg	Não tratada	Tratada
			<120	0	0
>=60	-1		120-199	1	3
50-59	0		130-139	2	4
40-49	1		140-159	3	5
<40	2		>=160	4	6

Escore total:.....

Total de pontos mulheres	Risco absoluto DAC em 10 anos
<9	<1%
9	1%
10	1%
11	1%
12	1%
13	2%
14	2%
15	3%
16	4%
17	5%
18	6%
19	8%
20	11%
21	14%
22	17%
23	22%
24	24%
>=25	>=30%