UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Influência do polimorfismo da apolipoproteína E sobre
a expressão gênica e a terapia de reposição hormonal e
atorvastatina, em mulheres em pós-menopausa**

Mustafa Hassan Issa

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo
2005

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010693

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

I86i Issa, Mustafa Hassan
Influência do polimorfismo da apolipoproteína E sobre a
expressão gênica e a terapia de reposição hormonal e atorvastatina,
em mulheres em pós-menopausa / Mustafa Hassan Issa. -- São
Paulo, 2005.
128p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Rosario Dominguez Crespo

I. Bioquímica clínica 2. Biologia molecular 3. Farmacogenética
I. T. II. Hirata, Rosario Dominguez Crespo, orientador.

616. 0756 CDD

Mustafa Hassan Issa

Influência do polimorfismo da apolipoproteína E sobre a expressão
gênica e a terapia de reposição hormonal e atorvastatina, em
mulheres em pós-menopausa

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 14 de abril de 2005.

Em nome de Deus, o Clemente, o Misericordioso.

**“Tudo é possível... a fé é a substância
das coisas que esperamos
e o argumento das que não vemos”**

Henry Ford

Dedico este trabalho...

A Deus, que através da inteligência humana faz dela o seu instrumento maior de transformação constante e eterno da principal de suas criações, a vida.

Aos meus queridos pais, Hassan Mustafa Issa e Asma Barakat Issa, que dedicam diariamente o trabalho de suas vidas a mim e aos meus irmãos a oportunidade única e maravilhosa de conhecer o sorriso do lindo rosto das letras e do conhecimento.

Este lindo rosto, que de forma infeliz, o destino e as dificuldades da vida não possibilitaram que a eles pudesse ter sorrido também.

Aos meus queridos irmãos, Omar Hassan Issa e Issa Hassan Issa, que em todos os momentos mais importantes da minha vida, e inclusive no presente, estiveram sempre ao meu lado cultivando comigo o espírito de união e de equipe, imprescindíveis para vencer os diversos obstáculos que a vida impõe.

A querida Professora Rosario Dominguez Crespo Hirata, pela orientação segura; e pela grande lição de dedicação, carinho, e retidão técnica e humana que com ela eu aprendi.

Também muito obrigado por ter sempre acreditado, e apostado em minha capacidade e potencial.

Que Deus a abençoe, e que Ele lhe dê saúde e forças para continuar em sua nobre missão de ensinar.

As palavras ainda são muito pouco para poder expressar a gratidão eterna que tenho por tudo isso.

Ao Professor Mario Hiroyuki Hirata, pela co-orientação, pelo incentivo e amizade; e principalmente pela lição de genialidade e inovação com quem eu tive e aprendi, as quais devem ser qualidades constantes na vida profissional e acadêmica.

A todos meus queridos familiares que estiveram sempre na torcida por mim.

A luz dos meus olhos... a minha muito querida e doce Soraya, sinônimo de companheirismo... que Deus e o destino a mim reservaram.

Aos meus estimados e queridos, Dr. Agostinho Checchia Noronha e Dr^a. Sonia do Rocio Camati, meus primeiros incentivadores a tomar o caminho da Pós-Graduação, e que foram também os meus primeiros exemplos e mestres a ensinarem-me na arte da atividade profissional de ser Farmacêutico-Bioquímico.

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome da sua Diretora, Prof^a. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, em nome de sua chefe, Prof^a. Tit. Ana Campa.

À Prof^a. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela honra que tive em poder cumprir mais uma vez, nesta Faculdade uma importante etapa na minha vida.

Aos queridos mestres da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, que forneceram a sólida base de conteúdo moral, ético, científico e humano para que hoje pudesse estar neste momento cumprindo esta importante etapa da minha vida. Apesar de considerar pouco para retribuir, deixo aqui registrado a todos, sem distinção de nomes, o meu grande e eterno agradecimento.

Aos queridos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de forma especial às Professoras Kioko Takei, Elsa Masae Mamizuka, Primavera Borelli, Elvira Maria Guerra Shinohara, Silvy Stuchi Maria Engler, e ao Professor Antônio Altair Magalhães Oliveira. Meu eterno obrigado por tudo de positivo que aprendi com cada um de vocês, e pelo que

recebi na forma de valiosos ensinamentos, exemplos que levarei por toda minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa e da reserva técnica (Processo nº 01/11749-5), compreendidos entre o período de 10 de março de 2002 a 10 de março de 2004. Meu sincero agradecimento pelo apoio e crédito depositado nesta pesquisa.

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo - Setor de Lipoproteínas - em nome dos médicos cardiologistas Dr. André Arpad Faludi e Dr. Marcelo Chiara Bertolami, da Farmacêutica-Bioquímica Yara Nakamura, da Secretária do setor Sr^a Vera Lucia da Silva, da bióloga Elisabeth Santos, e das nutricionistas Renata Alves, e Patrícia M. T. de Castro, pela imprescindível cooperação na seleção das pacientes deste trabalho, com quem também ficaram laços eternos de amizade. Meu muito obrigado.

À Dr^a Neusa Forti, componente da banca de avaliação no Exame de Qualificação, pelos seus valiosos conselhos e sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Laboratório Clínico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia em nome de seu responsável, Dr. Carlos Eduardo dos Santos Ferreira, pela realização das análises laboratoriais desta pesquisa.

Ao estatístico Helymar Machado, da Universidade de Campinas/SP, pelo valioso auxílio prestado nas análises estatísticas, que contribuíram em muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradecimentos pessoais

“Tenha um amigo em cada cidade”

Provérbio árabe.

Às queridas senhoras envolvidas neste estudo, que mesmo anônimas, voluntariamente contribuíram para o aumento do conhecimento científico brasileiro. Vocês têm minha admiração, e meu agradecimento sincero.

Aos prezados Dr. Alvaro Largura, Professor Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro e Maurício Pacheco de Andrade, dos quais recebi importantes exemplos profissionais, incentivos e conselhos decisivos para tomar o caminho da Pós-Graduação ao nível de Mestrado. Minha admiração e agradecimentos eternos.

Ao meu estimado e prezado amigo-irmão Monir Saleh, pela presença e pelo apoio decisivo no momento mais difícil vivido dentro desta etapa da vida. As palavras são pouco para expressar o meu agradecimento.

Ao Dr. Ricardo Soares Silva, médico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pela atenção e acompanhamento correto e seguro para com a minha saúde. Meu sincero e eterno obrigado!

Às famílias Bacha e Sleiman, em nome dos meus queridos amigos e companheiros de toda hora, Mohamed Bacha e Youssef Sleiman, que sempre me acolheram, e fizeram me sentir sempre um membro de suas famílias durante todo o período de residência na cidade de São Paulo. Quero deixar aqui registrado a minha gratidão eterna.

E também ao grande e inseparável amigo Wissam Osman, com quem os laços de amizade tornaram-se eternos no breve período de sua residência na cidade de São Paulo. Meu muito obrigado pelo apoio, incentivo e companhia fraternal, a qualquer hora e situação.

Aos meus também queridos amigos-irmãos, Ricardo Gerassi Martins Ramos, Heluih Ata Abdallah e Carlos Marcio Moura Ponce de Leon. Obrigado pelo incentivo constante, pela força, e também pelos conselhos sempre seguros.

A minha muito querida, grande amiga e companheira inseparável Raffaella Picciotti, pela honra de poder contar com a amizade de sua família, e por todo apoio e disposição dispensados nos momentos mais difíceis vividos na Pós-Graduação. Quero também deixar aqui registrado meu agradecimento pela ajuda na revisão do texto desta Dissertação de Mestrado. Assim como nossa forte amizade tenha também a certeza de que a minha admiração e gratidão por tudo são eternas.

Aos meus também queridos amigos de fidelidade indiscutível, do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF-USP: Hamilton Massayuki Hinuy, Carlos Eduardo de Melo, Bety Chen, Adriana Natsue Ozaki, Érika Miguel de Souza, Raimundo Antônio Gomes de Oliveira, Ivanise Marina Moretti Rebecchi, Selma Andréa Cavalli e Luis Antonio Salazar Navarrete. Estiveram ao meu lado contribuindo de forma construtiva e incondicional nos momentos mais importantes da Pós-Graduação. Obrigado pelo carinho, incentivo e pela especial torcida!

De forma indistinta, aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicado ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e

Toxicológicas da FCF-USP: André Ducati Luchessi, Alice Cristina Rodrigues, Ana Cristina Messas, Ana Terra dos Santos Macedo, Claudia Villazón Gonzales, Cristina Moreno Fajardo, Evelyn K. Anzai, Fabiana Dalla Vecchia, Francisco José Forestiero, Gabriel Augusto Vieira Fernandes, Helder Honorato Basques, Letícia Cecon, Ligia Maria Sescheli, Marcel Sonoki, Maria Alice Vieira Willrich, Nádia Preto de Godoy, Paulo Henrique Lage Carbone, Raquel de Oliveira, Renata Tosi Lima, Sarah Aparecida Soares, Sílvia Himelfarb, Simone Cohen Sorkin, Verônica Simões de Oliveira e Vladimir Tavares. É uma honra poder deixar seus nomes lembrados aqui. Meu eterno obrigado por tudo. Que os laços de amizade que construímos sejam para sempre.

Aos meus amigos que passaram pelo Laboratório de Biologia Molecular: Luciana de Barros Gallo, Andréa Luciana Araújo da Cunha, Carolina Costa Góis, Claudia Muraro Carvalho, Dárcio Matenhauer Lehrbach, Débora Moreira Pescarini, Dorra Hilal El-Andere, Edílson Pinheiro Gaspar, Elaine Aparecida Magrini da Fonseca, Elizabeth Cecília Rodriguez Guzmán, Fabiana Cristina Pereira dos Santos, Fabio E. P. Mello, Georgina Severo Ribeiro, Gladys Mossirer, Jorge Kleber Chavasco, Juliana Alonso Uehara, Katlin Brauer Massirer, Kelson Keith Kitamura Yoshioka, Leila Badreddine, Leonardo de Oliveira Matsumoto, Leonardo Pocai, Márcia Castejon, Marcia Keila Mitsue Nakamura, Marcos de Oliveira Machado, Maria Fernanda Pimentel de Carvalho, Marília Reis Gonçalves Rocha, Patrícia Barco, Paula G. Palmieri, Rosilene Fressatti Cardoso, Silvério Teixeira dos Santos, Sun Ok Yoon, Taiza Stumpp, Tânia Sueli de Andrade, Uana Miguel Jorge, Vanessa Remualdo, Walter Yukio Hirata e Yuki Fujihara. Foi uma grande honra poder dividir o espaço e o dia-a-dia do laboratório na companhia de todos vocês. Deixo aqui registrado meu mais sincero obrigado por tudo. Que nossos laços de amizade sejam também para sempre.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP: Márcia Cristina Caramico, Sueli Providelo, Ana Maria Dantas e Maria Auxiliadora de Lima. Obrigado pelo carinho e atenção.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Elaine Midory, Jorge Alves Lima e Benedita Espírito de Oliveira. Obrigado pelo seu carinho e auxílio profissional em todos os momentos que foram requisitados.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, Claudia Luciano dos Reis, Carmen Lúcia Moura e Maria Dorlei Moura, que dedicam-se com zelo e carinho no dia-a-dia, de forma indistinta aos alunos de Pós-Graduação e Professores do Departamento de Análises Clínicas. Meu muito obrigado por tudo.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concretizado com êxito.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	01
1.1. Doença arterial coronariana	01
1.2. Apolipoproteína E	02
1.3. Polimorfismo do gene <i>APOE</i>	05
1.4. Estruturas, interações e funções das isoformas da apo E	08
1.5. Associações do polimorfismo do gene <i>APOE</i> com perfil lipídico, DAC e menopausa.....	12
1.6. Expressão do gene <i>APOE</i> nas células mononucleares, efluxo do colesterol e DAC.....	16
1.7. Efeitos das progestinas e dos estrógenos	18
1.8. Efeitos das vastatinas	26
1.9. Polimorfismo do gene <i>APOE</i> e resposta terapêutica	28
2. Objetivos	31
3. Casuística e métodos	32
3.1. Casuística e protocolo terapêutico	32
3.2. Amostras biológicas	36
3.3. Determinação dos parâmetros bioquímicos	36
3.4. Extração e avaliação do DNA genômico	37
3.5. Genotipagem por PCR-RFLP	38
3.6. Análise da expressão gênica por RT-PCR	41
3.7. Controle de qualidade das técnicas de PCR e RT-PCR.....	45
3.8. Análise estatística dos resultados	46
4. Resultados	47
4.1. Avaliação do IMC antes e após tratamento	47
4.2. Avaliação do perfil lipídico antes e após tratamento	47
4.3. Avaliação do polimorfismo do gene <i>APOE</i>	53
4.4. Avaliação da expressão do RNAm do gene <i>APOE</i>	58
4.5. Estudos de correlação	62
5. Discussão	66
5.1. Tratamentos e lipídeos plasmáticos	66
5.2. Polimorfismo do gene <i>APOE</i>	67
5.3. Expressão do gene <i>APOE</i>	71
6. Conclusões	76
7. Referências bibliográficas	77
8. Anexos	119

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	06
Figura 2	08
Figura 3	09
Figura 4	11
Figura 5	13
Figura 6	41
Figura 7	45
Figura 8	65
Figura 9	65

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.....	34
Tabela 2.....	35
Tabela 3.....	38
Tabela 4.....	47
Tabela 5.....	48
Tabela 6.....	49
Tabela 7.....	50
Tabela 8.....	51
Tabela 9.....	52
Tabela 10.....	53
Tabela 11.....	54
Tabela 12.....	54
Tabela 13.....	55
Tabela 14.....	56
Tabela 15.....	56
Tabela 16.....	57
Tabela 17.....	58
Tabela 18.....	59
Tabela 19.....	60
Tabela 20.....	60
Tabela 21.....	61
Tabela 22.....	62
Tabela 23.....	63
Tabela 24.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AFCAPS/TexCAPS	Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study
apo	Apolipoproteína
APOE	<i>Gene da apoliproteína E</i>
Bp	<i>Base-pairs</i> , pares de bases
CARE	Cholesterol and Recurrent Events Study
cDNA	DNA complementar
CEE	Estrogênios conjugados eqüinos
CETP	Enzima colesteril éster transferase
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxi-ribonucléico
DP	Desvio-padrão
E2	17- β estradiol
E3	Estriol
GAPD	Gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HERS	Heart and Estrogen-progestin Replacement Study
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICARUS	Italian Climacteric Research Group Study
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de massa corpórea
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
LCAT	Enzima lecitina colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	LDL-oxidadas
LH	Lipase hepática
LIPID	Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease
Lp[a]	Lipoproteína (a)
LRP	Receptor da Proteína Relacionada ao RLDL
LRT	Lipoproteínas ricas em triglicerídeos
Mg	Miligramas
Mm	Milimol
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial
RNA_m	RNA mensageiro
NETA	Acetato de noretisterona
P	Progestina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reação em cadeia pela polimerase
PEPI	Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions Trial
RFLP	Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição
RLDL	Receptor da LDL
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
RVLDL	Receptor de VLDL
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERM's	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno
TE	Tampão Tris-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TG	Triglicerídeos
TRH	Terapia de reposição hormonal
UV	Ultra-violeta
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade
WHI	Women's Health Initiative
WOSCOPS	West of Scotland Coronary Prevention Study

RESUMO

No presente estudo, foi investigado o efeito do polimorfismo do gene da apolipoproteína E (*APOE*) sobre a expressão de RNAm e a resposta a terapia de reposição hormonal combinada ou não com atorvastatina, em 87 mulheres brancas sem vínculo genético em pós-menopausa com hipercolesterolemia. O polimorfismo *HhaI* (exon 4) do gene *APOE* foi analisado por PCR-RFLP e a quantificação do RNAm do gene *APOE* foi medida em células mononucleares do sangue periférico por RT-PCR *duplex*. As pacientes foram divididas em cinco grupos e tratadas pelo período de três meses com atorvastatina (10 mg/d); estradiol (2 mg/d); atorvastatina e estradiol; e estradiol e acetato de noretisterona (1 mg/d); e atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona. O polimorfismo do gene *APOE* não foi associado com variações no perfil lipídico sérico e na expressão de RNAm basais. Todos tratamentos reduziram significativamente as concentrações séricas de colesterol total e LDL-colesterol, independentemente do polimorfismo do gene *APOE*. A expressão do RNAm do gene *APOE* foi reduzida após os tratamentos com atorvastatina e com atorvastatina e estradiol. Esse efeito foi significativo nas mulheres portadoras de genótipo E3/E3 ($p=0,025$). Foi observada correlação positiva entre as variações de expressão do RNAm do gene *APOE* e de concentrações de colesterol total e LDL-colesterol após o tratamento com estradiol. Em conclusão, a expressão de RNAm do gene *APOE* em células mononucleares do sangue periférico foi reduzida pelo tratamento com atorvastatina e/ou estradiol. Esse efeito foi associado ao polimorfismo do gene *APOE* e à diminuição do colesterol sérico durante a terapia de reposição hormonal.

ABSTRACT

In the present study, the effect of the polymorphism at the apolipoprotein E gene (*APOE*) on mRNA expression and response to hormone replacement therapy (HTR) and atorvastatin was investigated in 87 unrelated postmenopausal women with hypercholesterolemia. The *APOE HhaI* (exon 4) polymorphism was analyzed by PCR-RFLP and mRNA expression was evaluated in mononuclear leukocytes by duplex RT-PCR. The patients were divided into five groups and treated during three months with atorvastatin (10 mg/day); estradiol (2 mg/day); atorvastatin and estradiol; estradiol and norethisterone acetate (1 mg/day); e atorvastatin, estradiol and norethisterone acetate. The *APOE* polymorphism was not associated with variations on basal lipids and mRNA expression levels. The treatments reduced significantly serum total and LDL cholesterol levels, without relation to the *APOE* polymorphism. The *APOE* mRNA expression was reduced after treatment with atorvastatin and atorvastatin combined with estradiol. This effect was significant in women carrying E3/E3 genotype ($p=0,025$). There was a positive correlation between the *APOE* mRNA expression and serum total and LDL cholesterol levels after treatment with estradiol. In conclusion, *APOE* mRNA expression on mononuclear leukocytes was reduced by atorvastatin and/or estradiol treatments. This effect was associated with the *APOE* polymorphism and with the reduction of the serum cholesterol during the HRT.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença arterial coronariana

A arteriosclerose constitui um grupo de distúrbios que têm em comum o espessamento e a perda da elasticidade das paredes arteriais, e compreende três variantes morfológicas distintas: a aterosclerose, a esclerose medial calcificada de Monckeberg e a arteriolosclerose (Schoen e Cotran, 1996).

A aterosclerose é o principal processo fisiopatológico que desencadeia a doença cardiovascular, e representa a forma mais comum e importante de arteriosclerose. A característica principal da aterosclerose é o espessamento e acúmulo de lipídios na camada intima da artéria, e possui uma forma de lesão denominada ateroma ou placa fibromatosa. Essa lesão é composta de grande quantidade de macrófagos ricos em lipídeos, fibras musculares lisas e linfócitos T (Schoen e Cotran, 1996).

A aterosclerose tem origem na infância e progride lentamente ao longo de décadas. Esse processo leva a obstrução gradual da luz arterial que pode evoluir para manifestações clínicas como angina de peito, infarto do miocárdio ou morte súbita (Strong, 1991).

Em alguns países da Europa e Estados Unidos, a mortalidade relacionada à aterosclerose chega a representar 50% da mortalidade total (Lotufo, 1993). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil ocupa a nona posição mundial no número absoluto de mortes (139.601 casos) por doenças cardiovasculares (DCV) (Prentice, 2002). Atualmente, 17 milhões de pessoas morrem anualmente dessas enfermidades e estima-se que até 2030 ocorrerão cerca de 24 milhões de casos ao ano (Prentice, 2002).

A doença aterosclerótica é de origem multifatorial e, dentre os fatores de risco que a predispõe, podem ser considerados: idade, sexo masculino, tabagismo, hipertensão arterial, pós-menopausa, dislipidemias e outros (Kannel *et al.*, 2004).

O risco de desenvolver doença coronariana é maior no sexo masculino que no feminino. O aumento do risco nas mulheres é demarcado pelo início da fase da menopausa (Gordon *et al.*, 1974), na qual ocorre a redução da produção dos estrógenos. A diminuição do estrógeno circulante afeta o metabolismo plasmático das lipoproteínas com conseqüente aumento do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) e redução do colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C). Essas alterações metabólicas são associadas com maior risco para o desenvolvimento de DCV nas mulheres, e que pode se tornar equivalente ao risco para o sexo masculino (Barrett-Connor *et al.*, 1991; Lobo, 1993).

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram incremento linear na mortalidade por doença arterial coronariana (DAC) com o aumento da concentração sérica de colesterol total, LDL-C e apolipoproteína B (apo B), em conjunto com a redução de HDL-C e da apolipoproteína A-I (apo A-I) (Kannel, 2000).

1.2. Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (apo E) é uma glicoproteína constituinte das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (LRT): quilomícrons, remanescentes de quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) (Rall *et al.*, 1982). A apo E também se encontra presente nas lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Weisgraber, 1994).

Diferentemente das outras apolipoproteínas, a apo E é sintetizada não apenas no fígado, que produz a maior parte da apo E plasmática, mas também no cérebro (astrócitos), baço, pulmões, rins, músculo liso e ovários (Mahley, 1988). Cerca de 10% da apo E plasmática é produzida pelos macrófagos, derivados dos monócitos humanos (Linton *et al.*, 1995).

A apo E é componente estrutural das VLDL e é adquirida pelos quilomícrons na circulação plasmática (Mahley e Rall, 2000). Na corrente sanguínea, essas lipoproteínas sofrem ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL) e perdem o seu

conteúdo de triglicerídeos. Os ácidos graxos liberados na hidrólise dos triglicerídeos são captados pelos tecidos periféricos, onde são utilizados como fonte de energia para os processos metabólicos. No processo de hidrólise, formam-se partículas lipoprotéicas menores e mais densas, os remanescentes de quilomícrons e de VLDL (as IDL). A apo E presente nos remanescentes de quilomícrons e nas IDL se liga a receptores específicos nas células hepáticas e extra-hepáticas, respectivamente, e facilita a interiorização das partículas pelas células (Cooper, 1997; Mahley e Rall, 2000, Chung e Wasan, 2004).

O papel metabólico principal da apo E é o de participar no transporte e na distribuição de lipídeos de um tipo de tecido ou célula a outro (Mahley e Rall, 2000). Esta proteína direciona o metabolismo dos triglicerídeos e colesterol endógenos distribuindo-os para as células dos tecidos periféricos, via VLDL e seus remanescentes, e os lipídios oriundos da dieta para o fígado, via remanescentes de quilomícrons (Cooper, 1997; Mahley e Rall, 2000).

A apo E também influencia a taxa de produção das lipoproteínas e o seu catabolismo por vias independentes da ligação a receptores celulares (Rensen e van Berkel, 1996). O aumento da síntese hepática de apo E leva ao aumento de produção e secreção de VLDL e, de forma direta, causa aumento das concentrações plasmáticas de colesterol da VLDL (VLDL-C) e triglicerídeos (van Dijk *et al.*, 1999). Além disso, o acúmulo de apo E na superfície das lipoproteínas diminui a taxa de lipólise dos triglicerídeos pela LPL e eleva as concentrações plasmáticas de triglicerídeos (Jong *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998a; Huang *et al.*, 1998b).

Como componente das lipoproteínas de alta densidade (HDL), a apo E contribui para o efluxo celular do colesterol (Mahley e Rall, 2000). Pelo processo do transporte reverso do colesterol, as células cedem o excesso de colesterol não-esterificado (livre) para as partículas menores e nascentes de HDL (subclasse HDL₃), processo este mediado pela proteína ABCA1 (*adenosine triphosphate-binding cassette protein A1*) presente na membrana das células (Oram e Lawn, 2001). O colesterol livre é então esterificado pela

enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e, após este processo, a partícula de HDL torna-se maior e menos eficiente como aceptora de colesterol das células periféricas (subclasse HDL₂) (Kwiterovich, 2000; Oram e Lawn, 2001).

Na circulação sanguínea, parte do colesterol esterificado das HDL é transferida para as LRT e LDL pela ação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) sendo trocado por triglicerídeos dessas lipoproteínas (Rader, 2003). O colesterol esterificado presente nas LRT e LDL é posteriormente removido da circulação pelos receptores de LDL (RLDL) hepáticos (Kwiterovich, 2000).

O transporte reverso do colesterol é completado quando a outra parte do colesterol esterificado contido nas HDL (subclasse HDL₂) retorna ao fígado para excreção pela via biliar (Kwiterovich, 2000; Rader, 2003), quando então a HDL liga-se ao receptor *scavenger* B1 (SR-B1). Este processo é facilitado pela presença da apo E na HDL (Arai *et al.*, 1999; Fidge, 1999).

Além do RLDL, a apo E também se liga a outros receptores celulares tais como a proteína relacionada ao RLDL (LRP), o receptor de VLDL (RVLDL), o receptor estimulado por lipólise e o receptor de apolipoproteína E-2 (Beisiegel *et al.*, 1989; Boucher e Gotthardt, 2004). Esses receptores são membros da mesma família do RLDL, são expressos em diversos tecidos e têm em comum a capacidade de transportar macromoléculas para o interior das células mediante a ligação com a apo E e outros ligantes extracelulares (Chung e Wasan, 2004).

A LRP tem afinidade por trinta diferentes ligantes protéicos, inclusive a apo E. Destacam-se dentre esses ligantes, proteinases e proteínas associadas a regulação da atividade proteolítica (Herz e Strickland, 2001). No fígado, a interação da apo E com as LRP desempenha papel essencial na remoção das IDL e dos remanescentes de quilomícrons (Herz, 1993; Cooper, 1997; Mahley e Ji, 1999).

O RVLDL tem papel fisiológico pouco esclarecido. Sabe-se que o RVLDL possui 76% de identidade estrutural com o RLDL humano (Yamamoto *et al.*, 1993). O RVLDL não reconhece a apo B e liga especificamente lipoproteínas que contêm apo E (Takahashi *et al.*, 2003). Além disso, apresenta afinidade similar pelas isoformas apo E2 e apo E3 e sua expressão não diminui após interiorização celular das lipoproteínas captadas (Takahashi *et al.*, 2004).

Foi encontrada expressão elevada do RNA mensageiro (RNAm) do RVLDL em tecidos com altas taxas de metabolismo de ácidos graxos tais como células musculares, adipócitos, coração, além de cérebro, placenta, e macrófagos; e não é expresso no fígado (Yen *et al.*, 1994; Chung e Wasan, 2004).

Experimentos *in vitro* realizados com fibroblastos modificados que não expressam o RLDL demonstraram a presença do receptor estimulado por lipólise. Esse receptor está presente principalmente na membrana dos hepatócitos e apresenta baixa afinidade pela apo B-100 das LDL e apo E2 das VLDL. A sua ação parece estar ligada à atividade da LPL (Yen *et al.*, 1994).

O receptor de apo E-2 foi encontrado principalmente no cérebro, mas também na placenta e nos testículos (Nimpf e Schneider, 2000) e apresenta alta afinidade de ligação pelas IDL (Kim *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997).

1.3. Polimorfismo do gene *APOE*

Nos humanos, o gene que codifica a apo E (*APOE*) possui 3,6 Kb de tamanho e tem quatro éxons (Mahley, 1988). O gene *APOE* está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19 q-13.2) como parte do grupamento gênico das apo C-I, apo C-II e apo C-IV (Figura 1) (Olaisen *et al.*, 1982).

Figura 1. Representação esquemática do agrupamento gênico das apolipoproteínas E-CI-CII no cromossomo 19 (adaptado de Zannis *et al.*, 2001).

A transcrição do gene *APOE* origina um RNAm de 1163 nucleotídeos que codifica uma proteína precursora de 317 aminoácidos (Mahley, 1988) e contém um peptídeo de sinal com 18 aminoácidos, codificado pelo éxon 2. Esse peptídeo é posteriormente removido na membrana do retículo endoplasmático (Zannis *et al.*, 1986). O primeiro éxon do gene *APOE* não contém seqüências codificantes. Já o éxon 4 codifica a maior parte da proteína que possui 299 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 34 kDa (Mahley, 1988).

O polimorfismo mais comum do gene *APOE* ocorre no éxon 4 (polimorfismo *HhaI*) que dá origem a três formas alélicas designadas: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, as quais codificam as três isoformas da proteína: apo E2, apo E3 e apo E4 (Zannis e Breslow, 1981; Davignon *et al.*, 1988). As combinações possíveis dos três alelos do gene *APOE* dão origem a seis genótipos diferentes, sendo três homozigotos (E2/E2, E3/E3 e E4/E4) e três heterozigotos (E2/E3, E3/E4 e E2/E4) (Zannis *et al.*, 1982; Weisgraber, 1994).

Outras variantes polimórficas raras têm sido descritas para o gene *APOE* tais como apo E1 (Hoffmann *et al.*, 2001), apo E5 (Mailly *et al.*, 1991) e apo E7 (Dong *et al.*, 2000).

A base molecular do polimorfismo no éxon 4 do gene *APOE* é a substituição de nucleotídeos que resultam em trocas de aminoácidos nas posições 112 e 158 da proteína (Rall e Mahley, 1992). As três isoformas da proteína se diferenciam uma da outra pela troca de um único aminoácido sendo que a apo E3 possui cisteína na posição 112 e arginina na posição 158, enquanto a apo

E2 possui o aminoácido cisteína nas posições 112 e 158 e a apo E4 possui arginina nas duas posições (Figura 2) (Weisgraber, 1994).

As frequências relativas dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ em populações de etnia branca são de aproximadamente 5%, 80% e 15%, respectivamente (De Knijff *et al.*, 1994). Essas frequências são semelhantes às frequências médias encontradas em populações americanas com ascendência européia e em indivíduos hiperlipidêmicos e normolipidêmicos da população brasileira (Cavalli *et al.*, 1996; Otta *et al.*, 1996; Mahley e Rall, 2000; Salazar *et al.*, 2000b; Schwanke *et al.*, 2002; De França *et al.*, 2004).

Tem sido sugerido que o alelo $\epsilon 3$ é o alelo ancestral (Hanlon e Rubinsztein, 1995). Isso se deve ao fato do $\epsilon 3$ ser o alelo mais freqüente e também porque os alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ podem se originar do alelo $\epsilon 3$ por uma única troca de nucleotídeo no gene *APOE*, sendo o alelo $\epsilon 4$ por uma transição T→C no códon 112, e o alelo $\epsilon 2$ por uma transição C→T no códon 158. Caso tenha sido este o processo de origem dos alelos *APOE*, a expectativa é que ambos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ devem conferir alguma vantagem seletiva, o que permitiu as suas persistências na população humana (Mahley, 1988; Weisgraber, 1994).

Figura 2: Substituições dos aminoácidos arginina-cisteína entre as posições 112 e 158 das isoformas da apo E (E2, E3 e E4). Peptídeo de sinal com 18 aminoácidos e domínios funcionais amino e carboxi-terminal (adaptado de www.med.osaka-cu.ac.jp/Neurosci/ApoE.htm).

1.4. Estruturas, interações e funções das isoformas da apo E

O conhecimento das estruturas primária e secundária das isoformas da apo E possibilitou esclarecimentos importantes acerca de suas funções (Weisgraber, 1994).

A apo E possui dois domínios estruturais que também definem seus domínios funcionais: o domínio amino-terminal (resíduos 1-191), e o domínio carboxi-terminal (resíduos 218-299) (Figura 2) (Weisgraber *et al.*, 1982). Análises físicas e bioquímicas determinaram que esses dois domínios encontram-se separados por uma região de estrutura em formato de dobra (Aggerbeck *et al.*, 1988; Wetterau *et al.*, 1988).

A análise da estrutura terciária da molécula demonstrou que o domínio amino-terminal encontra-se sob a forma de quatro hélices formando um pacote (Figura 3), com as seguintes pontes salinas: hélice 1, resíduos 24-42; hélice 2, resíduos 54-81; hélice 3, resíduos 87-122; e hélice 4, resíduos 130-164; e uma hélice curta adicional (resíduos 44-53) que conecta as hélices 1 e 2 (Wilson *et al.*, 1994b; Dong *et al.*, 1996b).

Figura 3: Estrutura tridimensional da apolipoproteína E destacando as diferenças entre as isoformas. **A:** Região da hélice-4 onde o rearranjo da ponte salina na apo E2 reduz potencial iônico positivo na porção de ligação ao RLDL. Asparagina-154 modifica a interação iônica a arginina-150 na apo E2 devido a substituição por cisteína na posição 158, puxando a cadeia lateral da arginina-150 para fora da nuvem iônica positiva, reduzindo seu potencial de ligação em até 100 vezes, em relação a isoforma apo E3, na região de ligação ao receptor celular. **B:** Empacotamento das 4 hélices da apo E demonstrando o rearranjo da cadeia lateral na arginina-61. A substituição por arginina na posição 112 na apo E4 induz a uma interação iônica com o ácido glutâmico-109, o que desloca a cadeia lateral na arginina-61 de sua posição original, que fica posicionada mais ao lado da hélice-2, permitindo interação com ácido glutâmico-255 na região do domínio carboxi-terminal da apo E (adaptado de Mahley e Huang, 1999).

A região do domínio amino-terminal compreendida entre os resíduos 136 e 150 é rica em aminoácidos básicos como a lisina e a arginina, e contém a região de ligação aos receptores celulares, especialmente o RLDL (Aggerbeck *et al.*, 1988; Wetterau *et al.*, 1988). Na região do domínio carboxi-terminal da apo E, estão localizadas α -hélices anfipáticas (resíduos 225-229), estruturas responsáveis pela capacidade de ligação da apo E às LRT (Weisgraber *et al.*, 1982).

As substituições arginina-cisteína no domínio amino-terminal da apo E causadas pelo polimorfismo *APOE* provocam importantes modificações estruturais que alteram as suas propriedades de associação aos RLDL (Mahley, 1988). A presença de aminoácidos básicos nesse domínio faz com que o potencial eletrostático positivo criado por esses resíduos leve ao aumento na atração pelos resíduos ácidos de cargas negativa no RLDL (Dong *et al.*, 1996b). As diferenças de afinidade dos RLDL pela apo E afetam o metabolismo das lipoproteínas ricas em apo E, principalmente as VLDL (Mahley e Rall, 2000).

A cisteína da posição 158 presente na isoforma apo E2 provoca modificações profundas nas pontes salinas dentro da hélice 4 (Figura 3.A) e entre as hélices 3 e 4, e também diminui muito o potencial iônico positivo da região para ligação ao RLDL compreendida entre os resíduos 140-150 (Wilson *et al.*, 1994a; Dong *et al.*, 1996a). Portanto, a apo E2 apresenta menor capacidade de ligação ao RLDL em comparação a apo E3 e a apo E4 (Lund-Katz *et al.*, 2001).

De modo distinto, a apo E3 e a apo E4, que apresentam arginina na posição 158 possuem afinidade de ligação pelo RLDL similar, pois a arginina é um aminoácido que aumenta a resultante de carga positiva na região de ligação ao RLDL (Lund-Katz *et al.*, 2001).

A troca arginina-cisteína é a única responsável pela ocorrência das diferenças de cargas entre as isoformas. A isoforma apo E4 é a mais catiônica delas, sendo diferenciada da forma mais comum apo E3 por uma única carga, e da isoforma apo E2 por duas unidades de carga (Figura 4) (Weisgraber, 1994).

Figura 4: Eletroforese de focalização isoelétrica com partículas de VLDL sem conteúdo lipídico, com fenótipos homozigotos apo E2/E2, apo E3/E3 e apo E4/E4 (adaptado de Mahley e Angelin, 1984).

A menor afinidade de ligação da apo E2 pelos RLDL leva a diminuição da captação dos remanescentes de quilomícrons e de VLDL pelos hepatócitos. Isso induz ao aumento na expressão de RLDL e conseqüentemente ao aumento na captação das LRT, e também das LDL produzidas na cascata de conversão lipolítica das VLDL a LDL (VLDL→IDL→LDL) (Huang *et al.*, 1998b). Por isso, o alelo $\epsilon 2$ está associado com menores concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-C e apo B (Davignon, 1991).

Na presença de apo E4, há aumento na captação dos remanescentes de quilomícrons e de VLDL que leva ao incremento do conteúdo intracelular de colesterol hepático. Em conseqüência, ocorre diminuição na expressão dos RLDL e na captação das partículas de LDL, o que resulta no aumento da concentração do LDL-C plasmático (Davignon, 1991).

Além disso, o sítio de ligação da apo E às lipoproteínas, localizado no domínio carboxi-terminal (resíduos 244 e 272), é crítico para ligação com as LRT (Dong *et al.*, 1994). As isoformas apo E2 e apo E3 ligam-se preferencialmente as partículas menores e mais ricas em fosfolípidios, como as HDL; enquanto a apo E4 apresenta maior associação à partículas maiores e ricas em triglicerídeos, como os quilomícrons e as VLDL (Demant *et al.*, 1991; Weisgraber, 1994).

As diferenças estruturais e metabólicas das isoformas da apo E determinam a sua concentração no plasma. A apo E2 é catabolizada mais lentamente que a apo E4, sendo assim, os indivíduos portadores de apo E2 apresentam as maiores concentrações plasmáticas de apo E, enquanto que os portadores de apo E4 apresentam os menores valores (Larson *et al.*, 2000).

1.5. Associações do polimorfismo do gene *APOE* com perfil lipídico, DAC e menopausa

Diversos estudos populacionais têm descrito a contribuição das isoformas da apo E na variação dos lipídeos plasmáticos (Davignon *et al.*, 1988; Siest *et al.*, 1995; Mahley e Rall, 2000; Eichner *et al.*, 2002). Estima-se que o polimorfismo da apo E é o responsável por aproximadamente 10% da variação encontrada nas concentrações plasmáticas do colesterol na população em geral (Davignon *et al.*, 1999).

A isoforma apo E3 é a mais freqüente nas diferentes populações e tem sido utilizada como referência para o estudo das funções da apo E. Em contraste, as isoformas apo E2 e apo E4 estão associadas a variações significativas nas concentrações plasmáticas da apo E, apo B, triglicerídeos, colesterol total e LDL-C, como se observa na figura 5 (Sing e Davignon, 1985; Utermann, 1985; Boerwinkle e Utermann, 1988; Eichner *et al.*, 2002).

A apo E2 tem sido associada com maiores concentrações plasmáticas de apo E, triglicerídeos plasmáticos, e também às menores concentrações de

colesterol total e apo B, e desta forma, associada ao risco diminuído para desenvolvimento da DAC (Davignon *et al.*, 1999).

Figura 5: Efeito do polimorfismo do gene *APOE* sobre os lipídeos e apolipoproteínas plasmáticas. **A:** Efeitos dos alelos *APOE* nas concentrações plasmáticas dos lipídios (TG: triglicerídeos; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-B: apo B da LDL; LDL-C: colesterol da LDL) (adaptado de Sing e Davignon, 1985). **B:** Efeitos dos genótipos *APOE* sobre as concentrações plasmáticas de apo E (quadrados) e apo B (círculos) (adaptado de Utermann, 1985).

Uma pequena porcentagem, menos de 10%, dos indivíduos portadores do genótipo homozigoto E2/E2 desenvolvem Hiperlipidemia Tipo III (ou disbetalipoproteinemia) (Innerarity *et al.*, 1984; Mahley *et al.*, 1999). Essa é uma condição na qual ocorre o acúmulo de partículas de IDL, que apresenta mobilidade entre as beta e pré-beta lipoproteínas (β -VLDL) na eletroforese em gel de agarose (Innerarity, 1986; Weisgraber, 1994).

Em um estudo com indivíduos espanhóis hipercolesterolêmicos foi observada associação do alelo ϵ 2 com concentrações mais elevadas de

triglicerídeos plasmáticos em comparação com os demais alelos do gene *APOE* (Peña *et al.*, 2002). Resultados similares haviam sido observados em populações hipercolesterolêmicas americanas (Pedro-Botet *et al.*, 2001), finlandesas e dinamarquesas (Gerdes *et al.*, 2000), bem como, em indivíduos normolipidêmicos (Dallongeville *et al.*, 1992).

De modo contrário, a apo E4 encontra-se associada às menores concentrações plasmáticas de apo E, e maiores concentrações de colesterol total, LDL-C e apo B (Utermann *et al.*, 1982; Menzel *et al.*, 1983; Utermann *et al.*, 1984; Davignon *et al.*, 1988; Stengard *et al.*, 1995; Davignon *et al.*, 1999).

A apo E4 tem sido considerada um fator de risco de DAC (Davignon *et al.*, 1988; Stengard *et al.*, 1995; Ou *et al.*, 1998; Mahley e Rall, 2000; Ordovas e Mooser, 2002), e de doença de Alzheimer (Siest *et al.*, 1994; Weisgraber e Mahley, 1996; Siest *et al.*, 2000b).

Salazar e colaboradores encontraram alta frequência do genótipo E3/E4 (40%) em um grupo de 50 mulheres brasileiras brancas com DAC. Nesse estudo, os polimorfismos dos genes *APOE*, *APOB* e *RLDL* foram associados ao maior risco de DAC (Salazar *et al.*, 2000b).

Os aumentos de LDL-C e apo B são observados nos indivíduos que apresentam pelo menos um alelo $\epsilon 4$, em comparação a aqueles portadores de pelo menos um alelo $\epsilon 2$ (Dallongeville *et al.*, 1991; Dallongeville *et al.*, 1992; Dallongeville, 1993; Davignon, 1993). O alelo $\epsilon 4$ também foi associado às maiores concentrações basais de triglicerídeos em alguns estudos (Hegele *et al.*, 1991; Tiret *et al.*, 1994; Frikke-Schmidt, 2000).

Estudos realizados na Itália e Finlândia demonstraram que crianças com alelo $\epsilon 4$ apresentam valores mais elevados de LDL-C quando comparadas com crianças portadoras dos alelos $\epsilon 2$ ou $\epsilon 3$, em consequência disso apresentam maior risco para desenvolvimento precoce de DAC (Lehtimäki *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1991).

A influência do alelo $\epsilon 4$ sobre as concentrações de LDL-C pode ser relativamente potencializada por outros fatores de risco para DAC, tais como, o estresse, dieta aterogênica, sedentarismo, obesidade, pós-menopausa, e outros (Ordovas e Mooser, 2002).

Em mulheres no período da pós-menopausa, o genótipo E3/E4 foi associado às concentrações do colesterol total e LDL-C maiores que as encontradas nas portadoras do genótipo E2/E3 (Schaefer *et al.*, 1994).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de DAC, encontra-se como já citado a pós-menopausa (Giannini, 1998). Os diversos sinais e sintomas associados com o período pós-menopausa resultam da queda na produção do hormônio estrógeno (Godsland, 2001). Nessa condição, ocorrem modificações lipídicas pró-aterogênicas, caracterizadas principalmente pela elevação das concentrações plasmáticas de colesterol total em aproximadamente 15% associada ao aumento de LDL-C e apolipoproteína B-100 (apo B-100) em 25% (Stevenson *et al.*, 1993), e à redução de HDL-C em até 25%, principalmente da subfração HDL₂ (Tikkanen *et al.*, 1982; De Aloysio *et al.*, 1999). Essas alterações ocorrem principalmente devido à expressão diminuída dos RLDL hepáticos e representam um conjunto de fatores que desencadeiam a doença aterosclerótica nas mulheres em pós-menopausa (Rifai *et al.*, 1999).

Na pós-menopausa, ocorre também diminuição da atividade enzima hepática 7-alfa hidroxilase, que causa a redução da síntese de ácidos biliares e, conseqüentemente, diminuição da excreção do colesterol (Walsh *et al.*, 1991; Crook *et al.*, 1992). Além disso, há redução da atividade da enzima LPL o que resulta no aumento de VLDL-C e triglicerídeos plasmáticos (Walsh *et al.*, 1991; Crook *et al.*, 1992).

Como forma de medida terapêutica, para a prevenção ou para a melhora destes sinais e sintomas, inclusive das modificações do perfil lipídico, milhões de mulheres quando atingem o período da pós-menopausa fazem uso da terapia de reposição hormonal (TRH). Essa terapia é feita com estrógenos

(terapia de reposição estrogênica) em combinação ou não com alguma progestina (terapia de reposição combinada) (Paganini-Hill, 2001).

No estudo *Italian Climacteric Research Group Study* (ICARUS), foi analisada a variação do perfil lipídico num grupo de 9309 mulheres. Na fase da pós-menopausa, os valores de colesterol total, LDL-C e triglicerídeos aumentaram, respectivamente, 6,9%, 7,5% e 9,0% em relação aos encontrados na fase da pré-menopausa. Essas alterações metabólicas observadas nas mulheres no período da pós-menopausa foram atribuídas à queda nas concentrações plasmáticas do estrógeno e apresentaram impacto sobre o risco de desenvolvimento de DAC (De Aloysio *et al.*, 1999).

Devido ao aumento na síntese do RLDL hepático, a terapia de reposição hormonal com estrógeno reduz as concentrações séricas de CT e LDL-C em aproximadamente 10 e 14%, respectivamente (Walsh *et al.*, 1991; Crook *et al.*, 1992).

Num estudo realizado com 270 mulheres dinamarquesas acompanhadas nos períodos pré- e pós-menopausa, observou-se aumento significativo de LDL-C e diminuição de HDL-C naquelas que não receberam TRH (Jensen *et al.*, 1990). Da mesma forma, em outro estudo com acompanhamento semelhante, nas mulheres que receberam TRH não foram observadas mudanças nestes parâmetros (Matthews *et al.*, 1989).

1.6. Expressão do gene *APOE* nas células mononucleares, efluxo do colesterol e DAC

Sabe-se que fisiologicamente os monócitos circulantes e os macrófagos secretam apo E (Castilho *et al.*, 2003), porém numa quantidade significativamente menor quando comparada à concentração da proteína circulante no plasma presente principalmente nas lipoproteínas ricas em triglicerídeos (LRT) (Blum *et al.*, 1980; Mazzone *et al.*, 1992; Cullen *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999). Nessas células, a produção endógena de apo E desempenha papel importante no efluxo do conteúdo de colesterol livre intracelular,

facilitando a transferência deste lipídeo para as partículas de HDL do meio extracelular (Mazzone e Reardon, 1994; Granot e Eisenberg, 1995; Smith *et al.*, 1996; von Eckardstein, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1999).

Nas células mononucleares periféricas, a variação da concentração intracelular do colesterol encontra-se em proporção da variação na expressão da apo E (Mazzone, 1996), assim como da apo A-I do plasma (Yamato *et al.*, 2003).

Wang e colaboradores estudaram o efeito da sinvastatina em camundongos “*knockout*” para os genes *RLDL* (*RLDL*–/–) e *APOE* (apo E–/–) alimentados com dieta hipercalórica (Wang *et al.*, 2002). Esses autores observaram que a administração de altas doses de sinvastatina nos *knockout* para o *RLDL* resultou na diminuição das concentrações plasmáticas do colesterol total e regressão no tamanho das lesões ateroscleróticas. Por outro lado, nos camundongos *knockout* para o gene *APOE*, mesmo alimentados com dieta normal, não se observou esse efeito. Isso sugere que os efeitos terapêuticos da sinvastatina dependam da expressão normal do gene *APOE*.

A importância da expressão do gene *APOE*, como fator anti-aterogênico foi previamente demonstrada em estudos realizados com animais de experimentação (Mahley e Rall, 1995; Krul e Cole, 1996; Hasty *et al.*, 1999; Yamato *et al.*, 2003), e em humanos (Corbo *et al.*, 1999). A relação significativa entre o alelo $\epsilon 4$, e as menores concentrações plasmáticas de apo E, foi observada em homens italianos com diagnóstico de DAC grave (Corbo *et al.*, 1999). E recentemente, foi pela primeira vez demonstrado que a ação anti-aterogênica da expressão gênica da apo E produz regressão da aterosclerose em animais de experimentos, de forma independente das concentrações plasmáticas do colesterol (Raffai *et al.*, 2005).

Devido a sua importância no mecanismo do transporte reverso do colesterol, bem como no metabolismo e na remoção plasmática das LRT (Yamada *et al.*, 1992; Bellosta *et al.*, 1995; Shimano *et al.*, 1995), a apo E desempenha um papel protetor contra a aterosclerose (Boisvert *et al.*, 1995;

Bellosta *et al.*, 1995; Linton *et al.*, 1995; Shimano *et al.*, 1995; von Eckardstein, 1996; Fazio *et al.*, 1997).

Estudos realizados com camundongos “*knockout*” para o gene *APOE* demonstraram concentrações aumentadas dos lipídeos plasmáticos especialmente da fração VLDL-C (Mensenkamp *et al.*, 1999). Nesses animais, também foram observadas lesões ateroscleróticas graves mesmo quando foram alimentados com dieta hipocalórica (Nakashima *et al.*, 1994; Reddick *et al.*, 1994), o que demonstra também o potencial aterogênico da partícula de VLDL (Mahley e Rall, 1995; Mahley e Huang, 1999).

Em camundongos que expressam apo E apenas nos macrófagos, foi observada proteção contra o desenvolvimento de aterosclerose, mesmo quando as concentrações plasmáticas da proteína estavam excessivamente baixas e quando os animais apresentavam hipercolesterolemia (Bellosta *et al.*, 1995). Por outro lado, em animais com expressão normal de apo E, exceto nos macrófagos, foi constatada a ocorrência das lesões ateroscleróticas (Fazio *et al.*, 1997). Esses e outros estudos demonstraram que a síntese de apo E pode também ser considerado fator crucial na suscetibilidade para desenvolvimento da aterosclerose.

1.7. Efeitos das progestinas e dos estrógenos

As progestinas são utilizadas com finalidades terapêuticas diversas, sendo a principal na TRH, de forma combinada com estrógenos para a prevenção da hiperplasia ou do carcinoma endometrial (Schindler *et al.* 2003).

Além da progestina natural, a progesterona, existem diferentes classes de progestinas, tais como a retroprogesterona (diidrogesterona), derivados da progesterona (medrogestona), derivados da 17-hidroxiprogesterona (acetato de clormadinona, acetato de ciproterona, acetato de megestrol, e o acetato de medroxiprogesterona), os derivados da 19-norprogesterona (nomegestrol, promegestona, trimegestona, e a nesterona), os derivados da 19-nortestosterona (noretisterona, linestrenol, levonorgestrel, desogestrel,

gestodene, norgestinato e o dienogesto), e os derivados da espironolactona (drospirenona) (Schindler *et al.*, 1996; Pasqualini *et al.*, 1998; Rozenbaum, 2002; Million Women Collaborators, 2003).

Algumas das progestinas sintéticas são pró-fármacos que têm que ser metabolizados pelo fígado para tornarem-se compostos ativos. Além do efeito progestogênico, que é o único comum a todas as progestinas, existe uma ampla variedade de efeitos biológicos, diferentes para as várias progestinas, e que devem ser levados em consideração quando utilizadas em algum tipo de terapia (Schindler *et al.*, 1996; Pasqualini *et al.*, 1998; Sitruk-Ware e Michelle, 2000; Rozenbaum, 2002).

O efeito progestogênico é definido como a capacidade que uma substância possui de induzir uma mudança característica no endométrio, originalmente induzida pela ação estrogênica (De Lignières *et al.*, 1995; Sitruk-Ware, 2002).

Para que apresentem o efeito progestogênico, independentemente de sua estrutura molecular, todas as progestinas devem poder ligar-se as duas classes de receptores de progesterona (PR-A e PR-B) existentes (Graham e Clarke, 1997).

Na TRH, por serem utilizadas quase sempre de forma combinada aos estrógenos (Shulman, 2002), poucos são os grandes estudos realizados para as comparações dos efeitos entre as diferentes progestinas, e por isso, pouco ainda é conhecido dos seus efeitos isolados nas mulheres em pós-menopausa (Schindler *et al.* 2003).

Os derivados da 19-nortestosterona apresentam alta atividade androgênica, e os derivados da 17-hidroxiprogesterona, baixa atividade (Schindler *et al.* 2003). Os derivados da 19-nortestosterona opõem-se aos efeitos dos estrógenos sobre o metabolismo lipídico, pois causam aumento da atividade da lipase hepática (LH) o que reduz as concentrações plasmáticas de HDL-C e triglicerídeos, e aumento de LDL-C. Por outro lado, os derivados da 17-hidroxiprogesterona apresentam nenhum, ou então, mínimos efeitos sobre o perfil lipídico (Soma *et al.*, 1993).

Os estrógenos são utilizados para as diferentes finalidades terapêuticas, sendo as principais: contracepção, prevenção da osteoporose e TRH. Neste contexto, são definidos como os agonistas dos estrógenos o estradiol (E2), estrona (E1), estriol (E3), estrógenos eqüinos conjugados (CEE), dietilestilbestrol (DES), e o etinilestradiol (EE). Também existem os moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERM) (Bennink, 2004).

Dentre os estrógenos naturais humanos, o mais potente deles é o 17-beta estradiol produzido principalmente na fase pré-menopausa pelos ovários, seguido pela estrona que é o principal estrógeno produzido na fase pós-menopausa, e por último, o estriol que é produzido em grandes quantidades pela placenta durante a gravidez (Williams *et al.*, 1995; Birkhauser, 1996).

Os estrógenos são bem absorvidos através da pele, e devido a esta propriedade as preparações por via transdérmica nas formas de emplastos e géis, tiveram seu uso aumentado ultimamente (Crook, 1997). Esta via possibilita uma distribuição lenta, porém contínua dos estrógenos, possibilitando concentrações plasmáticas mais constantes em comparação com aquelas obtidas pela via de administração oral (Järvinen *et al.*, 1999).

Na pós-menopausa, as concentrações plasmáticas do estradiol diminuem de 40-400 pg/mL da fase fértil para 5-20 pg/mL. Neste momento então, a principal fonte de estrógenos é a conversão periférica da androstenediona para estrona nas supra-renais. No entanto, este mecanismo não fornece estrógeno em concentrações suficientes para prevenir os sintomas resultantes da deficiência hormonal (Ziel e Finkle, 1975; Shapiro *et al.*, 1985; Brinton e Hoover, 1993). Desta forma, a principal justificativa farmacológica para o uso da TRH, é de aumentar as concentrações dos estrógenos circulantes. A adição preventiva de uma progestina é necessária nas mulheres com útero intacto (Whitehead e Lobo, 1988; Whitehead *et al.*, 1990) para limitar os possíveis efeitos de hiperplasia induzidos pelo uso dos estrógenos (Varma, 1985; Rose, 1996; McGowan e Pottern, 2000).

Na fase pós-menopausa, o aumento na incidência de câncer do cólon, osteoporose e DCV poderá ser prevenido pelo uso da TRH com estrógenos (Bennink, 2004). Entretanto, devem ser considerados os efeitos adversos que podem ocorrer com o uso dessa terapia (Bennink, 2004).

Os benefícios da TRH com estrógenos na prevenção da osteoporose na fase da pós-menopausa têm sido comprovados (Ettinger, 1993). Seu uso inibe o processo de reabsorção óssea, dessa forma mantém a densidade da porção mineral dos ossos (Stevenson, 1990; Liu, 1999). O efeito é principalmente dose-dependente e não são observadas diferenças significativas entre as diversas combinações de TRH (Christiansen *et al.*, 1982; Quigley, 1987; Ettinger *et al.*, 1992; Genant *et al.*, 1997; Naessen *et al.*, 1997).

O uso corrente ou mesmo recente da TRH com estrógenos parece estar claramente associado à redução no risco para desenvolvimento de câncer do cólon intestinal, e isto têm sido observado tanto nos estudos retrospectivos (Grodstein *et al.*, 1999; Nanda *et al.*, 1999; Newcomb e Storer, 1995), quanto nos prospectivos randomizados com grupos-controle (Rossouw *et al.*, 2002; Hulley *et al.*, 2002).

Foi observado que, na idade fértil, a incidência de mortes por DCV entre as mulheres é menor do que entre os homens. Na pós-menopausa, essa incidência aumenta mais rapidamente dentre as mulheres e, em média, após os 85 anos de idade esta razão torna-se invertida (Manolio *et al.*, 1993).

Sullivan e colaboradores estudaram 2268 mulheres durante dez anos e observaram que aquelas com lesões ateroscleróticas que fizeram uso de estrógenos apresentaram sobrevida significativamente maior, em comparação à aquelas não fizeram uso desse hormônio (Sullivan *et al.*, 1990).

No estudo *Nurses Health Study*, que incluiu 48.470 mulheres na pós-menopausa durante seguimento de dez anos, foi demonstrado que as mulheres que utilizaram a TRH com estrógenos como prevenção primária tiveram redução de aproximadamente 50% na mortalidade por DAC (Stampfer *et al.*, 1991). Esses benefícios foram observados tanto nas mulheres com menopausa

natural quanto cirúrgica, e independentemente da presença ou não de outros fatores de risco (Bush *et al.*, 1987; Henderson *et al.*, 1991; Grady *et al.*, 1992).

Um estudo de meta-análise realizado a partir de dados de grandes estudos observacionais indicou que o uso corrente de TRH com estrógenos está associado com a diminuição estatisticamente significativa na incidência de DAC e conseqüentemente também na redução da mortalidade (U.S. Preventive Services Task Force, 2002). Com o uso de TRH por dois ou mais anos, houve redução na incidência geral de DAC, conforme foi observado em um estudo conduzido por longo período de administração de TRH com estrógenos (Grady *et al.*, 2002). Entretanto os resultados de estudos prospectivos randomizados, controlados por placebo, parecem indicar para outra direção.

No estudo *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS), contraditoriamente, foi demonstrado aumento significativo na incidência de eventos coronarianos em mulheres com DAC que utilizaram a TRH por até um ano (Hulley *et al.*, 1998).

O estudo *Women's Health Initiative* (WHI), iniciado em 1993, indicou aumento no risco para incidência de eventos coronarianos relacionado à administração de estrógeno em combinação a uma progestina (Rossouw *et al.*, 2002).

Estes estudos indicam que, o uso de combinações específicas de estrógenos e progestinas podem não apresentar os efeitos benéficos esperados sobre a prevenção primária ou secundária da DAC nas mulheres em pós-menopausa (Langer, 2002).

A cardioproteção exercida pelos estrógenos resulta de vários mecanismos, tais como: distribuição de gordura corpórea, viscosidade sanguínea, coagulação e fibrinólise, metabolismo da glicose e insulina, metabolismo lipídico e efeitos arteriais diretos (Pines, 2002).

Estas evidências apóiam estudos epidemiológicos que têm sugerido o benefício do uso da TRH com estrógeno na prevenção primária da DAC nas mulheres em pós-menopausa (Grodstein *et al.*, 2000), chegando a até 50% na

redução dos eventos coronarianos (Stampfer e Colditz, 1991; Barret-Connor e Grady, 1998).

Após a menopausa, há tendência ao aumento da gordura corpórea do tipo andróide, associada com a predominância de deposição de gordura visceral, e diminuição da gordura ginoide (Ozbey *et al.*, 2002). A gordura andróide é considerada um fator de risco cardiovascular independente (Stern *et al.*, 1986) e geralmente está associada a outras alterações metabólicas como hipertensão arterial, hiperlipidemia e intolerância à glicose (Despres *et al.*, 1990). A terapia de reposição estrogênica parece diminuir a quantidade de gordura abdominal apesar de não modificar ou apresentar pequeno efeito na massa total de gordura corpórea (Harboe *et al.*, 1991).

A viscosidade plasmática é fator preditivo da ocorrência de DAC (Yarnell *et al.*, 1991; Rosenson, 1993). A reposição estrogênica é capaz de reduzir significativamente a viscosidade do plasma, podendo assim constituir importante mecanismo adicional de cardioproteção (Rosenson *et al.*, 1996; Rosenson *et al.*, 1998).

A fase de pós-menopausa é acompanhada de alterações no equilíbrio normal do sistema hemostático do organismo, com aumento dos fatores pró-trombóticos (fibrinogênio e fator VII) e diminuição dos fatores anti-trombóticos ou fibrinolíticos (ativador do plasminogênio tecidual [t-PA]), com conseqüente aumento do risco cardiovascular (Aznar *et al.*, 1988).

A reposição estrogênica isolada reduz de maneira significativa as concentrações séricas de fibrinogênio, mas aumenta o risco trombótico, pela elevação do fator VII (Teede *et al.*, 2000). Esse efeito pró-coagulante indesejável pode ser atenuado pela adição de progestinas que parecem impedir a elevação do fator VII (Godsland, 2001).

O sistema fibrinolítico é regulado principalmente pelo ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e pelo inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (PAI-1) (Sprengers e Kluft, 1987). A menopausa nas mulheres acarreta

alterações na capacidade fibrinolítica do plasma, aumentando o risco de eventos cardiovasculares nessa população de pacientes (Godsland, 2001).

Grandes estudos epidemiológicos, como o *Framingham Offspring Study*, demonstraram que mulheres em pós-menopausa apresentam concentrações mais elevadas de antígeno t-PA e PAI-1 do que mulheres na fase pré-menopausa (Kannel *et al.*, 1979). A reposição hormonal reduz estas concentrações, podendo, às vezes, atingir os valores encontrados na fase pré-menopausa (Gebara *et al.*, 1995; Madsen *et al.*, 2003).

Em relação ao metabolismo da glicose e insulina, os estudos demonstraram aumento da incidência de DAC e de outras doenças vasculares nos diabéticos, particularmente em mulheres diabéticas (Barrett-Connor *et al.*, 1991). Além disso, o aumento da ocorrência de doença vascular está também associado às formas leves de intolerância à glicose, resistência periférica aumentada à insulina e a hiperinsulinemia (Moller *et al.*, 1991).

Na pós-menopausa, ocorre diminuição da secreção pancreática de insulina, eliminação deficiente e progressivo aumento da resistência insulínica (Godsland, 1996). A administração de 17-beta-estradiol induz modificações benéficas no metabolismo da glicose e insulina (Cagnacci *et al.*, 1992).

A conhecida ação favorável dos estrógenos sobre o perfil lipídico têm sido comprovada de modo consistente por grandes estudos clínicos randomizados de prevenção primária, como o *Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions Trial* (PEPI) (Writing Group for the PEPI Trial, 1995), ou secundária (HERS) de DAC (Hulley *et al.*, 1998).

Além de produzir os efeitos benéficos conhecidos sobre o metabolismo lipídico, a TRH apresenta também outros benefícios (Walsh, *et al.*, 2000), tais como, a diminuição de homocisteína e Lp[a] (Horejsi e Ceska, 2000; Ödmark *et al.*, 2004).

A reposição estrogênica em mulheres hipercolesterolêmicas com DAC reduziu a concentração de anticorpos contra as LDL-oxidadas, indicando possuir efeito antioxidante sobre essas lipoproteínas (Subbiah, 1998; Subbiah,

2002), que desempenham importante papel na fase inicial do desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (Hoogerbrugge *et al.*, 1998). O mecanismo pelo qual os estrógenos exercem efeito antioxidante ainda não está esclarecido, contudo, foram observados tanto em experimentos *in vitro* (Subbiah e Abplanalp, 2002), como também *in vivo* (Hockerstedt *et al.*, 2004).

O estrógeno possui capacidade de produzir vasodilatação nas artérias coronárias e em diversos outros vasos por dois mecanismos fundamentais (Bush *et al.*, 1998; Collins, 2002). O primeiro decorrente de ação do tipo antagonista de cálcio que causa vasodilatação por ação direta sobre a musculatura lisa vascular (Mugge *et al.*, 1993). O segundo mecanismo é do tipo endotélio-dependente e induz a produção de óxido nítrico endotelial que tem potente efeito vasodilatador (Jokela *et al.*, 2003).

Estudos *in vivo* indicam que a TRH com estrógenos aumenta a produção de óxido nítrico e prostaciclina, enquanto diminui a produção de endotelina-1 (Jokela *et al.*, 2003). E pesquisa realizada em mulheres na fase de pós-menopausa, que receberam 17-beta-estradiol por seis meses associado a medroxiprogesterona, indicou aumento da relação óxido nítrico/endotelina-1 (Best *et al.*, 1998); podendo ser estes, alguns dos mecanismos responsáveis pela melhora na função endotelial obtida com o uso da TRH com estrógenos (Davidson *et al.*, 2000; Pines, 2002).

O risco para desenvolvimento de câncer de mama associado ao uso de TRH foi observado numa revisão de 51 estudos, tendo sido constatado um discreto aumento no risco relativo tanto em usuárias contínuas quanto naquelas que interromperam o uso de TRH por pelo menos um a quatro anos (Beral, 1997). Contudo, também foi observado que a mortalidade por câncer de mama parece diminuir com a administração da TRH (Willis *et al.*, 1996).

Foi observado aumento de duas a três vezes na incidência de trombose venosa profunda e embolia pulmonar durante uso da TRH (Daly *et al.*, 1996; Jick *et al.*, 1996; Grodstein *et al.*, 1996; Hulley *et al.*, 2002; Rossouw *et al.*, 2002). O risco de trombose aumenta com maiores doses de estrógenos, e é

maior durante o primeiro ano de uso (U.S. Preventive Services Task Force, 2002).

Diversos, porém nem todos os estudos, têm indicado aumento na incidência de doenças da vesícula biliar em usuárias correntes ou por longos períodos, mesmo naquelas que suspenderam o uso de TRH (Grodstein *et al.*, 1994; U.S. Preventive Services Task Force, 2002). Este dado é consistente com o aumento na incidência de cirurgias do trato biliar que foi constatado pelo estudo HERS (Hulley *et al.*, 2002).

1.8. Efeitos das vastatinas

Embora a TRH possa constituir-se numa terapia bem sucedida na prevenção ou controle da hipercolesterolemia em mulheres em pós-menopausa, outros protocolos terapêuticos tem sido utilizados.

Desde as décadas passadas, a utilização de intervenções farmacoterapêuticas, tais como o uso dos agentes hipolipemiantes (Farnie e Davignon, 1998), bem como o uso do ácido acetilsalicílico, drogas anti-trombóticas, anti-hipertensivos, têm contribuído de forma importante para o declínio gradual de ocorrência de DCV (McGovern *et al.*, 1996; Dobson *et al.*, 1999).

As vastatinas são atualmente considerados os fármacos mais seguros e eficazes no tratamento das hiperlipidemias, e desta forma, na prevenção primária e secundária de DAC (Bhatnagar, 1998; Bucher *et al.*, 1999).

As vastatinas inibem de forma competitiva e parcial a hidroximetilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima-chave na biossíntese endógena do colesterol. Dessa forma, ocorre a redução da concentração intracelular de colesterol, principalmente no fígado, que induz aumento na expressão dos RLDL hepáticos. Esse efeito acarreta maior captação das partículas de LDL e conseqüentemente a redução do LDL-C plasmático (Grundy, 1988; Slater e MacDonald, 1988).

Grandes estudos realizados com indivíduos hipercolesterolêmicos constataram a eficiência das vastatinas tanto na prevenção primária (WOSCOPS e AFCAPS/TexCAPS), como secundária (4S, CARE e LIPID) de DAC (The Scandinavian Simvastatine Survival Study, 1994; Shepherd *et al.*, 1995; Sacks *et al.*, 1996; Downs *et al.*, 1998).

Outros estudos constataram os potentes efeitos hipolipemiantes das vastatinas (Blum, 1994; Illingworth e Tobert, 1994; Hsu *et al.*, 1995; Nawrocki *et al.*, 1995), e também que o seu efeito na diminuição de LDL-C é dose-dependente (Blum, 1994). As reduções significantes nas concentrações plasmáticas do LDL-C são geralmente acompanhadas de reduções significantes de colesterol total, triglicerídeos e apo B, apo C-II, apo C-III e apo E, em conjunto com discreto aumento nas concentrações plasmáticas de HDL-C e apo A-I (Farnie e Davignon, 1998; Kajinami *et al.*, 2004).

Com base nos dados da literatura, atualmente as reduções mais acentuadas de colesterol total e LDL-C são obtidas com a utilização da rosuvastatina (Scott *et al.*, 2004). Estudos indicam que a rosuvastatina é duas e quatro vezes mais potente que a atorvastatina e a sinvastatina, respectivamente; e pelo menos oito vezes mais potente que a pravastatina ou a lovastatina. Não estando ainda bem estabelecida até o momento a equivalência dos fármacos baseada na dosagem por miligramas de vastatina (Kendrach e Kelly-Freeman, 2004).

Para as demais vastatinas, são consideradas equivalentes as seguintes dosagens: 40 mg de lovastatina, 20 mg de sinvastatina, 40 mg de pravastatina, 80 mg de fluvastatina, e 10 mg de atorvastatina; que em média, promovem a redução de colesterol total em 22% e de LDL-C em 27% (Roberts, 1997; Igel *et al.*, 2001).

De modo geral as vastatinas são bem toleradas e apresentam um bom perfil de segurança na sua utilização por longos períodos de tratamento (Illingworth *et al.*, 1988; Bocuzzi *et al.*, 1991; Dujovne *et al.*, 1991). Os estudos indicam taxas de descontinuação do uso em torno de 1,0 a 4,8%, valores próximos aos

observados entre os pacientes que receberam placebo nas pesquisas (Blum, 1994).

... Dentre os efeitos adversos mais graves observados com o uso contínuo das vastatinas, o mais comum é a hepatotoxicidade (Dujovne *et al.*, 1991; Lea e McTavish, 1997). Outro efeito adverso é a miopatia que embora raro, pode evoluir para rabdomiólise com conseqüente dano renal (Hsu *et al.*, 1995).

1.9. Polimorfismo do gene *APOE* e resposta terapêutica

A farmacogenética examina as características genéticas individuais com o objetivo de entender as variações apresentadas na resposta terapêutica (Shi *et al.*, 2001).

Os polimorfismos do gene *APOE* têm sido associados a variações nos perfis lipídicos pós-prandiais e na resposta à intervenção dietética (Boerwinkle *et al.*, 1994; Ordovas, 2002).

Em um estudo com indivíduos diabéticos não-insulino dependentes sem hipertrigliceridemia em jejum, os portadores de alelo $\epsilon 2$ apresentaram maior aumento de triglicerídeos plasmáticos, após receberem dieta rica em lipídeos, quando comparados aos portadores dos alelos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ (Reznik *et al.*, 1996). O polimorfismo -219 G/T, localizado na região promotora do gene *APOE*, também foi associado ao aumento significativo dos triglicerídeos plasmáticos no período pós-prandial (Moreno *et al.*, 2003). O alelo $\epsilon 4$ também foi associado com a maior absorção intestinal do colesterol da dieta alimentar (Gylling *et al.*, 1989; Tammi *et al.*, 2000).

Em geral a resposta farmacológica pode estar associada a variações em três categorias de genes (Shi *et al.*, 2001): (a) genes de enzimas de biotransformação drogas, (b) genes relacionados ao mecanismo de ação das drogas, (c) genes relacionados a vias metabólicas.

Visto que o polimorfismo *APOE* explica em parte a variabilidade observada nos lipídeos plasmáticos, vários investigadores têm procurado avaliar a influência dos polimorfismos do gene *APOE* na variação da resposta aos

fármacos hipolipemiantes (Ordovas e Schaefer, 1999; Ballantyne *et al.*, 2000; Ordovas e Mooser, 2002).

Nesses estudos foi observado que indivíduos hipercolesterolêmicos portadores de pelo menos um alelo $\epsilon 2$ respondiam melhor ao tratamento com lovastatina (40 mg/dia) (O'Malley *et al.*, 1990), pravastatina (40 mg/dia) (Ordovas *et al.*, 1995), sinvastatina (20 mg/dia) (Nestel *et al.*, 1997), fluvastatina (40 mg/dia) (Ballantyne *et al.*, 2000), e com atorvastatina (10 mg/dia) (Pedro-Botet *et al.*, 2001), em relação aos indivíduos portadores dos alelos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, de forma independente da idade e dos valores basais de LDL-C dos indivíduos (Kajinami *et al.*, 2004).

Em dois estudos recentes, foi avaliado o efeito do polimorfismo do gene *APOE* sobre o perfil lipídico pós-tratamento com TRH, sem adição de vastatinas, em mulheres japonesas em pós-menopausa (combinação de 0,625 mg/dia de estrógeno equino conjugado com 2,5 mg/dia de acetato de medroxiprogesterona) (Somekawa e Wakabayashi, 1998; Tsuda *et al.*, 2001). Após o tratamento com TRH por 6 meses, não foi observado efeito do polimorfismo do gene *APOE* sobre o perfil lipídico sérico (Somekawa e Wakabayashi, 1998). Curiosamente, após tratamento por 12 meses, as mulheres portadoras do alelo $\epsilon 2$ (genótipos E2/E2 e E2/E3) apresentaram redução significativa das concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL-C em comparação com as portadoras dos alelos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ (Tsuda *et al.*, 2001). Em ambos trabalhos, a TRH causou redução na razão LDL-C/HDL-C, que foi menor entre as mulheres portadoras do alelo $\epsilon 4$, mesmos resultados verificados para uma população caucasiana pelo trabalho de Garry e colaboradores (1999).

As reduções de colesterol total e LDL-C plasmáticos, em mulheres na fase de pós-menopausa, podem ser alcançadas pela administração combinada de vastatinas com TRH. Entretanto, a variabilidade na resposta terapêutica de 9 a 43%, nas mulheres em pós-menopausa, pode depender de vários fatores. Dentre esses fatores, destaca-se os polimorfismos do gene *APOE* (Gomez-Coronado *et al.*, 1999; Siest *et al.*, 2000a) ou de outros genes relacionados ao

metabolismo lipídico (Cubriilo-Turek *et al.*, 2001; Somekawa *et al.*, 2002), ou não (Tempfer *et al.*, 2004); assim como o perfil lipídico pré-tratamento (Hak *et al.*, 2004) e a concentração plasmática de outros hormônios sexuais androgênicos (Zofkova *et al.*, 2002).

A associação entre o polimorfismo do gene *APOE* e a prevenção da perda de densidade óssea em resposta a TRH foi também analisada. Em dois estudos, o alelo $\epsilon 2$ foi associado com menor perda da densidade óssea em mulheres sem TRH (Salamone *et al.*, 2000; Gerdes *et al.*, 2001). Em um dos estudos, após a TRH, não foi observada diferença na perda de densidade óssea entre as portadoras dos diferentes genótipos *APOE* (Salamone *et al.*, 2000). Enquanto que no outro, a perda de densidade óssea foi menor nas portadoras do alelo $\epsilon 4$ (Gerdes *et al.*, 2001).

Embora seja conhecida a associação entre o polimorfismo do gene *APOE* e a variabilidade na concentração dos lipídeos plasmáticos ou a resposta terapêutica as vastatinas, há ainda poucos estudos realizados em mulheres em pós-menopausa que receberam TRH. Além disso, não há estudos que avaliem o efeito do polimorfismo do gene *APOE* e das vastatinas, combinadas ou não a TRH, sobre a expressão gênica da apo E.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do polimorfismo do gene *APOE* sobre a expressão gênica e sobre a resposta ao tratamento com atorvastatina e a terapia de reposição hormonal, em mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a influência do polimorfismo do gene *APOE* sobre o perfil lipídico sérico de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após o tratamento com atorvastatina combinada ou não com estradiol e/ou acetato de noretisterona.

Avaliar a influência do polimorfismo do gene *APOE* sobre a expressão do RNAm do gene *APOE* em células mononucleares de sangue de mulheres em pós-menopausa, antes e após o tratamento com atorvastatina combinada ou não com estradiol e/ou acetato de noretisterona.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística e protocolo terapêutico

O grupo de estudo foi constituído por 87 mulheres sem vínculo genético, de etnia branca, com idade entre 50 e 65 anos, em pós-menopausa natural, hipercolesterolêmicas e sem histórico de doença arterial coronariana. A hipercolesterolemia foi determinada de acordo com os critérios das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias (DIRETRIZES..., 2001). As mulheres selecionadas foram acompanhadas por cardiologistas da Seção de Lipoproteínas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, SP (IDPC-SP).

No estudo, não foram incluídas mulheres com diabetes melito, hipotireoidismo, concentrações séricas dos triglicerídeos acima de 400 mg/dL, que faziam uso de terapia com hipolipemiantes ou que eram tabagistas.

Foram avaliados os parâmetros antropométricos e as concentrações dos lipídios séricos das mulheres incluídas no estudo. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela fórmula $IMC = kg/m^2$. As mulheres com IMC superior ou igual a 30 kg/m^2 foram consideradas obesas, de acordo com os critérios de classificação de obesidade estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (James *et al.*, 2001).

As mulheres selecionadas foram distribuídas, de modo randômico, em cinco grupos e foram tratadas com atorvastatina combinada ou não com estradiol e/ou acetato de noretisterona (NETA) (Tabela 1). Ao analisar os parâmetros antropométricos e lipídicos basais, não foram observadas diferenças na faixa etária, IMC, concentrações séricas de lipídeos e frequência de obesidade entre os cinco grupos de mulheres ($p > 0,05$) (Tabela 2).

O protocolo terapêutico do estudo foi realizado em duas etapas, placebo e fármacos-ativos; e durante estas duas fases as participantes receberam

também orientação nutricional durante todo período de participação no estudo, realizada por nutricionista.

Todas receberam, inicialmente, orientação dietética por nutricionista com a finalidade de reduzir a colesterolemia. Para as participantes que após o período de quatro semanas de dieta regular mantiveram as concentrações de LDL-colesterol acima de 130 mg/dL, foi introduzido o uso de 1 comprimido de placebo por dia equivalente para cada esquema terapêutico, por via oral, pelo período de quatro semanas.

Na fase fármacos-ativos, as mulheres fizeram uso de 1 comprimido por dia de cada medicamento estabelecido nos esquemas terapêuticos descritos na tabela 1, pelo período de 12 semanas. Ao final das fases placebo (basal) e fármacos-ativos (pós-tratamento), foram obtidas as amostras de sangue periférico para as análises do perfil lipídico sérico e da expressão do RNAm do gene *APOE*.

Foram mantidas as recomendações alimentares iniciais durante todo o estudo, para todas as mulheres.

O período da etapa fármaco-ativo foi considerado suficiente para a observação dos efeitos desejados nas mulheres em pós-menopausa, após os tratamentos com a TRH (De Lignières e Silberstein, 2000) ou atorvastatina (Stern *et al.*, 2000).

A resposta farmacológica aos diferentes esquemas utilizados foi avaliada pela determinação de parâmetros do perfil lipídico sérico. A segurança clínica dos esquemas terapêuticos foi monitorada pelo exame dos sinais vitais (pressão arterial e frequência cardíaca), e através de parâmetros laboratoriais que visaram as avaliações das funções hepática e muscular.

O protocolo terapêutico deste estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa do IDPC-SP e da FCF-USP (Anexos 1 e 2). O estudo foi conduzido após as mulheres selecionadas terem assinado o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3).

Tabela 1. Esquemas terapêuticos utilizados no tratamento das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa.

Esquemas	Frequência (%)	Tratamento
A (n=17)	19,5	Atorvastatina (10 mg/dia)
E+A (n=18)	20,7	Atorvastatina (10 mg/dia) + estradiol (2 mg/dia)
E (n=19)	21,8	Estradiol (2 mg/dia)
E+P (n=15)	17,2	Estradiol (2 mg/dia) + acetato de noretisterona (1 mg/dia)
E+P+A (n=18)	20,7	Atorvastatina (10 mg/dia) + estradiol (2 mg/dia) + acetato de noretisterona (1 mg/dia)

n = número de pacientes.

Tabela 2. Parâmetros antropométricos e lipídicos (média $\pm$ DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa.

Parâmetros	Grupo A (n=17)	Grupo E+A (n=18)	Grupo E (n=19)	Grupo E+P (n=15)	Grupo E+P+A (n=18)	Média (n=87)	<i>p</i>
Faixa etária (anos)	59,0 $\pm$ 4,2 (50 - 65)	57,0 $\pm$ 3,8 (52 - 64)	56,5 $\pm$ 4,1 (50 - 65)	58,5 $\pm$ 4,2 (51 - 65)	57,3 $\pm$ 3,1 (51 - 62)	57,6 $\pm$ 3,9 (50 - 65)	0,281 ^a
Obesidade (%)	35,3	50,0	21,0	40,0	38,9	36,8	$\chi^2=3,49$ $p=0,479$ 4gl ^b
IMC (kg/m ²)	29,3 $\pm$ 5,4 (21,9-40,3)	30,9 $\pm$ 5,9 (22,5-39,7)	27,5 $\pm$ 3,2 (21,2-33,7)	31,3 $\pm$ 5,3 (25,7-44,3)	27,9 $\pm$ 3,5 (22,3-34,6)	29,3 $\pm$ 4,9 (21,2-44,3)	0,087 ^a
Lipídeos (mg/dL)							
CT	278,6 $\pm$ 31,9	284,0 $\pm$ 38,8	280,4 $\pm$ 45,0	254,3 $\pm$ 40,3	300,4 $\pm$ 54,8	280,4 $\pm$ 44,4	0,057 ^a
HDL-C	56,8 $\pm$ 11,5	56,7 $\pm$ 8,0	56,4 $\pm$ 7,7	52,8 $\pm$ 13,5	59,9 $\pm$ 15,8	56,6 $\pm$ 11,6	0,333 ^a
LDL-C	185,6 $\pm$ 30,0	189,2 $\pm$ 33,4	187,8 $\pm$ 41,8	174,8 $\pm$ 35,5	203,9 $\pm$ 52,2	188,7 $\pm$ 39,8	0,336 ^a
VLDL-C	36,0 $\pm$ 17,0	38,5 $\pm$ 19,8	36,8 $\pm$ 20,9	26,7 $\pm$ 8,3	36,2 $\pm$ 15,9	35,1 $\pm$ 17,3	0,442 ^a
TG	180,1 $\pm$ 84,8	192,6 $\pm$ 99,2	184,1 $\pm$ 104,6	133,5 $\pm$ 41,7	181,0 $\pm$ 79,9	175,7 $\pm$ 86,7	0,442 ^a
apo A-I	153,6 $\pm$ 25,6	147,4 $\pm$ 22,1	147,8 $\pm$ 18,6	136,7 $\pm$ 15,8	157,3 $\pm$ 35,7	148,9 $\pm$ 25,1	0,182 ^a
apo B-100	144,0 $\pm$ 18,0	143,7 $\pm$ 24,9	145,3 $\pm$ 22,4	132,7 $\pm$ 18,5	154,9 $\pm$ 30,9	144,6 $\pm$ 24,1	0,133 ^a

n= número de mulheres em cada grupo. As faixas etárias e de índice de massa corporal encontram-se entre parênteses.

Grupo A: atorvastatina; Grupo E+A: atorvastatina e estradiol; Grupo E: estradiol; Grupo E+P: estradiol e acetato de noretisterona; Grupo E+P+A: atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona. CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL, apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100. IMC= índice de massa corporal (kg/m²).

^aTeste ANOVA; ^b χ^2 : Qui-quadrado; *gl*: graus de liberdade.

3.2. Amostras biológicas

Ao final de cada fase do protocolo terapêutico, foi obtido um único conjunto de amostras de sangue das mulheres, após jejum de 12 a 14 horas, utilizando o sistema de coleta a vácuo contendo anticoagulante (EDTA, 1 mg/mL sangue) para obtenção do sangue total. Uma amostra de 5 mL de volume foi utilizada para a extração do DNA genômico e outra de 10 mL de volume para a extração do RNA total. Também foram colhidas amostras de sangue sem anticoagulante para obtenção de soro, que foi utilizado para a determinação dos parâmetros bioquímicos.

3.3. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Foram determinadas as concentrações séricas dos triglicerídeos (TG), do colesterol total (CT), do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C), do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), e a do colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), apolipoproteína B-100 (apo B-100), e apolipoproteína A-I (apo A-I).

A concentração sérica de TG foi determinada pelo método enzimático GPO-PAP (Fossati e Principe, 1982). A concentração sérica do CT foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico (Fossati e Medici, 1987). A concentração do HDL-C foi determinada por imunoensaio, pelo método homogêneo/direto (Kakuyama *et al.*, 1994). As concentrações do LDL-C, e do VLDL-C obtida pela divisão da concentração sérica dos triglicerídeos por cinco, foram obtidas pela fórmula de Friedewald (Friedewald, 1972). As concentrações séricas de apo B-100 e de apo A-I foram determinadas por imunoturbidimetria (Rifai e King, 1986) com *Kits* da Roche (Basel, Suíça).

As determinações dos parâmetros bioquímicos foram realizadas em analisador automático, modelo Hitachi 912 (Hitachi Ltda. Tóquio, Japão), utilizando *Kits* da Roche (Basel, Suíça).

O controle de qualidade das determinações séricas de lipídeos e lipoproteínas, foi realizado pela determinação concomitante de soros controle

normal e patológico comerciais, e pela participação no programa de controle de qualidade externo da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC).

3.4. Extração e avaliação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina, otimizado por Salazar *et al.* (1998). Resumidamente, as amostras de sangue foram submetidas à lise celular com 1 mL do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 200 µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0, NaCl a 0,4 M) contendo SDS a 10%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de NaCl a 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação com etanol absoluto e finalmente, ressuspendido em 100 µL do tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1 mM, pH 8,0) e mantido a -4°C.

A integridade das amostras de DNA extraídas foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE na concentração final de 1,0 X (Tris-HCl a 90 mM, pH 8,4, EDTA a 2 mM, ácido bórico a 90 mM), a 100 V por 30 min, em cuba eletroforética (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo a 0,5 mg/L (Sambrook *et al.*, 2001) e as bandas eletroforéticas foram avaliadas juntamente com de padrão de DNA de tamanho molecular em escala de 1 Kb (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA).

As bandas foram visualizadas sob luz UV em transiluminador Chemilmager™ 4400 que faz parte do sistema de digitalização de imagens Multimage™ Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro/CA, EUA).

A quantificação e análise do grau de pureza (relação A_{260}/A_{280}) das amostras de DNA foram realizadas por espectrofotometria na região do UV em

espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EUA), após diluição a 1:50 em tampão TE pH 8,0 (Sambrook *et al.*, 2001).

3.5. Genotipagem por PCR-RFLP

A determinação dos genótipos para o polimorfismo *HhaI* (exon 4) do gene *APOE* foi realizada segundo técnica previamente otimizada em nosso laboratório (Otta *et al.*, 1996; Cavalli *et al.*, 1996; Salazar *et al.*, 2000b).

A amplificação da região polimórfica para genotipagem do gene *APOE* foi realizada por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando-se seqüências de iniciadores (Tabela 3), previamente descritos por Hixson e Vernier (1990).

Tabela 3. Seqüências e localização gênica dos iniciadores e tamanho do fragmento amplificado para os genes *APOE* e *GAPD*.

Iniciadores	Seqüências	Posição no gene	Tamanho Produto de PCR
Genotipagem			
<i>APOE sense</i>	5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'	3873-3890*	244 bp
<i>APOE anti-sense</i>	5'-ACAGAATTTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3'	4084-4100*	
Expressão gênica			
<i>APOE sense</i>	5'-TGC GTTGCTGGTCACATT-3'	79-96**	286 bp
<i>APOE anti-sense</i>	5'-GGTCAGTTGTTCTCCAGTTC-3'	344-364**	
<i>GAPD sense</i>	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	4206-4225***	452 bp
<i>GAPD anti-sense</i>	5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-3'	4742-4761***	

* Número de acesso AF261279 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>)

** Número de acesso M12529 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>)

*** Número de acesso J04038 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>)

Para a amplificação foi utilizado tampão de PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl₂ a 2,0 mmol/L), 200 µM de cada deoxinucleotídeo (mistura de dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, e dTTP) (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA), 200 nM de cada iniciador (GIBCO BRL-Life Technologies, São Paulo/SP, Brasil), 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools do Brasil, Rio de Janeiro, RJ), DMSO a 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1 µL de DNA genômico para volume final de 50 µL. A mistura foi colocada no termociclador *Peltier Thermal Cyclor* modelo PTC-200 (MJ Research, EUA) e aquecida por 3 min a 98°C. Em seguida, foram realizados 30 ciclos de desnaturação (95°C por 90 s), hibridação (61°C por 90 s) e extensão (72°C por 2 min). A reação foi finalizada com um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. A 5 µL de produto de PCR foi adicionado 1 µL de tampão de aplicação (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30%). A amostra foi submetida à eletroforese em tampão TBE na concentração final de 1,0 X, por 30 min a 100 V, em cuba eletroforética (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). A seguir, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo a 0,5 mg/L (Sambrook *et al.*, 2001). As bandas de 244 bp foram avaliadas juntamente com o padrão de DNA de tamanho molecular em escala de 100 bp (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA) e visualizadas sob luz UV como descrito no item 3.4.

Posteriormente, os produtos de PCR (8,5 µL) foram incubados com 5 U enzima de restrição *HhaI* (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) em tampão de enzima (Tris-HCl a 50 mmol/L, pH 8,0, NaCl a 50 mmol/L, MgCl₂ a 10 mmol/L) em volume final de 10 µL, por 4 horas, a 37°C.

Os produtos de restrição enzimática (5 µL) foram preparados em tampão de aplicação (1 µL) e separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em tampão TBE. A eletroforese foi executada no sistema de eletroforese vertical

V16-2 (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), a 250V (20 mA) por 4 h (Sambrook *et al.*, 2001). Os fragmentos de DNA foram corados pelo método de precipitação com prata (Sambrook *et al.*, 2001). A identificação das bandas dos fragmentos foi realizada comparando-se sua distância de migração a padrões de DNA de tamanho molecular em escala de 50 bp e 10 bp (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA). As bandas foram também visualizadas sob luz na região do visível em transiluminador como descrito no item 3.4.

Na figura 6, são mostrados os produtos de restrição do polimorfismo *HhaI* do gene *APOE*, separados pela eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. As linhas 2, 3 e 7 correspondem ao genótipo E3/E3, por que verificamos a presença de fragmentos de restrição de 91 bp e 48 bp de tamanho. A linha 4 corresponde ao genótipo E3/E2, pela presença dos fragmentos de restrição de 91 bp, 81 bp e 48 bp. O genótipo E3/E4 é observado nas linhas 1, 5 e 6 pela presença dos fragmentos de 91 bp, 72 bp e 48 bp.

Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% de produtos de restrição enzimática para o polimorfismo *HhaI* do gene *APOE*. Linhas 2, 3 e 7: genótipo E3/E3; linha 4: genótipo E3/E2; linhas 1, 5 e 6: genótipo E3/E4; linha 8: produto de PCR. Linhas M1 e M2: padrões de tamanho molecular de DNA em escala de 50 e 10 bp, respectivamente.

3.6. Análise da expressão gênica por RT-PCR

3.6.1. Extração e análise do RNA

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por centrifugação sob um gradiente de densidade em solução de Ficoll-Paque® Plus (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA) a partir de 10 mL de sangue periférico total, colhidos em EDTA (1 mg/mL de sangue) (Fortino *et al.*, 1971). As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 min, em centrífuga CELM modelo LS 35 (CELM Ind., São Paulo/SP, Brasil), a temperatura ambiente (TA). O plasma rico em plaquetas foi descartado. As células sangüíneas foram diluídas a 1:2 com tampão TE pH 7,4 (Tris-HCl a 10 mM, pH 7,4 e EDTA a 10 mM, pH 8,0). Essa suspensão de células foi adicionada lentamente sobre uma solução de Ficoll-Paque® Plus (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA) (d=1,070 g/mL) e centrifugada a 1350 rpm, por 30

min a TA. A camada contendo as CMSP foi recuperada e lavada duas vezes com tampão TE (pH 7,4). As células assim obtidas foram contadas em microscópio ótico com auxílio de Câmara de Newbauer, após coloração com azul de tripan 0,1%, e utilizadas imediatamente para extração do RNA total, empregando procedimento otimizado em nosso laboratório (Salazar *et al.*, 2000a).

Resumidamente, as CMSP ($1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^7$) foram lisadas utilizando-se 1 mL do reagente TRIZOL® (GIBCO BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) por homogeneização. A seguir foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, homogeneizadas e centrifugadas a 12000 x g, por 15 min, a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa foi separado e precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 12000 x g, por 15 min a 4°C e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água esterilizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para um volume final de 100 μ L. A solução de RNA total foi dividida em três alíquotas de volumes iguais, que foram incubadas por 10 min a 55°C e armazenadas a -80°C para posterior análise.

A quantificação e análise do grau de pureza (relação A_{260}/A_{280}) das amostras de RNA total foram realizadas por espectrofotometria na região do UV em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EUA), após diluição a 1:50 em tampão TE (pH 7,4) (Sambrook *et al.*, 2001).

3.6.2. Ensaio RT-PCR

O cDNA foi sintetizado, a partir do RNAm, utilizando-se a enzima transcriptase reversa (RT) (Super Script™ II RNase H⁻ RT) (GIBCO BRL-Life Technologies do Brasil, Gaithersburg, MD, EUA). Foi adicionado a microtubos um volume da solução de RNA equivalente a 1-3 μ g de RNA total, 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (GIBCO BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), e água destilada esterilizada tratada com DEPC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para completar o volume de 12 μ L. Esta

solução foi aquecida por 10 min a 70°C, e em seguida, resfriada em banho de gelo. Em seguida, acrescentou-se a seguinte mistura de reagentes: tampão da enzima RT (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,3, KCl a 75 mM, MgCl₂ a 3 mM), DTT a 100 mM, dNTPs a 200 µM, e 200 U da enzima RT em volume final de 20 µL. Essa mistura foi incubada por 10 min a 25°C para permitir a hibridação dos oligonucleotídeos aleatórios ao RNA, seguida de 50 min a 42°C para a síntese do cDNA pela enzima RT, e 15 min a 70°C para inativação da enzima RT. O cDNA foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

A amplificação do cDNA (2 µL) do gene *APOE* foi realizada por PCR na presença de tampão de PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl₂ a 2,0-4,0 mmol/L), 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Biotools do Brasil, Rio de Janeiro, RJ), 150-300 nM de iniciadores específicos (GIBCO BRL-Life Technologies do Brasil, São Paulo/SP, Brasil) para avaliação da expressão do gene *APOE* (Tabela 3) e 200 mM de cada deoxinucleotídeo (dNTP) (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA), para o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada no termociclador *Peltier Thermal Cycler* modelo PTC-200 (MJ Research, EUA), seguindo-se o seguinte protocolo: ciclo inicial a 3 min a 98°C; 25-45 ciclos com: desnaturação (95°C por 60 s), hibridização (51-62°C por 75 s) e extensão (72°C por 70 s); e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

O gene da gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase (*GAPD*) foi utilizado como gene constitutivo. A amplificação do cDNA (2 µL) foi realizada em tampão de PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl₂ a 1,5 mmol/L), 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Biotools do Brasil, Rio de Janeiro, RJ), 50-200 nM dos iniciadores específicos (GIBCO BRL-Life Technologies, São Paulo/SP, Brasil) para o gene *GAPD* (Tabela 1) (Tokunaga *et al.*, 1987), e 200 mM de dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA), para o volume final de 50 µL. As amostras de cDNA foram amplificadas nas mesmas condições que as do cDNA do gene *APOE*.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% conforme procedimento descrito no item 3.5. As bandas de 286 bp (do gene

APOE) e 452 bp (do gene *GAPD*) foram avaliadas juntamente com de padrão de DNA de tamanho molecular em escala de 100 bp (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA) e visualizadas sob luz UV.

A utilização do gene *GAPD* na PCR-*duplex* permitiu a correção de variações interensaio inerentes ao processo: extração do RNA, síntese de cDNA, e amplificação pela PCR; além de também de servir como controle positivo da reação, assegurando a presença do cDNA na RT-PCR (Weber *et al.*, 2001).

Após a etapa de otimização, as condições experimentais da RT-PCR individuais foram: 1 µg de RNA na reação de RT, e na PCR foram utilizados 150 nM de iniciadores específicos, 2 mM MgCl₂, 62°C de temperatura de hibridização e 35 ciclos.

A seguir foram testadas as condições adequadas para a amplificação concomitante dos *APOE* e *GAPD* por PCR-*duplex*. A PCR-*duplex* foi realizada na presença de 2 µL de cDNA, tampão de PCR (Tris-HCl a 10 mmol/L, pH 9,0, KCl a 50 mmol/L, MgCl₂ a 2,0 mmol/L), 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Biotools do Brasil, Rio de Janeiro, RJ), 50-200 nM de iniciadores *APOE* e 12,5-50 nM de iniciadores *GAPD* (Tabela 1), e 200 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA), para volume final de 50 µL. Os ensaios de PCR-*duplex* foram realizados no termociclador *Peltier Thermal Cycler* modelo PTC-200 (MJ Research, EUA), seguindo-se o seguinte protocolo: ciclo inicial a 3 min a 98°C; 30-40 ciclos com desnaturação (95°C por 60 s), hibridação (62-64°C por 75-90 s) e extensão (72°C por 75 s); e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

Após os testes, a reação de PCR-*duplex* apresentou bandas de *APOE* e *GAPD* com sensibilidade e especificidade adequadas, nas seguintes condições: 200 nM iniciadores para o gene *APOE* e 25 nM para o gene *GAPD*; 37 ciclos com 62°C de temperatura de hibridação, a 75 s, e extensão a 70 s. Essas condições foram estabelecidas tanto para a PCR-*duplex* (Figura 7, linha 2) como para os ensaios de RT-PCR individuais dos genes *APOE* (Figura 7, linha 1), e *GAPD* (Figura 7, linha 3), o que foi confirmado pela análise densitométrica das bandas obtidas.

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1,0 % dos produtos de RT-PCR do RNA_m dos genes *APOE* (286 bp) e *GAPD* (452 bp) em células mononucleares do sangue periférico. Linha 1: produto de PCR-simples do gene *APOE*; linha 2: produto de PCR-*duplex*; linha 3: produto de PCR-simples do gene *GAPD*. Linha M: marcador de tamanho molecular de DNA em escala de 100 bp. Linha B: controle dos reagentes.

3.7. Controle de qualidade das técnicas de PCR e RT-PCR

As amplificações realizadas pela técnica de PCR foram monitoradas utilizando-se controle de reagentes em cada conjunto de reações. Esta análise constituiu-se de um tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto o ácido nucléico (DNA genômico ou cDNA).

As análises de RT-PCR foram realizadas em triplicata para cada amostra, e a medida semi-quantitativa da expressão do gene *APOE* (relação *APOE/GAPD*) foi obtida pela média dos três valores. Também foram repetidas 10% das reações de PCR, aleatoriamente.

As reações de restrição enzimática foram controladas utilizando-se amostras controle com resultados dos genótipos previamente conhecidos, que consistiam de diversas amostras que continham todos os alelos identificáveis.

Na técnica de RT-PCR, a contaminação com DNA genômico foi evitada pela utilização de oligonucleotídeos especialmente desenhados com base na sequência dos exons 2 (*APOE sense*) e 4 (*APOE anti-sense*) do gene *APOE*. Assim, a presença de DNA genômico seria evidenciada pela amplificação de um fragmento de maior tamanho, pois incluiria os introns 3 e 4. Também foi

utilizado um controle de reagentes em cada conjunto de reações. Esta análise constituiu-se de um tubo no qual foram adicionados todos os reagentes para a síntese de cDNA, exceto a enzima RT.

3.8. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados pelos programas SigmaStat para Windows, versão 2.03 (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, EUA), e SAS Sistem para Windows, versão 6.12 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA).

As variáveis com distribuição assimétrica, ou sem distribuição normal, foram transformadas em logaritmo ($\log_{10}$). Para análise da hipótese de igualdade de proporções entre grupos foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2) (Beiguelman, 1995).

Para comparar as variáveis numéricas medidas em um único tempo entre os grupos de tratamento foi utilizada a Análise de Variância Simples (*One-way ANOVA*), seguida de teste de comparação múltiplas de Tukey. Para as comparações das variáveis numéricas entre os dois grupos mais freqüentes de genótipos foi utilizado o teste *t* de *Student*.

Para comparar as medidas pré e pós-tratamentos, entre os grupos de tratamentos e entre os genótipos foi utilizada a Análise de Variância para medidas Repetidas (*Repeated Measures ANOVA*). Na comparação entre os grupos (inter-grupos) em cada tempo foi utilizado o teste de Tukey, e na comparação das medidas entre os tempos para cada grupo (intra-grupos) foi utilizado o teste de perfil por contraste (*Profile test*). Para analisar a relação entre duas variáveis numéricas foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (Rosner, 1986).

O nível de significância para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do IMC antes e após tratamento

O efeito do uso da terapia de reposição hormonal (TRH) associada ou não com atorvastatina sobre o IMC foi analisado nas mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa. Os resultados dos valores médios antes e após 12 semanas de cada tratamento e a variação percentual do IMC das pacientes são apresentados na tabela 4. A análise dos resultados demonstrou que os valores de IMC não foram alterados com o uso dos diferentes esquemas terapêuticos ($p>0,05$).

Tabela 4. Valores de IMC (Média $\pm$ DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após os diferentes esquemas terapêuticos.

Esquemas terapêuticos	Basal	Após tratamento	Variação (%)	p^a
Grupo A (17)	29,32 $\pm$ 5,43	29,46 $\pm$ 5,25	0,74 $\pm$ 6,23	0,688
Grupo E+A (18)	30,86 $\pm$ 5,91	30,42 $\pm$ 5,82	0,31 $\pm$ 19,37	0,763
Grupo E (19)	27,48 $\pm$ 3,24	27,36 $\pm$ 3,63	-0,38 $\pm$ 7,28	0,696
Grupo E+P (15)	31,31 $\pm$ 5,28	30,97 $\pm$ 5,17	-0,97 $\pm$ 3,40	0,263
Grupo E+P+A (18)	27,97 $\pm$ 3,53	27,89 $\pm$ 3,69	-0,32 $\pm$ 2,85	0,608

+/- indica aumento ou redução; ^aProfile test. Número de mulheres entre parênteses.

IMC= índice de massa corporal (kg/m^2).

Grupo A: atorvastatina; Grupo E+A: atorvastatina e estradiol; Grupo E: estradiol; Grupo E+P: estradiol e acetato de noretisterona; Grupo E+P+A: atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona.

4.2. Avaliação do perfil lipídico antes e após tratamento

O efeito do tratamento com TRH associado ou não a atorvastatina sobre o perfil lipídico foi analisado nas mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa. A medida da resposta terapêutica foi obtida pelo cálculo da

variação percentual média nos grupos, através da análise dos resultados dos valores médios dos parâmetros lipídicos antes e após o período de três meses de tratamento com estradiol isolado ou em associação com NETA ou atorvastatina.

Os resultados dos valores médios antes e após três meses de tratamento, e a variação percentual dos parâmetros lipídicos séricos das pacientes são apresentados nas tabelas 5 a 10.

Na tabela 5, são mostradas as concentrações dos parâmetros lipídicos antes e após o tratamento com atorvastatina (Grupo A). Nota-se que a atorvastatina reduziu significativamente ($p < 0,001$) os valores do CT (-29,4%), LDL-C (-41,2%), apo B-100 (-32,7%); TG (-12,3%) ($p = 0,034$) e VLDL-C (-12,3%) ($p = 0,034$). Não foi encontrada, neste grupo, variação estatisticamente significativa para os valores do HDL-C (+2,3%) ($p = 0,672$). Entretanto, as concentrações séricas da apo A-I foram significativamente reduzidas (-8,3%, $p = 0,016$) após o tratamento.

Tabela 5. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média $\pm$ DP) de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia) (Grupo A).

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Basal (17)	Após tratamento (17)	Variação (%)	p^a
CT	278,6 $\pm$ 31,9	195,5 $\pm$ 23,8	-29,4 $\pm$ 7,9	< 0,001
TG	180,1 $\pm$ 84,8	149,6 $\pm$ 70,5	-12,3 $\pm$ 28,9	0,034
HDL	56,8 $\pm$ 11,5	57,6 $\pm$ 11,8	+2,3 $\pm$ 13,1	0,672
LDL-C	185,6 $\pm$ 30,0	108,0 $\pm$ 20,3	-41,2 $\pm$ 10,8	< 0,001
VLDL-C	36,0 $\pm$ 17,0	29,9 $\pm$ 14,1	-12,3 $\pm$ 28,9	0,034
apo A-I	153,6 $\pm$ 25,6	139,2 $\pm$ 22,4	-8,3 $\pm$ 13,6	0,016
apo B-100	144,0 $\pm$ 18,0	96,2 $\pm$ 14,2	-32,7 $\pm$ 10,2	< 0,001

+/- indica aumento ou redução; ^aProfile test. Número de mulheres entre parênteses.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Os resultados relativos ao tratamento com atorvastatina e estradiol (Grupo E+A) são mostrados na tabela 6. Neste esquema terapêutico, foi encontrada redução média significativa ($p < 0,001$) para os valores do CT (-26,4%), LDL-C (-41,1%) e apo B-100 (-26,5%). Embora os valores de concentrações séricas do HDL-C (+11,0%) e apo A-I (+10,6%) tenham se elevado após este tratamento, as diferenças não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Também não foram encontradas variações estatisticamente significantes para os valores dos TG (+2,4%) e VLDL-C (+2,4%) ($p > 0,05$).

Tabela 6. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média $\pm$ DP) de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia) e estradiol (2 mg/dia) (Grupo E+A).

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Basal (18)	Após tratamento (18)	Variação (%)	p^a
CT	284,1 $\pm$ 38,8	206,1 $\pm$ 35,8	-26,4 $\pm$ 15,1	< 0,001
TG	192,6 $\pm$ 99,2	173,4 $\pm$ 69,3	+2,4 $\pm$ 42,1	0,574
HDL	56,7 $\pm$ 8,0	63,0 $\pm$ 16,1	+11,0 $\pm$ 20,5	0,053
LDL-C	189,2 $\pm$ 33,4	109,1 $\pm$ 30,1	-41,1 $\pm$ 18,2	< 0,001
VLDL-C	38,5 $\pm$ 19,8	34,7 $\pm$ 13,8	+2,4 $\pm$ 42,1	0,574
apo A-I	147,4 $\pm$ 22,1	160,9 $\pm$ 31,1	+10,6 $\pm$ 22,3	0,101
apo B-100	143,7 $\pm$ 24,9	104,9 $\pm$ 27,0	-26,5 $\pm$ 16,0	< 0,001

+/- indica aumento ou redução; ^aProfile test. Número de mulheres entre parênteses.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Na tabela 7, são mostradas as concentrações dos parâmetros lipídicos antes e após o tratamento com estradiol (Grupo E). Nota-se que, neste esquema terapêutico, foram também observadas reduções significativas ($p < 0,001$) para os valores do CT (-9,4%), LDL-C (-20,8%) e apo B-100 (-11,7%). Por outro lado, as concentrações séricas dos TG (+19,0%) e VLDL-C

(+19,0%) aumentaram, porém as diferenças encontradas não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$). Já os valores do HDL-C (+12,3%) e apo A-I (+11,3%) aumentaram significativamente ($p<0,01$) após o tratamento com estradiol.

Tabela 7. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média $\pm$ DP) de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após tratamento com estradiol (2 mg/dia) (Grupo E).

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Basal (19)	Após tratamento (19)	Variação (%)	p^a
CT	280,4 $\pm$ 45,0	251,6 $\pm$ 27,6	-9,4 $\pm$ 8,4	< 0,001
TG	184,1 $\pm$ 104,6	202,8 $\pm$ 93,5	+19,0 $\pm$ 36,0	0,053
HDL	56,4 $\pm$ 7,7	62,9 $\pm$ 8,9	+12,3 $\pm$ 12,6	< 0,001
LDL-C	187,8 $\pm$ 41,8	145,3 $\pm$ 22,7	-20,8 $\pm$ 13,3	< 0,001
VLDL-C	36,8 $\pm$ 20,9	40,5 $\pm$ 18,7	+19,0 $\pm$ 36,0	0,054
apo A-I	147,8 $\pm$ 18,6	162,7 $\pm$ 18,8	+11,3 $\pm$ 15,9	0,010
apo B-100	145,3 $\pm$ 22,4	126,6 $\pm$ 11,9	-11,7 $\pm$ 10,2	< 0,001

+/- indica aumento ou redução; ^aProfile test. Número de mulheres entre parênteses.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Na tabela 8, são mostradas as concentrações variações dos parâmetros lipídicos durante o tratamento com estradiol e NETA (Grupo E+P). Nota-se que, neste esquema terapêutico, também houve redução significativa para os valores do CT (-9,9%, $p=0,005$), LDL-C (-13,3%, $p=0,004$) e apo B-100 (-11,2%, $p=0,002$). Também foi constatada diminuição significativa no HDL-C sérico (-8,4%, $p=0,030$), sendo esta média. Percebe-se ainda que estes valores são acompanhados por redução concomitante dos valores da apo A-I (-4,9%), porém essa variação não foi significativa ($p=0,067$). Não foram observadas

variações significativas nas concentrações séricas dos TG (+17,5%) ($p=0,097$), e VLDL-C (+17,4%) ($p=0,099$), neste grupo.

Tabela 8. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média $\pm$ DP) de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após tratamento com estradiol (2 mg/dia) e acetato de noretisterona (1 mg/dia) (Grupo E+P).

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Basal (15)	Após tratamento (15)	Variação (%)	p^a
CT	254,3 $\pm$ 40,3	226,3 $\pm$ 26,7	-9,9 $\pm$ 12,3	0,005
TG	133,5 $\pm$ 41,7	151,1 $\pm$ 48,9	+17,5 $\pm$ 34,5	0,097
HDL	52,8 $\pm$ 13,5	47,1 $\pm$ 7,7	-8,4 $\pm$ 14,0	0,030
LDL-C	174,8 $\pm$ 35,5	148,9 $\pm$ 27,1	-13,3 $\pm$ 16,1	0,004
VLDL-C	26,7 $\pm$ 8,3	30,2 $\pm$ 9,8	+17,4 $\pm$ 34,6	0,099
apo A-I	136,7 $\pm$ 15,8	129,3 $\pm$ 14,9	-4,9 $\pm$ 10,3	0,067
apo B-100	132,7 $\pm$ 18,5	117,3 $\pm$ 18,2	-11,2 $\pm$ 11,7	0,002

+/- indica aumento ou redução; ^aProfile test. Número de mulheres entre parênteses.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Na tabela 9, são mostradas as concentrações dos parâmetros lipídicos antes e após o uso da combinação terapêutica de atorvastatina, estradiol e NETA (Grupo E+P+A). Foram encontradas reduções significativas ($p<0,001$) para os valores do CT (-33,5%), LDL-C (-45,8%) e apo B-100 (-35,8%). Também neste grupo, foram encontradas reduções nas concentrações dos TG (-9,5%) e VLDL-C (-9,5%); contudo, em relação aos valores basais, essas variações pós-tratamento, não foram significativas ($p>0,05$). Os valores do HDL-C (-4,3%) e apo A-I (-2,7%) também se reduziram após o tratamento, porém sem significância estatística ($p>0,05$).

Tabela 9. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos (Média $\pm$ DP) de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia), estradiol (2 mg/dia) e acetato de noretisterona (1 mg/dia) (Grupo E+P+A).

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Basal (18)	Após tratamento (18)	Variação (%)	p^a
CT	300,4 $\pm$ 54,8	200,1 $\pm$ 58,8	-33,5 $\pm$ 13,7	< 0,001
TG	181,0 $\pm$ 79,9	162,0 $\pm$ 131,9	-9,5 $\pm$ 37,9	0,089
HDL	59,9 $\pm$ 15,8	55,5 $\pm$ 10,8	-4,3 $\pm$ 20,3	0,173
LDL-C	203,9 $\pm$ 52,2	112,2 $\pm$ 51,9	-45,8 $\pm$ 15,2	< 0,001
VLDL-C	36,2 $\pm$ 15,9	32,4 $\pm$ 26,4	-9,5 $\pm$ 37,9	0,089
apo A-I	157,3 $\pm$ 35,7	147,7 $\pm$ 26,8	-2,7 $\pm$ 24,0	0,344
apo B-100	154,9 $\pm$ 30,9	99,3 $\pm$ 25,0	-35,8 $\pm$ 9,6	< 0,001

+/- indica aumento ou redução; ^aProfile test. Número de mulheres entre parênteses.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Na tabela 10, são mostrados os valores das variações percentuais médias dos parâmetros lipídicos nas mulheres estudadas, após os diferentes esquemas terapêuticos avaliados. Observam-se diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) dessas variações entre os diferentes esquemas terapêuticos, sendo que as pacientes tratadas com a terapia combinada de atorvastatina, estradiol e NETA (Grupo E+P+A) apresentaram reduções mais acentuadas dos valores séricos do CT (-33,5%), LDL-C (-45,8%) e apo B-100 (-35,8%). Por outro lado, as menores reduções do CT, LDL-C e apo B-100 foram observadas nos Grupos E (estradiol) e E+P (combinação de estradiol e NETA). Além disso, nesses dois grupos, os valores dos TG e VLDL-C aumentaram após o tratamento.

Nas mulheres tratadas apenas com estradiol (Grupo E), foram constatados os maiores aumentos médios nas concentrações séricas do HDL-C (+12,3%) e apo A-I (+11,3%). Entretanto, observou-se redução nas concentrações séricas do HDL-C (-8,4% e -4,3%) e apo A-I (-4,9% e -2,7%), valores respectivamente

encontrados para os Grupos E+P e E+P+A. Enquanto que, houve a redução da apo A-I (-8,3%) e não do HDL-C (+2,3%), observada nas mulheres que fizeram apenas uso da atorvastatina (Grupo A).

Tabela 10. Variação (%) do perfil lipídico (Média $\pm$ DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, após tratamento com os vários esquemas terapêuticos.

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Grupo A (17)	Grupo E+A (18)	Grupo E (19)	Grupo E+P (15)	Grupo E+P+A (18)	p^a
CT	-29,4 $\pm$ 7,9	-26,4 $\pm$ 15,1	-9,4 $\pm$ 8,4	-9,9 $\pm$ 12,3	-33,5 $\pm$ 13,7	<0,001
TG	-12,3 $\pm$ 28,9	+2,4 $\pm$ 42,1	+19,0 $\pm$ 36,0	+17,5 $\pm$ 34,5	-9,5 $\pm$ 37,9	0,014
HDL	+2,3 $\pm$ 13,1	+11,0 $\pm$ 20,5	+12,3 $\pm$ 12,6	-8,4 $\pm$ 14,0	-4,3 $\pm$ 20,3	<0,001
LDL-C	-41,2 $\pm$ 10,8	-41,1 $\pm$ 18,2	-20,8 $\pm$ 13,3	-13,3 $\pm$ 16,1	-45,8 $\pm$ 15,2	<0,001
VLDL-C	-12,3 $\pm$ 28,9	+2,4 $\pm$ 42,1	+19,0 $\pm$ 36,0	+17,4 $\pm$ 34,6	-9,5 $\pm$ 37,9	0,014
apo A-I	-8,3 $\pm$ 13,6	+10,6 $\pm$ 22,3	+11,3 $\pm$ 15,9	-4,9 $\pm$ 10,3	-2,7 $\pm$ 24,0	0,002
apo B-100	-32,7 $\pm$ 10,2	-26,5 $\pm$ 16,0	-11,7 $\pm$ 10,2	-11,2 $\pm$ 11,7	-35,8 $\pm$ 9,6	<0,001

+/- indica aumento ou redução; ^aTeste ANOVA. Número de mulheres entre parênteses.

Grupo A: atorvastatina; Grupo E+A: atorvastatina e estradiol; Grupo E: estradiol; Grupo E+P: estradiol e acetato de noretisterona; Grupo E+P+A: atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

4.3. Avaliação do polimorfismo do gene *APOE*

Os resultados da frequência dos diferentes genótipos (E2/E3, E3/E3, E3/E4 e E4/E4) do gene *APOE* e da distribuição dos alelos das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa são apresentados na tabela 11.

Na tabela 12, são apresentados os valores do perfil lipídico sérico basal entre as portadoras dos genótipos E2/E3, E3/E3 e E3/E4. Devido a sua baixa frequência, a única portadora do genótipo E4/E4 foi excluída dos cálculos para a análise dos resultados. Observa-se que as maiores médias das

concentrações do CT, LDL-C e apo B-100 foram encontradas nas portadoras do genótipo E3/E4, e que as maiores médias das concentrações séricas dos TG, VLDL-C e apo A-I são encontradas nas portadoras do genótipo E3/E3. Entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$).

Esses resultados são sugestivos de que o polimorfismo *HhaI* do gene *APOE* não está associado a variações no perfil lipídico basal no grupo de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa.

Tabela 11. Distribuição dos genótipos e freqüência relativa de alelos do gene *APOE* nas mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa.

Grupo de	Distribuição de Genótipos				Freqüência de Alelos		
	E2/E3	E3/E3	E3/E4	E4/E4	ε2	ε3	ε4
Estudo	6,9%	58,6%	33,3%	1,2%			
(87)	(6)	(51)	(29)	(1)	0,034	0,788	0,178

Número de mulheres entre parêntesis.

Tabela 12. Concentrações séricas dos parâmetros lipídicos basais (Média ± DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, de acordo com os genótipos *APOE*.

Parâmetros	E2/E3	E3/E3	E3/E4	p^a
lipídicos (mg/dL)	(6)	(51)	(29)	
CT	263,0 ± 34,5	279,8 ± 40,2	286,9 ± 52,8	0,508
TG	137,5 ± 56,5	193,5 ± 98,1	155,1 ± 61,6	0,099
HDL	54,7 ± 11,2	56,2 ± 11,5	57,6 ± 12,2	0,829
LDL-C	180,8 ± 30,0	185,0 ± 34,0	198,3 ± 49,5	0,395
VLDL-C	27,5 ± 11,3	38,7 ± 19,6	31,0 ± 12,3	0,099
apo A-I	135,3 ± 12,3	152,7 ± 26,5	144,6 ± 23,6	0,168
apo B-100	135,4 ± 22,6	143,8 ± 23,2	148,4 ± 26,2	0,476

Média ± DP. ^a Teste ANOVA. Número de mulheres encontram-se entre parêntesis.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Os resultados referentes aos efeitos do polimorfismo do gene *APOE* sobre a resposta aos diferentes esquemas terapêuticos (variação percentual na concentração dos lipídios séricos) são apresentados nas tabelas 13 a 17. Devido ao número reduzido de casos em cada grupo de tratamento, as pacientes portadoras do genótipo E2/E3 foram excluídas das análises.

No grupo de mulheres tratadas com atorvastatina (Tabela 13) e com os esquemas terapêuticos E, E+P e E+P+A (Tabelas 15, 16 e 17), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) nas variações dos parâmetros lipídicos após o tratamento, entre as portadoras de genótipo E3/E3 e E3/E4.

No grupo tratado com atorvastatina e estradiol (Grupo E+A), verificou-se que as pacientes portadoras do genótipo E3/E4 tiveram aumento discreto ($p = 0,055$) nas concentrações séricas dos TG e VLDL-C, em relação ao genótipo E3/E3 (Tabela 14).

Tabela 13. Variação (%) nas concentrações dos lipídeos séricos (Média $\pm$ DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia), de acordo com os genótipos *APOE*.

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Genótipos		p^a
	E3/E3 (10)	E3/E4 (7)	
CT	-29,75 $\pm$ 4,83	-28,98 $\pm$ 11,58	0,972
TG	-12,49 $\pm$ 35,20	-12,07 $\pm$ 19,31	0,799
HDL-C	5,96 $\pm$ 11,53	-3,01 $\pm$ 14,35	0,170
LDL-C	-42,06 $\pm$ 5,09	-40,01 $\pm$ 16,43	0,914
VLDL-C	-12,49 $\pm$ 35,20	-12,07 $\pm$ 19,31	0,799
apo A-I	-4,93 $\pm$ 14,53	-13,05 $\pm$ 11,36	0,252
apo B-100	-32,83 $\pm$ 6,27	-32,44 $\pm$ 14,71	0,902

+/- indica aumento ou redução; ^a Teste *t* de *Student*. Número de mulheres entre parênteses. CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Tabela 14. Variação (%) nas concentrações dos lipídeos séricos (Média ± DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia) e estradiol (2 mg/dia), de acordo com os genótipos *APOE*.

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Genótipos		<i>p</i> ^a
	E3/E3 (11)	E3/E4 (6)	
CT	-30,97 ± 12,99	-16,75 ± 16,27	0,089
TG	-9,98 ± 49,49	23,38 ± 15,85	0,055
HDL-C	9,28 ± 15,37	11,19 ± 29,79	0,996
LDL-C	-44,58 ± 16,45	-32,57 ± 20,72	0,215
VLDL-C	-9,98 ± 49,49	23,38 ± 15,85	0,055
apo A-I	2,54 ± 17,58	17,07 ± 19,87	0,147
apo B-100	-29,22 ± 15,68	-20,68 ± 17,59	0,341

+/- indica aumento ou redução; ^a Teste *t* de *Student*. Número de mulheres entre parênteses.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Tabela 15. Variação (%) nas concentrações dos lipídeos séricos (Média ± DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, após tratamento com estradiol (2 mg/dia), de acordo com os genótipos *APOE*.

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Genótipos		<i>p</i> ^a
	E3/E3 (11)	E3/E4 (5)	
CT	-6,94 ± 8,64	-14,01 ± 9,30	0,163
TG	10,01 ± 17,48	45,12 ± 57,22	0,149
HDL-C	10,81 ± 14,82	14,48 ± 6,55	0,534
LDL-C	-16,69 ± 14,88	-27,13 ± 10,98	0,199
VLDL-C	9,94 ± 17,38	45,12 ± 57,22	0,148
apo A-I	6,49 ± 17,32	21,74 ± 13,46	0,103
apo B-100	-8,57 ± 10,70	-17,14 ± 7,20	0,128

+/- indica aumento ou redução; ^a Teste *t* de *Student*. Número de mulheres entre parênteses.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Tabela 16. Variação (%) nas concentrações dos lipídeos séricos (Média $\pm$ DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, após tratamento com estradiol (2 mg/dia) e acetato de noretisterona (1 mg/dia), de acordo com os genótipos *APOE*.

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Genótipos		<i>p</i> ^a
	E3/E3 (8)	E3/E4 (5)	
CT	-6,07 $\pm$ 14,44	-14,90 $\pm$ 9,81	0,264
TG	19,00 $\pm$ 25,67	14,02 $\pm$ 54,70	0,563
HDL-C	-3,98 $\pm$ 9,64	-14,79 $\pm$ 18,74	0,155
LDL-C	-9,87 $\pm$ 18,98	-16,23 $\pm$ 14,90	0,567
VLDL-C	18,84 $\pm$ 25,82	14,02 $\pm$ 54,70	0,570
apo A-I	-5,97 $\pm$ 12,91	-2,23 $\pm$ 7,29	0,520
apo B-100	-9,95 $\pm$ 11,56	-11,79 $\pm$ 15,16	0,761

+/- indica aumento ou redução; ^aTeste *t* de *Student*. Número de mulheres entre parênteses.
 CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL;
 VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Tabela 17. Variação (%) nas concentrações dos lipídeos séricos (Média $\pm$ DP) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, após tratamento com atorvastatina (10 mg/dia), estradiol (2 mg/dia) e acetato de noretisterona (1 mg/dia), de acordo com os genótipos *APOE*.

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Genótipos		p^a
	E3/E3 (11)	E3/E4 (6)	
CT	-32,77 $\pm$ 16,26	-35,88 $\pm$ 9,57	0,794
TG	-6,98 $\pm$ 43,24	-15,93 $\pm$ 32,46	0,750
HDL-C	-9,60 $\pm$ 11,14	5,45 $\pm$ 31,19	0,190
LDL-C	-45,80 $\pm$ 17,32	-46,85 $\pm$ 13,43	0,977
VLDL-C	-6,98 $\pm$ 43,24	-15,93 $\pm$ 32,46	0,750
apo A-I	-9,15 $\pm$ 19,29	7,53 $\pm$ 31,30	0,221
apo B-100	-36,59 $\pm$ 11,72	-35,56 $\pm$ 5,17	0,720

+/- indica aumento ou redução; ^a Teste *t* de *Student*. Número de mulheres entre parênteses.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

4.4. Avaliação da expressão do RNAm do gene *APOE*

Na tabela 18, são apresentados os valores das taxas de expressão basal média de RNAm em células mononucleares periféricas das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa. Verificou-se que as médias dos valores de expressão do RNAm não diferiram estatisticamente entre os diferentes genótipos analisados ($p > 0,05$). Devido a sua baixa frequência, a única portadora do genótipo E4/E4 foi excluída das análises dos resultados apresentados na tabela 18.

Os valores médios de expressão do RNAm do gene *APOE*, antes e após cada tratamento com TRH associada ou não com a atorvastatina, são apresentados na tabela 19. Pode ser observada redução significativa da expressão do RNAm após o tratamento no Grupo A ($p = 0,049$) e Grupo E+A

($p=0,049$). Não foram encontrados efeitos significativos dos outros esquemas terapêuticos sobre a expressão do gene *APOE*.

Quando as mulheres do estudo foram agrupadas de acordo com os genótipos *APOE*, observou-se que as portadoras do genótipo E3/E3 apresentaram redução significativa ($p=0,025$) na expressão do RNAm após o tratamento com atorvastatina e estradiol (Grupo E+A) (tabela 20). Por outro lado, no grupo das mulheres portadoras do genótipo E3/E4, não foi observada diferença na expressão do gene *APOE* após os tratamentos (Tabela 21).

Quando se analisaram os resultados de variação da expressão do RNAm do gene *APOE*, verificou-se que as portadoras do genótipo E3/E3 tiveram variações similares as das portadoras do genótipo E3/E4 ($p>0,05$) para cada esquema terapêutico utilizado (Tabela 22).

Tabela 18. Valores de expressão basal do RNAm do gene *APOE* (Média $\pm$ DP) em células mononucleares periféricas das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, de acordo com os genótipos *APOE*.

Genótipos	E2/E3 (6)	E3/E3 (51)	E3/E4 (29)	p^a
Expressão basal	0,71 $\pm$ 0,48	0,95 $\pm$ 0,56	0,88 $\pm$ 0,43	0,317

Número de mulheres entre parênteses; ^aTeste ANOVA.

Tabela 19. Valores de expressão do RNAm do gene *APOE* (Média $\pm$ DP) em células mononucleares periféricas das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após os diferentes esquemas terapêuticos.

Esquemas terapêuticos	Basal	Após tratamento	Variação	p^a
Grupo A (17)	0,96 $\pm$ 0,49	0,68 $\pm$ 0,20	-0,28 $\pm$ 0,54	0,049
Grupo E+A (18)	0,88 $\pm$ 0,25	0,76 $\pm$ 0,27	-0,12 $\pm$ 0,32	0,049
Grupo E (19)	0,81 $\pm$ 0,46	0,75 $\pm$ 0,15	-0,06 $\pm$ 0,47	0,765
Grupo E+P (15)	1,19 $\pm$ 0,90	0,72 $\pm$ 0,24	-0,47 $\pm$ 0,82	0,091
Grupo E+P+A (18)	0,71 $\pm$ 0,15	0,70 $\pm$ 0,21	-0,01 $\pm$ 0,15	0,429

+/- indica aumento ou redução; ^aProfile test. Número de mulheres entre parênteses.

Grupo A: atorvastatina; Grupo E+A: atorvastatina e estradiol; Grupo E: estradiol; Grupo E+P: estradiol e acetato de noretisterona; Grupo E+P+A: atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona.

Tabela 20. Análise da expressão do RNAm do gene *APOE* (Média $\pm$ DP) em células mononucleares periféricas das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa portadoras do genótipo E3/E3, antes e após os diferentes esquemas terapêuticos.

Esquemas terapêuticos	Basal	Após tratamento	Variação	p^a
Grupo A (10)	0,86 $\pm$ 0,39	0,70 $\pm$ 0,19	-0,16 $\pm$ 0,41	0,410
Grupo E+A (11)	0,97 $\pm$ 0,28	0,78 $\pm$ 0,12	-0,19 $\pm$ 0,26	0,025
Grupo E (11)	0,78 $\pm$ 0,47	0,76 $\pm$ 0,14	-0,02 $\pm$ 0,49	0,594
Grupo E+P (8)	1,54 $\pm$ 1,01	0,75 $\pm$ 0,27	-0,80 $\pm$ 0,95	0,072
Grupo E+P+A (11)	0,73 $\pm$ 0,17	0,74 $\pm$ 0,25	0,01 $\pm$ 0,17	0,891

+/- indica aumento ou redução; ^aProfile test. Número de mulheres entre parênteses.

Grupo A: atorvastatina; Grupo E+A: atorvastatina e estradiol; Grupo E: estradiol; Grupo E+P: estradiol e acetato de noretisterona; Grupo E+P+A: atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona.

Tabela 21. Análise da expressão do RNAm do gene *APOE* (Média $\pm$ DP) em células mononucleares periféricas das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa portadoras do genótipo E3/E4, antes e após os diferentes esquemas terapêuticos.

Esquemas terapêuticos	Basal	Após tratamento	Variação	p^a
Grupo A (7)	1,10 $\pm$ 0,61	0,65 $\pm$ 0,22	-0,45 $\pm$ 0,67	0,065
Grupo E+A (6)	0,74 $\pm$ 0,14	0,744 $\pm$ 0,46	0,004 $\pm$ 0,42	0,644
Grupo E (5)	0,91 $\pm$ 0,32	0,80 $\pm$ 0,18	-0,11 $\pm$ 0,29	0,584
Grupo E+P (5)	0,87 $\pm$ 0,69	0,74 $\pm$ 0,23	-0,13 $\pm$ 0,53	0,941
Grupo E+P+A (6)	0,73 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,12	-0,07 $\pm$ 0,09	0,097

+/- indica aumento ou redução; ^a*Profile test*. Número de mulheres entre parênteses.

Grupo A: atorvastatina; Grupo E+A: atorvastatina e estradiol; Grupo E: estradiol; Grupo E+P: estradiol e acetato de noretisterona; Grupo E+P+A: atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona.

Tabela 22. Análise das variações dos valores de expressão do RNAm do gene *APOE* (Média $\pm$ DP), em células mononucleares periféricas das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa portadoras dos genótipos E3/E3 e E3/E4, após tratamento, de acordo com os diferentes grupos de esquemas terapêuticos.

Esquemas terapêuticos	Genótipos		p^a
	E3/E3 (51)	E3/E4 (29)	
Grupo A	-0,16 $\pm$ 0,41 (10)	-0,45 $\pm$ 0,67 (7)	0,294
Grupo E+A	-0,19 $\pm$ 0,26 (11)	0,004 $\pm$ 0,42 (6)	0,643
Grupo E	-0,02 $\pm$ 0,49 (11)	-0,11 $\pm$ 0,29 (5)	0,491
Grupo E+P	-0,80 $\pm$ 0,95 (8)	-0,13 $\pm$ 0,53 (5)	0,172
Grupo E+P+A	0,01 $\pm$ 0,17 (11)	-0,07 $\pm$ 0,09 (6)	0,233

+/- indica aumento ou redução; ^aTeste *t* de *Student*. Número de mulheres entre parênteses.

Grupo A: atorvastatina; Grupo E+A: atorvastatina e estradiol; Grupo E: estradiol; Grupo E+P: estradiol e acetato de noretisterona; Grupo E+P+A: atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona.

4.5. Estudos de correlação

Foram realizados estudos de correlação entre as taxas de expressão do RNAm do gene *APOE* e os valores dos parâmetros lipídicos séricos.

Na tabela 23, são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson (*r*) entre a taxa de expressão do RNAm do gene *APOE* e os valores dos parâmetros lipídicos no período basal. Não houve correlação significativa ($p > 0,05$) entre as variáveis analisadas no grupo total ($n=87$) das mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa.

Os coeficientes de correlação entre as variações percentuais da taxa de expressão do RNAm do gene *APOE* e as variações percentuais das concentrações séricas dos lipídeos para cada esquema terapêutico

separadamente são apresentados na tabela 24. Nas pacientes tratadas com estradiol (Grupo E) houve correlação positiva entre a variação percentual da taxa de expressão do RNAm do gene *APOE* e a variação percentual da concentração sérica do CT ($r=0,47571$ e $p=0,0395$), e do LDL-C ($r=0,62470$ e $p=0,0042$), apresentados respectivamente nas figuras 8 e 9.

Tabela 23. Coeficientes de correlação entre as taxas de expressão do RNAm do gene *APOE* e os parâmetros lipídicos basais em mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa.

Parâmetros lipídicos basais (mg/dL)	Expressão basal RNAm <i>APOE</i> (87)	
	<i>r</i>	<i>p</i>
CT	0,06721	0,5362
TG	-0,16980	0,1159
HDL-C	-0,04100	0,7062
LDL-C	0,15921	0,1408
VLDL-C	-0,16980	0,1159
apo A-I	0,02761	0,7996
apo B-100	0,05160	0,6350

Número de mulheres entre parênteses. *r* = coeficiente de correlação de *Pearson*.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Tabela 24. Coeficientes de correlação entre as variações (%) da expressão do RNAm do gene *APOE* e dos parâmetros lipídicos em mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa tratadas com diferentes esquemas terapêuticos.

Parâmetros lipídicos (% de variação)		Expressão basal RNAm <i>APOE</i> (% de variação)				
		Grupo A (17)	Grupo E+ A (18)	Grupo E (19)	Grupo E+P (15)	Grupo E+P+A (18)
CT	r=	-0,09443	0,12707	0,47571	-0,41461	0,22946
	p=	0,7185	0,6154	0,0395	0,1244	0,3597
TG	r=	-0,21858	-0,23493	0,07690	0,10569	0,26802
	p=	0,3993	0,3480	0,7544	0,7077	0,2822
HDL-C	r=	-0,01611	-0,01899	-0,41254	-0,27662	-0,06135
	p=	0,9511	0,9404	0,0792	0,3183	0,8089
LDL-C	r=	0,01008	0,16461	0,62470	-0,46689	0,11757
	p=	0,9694	0,5140	0,0042	0,0793	0,6422
VLDL-C	r=	-0,21858	-0,23493	0,07734	0,10300	0,26802
	p=	0,3993	0,3480	0,7530	0,7149	0,2822
apo A-I	r=	0,23178	-0,33150	0,17655	0,46929	0,17753
	p=	0,3707	0,1790	0,4697	0,0776	0,4810
apo B-100	r=	-0,11513	0,05815	0,22009	-0,31870	-0,11584
	p=	0,6599	0,8187	0,3653	0,2470	0,6472

Número de mulheres entre parênteses. *r* = coeficiente de correlação de *Pearson*.

CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-I; apo B-100: apolipoproteína B-100.

Grupo A: atorvastatina; Grupo E+A: atorvastatina e estradiol; Grupo E: estradiol; Grupo E+P: estradiol e acetato de noretisterona; Grupo E+P+A: atorvastatina, estradiol e acetato de noretisterona.

Figura 8: Representação gráfica da correlação dos valores da variação (%) entre as taxas de expressão do RNAm do gene *APOE* e a concentração sérica do colesterol total, no grupo de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa tratadas com estradiol (n=19).

Figura 9: Representação gráfica da correlação dos valores da variação (%) entre as taxas de expressão do RNAm do gene *APOE* e a concentração sérica do LDL colesterol, no grupo de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa tratadas com estradiol (n=19).

5. DISCUSSÃO

5.1. Tratamentos e lipídeos plasmáticos

No presente estudo, verificou-se que a TRH resultou em redução significativa das concentrações séricas do colesterol total, LDL-C e apo B. A redução das concentrações do colesterol total, LDL-C e apo B no plasma provavelmente deveu-se ao aumento da expressão dos receptores de LDL hepáticos induzido pelo estrógeno (Christiansen, 1997; Godsland, 2001) e por progestinas (Lobo, 1991; Tikkanen, 1996; Ödmark *et al.*, 2004).

Quanto ao HDL-C sérico, houve aumento após o tratamento com estradiol (Grupo E) e diminuição após o tratamento com estradiol e acetato de noretisterona (Grupo E+P). Resultados similares foram observados por Dorangeon *et al.*, (1992) e Walsh *et al.* (1993). Por outro lado, a combinação de 17-beta-estradiol e NETA causou a diminuição do HDL-C em mulheres em pós-menopausa (Munk-Jensen *et al.*, 1994; Ylikorkala *et al.*, 2000).

A elevação de HDL-C provavelmente resulta do aumento da síntese de apo A-I combinada a da diminuição da atividade da lipase hepática induzidos pelos estrógenos (Paganini-Hill *et al.*, 1996). Por outro lado, a progestina estimula a atividade da LH e aumenta o catabolismo das HDL (Rosano e Panina, 1999).

Em nosso estudo, o tratamento com estradiol não modificou significativamente as concentrações séricas de triglicerídeos e VLDL-C, mesmo quando associado com a progestina. Por outro lado, outros estudos relataram aumento nas concentrações séricas de triglicerídeos de 24% a 67% (Miller *et al.*, 1991; Lobo *et al.*, 1994; Farish *et al.*, 1996; Landenpara *et al.*, 1996; Rosenson *et al.*, 1998). O aumento de triglicerídeos plasmáticos se deve ao estímulo da secreção hepática de VLDL por estrógenos (Writing Group for the PEPI Trial, 1995; Christiansen, 1997; Shiraki *et al.*, 1997).

No nosso estudo, foi observado que as mulheres que fizeram uso da atorvastatina associada ou não a TRH, apresentaram as maiores reduções nas concentrações séricas de colesterol total, LDL-C e apo B-100 quando

comparadas as que receberam somente a TRH. As pacientes que fizeram uso de atorvastatina combinada com estradiol e NETA (Grupo E+P+A) apresentaram as maiores médias de redução para os valores de CT, LDL-C, apo B-100, TG e VLDL-C. A atorvastatina isolada ou combinada com TRH não modificou as concentrações séricas de HDL-C.

Os estrógenos parecem atuar em sinergismo com os inibidores da HMG-CoA redutase como indutores da expressão de LDL (Christiansen, 1997). Esse efeito pode ser observado no nosso estudo, pela significativa redução de LDL-C sérico obtida entre as pacientes tratadas com atorvastatina em combinação com estradiol (Grupo E+A) e estradiol mais NETA (Grupo E+P+A).

Embora se observem melhores resultados na redução da colesterolemia com o uso de uma vastatina em combinação com TRH, é consenso atual que deve ser empregada a menor dose possível de hormônios, pelo espaço de tempo mais breve possível, durante o período em que ainda estiverem ocorrendo os sintomas da transição para a fase da menopausa (Hulley e Grady, 2004).

Os resultados deste trabalho e as evidências encontradas em diversos estudos reforçam a idéia de que a escolha do esquema de TRH a ser utilizado para cada mulher deverá ser efetuada de forma individualizada, de modo a considerar os riscos e benefícios para cada paciente. Como exemplo disso, nas mulheres que apresentam hipertrigliceridemia, a reposição estrogênica oral deve ser feita com cautela, pois pode desencadear elevação importante dos triglicerídeos, às vezes para concentrações superiores a 1000 mg/dL, aumentando o risco do aparecimento de crises de pancreatite aguda (Schoen e Cotran, 1996).

5.2. Polimorfismo do gene *APOE*

As freqüências dos alelos do gene *APOE* nas mulheres do nosso estudo foram semelhantes às descritas previamente em indivíduos hiperlipidêmicos da população brasileira (ϵ 2: 0,08; ϵ 3: 0,81; ϵ 4: 0,11) (Otta *et al.*, 1996, Salazar *et*

et al., 2000b), e em outras populações caucasóides (ϵ_2 : 0,08; ϵ_3 : 0,78; ϵ_4 : 0,14) (De Knijff *et al.*, 1994; Mahley e Rall, 1995; Siest *et al.*, 1995; Lahoz *et al.*, 1996; Gerdes *et al.*, 1996).

Nas mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa deste trabalho, o polimorfismo do gene *APOE* não foi associado com variações nas concentrações basais dos parâmetros do perfil lipídico (Tabela 12). Esses resultados encontram-se em concordância com dados do estudo realizado com mulheres finlandesas em pós-menopausa histerectomizadas (Karjalainen *et al.*, 2000a).

A falta de associação entre os genótipos *APOE* e as concentrações séricas dos parâmetros do perfil lipídico basal também foi observada em mulheres japonesas em pós-menopausa (Somekawa e Wakabayashi, 1998). E variações nas concentrações basais apenas dos TG, HDL-C e apo A-I também não foram associadas com o polimorfismo *APOE* em outro estudo com mulheres japonesas em pós-menopausa (Tsuda *et al.*, 2001).

Em outros estudos, o genótipo E3/E4 foi associado com maiores valores séricos de colesterol total, LDL-C e apo B-100 em mulheres espanholas em pós-menopausa (Tolosa *et al.*, 2001) ou finlandesas (Heikkinen *et al.*, 1999). Além disso, foi verificado que o alelo ϵ_4 parece estar associado ao início precoce da menopausa em mulheres iranianas (Koochmeshgi *et al.*, 2004).

O efeito do polimorfismo do gene *APOE* sobre as concentrações basais de colesterol total, LDL-C e apo B verificado em mulheres caucasóides que se encontravam em idade fértil (Larson *et al.*, 2000; Pallaud *et al.*, 2001; Frikke-Schmidt *et al.*, 2000) nem sempre é observado em mulheres em pós-menopausa. Portanto, é possível que a hipercolesterolemia induzida pela redução de estrógenos no período de pós-menopausa exerça um efeito maior que o atribuído ao polimorfismo do gene *APOE*.

Neste estudo, o polimorfismo do gene *APOE* não foi associado com variações no perfil lipídico sérico após o tratamento com TRH. Resultados

similares foram observados em outro estudo (Karjalainen *et al.*, 2000b), porém os efeitos do polimorfismo *APOE* sobre a resposta a TRH tem sido variáveis.

Karjalainen e colaboradores estudaram 79 mulheres finlandesas em pós-menopausa tratadas com terapia de reposição com estrógenos por seis meses e verificaram redução no LDL-C plasmático foi associada com variações na concentração de estrógeno sérico, mas não foi modificada pelo polimorfismo *APOE* (Karjalainen *et al.*, 2000b).

Em mulheres japonesas, não foram observadas diferenças nos triglicerídeos séricos entre as portadoras dos diferentes genótipos *APOE* após tratamento por seis meses com a combinação de CEE (0,625 mg/dia) e MPA (2,5 mg/dia). Contudo, as portadoras do alelo $\epsilon 2$ (genótipos E2/E2 e E2/E3), apresentaram os menores valores nas concentrações de colesterol total, LDL-C, apo B e apo E plasmáticas (Somekawa e Wakabayashi, 1998).

Também em outro estudo com mulheres japonesas, em que foram tratadas por doze meses com TRH (CEE, 0,625 mg/dia e MPA, 2,5 mg/dia), não foram observadas diferenças significantes nas concentrações séricas pós-tratamento de colesterol total, LDL-C e triglicerídeos entre as portadoras dos genótipos E3/E4 e E4/E4. Entretanto, foram observados decréscimos significantes de colesterol total e LDL-C séricos nas portadoras dos genótipos E2/E2, E2/E3 e E3/E3 (Tsuda *et al.*, 2001).

Tolosa e colaboradores verificaram que mulheres espanholas em pós-menopausa portadoras do genótipo E2/E3 apresentavam maiores concentrações séricas de triglicerídeos, três meses após tratamento com estrógenos, em comparação com as portadoras dos genótipos E3/E3 e E3/E4 (Tolosa *et al.*, 2001).

No presente trabalho, nas mulheres em pós-menopausa tratadas com atorvastatina combinada ou não com TRH não foram observadas diferenças de resposta terapêutica entre os genótipos E3/E3 e E3/E4, com exceção de uma discreta diferença na variação dos triglicerídeos e VLDL-C após o tratamento com atorvastatina associada com estradiol. Enquanto que houve redução de

36,6% desses lipídeos nas mulheres portadoras de E3/E3, as portadoras do genótipo E3/E4 tiveram aumento de 17,9% (Tabela 14).

A associação entre o genótipo E3/E4 e o aumento nas concentrações séricas de triglicerídeos e VLDL-C, após o tratamento com atorvastatina e estradiol (Grupo E+A), foi observado anteriormente em um grupo menor de pacientes tratadas com o mesmo esquema terapêutico (Issa *et al.*, 2003a; Issa *et al.*, 2003b).

O provável mecanismo pelo qual as isoformas de apo E modulam a resposta às vastatinas está relacionado com as diferenças de afinidade das isoformas pelos seus receptores hepáticos. Como visto anteriormente, as lipoproteínas que contêm apo E4 são captadas mais eficientemente pelo fígado que aquelas que contêm apo E3 e apo E2. Portanto, os portadores de apo E4 tem maior concentração intra-hepática de colesterol e, consequentemente menor atividade da enzima HMG-CoA redutase intracelular. Em contraposição, os portadores de apo E2 tem maior atividade de HMG-CoA redutase intracelular. Assim, a atividade basal de HMG-CoA redutase é menor nos portadores de apo E4 que nos portadores de apo E2. Consequentemente, as vastatinas tem menor efeito sobre a HMG-CoA redutase nos portadores de apo E4, e maior nos portadores de apo E2 (Siest *et al.*, 2003).

É conhecido que a presença do alelo $\epsilon 4$ é um importante fator de risco para o desenvolvimento de DAC (Leon *et al.*, 2004), tanto pela influência que exerce sobre o perfil lipídico basal (Davignon *et al.*, 1988; Stengard *et al.*, 1995; Siest *et al.*, 1995; Stengard *et al.*, 1996), como pelo pior prognóstico na resposta a terapia hipolipemiante com atorvastatina observado em homens (Pedro-Botet *et al.*, 2001), em mulheres japonesas em pós-menopausa tratadas com TRH combinada, de CEE com MPA (Tsuda *et al.*, 2001), e em finlandesas tratadas com valerato de estradiol e acetato de ciproterona (Heikkinen *et al.*, 1999).

Além disso, é possível que a expressão aumentada de receptores de LDL, induzida pelo estradiol, esteja deficiente nas mulheres em pós-menopausa portadoras de apo E4 (Lehtimäki *et al.*, 2002).

A apo E inibe a lipólise mediada pela LPL de triglicerídeos das LRT e esta ação é dependente do conteúdo dos resíduos de arginina na apo E. Considerando que a apo E4 tem maior teor de arginina (Arg nos códons 112 e 158) que a apo E3 (Cis no códon 112, Arg no códon 158) e a apo E2 (Cis nos códons 112 e 158), é de se esperar que os portadores de apo E4 apresentem maior inibição da LPL e consequentemente maior concentração de LRT e de triglicerídeos no plasma (Rensen e van Berkel, 1996).

Com bases nessas considerações, a presença de apo E4 parece contribuir para o desenvolvimento de hipertrigliceridemia moderada, um fator de risco independente de DAC, durante a TRH associada com atorvastatina nas mulheres em pós-menopausa.

5.3. Expressão do gene *APOE*

Neste estudo, não foram observadas diferenças na expressão basal de RNAm do gene *APOE* nas células mononucleares do sangue periférico entre as mulheres portadoras dos genótipos E2/E3, E3/E3 e E3/E4 (Tabela 18). Resultado similar foi observado em estudos de macrófagos humanos cultivados na ausência de LDL-acetilada (LDL-ac) (Cullen *et al.*, 1998).

Ao avaliar a expressão do RNAm do gene *APOE* em células mononucleares periféricas após o tratamento com os diferentes esquemas terapêuticos, observou-se que a administração isolada da atorvastatina (Grupo A) ou em combinação com estradiol (Grupo E+A) causou diminuição significativa na expressão gênica. Esses resultados sugerem que a atorvastatina tem efeito inibitório sobre a expressão do gene *APOE* e que esse efeito é intensificado na presença de estradiol. Esse efeito não foi observado quando a atorvastatina foi utilizada em combinação com estradiol e NETA (Tabela 19).

Até o momento, existem poucos trabalhos disponíveis na literatura que estudaram os efeitos das vastatinas sobre a expressão do gene *APOE* em células mononucleares periféricas ou em macrófagos.

Castilho e colaboradores realizaram experimentos *in vitro* com a linhagem THP-1 de macrófagos em cultura e verificaram que a expressão do RNAm do gene *APOE* foi diminuída sob efeito da atorvastatina e da cerivastatina (Castilho *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi verificado que essas vastatinas provocaram diminuição na expressão gênica da *APOE* de modo independente da presença ou ausência de colesterol no meio de cultura.

Llaverias e colaboradores utilizando macrófagos THP-1 expostos a LDL-oxidada (LDL-ox) verificaram que, na presença de atorvastatina, houve diminuição na expressão do RNAm do gene *APOE* medida por RT-PCR. Segundo os autores, a redução na expressão gênica pode ter resultado da menor concentração intracelular de ésteres de colesterol provocada pela diminuição na expressão da enzima intracelular FABP (*Fatty Acid Binding Protein*) e da proteína de superfície celular CD68 (*Scavenger Receptor de Classe D*) (Llaverias *et al.*, 2004).

A inibição da expressão do RNAm do gene *APOE* induzida pelo tratamento com atorvastatina isolada ou em combinação com estradiol, encontrada em nosso trabalho, pode ser um reflexo da redução do conteúdo de colesterol esterificado no interior da célula mononuclear periférica, como foi observado em estudos realizados com macrófagos derivados de monócitos humanos *in vitro* (Bernini *et al.*, 1995; Cignarella *et al.*, 2005).

Foi sugerido que a redução do colesterol esterificado intracelular nas células mononucleares induzida pela atorvastatina (Bocan *et al.*, 1998) resulta da diminuição na atividade da enzima acil coenzima A-acil transferase (ACAT). A ACAT é a responsável pelo controle do depósito intracelular de colesterol livre e que tem um papel fundamental no processo do efluxo do colesterol (Tabas, 1995).

Além disso, a atorvastatina pode também diminuir a expressão dos receptores de membrana do tipo *scavenger receptor* nas células mononucleares, diminuindo a captação no plasma de colesterol oriundo das

partículas de LDL modificadas (LDL-ox e LDL-ac), que são mais aterogênicas que a partícula de LDL nativa (Sakai *et al.*, 1997; Bellosta *et al.*, 1998).

McCrohon e colaboradores observaram que o 17-beta-estradiol e a progesterona promovem a diminuição da concentração intracelular de colesterol esterificado em células mononucleares periféricas isoladas de mulheres (McCrohon *et al.*, 1999).

Napolitano e colaboradores (2001) demonstraram que a diminuição da concentração intracelular de colesterol esterificado induzida pelo 17-beta-estradiol em células mononucleares periféricas humanas estava relacionada com o aumento da atividade da colesteryl éster hidrolase (CEH) (Napolitano *et al.*, 2001). Essa enzima é responsável pela geração de colesterol livre e que contribui no pelo processo do efluxo do colesterol (Sulistiyani, 1997).

Em nosso estudo, foram observadas correlações positivas pós-tratamento entre as variações de expressão do RNAm do gene *APOE* e as variações do colesterol total e LDL-C plasmáticos, no grupo de mulheres tratadas com 17-beta-estradiol (Tabela 24). Esses resultados indicam que a ação do estradiol sobre a expressão dos RLDL, e conseqüente redução dos ésteres de colesterol intracelular, resultam na inibição da expressão do RNAm do gene *APOE* da célula mononuclear.

Em conseqüência à redução na concentração intracelular do colesterol esterificado, pode então haver modificação na expressão das proteínas envolvidas no processo do transporte reverso do colesterol, entre as quais está a apo E (Sone *et al.*, 2004).

Estudos tem mostrado que a apo E modula o metabolismo do colesterol celular facilitando o efluxo do colesterol. Em estudo com macrófagos derivados de monócitos, foi demonstrado o efluxo de colesterol em partículas que contém apo E, mesmo na ausência de aceptores de colesterol externos (Zhang *et al.*, 1996).

Os macrófagos derivados de camundongos *knockout* para o gene *APOE* (apo E-/-) exibem capacidade diminuída de efluxo do colesterol e outros

lipídeos comparados com os camundongos selvagens (Mazzone, 1996; Langer *et al.*, 2000). Além disso, o aumento da concentração intracelular de colesterol livre estimula a transcrição de apo E em macrófagos e adipócitos (Mazzone *et al.*, 1989). Essas observações indicam que há um sensor molecular que regula a expressão tecido-específica do gene *APOE* em resposta ao teor de lipídeos.

Laffitte e colaboradores, demonstraram que os receptores nucleares *Liver X receptor* (LXR) e seus ligantes oxisteróis são os reguladores-chaves da expressão *APOE* em macrófagos e adipócitos. Segundo os autores, as vias de sinalização do LXR têm papel central no controle do efluxo do colesterol através da regulação coordenada da expressão dos genes *APOE*, *ABCA1* e *ABCG1* (Laffitte *et al.*, 2001) .

Recentemente foi observado que as estatinas inibem o efluxo do colesterol e a expressão de genes alvo do LXR em células THP-1 e macrófagos humanos pela inibição da síntese de ligantes oxisteróis do LXR (Wong *et al.*, 2004).

Com base nessas evidências, é possível que a ação da atorvastatina sobre a expressão do RNAm do gene *APOE* seja modulada pelos LXR em resposta ao conteúdo intracelular de ésteres de colesterol. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

Quando se analisou a influência do polimorfismo do gene *APOE* sobre a expressão do RNAm do gene *APOE*, foi observado que as mulheres portadoras do genótipo E3/E3 tratadas com atorvastatina e estradiol apresentaram redução significativa na expressão gênica (Tabela 20), o que não foi encontrado nas portadoras do genótipo E3/E4 (Tabela 21). Esses resultados sugerem que a redução na expressão gênica *APOE* induzida pelo tratamento com atorvastatina combinada com estradiol parece estar relacionada ao genótipo *APOE* nas mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa.

Em estudo realizado por Cullen e colaboradores, utilizando macrófagos humanos expostos à LDL-ac, foi observado que a expressão de RNAm do gene *APOE* foi maior em macrófagos obtidos de portadores do genótipo E4/E4, e menor nos portadores do genótipo E2/E2. Ao analisar o conteúdo intracelular de

colesterol, os autores observaram que a taxa de efluxo do colesterol foi maior nas células E2/E2 e menor nas células E4/E4 (Cullen *et al.*, 1998).

Os resultados desse, e de outros estudos indicam que as taxas de expressão de RNAm do gene *APOE*, e a síntese de apo E, são reguladas pelo conteúdo de colesterol no interior da célula mononuclear (Mazzone, 1996; Cignarella *et al.*, 2005).

Dessa forma, o polimorfismo *APOE* tem um efeito importante na regulação da expressão do RNAm do gene *APOE* em macrófagos, que é acentuado pelo tratamento com potentes agentes hipolipemiantes tais como a atorvastatina, ou o estradiol utilizado na TRH em mulheres em pós-menopausa.

Os resultados deste trabalho contribuem para a melhor compreensão do papel do gene *APOE* nos mecanismos de resposta do perfil lipídico sérico a agentes hipolipemiantes em mulheres durante o período da pós-menopausa. A elucidação desses mecanismos poderá auxiliar na adequação do tratamento de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa pelo aumento da eficácia e da segurança terapêuticas. Assim como, também poderá contribuir para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Isto também vêm de encontro com o desafio que nossos colegas profissionais Farmacêuticos-Bioquímicos atualmente encontram nesta era pós-genoma para alcançar os meios terapêuticos mais adequados, ou seja, com a maior especificidade, menor efeito adverso e dose individualizada ao tratamento indicado. Isto só será possível quando se estiver bem conhecida a relação entre os genes e suas influências exercidas na resposta ao medicamento. E sem dúvida, se o diagnóstico precoce e mais adequado das doenças relacionadas forem previamente realizados, será cumprido o objetivo de promoção do bem estar do doente.

6. CONCLUSÕES

1. A atorvastatina combinada ou não com a terapia de reposição hormonal reduz significativamente as concentrações séricas do colesterol total e LDL colesterol em mulheres em pos-menopausa;
2. O polimorfismo *HhaI* do gene *APOE* não está associado com variações no perfil lipídico sérico em mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, antes e após tratamento com atorvastatina associada ou não com a terapia de reposição hormonal;
3. O polimorfismo *HhaI* do gene *APOE* não está associado a diferenças na expressão basal do RNAm do gene *APOE* em células mononucleares do sangue periférico de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa;
4. A atorvastatina isolada ou combinada com estradiol reduz a expressão do RNAm do gene *APOE* em células mononucleares do sangue periférico de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, e esse efeito está associado ao genótipo E3/E3;
5. A diminuição da colesterolemia no plasma em resposta ao tratamento com estradiol é um fator importante para a redução da taxa de expressão do RNAm do gene *APOE* em células mononucleares do sangue periférico de mulheres hipercolesterolêmicas em pós-menopausa, durante a terapia de reposição hormonal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGERBECK, L.P.; WETTERAU, J.R.; WEISGRABER, K.H.; WU, C-S.C.; LINDGREN, F.T. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. Properties of the amino- and carboxyl-terminal domains. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.261, p.6249-6258, 1988.
- ARAI, T.; RINNINGER, F.; VARBAN, L.; FAIRCHILD-HUNTRESS, V.; LIANG, C.P.; CHEN, W.; SEO, T.; DECKELBAUM, R.; HUSZAR, D.; TALL, A.R. Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.96, p.12050-12055, 1999.
- AZNAR, J.; ESTELLES, A.; TORMO, G.; SAPENA, P.; TORMO, V.; BLANCH, S.; ESPANA, F. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. **Br. Heart J.**, London, v.59, p.535-541, 1988.
- BALLANTYNE, C.M.; HERD, J.A.; STEIN, E.A.; FERLIC, L.L.; DUNN, J.K.; GOTTO JR., A.M.; MARIAN, A.J. Apolipoprotein E genotypes and response of plasma lipids and progression-regression of coronary atherosclerosis to lipid-lowering drug therapy. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v.36, p.1572-1578, 2000.
- BARRETT-CONNOR, E.L.; COHN, B.A.; WINGARD, D.L.; EDELSTEIN, S.L. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischaemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.265, p.627-31, 1991.
- BARRETT-CONNOR, E.L.; GRADY, D. Hormone replacement therapy, heart disease and other considerations. **Annu. Rev. Public Health**, Palo Alto, v.19, p.55-72, 1998.
- BEIGUELMAN, B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto/SP, cap.2, p.212, 1995.

- BEISIEGEL, U.; WEBER, W.; IHRKE, G.; HERZ, J.; STANLEY, K.K. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E binding protein. **Nature**, London, v.341, p.162-164, 1989.
- BELLOSTA, S.; MAHLEY, R.W.; SANAN, D.A.; MURATA, J.; NEWLAND, D.L.; TAYLOR, J.M.; PITAS, R.E. Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.96, p.2170-2179, 1995.
- BELLOSTA, S.; BERNINI, F.; FERRI, N.; QUARATO, P.; CANAVESI, M.; ARNABOLDI, L.; FUMAGALLI R.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.137, Supl. p.S101-S109, 1998.
- BENNINK, H.J.T.C. Are all estrogens the same? **Maturitas.**, Amsterdam, v.47, n.4, p.269-275, 2004.
- BERAL, V. For the Collaborate Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy. **Lancet**, London, v.350, p.1047-1059, 1997.
- BERNINI, F.; SCURATI, N.; BONFADINI, G.; FUMAGALLI, R. HMG-CoA reductase inhibitors reduce acetyl LDL endocytosis in mouse peritoneal macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.15, p.1352-1358, 1995.
- BEST, P.J.; BERGER, P.B.; MILLER, V.M.; LERMAN, A. The effect of estrogen replacement on plasma nitric oxid and endothelin-1 levels in postmenopausal women. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.15, p.285-288, 1998.
- BHATNAGAR, D. Lipid-lowering drugs in the managment of hyperlipidaemia. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.79, p.205-230, 1998.
- BIRKHAUSER, M.H. Chemistry, physiology, and pharmacology of sex steroids. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v.28, suppl. 5, p.S1-S13, 1996.
- BLUM, C.B.; ARON, L.; SCIACCA, R. Radioimmunoassay studies of human apolipoprotein E. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.66, p.1240-1250, 1980.

- BLUM, C.B. Comparison of the properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.73, p.3D-11D, 1994.
- BOCAN, T.M.; MUELLER, S.B.; BROWN, E.Q.; LEE, P.; BOCAN, M.J.; REA, T.; PAPE, M.E. HMG-CoA reductase and ACAT inhibitors act synergistically to lower plasma cholesterol and limit atherosclerotic lesion development in the cholesterol-fed rabbit. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.139 p.21-30, 1998.
- BOCUZZI, S.J.; BOCANEGRA, T.S.; WALKER, J.F.; SHAPIRO, D.R.; KEEGAN, M.E. Long-term safety and efficacy profile of simvastatin. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.68, p.1127-1131, 1991.
- BOERWINKLE, E.; BROWN, S.; SHARRETT, A.R.; HEISS, G.; PATSCH, W. Apolipoprotein E polymorphism influences postprandial retinyl palmitate but not triglyceride concentrations. **Am. J. Hum. Genet.**, Baltimore, v.54, n.2, p.341-360, 1994.
- BOERWINKLE, E.; UTERMANN, G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. **Am. J. Hum. Genet.**, Baltimore, v.42, n.1, p.104-112, 1988.
- BOISVERT, W.A.; SPANGENBERG, J.; CURTISS, L.K. Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.96, p.1118-1124, 1995.
- BOUCHER, P.; GOTTHARDT, M. LRP and PDGF Signaling: A Pathway to Atherosclerosis. **Trends Cardiovasc. Med.**, New York, v.14, p.55-60, 2004.
- BRINTON, L.A.; HOOVER, R.N. Estrogen replacement therapy and endometrial cancer risk: unresolved issues. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.81, p.265-271, 1993.
- BUCHER, H.C.; GRIFFITH, L.E.; GUYATT, G.H. Systematic review on the risk and benefit of different cholesterol-lowering interventions. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.19, p.187-195, 1999.

- BUSH, D.E.; JONES, C.E.; BASS, K.M. Estrogen replacement reverses endothelial dysfunction in postmenopausal women. **Am. J. Med.**, New York, v.104, p.552-558, 1998.
- BUSH, T.L.; BARRETT-CONNOR, E.L.; COWAN, L.D.; CRIQUI, M.H.; WALLACE, R.B.; SUCHINDRAN, C.M.; TYROLER, H.A.; RIFKIND, B.M. Cardiovascular mortality and non-contraceptive use of oestrogen in women: results from the Lipid Research Clinic Program Follow-up Study. **Circulation**, Dallas, v.75, p.1102-1109, 1987.
- CAGNACCI, A.; SOLDANI, R.; CARRIERO, P.; PAOLETTI, A.M.; FIORETTI, P.; MELIS, G.B. Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.74, p.396-400, 1992.
- CASTILHO, L.N.; CHAMBERLAND, A.; BOULET, L.; DAVIGNON, J.; COHN, J.S.; BERNIER, L. Effect of atorvastatin on ApoE and ApoC-I synthesis and secretion by THP-1 macrophages. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** New York, v.42, p.251-257, 2003.
- CAVALLI, S.A.; OTTA, M.I.; HIRATA, R.D.C.; NGUYEN, N.Y.; HIRATA, M.H. Apolipoprotein E genotyping in Brazilian normocholesterolemic individuals. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.42, p.S298, [Abstract], 1996.
- CHUNG, N.S.; WASAN, K. M. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.56 p.1315-1334, 2004.
- CHRISTIANSEN, C. Sex steroids and the cardiovascular system. **Osteoporosis Int.**, London, v.7, suppl. 1, p.S8-S11, 1997.
- CHRISTIANSEN, C.; CHRISTENSEN, M.S.; LARSEN, N.E.; TRANSBOL, I.B. Pathophysiological mechanisms of estrogen effect on bone metabolism. Dose-response relationships in early postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.55, p.1124-1130, 1982.
- CIGNARELLA, A.; ENGEL, T.; VON ECKARDSTEIN, A.; KRATZ, M.; LORKOWSKI, S.; LUEKEN, A.; ASSMANN, G.; CULLEN, P.

- Pharmacological regulation of cholesterol efflux in human monocyte-derived macrophages in the absence of exogenous cholesterol acceptors. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.179, p.229-236, 2005.
- COLLINS, P. Clinical cardiovascular studies of hormone replacement therapy. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.3, n.90, supl.1A, p.30F-34F, 2002.
- COOPER, A.D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. **J. Lipid. Res.**, Memphis, v.38, p.2173–2192, 1997.
- CORBO, R.M.; VILARDO, T.; RUGGERI, M.; GEMMA, A.T.; SCACCHI, R. Apolipoprotein E genotype and plasma levels in coronary artery disease. A case-control study in the Italian population. **Clin. Biochem.**, Toronto, v.32, n.3, p.217-222, 1999.
- CROOK, D. The metabolic consequences of treating postmenopausal women with non-oral hormone replacement therapy. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, London, v.104, supl.16, p.4-13, 1997.
- CROOK, D.; CUST, M.P.; GANGAR, K.F.; WORTHINGTON, M.; HILLARD, T.C.; STEVENSON, J.C.; WHITEHEAD, M.I.; WYNN, V. Comparison of transdermal and oral estrogen-progestin replacement therapy: effects on serum lipids and lipoproteins. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.166, p.90-95, 1992.
- CUBRILO-TUREK, M.; SERTIC, J.; DURAKOVIC, Z. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism, lipids, and apolipoproteins in menopausal women on hormone replacement therapy. **Acta Med Croatica.**, Zagreb, v.55, n.4-5, p.161-167, 2001.
- CULLEN, P.A.; CINARELLA, B.; BRENNHAUSEN, B.; MOHR, S.; ASSMANN, G.; ECKARDSTEIN, A. V. Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and in cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.101, p.1670-1677, 1998.

- DALLONGEVILLE, J. Apolipoprotéine E: propriétés physiologiques, polymorphisme et athérosclérose. **Sang. Thrombose Vaisseaux**, v.5, p.707-717, 1993.
- DALLONGEVILLE, J.; LUSSIER-CACAN, S.; DAVIGNON, J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.33, p.447-454, 1992.
- DALLONGEVILLE, J.; ROY, M.; LEBOUF, N.; XHIGNESSE, M.; DAVIGNON, J.; LUSSIER-CACAN, S. Apolipoprotein E polymorphism association with lipoprotein profile in endogenous hypertriglyceridemia and familial hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.11, p.272-278, 1991.
- DALY, E.; VESSEY, M.P.; HAWKINS, M.M.; CARSON, J.L.; GOUGH, P.; MARSH, S. Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. **Lancet**, London, v.348, p.977-980, 1996.
- DAVIDSON, M.H.; MAKI, K.C.; MARX, P.; MAKI A.C.; CYROWSKI, M.S.; NANAVATI, N.; ARCE, J.C. Effects of continuous estrogen and estrogen-progestin replacement regimens on cardiovascular risk markers in postmenopausal women. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.160, p.3315-3325, 2000.
- DAVIGNON, J. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. In: Schwartz, C.J.; Born, G.V.R.; editors, New horizons in coronary heart disease, London, **Curr. Sci.**, Bangalore, p.5.1-5.21, 1993.
- DAVIGNON, J. Apolipoprotein E polymorphism, dyslipidemia and atherosclerosis. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Heidelberg, v.1, p.53-56, 1991.
- DAVIGNON, J.; COHN, J.S.; MABILE, L.; BERNIER, L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.286, p.115-143, 1999.
- DAVIGNON, J.; GREGG, R.E.; SING, C.F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.8, p.1-21, 1988.

- DE ALOYSIO, D.; GAMBACCIANI, M.; MESCHIA, M.; PANSINI, F.; MODENA, A.B.; BOLIS, P.F.; MASSOBRI, M.; MAIOCCHI, G.; PERUZZI, E. The Icarus Study Group. The effect of menopause on blood lipid and lipoprotein levels. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.147, p.147-153, 1999.
- DE FRANCA, E.; ALVES, J.G.B.; HUTZ, M.H. Apolipoprotein E Polymorphism and Its Association with Serum Lipid Levels in Brazilian Children. **Human Biology**, Detroit, v.76, n.2, p. 267-275, 2004.
- DE KNIJFF, P.; VAN DEN MAADENBERG, A.M.J.M.; FRANTS, R.R.; HAVEKES, L.M. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma apolipoprotein levels. **Hum. Mutat.**, New York, v.4, p.178-194, 1994.
- DE LIGNIERÈS, B.; DENNERSTEIN, L.; BACKSTROM, T. Influence of route of administration on progesterone metabolism. **Maturitas**, Amsterdam, v.21, p.251-257, 1995.
- DE LIGNIERÈS, B.; SILBERSTEIN, S. Pharmacodynamics of oestrogens and progestogens. **Cephalalgia**, Oslo, v.20, n.3, p.200-207, 2000.
- DEMANT, T.; BEDFORD, D.; PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipidemic subjects. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.88, p.1490-1501, 1991.
- DESPRES, J.P.; MOORJANKI, S.; LUPIEN, P.J.; TREMBLAY, A.; NADEAU, A.; BOUCHARD, C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.10, p.497-511, 1990.
- DIRETRIZES brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v.77, supl. III, p.4-48, 201. [III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias, Pouso Alegre, MG, 2001].
- DOBSON, A.J.; MCELDUFF, P.; HELLER, R.; ALEXANDER, H.; COLLEY, P.; D'ESTE, K. Changing patterns of coronary heart disease in the hunter region

- of New South Wales, Australia. **J. Clin. Epidemiol.**, Oxford, v.52, p.761-771, 1999.
- DONG, J.; BALESTRA, M.E.; NEWHOUSE, Y.M.; WEISGRABER, K.H. Human apolipoprotein E7: lysine mutations in the carboxy-terminal domain are directly responsible for preferential binding to very low density lipoproteins. **J. Lipid. Res.**, Memphis, v.41, n.11, p.1783-1789, 2000.
- DONG, L-M.; WILSON, C.; WARDELL, M.R.; SIMMONS, T.; MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.H.; AGARD, D.A. Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.269, p.22358-22365, 1994.
- DONG, L-M.; PARKIN, S.; TRAKHANOV, S.D.; RUPP, B.; SIMMONS, T.; ARNOLD, K.S.; NEWHOUSE, Y.M.; INNERARITY, T.L.; WEISGRABER, K.H. Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia. **Nat. Struct. Biol.**, New York, v.3, p.718-722, 1996a.
- DONG, L-M.; WEISGRABER, K.H. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.271, p.19053-19057, 1996b.
- DORANGEON, P.; THOMAS, J.L.; GILLERY, P. Short-term effects on lipids and lipoproteins of two progestones used in postmenopausal replacement therapy. **Eur. J. Clin. Res.**, v.3, p.187-193, 1992.
- DOWNS, J.R.; CLEARFIELD, M.; WEIS, S.; WHITNEY, E.; SHAPIRO, D.R.; BEERE, P.A.; LANGENDORFER, A.; STEIN, E.A.; KRUYER, W.; GOTTO, A.M. JR. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels. Results of AFCAPS/TexCAPS. **JAMA**, Chicago, v.279, p.1615-1622, 1998.
- DUJOVNE, C.A.; CHREMOS, A.N.; POOL, J.L.; SCHAPNER, H.; BRADFORD, R.H.; SHEAR, C.L.; HIGGINS, J.; DOWNTON, M.; FRANKLIN, F.A.; NASH, D.T.; GOULD, A.L.; LANGENDÖRFER, A. Expanded clinical evaluation of

- lovastatin (EXCEL) study results. Additional perspectives on the tolerability of lovastatin. **Am. J. Med.**, New York, v.91, supl.1B, p.25S-30S, 1991.
- EICHNER, J.E.; DUNN, S.T.; PERVEEN, G.; THOMPSON, D.M.; STEWART, K.E.; STROEHLA, B.C. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.155, n.6, p.487-495, 2002.
- ETTINGER, B. Use of low dosage 17 beta-estradiol for the prevention of osteoporosis. **Clin. Ther.**, Princeton, v.15, n.6, p.950-962, 1993.
- ETTINGER, B.; GENANT, H.K.; STEIGER, P.; MADVIG, P. Low dosage micronized 17-estradiol prevents bone loss in postmenopausal women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.166, p.479-488, 1992.
- FARISH, E.; SPOWART, K.; BARNES, J.F.; FLECHTER, C.D.; CALDER, A.; BROWN, A.; HART, P.M.; DEGEN, M.M. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipoproteins including Lp(a) and LDL subfractions. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.126, p.77-84, 1996.
- FARNIE, M.; DAVIGNON, J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.82, n.4B, p.3J-10J, 1998.
- FAZIO, S.; BABAEV, V.R.; MURRAY, A.B.; HASTY, A.H.; CARTER, K.J.; GLEAVES, L.A.; ATKINSON, J.B.; LINTON, M. F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.94, p.4647-4652, 1997.
- FIDGE, N.H. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. **J. Lipid. Res.**, Memphis, v.40, n.2, p.187-201, 1999.
- FORTINO, M.; MERSON, E.J.; ALLEN, F.H. Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, Philadelphia, v.1, p.131-133, 1971.
- FOSSATI, P.; PRINCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.28, p.2077-2080, 1982.

- FOSSATI, P.; MEDICCI, R. Abstract Book. **International Symposium on Cholesterol Control and Cardiovascular Diseases: Prevention and Therapy**. Milan, Italy. Apud: Bayer Corporation, Diagnostic Division, Tarrytown, N.Y.;Cholesterol-Fast Color [Bula], 1987.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.18. p.499-502, 1972.
- FRIKKE-SCHMIDT, R. Context-dependent and invariant associations between APOE genotype and levels of lipoproteins and risk of ischemic heart disease: a review. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.**, Lund, v.233, p.3-25, 2000.
- FRIKKE-SCHMIDT, R.; NORDESTGAARD, B.G.; AGERHOLM-LARSEN, B.; SCHNOHR, P.; TYBJAERG-HANSEN, A. Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype. **J. Lipid. Res.**, Memphis, v. 41, n.11, p.1812-1822, 2000.
- GARRY, P.J.; BAUMGARTNER, R.N.; BRODIE, S.G.; MONTOYA, G.D.; LIANG, H.C.; LINDEMAN, R.D.; WILLIAMS, T.M. Estrogen replacement therapy, serum lipids, and polymorphism of the apolipoprotein E gene. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.45, n.8, p.1214-1223, 1999.
- GEBARA, O.C.E.; MITTLEMAN, M.; SUTHERLAND, P.; LIPINSKA, I.; MATHENEY, T.; XU, P.; WELTY, F.K.; WILSON, P.W.; LEVY, D.; MULLER, J.E. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. **Circulation**, Dallas, v.91, p.1952-1958, 1995.
- GENANT, H.K.; LUCAS, J.; WEISS, S.; AKIN, M.; EMKEY, R.; MCNANEY-FLINT, H.; DOWNS, R.; MORTOLA, J.; WATTS, N.; YANG, H.M.; BANAV, N.; BRENNAN, J.J.; NOLAN, J.C. Low-dose esterified estrogen therapy:

- effects on bone, plasma estradiol concentrations, endometrium and lipid levels. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.157, p.2609-2615, 1997.
- GERDES, L.U.; GERDES, C.; KERVINEN, K.; SAVOLAINEN, M.; KLAUSEN, I.C.; HANSEN, P.S.; KESANIEMI, Y.A.; FAERGEMAN, O. The apolipoprotein epsilon 4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction: a substudy of the Scandinavian Simvastatin Survival Study. **Circulation.**, Dallas, v.101, n.12, p.1366-1371, 2000.
- GERDES, L.U.; GERDES, C.; HANSEN, P.S.; KLAUSEN, I.C.; FARGEMAN, O.; DYERBERG, J. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. **Hum. Genet.**, Berlin, v.98, p.546-550, 1996.
- GERDES, L.U.; VESTERGAARD, P.; HERMANN, A.P.; MOSEKILDE, L. Regional and Hormone-Dependent Effects of Apolipoprotein E Genotype on Changes in Bone Mineral in Perimenopausal Women. **J Bone Miner Res.**, New York, v.16, n.10, p.1906-1916, 2001.
- GIANNINI, S.D. **Aterosclerose e dislipidemias**. BG Cultural, São Paulo, 1998.
- GODSLAND, I.F. Effects of postmenopausal hormone replacement therapy on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein (a) concentrations: analysis of studies published from 1974-2000. **Fertil. Steril.**, New York, v.75, p.898-915, 2001.
- GODSLAND, I.F. The influence of female sex steroids on glucose metabolism and insulin action. **J. Intern. Med. Suppl.**, Oxford, v.240, suppl.738, p.1-60, 1996.
- GOMEZ-CORONADO, D.; ALVAREZ, J.J.; ENTRALA, A.; OLMOS, J.M.; HERRERA, E.; LASUNCION, M.A. Apolipoprotein E polymorphism in men and women from a Spanish population: allele frequencies and influence on plasma lipids and apolipoproteins. **Atherosclerosis**. Amsterdam, v.147, n.1, p.167-176, 1999.
- GORDON, T.; GARCIA-PALMIERI, M.R.; KAGAN, A. Differences in coronary hear disease in Framingham, Honolulu, and Puerto Rico. **J. Chronic Dis.**, St. Louis, v.27, p.329, 1974.

- GRADY, D.; HERRINGTON, D.; BITTNER, V.; BLUMENTHAL, R.; DAVIDSON, M.; HLATKY, M.; HSIA, J.; HULLEY, S.; HERD, A.; KHAN, S.; NEWBY, LK.; WATERS, D.; VITTINGHOFF, E.; WENGER, N. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy. Heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS II). **JAMA**, Chicago, v.288, p.49–57, 2002.
- GRADY, D.; RUBIN, S.M.; PETITTI, D.B.; FOX, C.S.; BLACK, D.; ETTINGER, B.; ERNSTER, V.L.; CUMMINGS, S.R. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.117, p.1016-1037, 1992.
- GRAHAM, J.D.; CLARKE, C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.52, p.502-519, 1997.
- GRANOT, E.; EISENBERG, S. Failure of exogenous apoprotein E-3 to enhance cholesterol egress from J-774 murine macrophages in culture. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.114, p.115-122, 1995.
- GRODSTEIN, F.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J. Postmenopausal hormone use and cholecystectomy in a large prospective study. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.83, p.5-11, 1994.
- GRODSTEIN, F.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; WILLET, W.C.; SPEIZER, F.E.; STAMPFER, M.J. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.133, p.933-941, 2000.
- GRODSTEIN, F.; NEWCOMB, P.A.; STAMPFER, M.J. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. **Am. J. Med.**, New York, v.106, p.574-582, 1999.
- GRODSTEIN, F.; STAMPFER, M.J.; GOLDBERGER, S.Z.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C.; HENNEKENS, C.H. Prospective study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women. **Lancet**, London, v.348, p.983-987, 1996.

- GRUNDY, S.M. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. **N. Engl. J. Med.**, v.319, p. 24-33, 1988.
- GYLLING, H.; KUUSI, T.; VANHANEN, H.; MIETINEN, T.A. Apolipoprotein E phenotype and cholesterol metabolism in familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.80, p.27-32, 1989.
- HAK, A.E.; WITTEMAN, J.C.M.; HUGENS, W.; KEYZER, J.J.; POP, V.J.; UITTERLINDEN, A.G.; POLS, H.A.P. The increase in cholesterol with menopause is associated with the apolipoprotein E genotype. A population-based longitudinal study. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.175, p.169-176, 2004.
- HANLON, C.S.; RUBINSZTEIN, D.C. Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.112, p.85-90, 1995.
- HARBOO, J.; MARSLEW, U.; GOTFEDSEN, A.; CHRISTIANSEN, C. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. **Metab. Clin. Exp.**, New York, v.40, p.1323-1326, 1991.
- HASTY, A.H.; LINTON, M.F.; SWIFT, L.L.; FAZIO, S. Determination of the lower threshold of apolipoprotein E resulting in remnant lipoprotein clearance. **J. Lipid. Res.**, Memphis, v.40, n.8, p.1529-1538, 1999.
- HEGELE, R.A.; BRECKENRIDGE, W.C.; COX, D.W.; MAGUIRE, G.F.; LITTLE, J.A.; CONNELLY, P.W. Interaction between variant apolipoproteins C-II and E that affects plasma lipoprotein concentrations. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.11, n.5, p.1303-1309, 1991.
- HEIKKINEN, A.M.; NISKANEN, L.; RYYNANEN, M.; KOMULAINEN, M.H.; TUPPURAINEN, M.T.; PARVIAINEN, M.; SAARIKOSKI, S. Is the response of serum lipids and lipoproteins to post-menopausal hormone replacement therapy modified by ApoE genotype? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.19, p.402-407, 1999.

- HENDERSON, B.E.; PAGANINI-HILL, A.; ROSS, R.K. Decreased mortality in users of estrogen replacement therapy. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.151, p.75-78, 1991.
- HERZ, J. The LDL-receptor-related protein, portrait of a multifunctional receptor. **Curr. Opin. Lipidol.**, London, v.4, p.107-113, 1993.
- HERZ, J.; STRICKLAND, D.K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.108, p.779-784, 2001.
- HIXSON, J.E.; VERNIER, D.T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.31, p.545-548, 1990.
- HOCKERSTEDT, A.; JAUHAINEN, M.; TIKKANEN, M.J. Lecithin/cholesterol acyltransferase induces estradiol esterification in high-density lipoprotein, increasing its antioxidant potential. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.89, n.10, p.5088-5093, 2004.
- HOFFMANN, M.M.; SCHARNAGL, H.; KOSTER, W.; WINKLER, K.; WIELAND, H.; MARZ, W. Apolipoprotein E1 Baden (Arg (180)→Cys). A new apolipoprotein E variant associated with hypertriglyceridemia. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 303, n.1-2, p.41-48, 2001.
- HOOGERBRUGGE, N.; ZILLIKENS, M.C.; JANSEN, H.; MEETER, K.; DECKERS, J.W.; BIRKENHAGER, J.C. Estrogen replacement decreases the level of antibodies against oxidized low-density lipoprotein in postmenopausal women with coronary heart disease. **Metabolism**, New York, v.47, n.6, p.675-680, 1998.
- HOREJSI, B.; CESKA, R. Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein (a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis. **Physiol. Res.**, Praha, v.49, suppl.1, p.S63-S69, 2000.
- HSU, I.; SPINLER, S.A.; JOHNSON, N.E. Comparative evaluation of the safety and efficacy of HMG-CoA reductase inhibitor monotherapy in the treatment of primary hypercholesterolemia. **Ann. Pharmacother.**, Cincinnati, v.29, p.743-759, 1995.

- HUANG, Y.; LIU, X.Q.; RALL, S.C.; MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E2 reduces the low-density-lipoprotein level in transgenic mice by impairing lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.17483-17490, 1998a.
- HUANG, Y.; JI, Z-S.; BRECHT, W.J.; RALL, S.C. JR.; TAYLOR, J.M.; MAHLEY, R.W. Overexpression of apolipoprotein E3 in transgenic rabbits causes combined hyperlipidemia by stimulating hepatic very low density lipoprotein (VLDL) production and impairing VLDL lipolysis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.19, p.2952-2959, 1999.
- HUANG, Y.; LIU, X.Q.; RALL, S.C. JR.; TAYLOR, J.M.; VON ECKARDSTEIN, A.; ASSMANN, G.; MAHLEY, R.W. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.26388-26393, 1998b.
- HULLEY, S.; FURBERG, C.; BARRETT-CONNOR, E.L.; CAULEY, J.; GRADY, D.; HASKELL, W.; HASKELL, W.; KNOPP, R.; LOWERY, M.; SATTERFIELD, S.; SCHROTT, H.; VITTINGHOFF, E.; HUNNINGHAKE, D. HERS RESEARCH GROUP. Noncardiovascular outcomes during 6.8 years of hormone therapy. Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study Follow-up (HERS II). **JAMA**, Chicago, v.288, p.58-66, 2002.
- HULLEY, S.; GRADY, D. The WHI estrogen – alone trial - Do things look any better? **JAMA, Chicago**, v. 291, n. 14, p.1769-1771, 2004.
- HULLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and estrogen/progestin replacement study (HERS) Research Group. **JAMA**, Chicago, v.280, p.605-613, 1998.
- IGEL, M.; SUDHOP, T.; VON BERGMANN, K. Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v.42, p.835-845, 2002.

- IGEL, M.; SUDHOP, T.; VON BERGMANN, K. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins). **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.57, p.357-364, 2001.
- ILLINGWORTH, D.R.; TOBERT, J.A. A review of clinical trials comparing HMG-CoA reductase inhibitors. **Clin. Ther.**, Princeton, v.16, p.366-385, 1994.
- ILLINGWORTH, D.R.; BACON, S.P.; LARSEN, K.K. Long term experience with HMG-CoA reductase inhibitors in the therapy of hypercholesterolemia. **Atheroscler. Rev.**, v.18, p.161, 1988.
- INNERARITY, T.L.; HUI, D.Y.; BERSOT, T.P.; MAHLEY, R.W. **Lipoprotein Deficiency Syndromes**, p.273, 1986.
- INNERARITY, T.L.; WEISGRABER, K.H.; ARNOLD, K.S.; RALL, S.C. JR.; MAHLEY, R.W. Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2. Evidence for modulation of the binding site conformation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.259, p.7261-7267, 1984.
- ISSA, M.H.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; HIRATA, R.D.C. Análise da influência do polimorfismo *HhaI* da apolipoproteína E sobre a resposta terapêutica as vastatinas e à terapia de reposição hormonal em um grupo de mulheres pós-menopausadas com hipercolesterolemia. **XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, III Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**. Rio de Janeiro/RJ. Jun. 2003a.
- ISSA, M.H.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; HIRATA, R.D.C. Efeito do polimorfismo genético da apolipoproteína E sobre o perfil lipídico sérico em mulheres pós-menopausadas hipercolesterolemicas, durante a terapia de reposição hormonal combinada com atorvastatina. **VIII Semana de Ciência e Tecnologia da FCF/USP**. São Paulo/SP. Out. 2003b.
- JAMES, P.T.; LEACH, R.; KALAMARA, E.; SHAYEGHI, M. The worldwide obesity epidemic. **Obes. Res.**, Silver Spring, v.9, supl.4, p.228S-233S, 2001.

- JÄRVINEN, A.; NYKÄNEN, S.; PAASINIEMI, L. Absorption and bioavailability of oestradiol from a gel, a patch and a tablet. **Maturitas**, Amsterdam, v.32, p.103-113, 1999.
- JENSEN, J.; NILAS, L.; CHRISTIANSEN, C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. **Maturitas**, Amsterdam, v.12, p.321-331, 1990.
- JICK, H.; DERBY, L.E.; MYERS, M.W.; VASILAKIS, C.; NEWTON, K.M. Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. **Lancet**, London, v.348, p.981-983, 1996.
- JOKELA, H.; DASTIDAR, P.; RONTU, R.; SALOMAKI, A.; TEISALA, K.; LEHTIMAKI, T.; PUNNONEN, R. Effects of long term estrogen replacement therapy versus combined hormone replacement therapy on nitric oxide dependent vasomotor function. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.88, n.9, p.4348-4354, 2003.
- JONG, M.C.; DAHLMANS, V.E.H.; VAN GORP, P.J.J.; BREUER, M.L.; MOL, M.J.; VAN DER ZEE, A.; FRANTS, R.R.; HOFKER, M.H.; HAVEKES, L.M. Both lipolysis and hepatic uptake of VLDL are impaired in transgenic mice coexpressing human apolipoprotein E3-Leiden and human apolipoprotein C1. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.16, p.934-940, 1996.
- KAJINAMI, K.; TAKEKOSHI, N.; BROUSSEAU, M.E.; SCHAEFER, E.J. Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.177, p.219-234, 2004.
- KAKUYAMA, T.; KIMURA, S.; HASIGUCHI, Y. Fully automated determination of HDL-cholesterol from human serum with Hitachi 911. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.40, p.A1104. [Abstract], 1994.
- KANNEL, W.B. The Framingham Study: Its 50-year legacy and future promise. **J. Atheroscler. Thromb.**, Tokyo, v.6, n.2, p.60-66, 2000.
- KANNEL, W.B.; D'AGOSTINO, R.B.; SULLIVAN, L.; WILSON, P.W. Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles. **Am. Heart J.**, St. Louis., v.148, n.1, p.16-26, 2004.

- KANNEL, W.B.; FEINLEIB, M.; MCNAMARA, J.R.; GARRISON, R.J. CASTELLI, W.P. An investigation of coronary heart disease in families: the Framingham Offspring Study. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.110, p.281-290, 1979.
- KARJALAINEN, A.; HEIKKINEN, J.; SAVOLAINEN, M.J.; BÄCKSTRÖM, ANN-CHRISTINE.; KESÄNIEMI, Y.A. Regulation of plasma low density lipoprotein levels in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.151, n.2, p.559-566, 2000a.
- KARJALAINEN, A.; HEIKKINEN, J.; SAVOLAINEN, M.J.; BÄCKSTRÖM, ANN-CHRISTINE.; KESÄNIEMI, Y.A. Mechanisms regulating LDL metabolism in subjects on peroral and transdermal estrogen replacement therapy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, Dallas, v.20, n.4, p.1101-1106, 2000b.
- KENDRACH, M.G.; KELLY-FREEMAN, M. Approximate equivalent rosuvastatin doses for temporary statin interchange programs. **Ann Pharmacother.**, Cincinnati, v.38, n.7-8, p.1286-1292, 2004.
- KIM, D.H.; IJIMA, H.; GOTO, K.; SAKAI, J.; ISHII, H.; KIM, H.J.; SUZUKI, H.; KONDO, H.; SAEKI, S.; YAMAMOTO, T. Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.271, n.14, p.8373-8380, 1996.
- KIM, D.H.; MAGOORI, K.; INOUE, T.R.; MAO, C.C.; KIM, H.J.; SUZUKI, H.; FUJITA, T.; ENDO, Y.; SAEKI, S.; YAMAMOTO, T. Exon/intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.272, p.8498-8504, 1997.
- KOOCHMESHGI, J.; HOSSEINI-MAZINANI, S.M.; MORTEZA SEIFATI, S.; HOSEIN-PUR-NOBARI, N.; TEIMOORI-TOOLABI, L. Apolipoprotein E genotype and age at menopause. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.1019, p.564-567, 2004.

- KRUL, E.S.; COLE, T.G. Quantitation of Apolipoprotein E. In: **Methods in Enzymology**. Plasma lipoproteins. Part C. Quantitation. (Eds. Bradley W.A.; Gianturco S.H.; Segrest J.P.), p.170-187. London, Academic Press, 1996.
- KWITEROVICH, P.O. JR. The metabolic Pathways of High-Density Lipoprotein, Low-Density Lipoprotein, and Triglycerides: A Current Review. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.86 (supl.), p.5L-10L, 2000.
- LAFFITTE B.A.; REPA, J.J.; JOSEPH, S.B.; WILPITZ, D.C.; KAST, H.R.; MANGELSDORF, D.J.; TONTONNOZ, P. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. **Proc Natl Acad Sci USA.**, Washington, v.98, n.2, p.507-512, 2001.
- LAHOZ, C.; OSGOOD, D.; WILSON, P.W.; SCHAEFER, E.J.; ORDOVAS, J.M. Frequency of phenotype-genotype discrepancies at the apolipoprotein E locus in a large population study. **Clin Chem.**, Baltimore, v.42, n.11, p.1817-1823, 1996.
- LANDENPARA, S.; PUOLAKKA, J.; PYOROLA, T.; LUOTOLA, H.; TAKINSEN, M.R. Effects of postmenopausal estrogen/progestin replacement therapy on LDL particles: comparison of transdermal and oral treatment regimens. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.122, p.153-162, 1996.
- LANGER, C.; HUANG, Y.; CULLEN, P.; WIESENHUTTER, B.; MAHLEY, R.W.; ASSMANN, G.; VON ECKARDSTEIN, A. Endogenous apolipoprotein E modulates cholesterol efflux and cholesteryl ester hydrolysis mediated by high-density lipoprotein-3 and lipid-free apolipoproteins in mouse peritoneal macrophages. **J. Mol. Med.**, Amsterdam, v.78, p.217-227, 2000.
- LANGER, R.D. Hormone Replacement and the Prevention of Cardiovascular Disease. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.89, supl., p.36E-46E, 2002.
- LARSON, I.A.; ORDOVAS, J.M.; DeLUCA, C.; BARNARD, J.R.; FEUSSNER, G.; SCHAEFER, E.J. Association of Apo E genotype with plasma apo E levels. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.148, n.2, p.327-335, 2000.

- LEA, A.P.; MCTAVISH, D. Atorvastatin. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. **Drugs**, New York, v.53, p. 828-847, 1997.
- LEHTIMAKI, T.; DASTIDAR, P.; JOKELA, H.; KOIVULA, T.; LEHTINEN, S.; EHNHOLM, C.; PUNNONEN, R. Effect of long-term hormone replacement therapy on atherosclerosis progression in postmenopausal women relates to functional apolipoprotein E genotype. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.87, n.9, p.4147-4153, 2002.
- LEHTIMAKI, T.; MOILANEN, T.; VUKARI, J.; AKERBLOM, H.K.; EHNHOLM, C.; RONNEMA, T.; MARNIEMI, J.; DAHLEN, G.; NIKKARI, T. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.31, p.487-495, 1990.
- LEON, A.S.; TOGASHI, K.; RANKINEN, T.; DESPRES, J.P.; RAO, D.C.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; BOUCHARD, C. Association of apolipoprotein E polymorphism with blood lipids and maximal oxygen uptake in the sedentary state and after exercise training in the HERITAGE family study. **Metabolism**, New York, v.53, n.1, p.108-116, 2004.
- LIN, C.Y.; DUAN, H.; MAZZONE T. Apolipoprotein E-dependent cholesterol efflux from macrophages: kinetic study and divergent mechanisms for endogenous versus exogenous apolipoprotein E. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.40, n.9, p.1618-1627, 1999.
- LINTON, M.R.F.; ATKINSON, J.B.; FAZIO, S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. **Science**, Washington, v.267, p.1034-1037, 1995.
- LIU, J.H. Progestins and their application in the menopause. What have we learned. **Infert. Reprod. Med. Clinical N. Am.**, v.10, p.329-342, 1999.
- LLAVERIAS, G.; NOE, V.; PENUELAS, S.; VAZQUEZ-CARRERA, M.; SANCHEZ, R.M.; LAGUNA, J.C.; CIUDAD, C.J.; ALEGRET, M. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human

- macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.318, n.1, p.265-274, 2004.
- LOBO, R.A. Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.73, p.925-930, 1991.
- LOBO, R.A. Treatment of the Postmenopausal Woman. Basic and Clinical Aspects, **New York**, Raven Press, 1993.
- LOBO, R.A.; PICKAR, J.H.; WILD, R.A.; WALSH, B.; HIRVONEN, E. Metabolic impact of adding medroxyprogesterone acetate to conjugated estrogen therapy in postmenopausal women. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.84, p.987-995, 1994.
- LOTUFO, P.A. **Doenças Cardiovasculares no Brasil: estudo de caso da tendência da mortalidade no estado de São Paulo, 1970-1989.** p.195, (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública - USP), São Paulo, 1993.
- LUND-KATZ, S.; WEHRLI, S.; ZAIUO, M.; NEWHOUSE, Y.; WEISGRABER, K.H.; PHILIPS, M.C. Effects of polymorphism on the microenvironment of the LDL receptor-binding region of human apo E. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.42, p.894-901, 2001.
- MADSEN, J.S.; KRISTENSEN, S.R.; GRAM, J.; BLADBJERG, E.M.; HENRIKSEN, F.L.; GRAM, J.; CHRISTENSEN, K.; JESPERSEN, J. Positive impact of hormone replacement therapy on the fibrinolytic system: a long-term randomized controlled study in healthy postmenopausal women. **J. Thromb. Haemost.**, Oxford, v.1, n.9, p.1984-1991, 2003.
- MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with a role in cell biology. **Science**, Washington, v.240, p.622-630, 1988.
- MAHLEY, R.W.; ANGELIN, B. Type III hyperlipoproteinemia: recent insights into the genetic defect of familial dysbetalipoproteinemia. **Adv Intern Med.** Chicago, v.29, p.385-411, 1984.

- MAHLEY, R.W.; HUANG, Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. **Curr. Opin. Lipidol.**, London, v.10, p.207-217, 1999.
- MAHLEY, R.W.; HUANG, Y.; RALL, S.C. JR. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries, and paradoxes. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.40, p.1933-1949, 1999.
- MAHLEY, R.W.; JI, Z-S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.40, p.1-16, 1999.
- MAHLEY, R.W.; RALL, S.C. JR. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, Palo Alto, v.1, p.507-537, 2000.
- MAHLEY, R.W.; RALL, S.C. JR. Type III hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly and D. Valle Editors, **The metabolic and molecular bases of inherited diseases**. McGraw-Hill, New York, p.1953-1980, 1995.
- MAILLY, F.; XU, C.F.; XHIGNESSE, M.; LUSSIER-CACAN, S.; TALMUD, P.J.; DAVIGNON, J.; HUMPHRIES, S. E.; NESTRUCK, A.C. Characterization of a new apolipoprotein E5 variant detected in two French-Canadian subjects. **J. Lipid. Res.**, Memphis, v.32, p.613-620, 1991.
- MANOLIO, T.A.; FURBERG, C.D.; SCHEMANSKI, L.; PSATY, B.M.; O'LEARY, D.H.; TRACY, R.P.; BUSH, T.L. Associations of postmenopausal oestrogen use with cardiovascular disease and its risk factors in older women. **Circulation**, Dallas, v.88, p.2163-2171, 1993.
- MATTHEWS, K. A.; MEILAHN, E.; KULLER, L.H.; KELSEY S. F.; CAGGIULA, A.W.; WING, R.R. Menopause and risk factors for coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.7, p.641-646, 1989.
- MAZZONE, T. Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential functions. **Curr. Opin. Lipidol.**, London, v.7, p.303-310, 1996.

- MAZZONE, T.; BASHEERUDDIN, K.; POULOS, C. Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.30, p.1055-1064, 1989.
- MAZZONE, T.; PUSTELNIKAS, L.; REARDON, C.A. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.267, p.1081-1087, 1992.
- MAZZONE, T.; REARDON, C. Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.35, p.1345-1353, 1994.
- McCROHON, J.A.; NAKHLA, S.; JESSUP, W.; STANLEY, K.K.; CELERMAJER, D.S. Estrogen and progesterone reduce lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages: a sex-specific effect. **Circulation.**, Dallas, v.100, n.23, p.2319-2325, 1999.
- McGOVERN, P.G.; PANKOW, J.S.; SHAHAR, E.; DOLISZNY, K.M.; FOLSOM, A.R.; BLACKBURN, H.; LUEPKER, R.V. Recent trends in acute coronary heart disease-mortality, morbidity, medical care, and risk factors. The Minnesota Heart Survey Investigators. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.334, p.884-890, 1996.
- McGOWAN, J.A.; POTTERN, L. Commentary on the Women's Health Initiative. **Maturitas**, Amsterdam, v.34, p.109-112, 2000.
- MENZEL, H-J., KLADETZKY, R-G., ASSMANN, G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.3, p.310-315, 1983.
- MENSENKAMP, A.R.; JONG, M.C.; VAN GOOR, H.; VAN LUYN, M.J.; BLOKS, V.; HAVINGA, R.; VOSHOL, P.J.; HOFKER, M.H.; VAN DIJK, K.W.; HAVEKES, L.M.; KUIPERS, F. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.274, n.50, p.35711-35718, 1999.
- MILLER, V.T.; MUESSING, R.A.; LAROSA, J.C.; PHILLIPS, E.A.; STILMAN, R.J. Effects of conjugated estrogen with and without three different

- progentins on lipoproteins, high density lipoprotein sub-fractions and apolipoprotein A1. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.77, p.235-240, 1991.
- MILLION WOMEN COLLABORATORS. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the million women-study. **Lancet**, London, v.362, p.419-427, 2003.
- MOLLER, D.; FLIER, J. Insuline resistance - mechanisms, syndromes and implications. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.325, p.938-948, 1991.
- MORENO, J.A.; LOPEZ-MIRANDA, J.; MARIN, C.; GOMEZ, P.; PEREZ-MARTINEZ, P.; FUENTES, F.; FERNANDEZ DE LA PUEBLA, R.A.; PANIAGUA, J.A.; ORDOVAS, J.M.; PEREZ-JIMENEZ, F. The influence of the apolipoprotein E gene promoter (-219G/T) polymorphism on postprandial lipoprotein metabolism in young normolipemic males. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.44, n.11, p.2059-2064, 2003.
- MUGGE, A.; RIEDEL, M.; BARTON, M.; KUHN, M.; LICHTLEN, P.R. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 β -estradiol in vitro. **Cardiovascular Research**, London, v.27, p.1939-1942, 1993.
- MUNK-JENSEN, N.; ULRICH, L.G.; OBEL, E.B.; NIELSEN, S.P.; EDWARDS, D.; MEINERTZ, H. Continuous combined and sequential estradiol and norethindrone acetate treatment of postmenopausal women: effect on plasma lipoproteins in a two-year placebo controlled trial. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.171, p.132-138, 1994.
- NAESSEN, T.; BERGLUND, L.; ULMSTEN, U. Bone loss in elderly women prevented by ultralow doses of parenteral 17-beta estradiol. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.177, p.115-119, 1997.
- NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A.S.; RAINES, E.W.; BRESLOW, J.L.; ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.14, p.133-140, 1994.

- NANDA, K.; BASTIAN, L.A.; HASSELBLAD, V.; SIMEL, D.L. Hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.93, p.880-888, 1999.
- NAPOLITANO, M.; BLOTTA, I.; MONTALI, A.; BRAVO, E. 17-beta-estradiol enhances the flux of cholesterol through the cholesteryl ester cycle in human macrophages. **Biosci. Rep.**, New York, v.21, n.5, p.637-652, 2001.
- NAWROCKI, J.W.; WEISS, S.R.; DAVIDSON, M.H.; SPRECHER, D.L.; SCHWARTZ, S.L.; LUPIEN, P.J.; JONES, P.H.; HABER, H.E.; BLACK, D.M. Reduction of LDL-cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin in new HMG-CoA reductase inhibitor. **Arterioscler. Thromb. Vascular. Biol.**, Dallas, v.15, p.678-682, 1995.
- NESTEL, P.; SIMONS, L.; BARTER, P.; CLIFTON, P.; COLQUHOUN, D.; HAMILTON-CRAIG, I. A comparative study of the efficacy of simvastatin and gemfibrozil in combined hyperlipoproteinemia: prediction of response by baseline lipids, apo E genotype, lipoprotein (a) and insulin. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.129, p.231-239, 1997.
- NEWCOMB, P.A.; STORER, B.E. Postmenopausal hormone use and risk of large-bowel cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.87, n.14, p.1067-1071, 1995.
- NIMPF, J.; SCHNEIDER, W. J. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1529, p.287-298, 2000.
- O'MALLEY, J.P.; ILLINGWORTH, D.R. The influence of apolipoprotein E phenotype on the response to lovastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Metab. Clin. Exp.**, New York, v.39, p.150-154, 1990.
- ÖDMARK, I.S.; BACKSTROM, T.; HAEGER, M.; JONSSON, B.; BIXO, M. Effects of continuous combined conjugated estrogen/medroxyprogesterone

- acetate and 17-beta estradiol/norethisterone acetate on lipids and lipoproteins. **Maturitas**, Amsterdam, v.48, n.2, 137-146, 2004.
- OLAISEN, B.; TEISBERG, P.; GEDDE-DAHL, T. JR. The locus for apolipoprotein E (apo E) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. **Hum. Genet.**, Berlin, v.62, p.233, 1982.
- ORAM, J.F.; LAWN, R.M. ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.42: p.1173-1179, 2001.
- ORDOVAS, J.M. Gene-diet interaction and plasma lipid responses to dietary intervention. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v.30, n.2, p.68-73, 2002.
- ORDOVAS, J.M.; LOPEZ-MIRANDA, J.; PEREZ-JIMENEZ, F.; RODRIGUEZ, C.; PARKS, J.S.; COLE, T. Effect of apolipoprotein E and A-IV phenotypes on the low density lipoprotein response to HMG-CoA reductase inhibitor therapy. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.113, p.157-166, 1995.
- ORDOVAS, J.M.; MOOSER, V. The APOE locus and the pharmacogenetics of lipid response. **Curr. Opin. Lipidol.**, London, v.13, n.2, p.113-117, 2002.
- ORDOVAS, J.M.; SCHAEFER, E.J. Treatment of dyslipidemia: genetic interactions with diet and drug therapy. **Curr. Atheroscler. Rep.**, Philadelphia, v.1, n.1, p.16-23, 1999.
- OTTA, M.I.; CAVALLI, S.A.; HIRATA, R.D.C.; LOTTENBERG, S.; QUINTÃO, E.C.R.; HIRATA, M.H. Apolipoprotein E genotype frequencies in hypercholesterolemic and diabetic individuals. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.42, p.S297. 1996, [Abstract].
- OU, T.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; ARINAMI, T.; AMEMIYA, H.; FUJIWARA, H.; KAWATA, K.; SAITO, M.; KIKUCHI, S.; NOGUCHI, Y.; SUGISHITA, Y.; HAMAGUCHI, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and apolipoprotein E polymorphisms are independent risk factors for coronary heart disease in Japanese: a case-control study. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.137. p.23-28, 1998.

- OZBEY, N.; SENCER, E.; MOLVALILAR, S.; ORHAN, Y. Body fat distribution and cardiovascular disease risk factors in pre- and postmenopausal obese women with similar BMI. **Endocr. J.**, Tokyo, v.49, n.4, p.503-509, 2002.
- PAGANINI-HILL, A. Hormone replacement therapy and stroke: risk, protection or no effect? **Maturitas**. Amsterdam, v.38, n.3, p.243-261, 2001.
- PAGANINI-HILL, A.; DWORSKY, R.; KRAUSS, R.M. Hormone replacement therapy, hormone levels and lipoprotein cholesterol concentration in elderly women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.174, p.897-902, 1996.
- PALLAUD, C.; GUEGUEN, R.; SASS, C.; GROW, M.; CHENG, S.; SIEST, G.; VISVIKIS, S. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.42, n.11, p.1879-1890, 2001.
- PASQUALINI, J.R.; PARIS, J.; SITRUK-WARE, R.; CHETRITE, G.; BOTELLA, J. Progestins and Breast Cancer. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.65, p.225-235, 1998.
- PEDRO-BOTET, J.; SCHAEFER, E.J.; BAKKER-ARKEMA, R.G.; BLACK, D.M.; STEIN, E.M.; CORELLA, D.; ORDOVAS, J.M. Apolipoprotein E genotype affects plasma lipid response to atorvastatin in a gender specific manner. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.158, p.183-193, 2001.
- PEÑA, R.; LAHOZ, C.; MOSTAZA, J.M.; JIMENEZ, J.; SUBIRATS, E.; PINTO, X.; TABOADA, M.; LOPEZ-PASTOR, A. Rap Study Group. Effect of apoE genotype on the hypolipidaemic response to pravastatin in an outpatient setting. **J Intern Med.**, Oxford, v.251, n.6, p.518-525, 2002.
- PINES, A. Hormone therapy and the cardiovascular system. **Maturitas**, Amsterdam, v.43, suppl.1, p.S3-S10, 2002.
- PRENTICE, T. Cardiovascular disease can be halved, World Health Report finds. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v.80, n.11, p.922, 2002.
- QUIGLEY, M.E.T. Estrogen therapy arrests bone loss in elderly women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.156, p.1516-1523, 1987.
- RADER, D.J. Regulation of reverse cholesterol transport and clinical implications. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.92, n.4A, p.42J-49J, 2003.

- RAFFAI, R.L.; LOEB, S.M.; WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.25, n.2, p.436-441, 2005.
- RALL, S.C.; MAHLEY, R.W. The role of apolipoprotein genetic variants in lipoprotein disorders. **J. Intern. Med.**, Oxford, v.231, p.653-659, 1992.
- RALL, S.C.; WEISGRABER, K.H.; MAHLEY, R.W. Human Apolipoprotein E – The complete amino acid sequence. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.257, p.4171-4178, 1982.
- REDDICK, R.L.; ZHANG, S.H.; MAEDA, N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.14, p.141-147, 1994.
- RENSEN, P.C.; VAN BERKEL, T.J. Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.**, v.271 n.25, p.14791-14799, 1996.
- REZNIK, Y.; POUSSE, P.; HERROU, M.; MORELLO, R.; MAHOUEAU, J.; DROSDOWSKY, M.A.; FRADIN, S. Postprandial lipoprotein metabolism in normotriglyceridemic non-insulin-dependent diabetic patients: influence of apolipoprotein E polymorphism. **Metabolism.**, New York, v.45, n.1, p.63-71, 1996.
- RIFAI, N.; JOUBRAN, R.; YU, H.; ASMI, M.; JOUMA, M. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. **Clin Chem.** Baltimore, v.45, n.11, p.1967-1973, 1999.
- RIFAI, N.; KING, M.E. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.32, n.6, p.957-961, 1986.
- ROBERTS, W.C. The rule of 5 and the rule of 7 in lipid-lowering by statin drugs. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.80, p.106-107, 1997.
- ROSANO, G.M.C.; PANINA, G. Oestrogens and the heart. **Therapie.**, Paris, v.54, p. 381-385, 1999.

- ROSE, P.G. Endometrial carcinoma. **N. Eng. J. Med.**, Boston, v.335, p.640-649, 1996.
- ROSENSON, R.S. Myocardial injury: the acute phase response and lipoprotein metabolism. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v.22, n.3, p.933-940, 1993.
- ROSENSON, R.S.; MC CORMICK, A.; URETZ, E.F. Distribution of blood viscosity values and biochemical correlates in healthy adults. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.42, n.8, p.1189-1195, 1996.
- ROSENSON, R.S.; TANGNEY, C.C.; MOSCA, L.J. Hormone replacement therapy improves cardiovascular risk by lowering plasma viscosity in postmenopausal women. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.18, n.12, p.1902-1905, 1998.
- ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**, 2.ed. Boston: PWS Publishers, 1986.
- ROSSOUW, J.E.; ANDERSON, G.L.; PRENTICE, R.L.; LACROIX, A.Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M.L.; JACKSON, R.D.; BERESFORD, S.A.; HOWARD, B.V.; JOHNSON, K.C.; KOTCHEN, J.M.; OCKENE, J.; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA.**, Chicago, v.288, n.3, p.321-333, 2002.
- ROZENBAUM, H. Les Progestatifs. **ESKA**, Paris; 2002.
- SACKS, F.M.; PFEFFER, M.A.; MOYE, L.A.; ROULEAU, J.L.; RUTHERFORD, J.D.; COLE, T.G.; BROWN, L.; WARNICA, J.W.; ARNOLD, J.M.; WUN, C.C.; DAVIS, B.R.; BRAUNWALD, E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.335, p.1001-1009, 1996.
- SAKAI, M.; KOBORI, S.; MATSUMURA, T.; BIWA, T.; SATO, Y.; TAKEMURA, T.; HAKAMATA, H.; HORIUCHI, S.; SHICHIRI, M. HMG-CoA reductase

- inhibitors suppress macrophage growth induced by oxidized low density lipoprotein. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.133, p.51-59, 1997.
- SALAMONE, L.M.; CAULEY, J.A.; ZMUDA, J.; PASAGIAN-MACAULAY, A.; EPSTEIN, R.S.; FERRELL, R.E.; BLACK, D.M.; KULLER, L.H. Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Bone Loss: Estrogen Status Modifies the Influence of Apolipoprotein E on Bone Loss. **J Bone Miner Res.**, New York, v.15, n.2, p. 308-314, 2000.
- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and criopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.44, n.8, p.1748-1750, 1998.
- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; GIANNINI, S.D.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; LIMA, T.M.; HIRATA, R.D.C. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.300, p.139-149, 2000b.
- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Otimização da técnica de RT-PCR para avaliação gênica do receptor de LDL em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com medicamentos hipolipemiantes. **Rev. bras. anal. clín.**, Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.195-199 2000a.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual** 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York p.E10-E14, 2001.
- SCHAEFER, E.J.; LAMON-FAVA, S.; JOHNSON, S.; ORDOVAS, J.M.; SCHAEFER, M.M.; CASTELLI, W.P.; WILSON, P.W.F. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins levels - Results from the Framingham Offspring Study. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.14, p.1105-1113, 1994.

- SCHINDLER, A.E.; CAMPAGNOLI, C.; DRUCKMANN, R.; HUBER, J.; PASQUALINI, J.R.; SCHWEPPE, K.W. Progestins: present and future. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.**, Oxford, v.59, p.357-363, 1996.
- SCHINDLER, A.E.; CAMPAGNOLI, C.; DRUCKMANN, R.; HUBER, J.; PASQUALINI, J.R.; SCHWEPPE, K.W.; THIJSEN, JOS H.H. Classification and pharmacology of progestins. **Maturitas**, Amsterdam, v.46, Supl.1 p.S7-S16, 2003.
- SCHOEN, F.J.; COTRAN, R.S. **Patologia Estrutural e Funcional**, 5^a ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., p.418-419, 1996.
- SCHWANKE, C.H.A.; DA CRUZ, I.B.M.; LEAL, N.F.; SCHEIBE, R.; MORIGUCHI, Y.; MORIGUCHI, E.H. Analysis of the Association Between Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Risk Factors in an Elderly Population with Longevity. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v.78, n.6, p.571-579, 2002.
- SCOTT, L.J.; CURRAN, M.P.; FIGGITT, D.P. Rosuvastatin: a review of its use in the management of dyslipidemia. **Am. J. Cardiovasc. Drugs.**, Auckland, v.4, n.2, p.117-138, 2004.
- SHAPIRO, S.; KELLY, J.P.; ROSENBERG, L.; KAUFMAN, D.W.; HELMRICH, S.P.; ROSENSHEIN, N.B.; LEWIS, J.L. JR.; KNAPP, R.C.; STOLLEY, P.D.; SCHOTTENFELD, D. Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens. **N. Eng. J. Med.**, Boston, v.313, p.969-972, 1985.
- SHEPHERD, J.; COBBE, S.M.; FORD, I.; ISLES, C.G.; LORIMER, A.R.; MCFARLANE, P.W.; MCKILLOP, J.H.; PACKARD, C.J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.333, p.1301-1307, 1995.
- SHI, M.M.; BLEAVINS, M.R.; DE LA IGLESIA, F.A. Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials. **Drug. Metab. Dispos.**, Bethesda, v.4, p.591-595, 2001.

- SHIMANO, H.; OHSUGA, J.; SHIMADA, M.; NAMBA, Y.; GOTODA, T.; HARADA, K.; KATSUKI, M.; YAZAKI, Y.; YAMADA, N. Inhibition of diet-induced atheroma formation in transgenic mice expressing apolipoprotein E in the arterial wall. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.95, p.469-476, 1995.
- SHIRAKI, M.; SHIRAKI, Y.; AOKI, C.; HOSOI, T.; INOUE, S.; KANEKI, M.; OUCHI, Y. Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v.12, n.9, p.1438-1445, 1997.
- SHULMAN, L.P. Effects of progestins in different hormone replacement therapy formulations on estrogen-induced lipid changes in postmenopausal women. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.89, n.12A, p.47E-54E, 2002.
- SIEST, G.; BERTRAND, P.; HERBERTH, B.; VINCENT-VIRY, M.; SCHIELE, F.; SASS, C.; VISVIKS, S. Apolipoprotein E polymorphisms and concentration in chronic diseases and drug responses. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v.38, n.9, p.841-852, 2000a.
- SIEST, G.; FERRARI, L.; ACCAOUI, M.J.; BATT, A.M.; VISVIKIS, S. Pharmacogenomics of drugs affecting the cardiovascular system. **Clin Chem Lab Med.**, Berlin, v.41, n.4, p.590-599, 2003.
- SIEST, G.; PILLOT, T.; REGIS-BAILLY, A.; LEININGER-MULLER, B.; STEINMETZ, J.; GALTEAU, M.M.; VISVIKIS, S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.41, p.1068-1086, 1995.
- SIEST, G.; SCHLENCK, A.; VINCENT-VIRY, M.; SCHIELE, F.; VISVIKS, S. Apolipoprotein E: laboratory determinations and clinical interest. In: Rifai, N.; Warnik, G.R.; Dominiczack, M.H. editors. Handbook of lipoprotein testing. Washington D.C.: **AACC Press.**, v.19, p.401-440, 2000b.
- SIEST, G.; VISVIKS, S.; LUCOTTE, G.; JEANDEL, C. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. **The Fats of Life**, v.7, p.8-9, 1994.
- SING, C.F.; DAVIGNON, J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. **Am. J. Hum. Genet.**, Baltimore, v.37, p.268-285, 1985.

- SITRUK-WARE, R. Progestins in hormonal replacement therapy: new molecules. Risks and Benefits. **Menopause**, New York, v.9, p.6-15, 2002.
- SITRUK-WARE, R.; MICHELLE, D.R. **Progestins and antiprogestins in clinical practice**. New York: Marcel Decker; 2000.
- SLATER, E.E.; MAC DONALD, J.S. Mechanism of action and biological profile of HMG-CoA reductase inhibitors: a new therapeutic alternative. **Drugs**, New York, v.36, suppl.3, p.72-82, 1988.
- SMITH, J.D.; MIYATA, M.; GINSBERG, M.; GRIGAUX, C.; SHMOOKLER, E.; PLUMP, A.S. Cyclic AMP induces apolipoprotein E binding activity and promotes cholesterol efflux from a macrophage cell line to apolipoprotein acceptors. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.271, p.30647-30655, 1996.
- SOMA, M.R.; OSWAGO, I.; PAOLETTI, R.; FUMAGALLI, R.; MORRISETT, J.D.; MESCHIA, M.; CROSIGNANI, P. The lowering of lipoprotein(a) induced by estrogen plus progesterone replacement therapy in postmenopausal women. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.153, p.1402-1408, 1993.
- SOMEKAWA, Y.; UMEKI, H.; KOBAYASHI, K.; TOMURA, S.; ASO, T.; HAMAGUCHI, H. Effects of hormone replacement therapy and hepatic lipase polymorphism on serum lipid profiles in postmenopausal Japanese women. **J Clin Endocrinol Metab**. Springfield, v.87, n.10, p.4766-4770, 2002.
- SOMEKAWA, Y.; WAKABAYASHI, A. Relationship between apolipoprotein E polymorphism, menopausal symptoms and serum-lipids during hormone replacement therapy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v.79, p.185-191, 1998.
- SONE, H.; SHIMANO, H.; SHU, M.; NAKAKUKI, M.; TAKAHASHI, A.; SAKAI, M.; SAKAMOTO, Y.; YOKOO, T.; MATSUZAKA, K.; OKAZAKI, H.; NAKAGAWA, Y.; IIDA, K.T.; SUZUKI, H.; TOYOSHIMA, H.; HORIUCHI, S.; YAMADA, N. Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.316, n.3, p.790-794, 2004.

- SPRENGERS, E.D.; KLUFT, C. Plasminogen activator inhibitors. **Blood**, New York, v.69, p.381-387, 1987.
- STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of epidemiological evidence. **Preventive Medicine**, New York, v.20, p.47-63, 1991.
- STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C. MANSON, J.E.; ROSNER, B.; SPEIZER, F.E.; HENNEKENS, C.H. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.325, p.756-762, 1991.
- STENGARD, J.H.; ZERBA, K.E.; PEKKANEN, J.; EHNHOLM, C.; NISSINEN, A.; SING, C.F. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in longitudinal study of elderly finnish men. **Circulation**, Dallas, v.91, p.265-269, 1995.
- STENGARD, J.H.; PEKKANEN, J.; EHNHOLM, C.; NISSINEN, A.; SING, C.F. Genotypes with the apolipoprotein epsilon4 allele are predictors of coronary heart disease mortality in a longitudinal study of elderly finnish men. **Hum. Genet.**, Berlin, v.97, p.677-684, 1996.
- STERN, M.; HAFFNER, S. Body fat distribution and hyperinsulinaemia as risk factor for diabetes and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis**, Dallas, v.6, p.123-130, 1986.
- STERN, R.H.; YANG, B.B.; HOUNSLOW, N.J.; MACMAHON, M.; ABEL, R.B.; OLSON, S.C. Pharmacodynamics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v.40, n.6, p.616-623, 2000.
- STEVENSON, J.C. Pathogenesis, prevention and treatment of osteoporosis. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.75, p.36S-41S, 1990.
- STEVENSON, J.; CROOK, D.; GODSLAND, O. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.98, p.83-90, 1993.

- STRONG, J.P. The natural history of atherosclerosis in childhood. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.623, p.9, 1991.
- SUBBIAH, M.T. Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.35, n.3, p.271-276, 2002.
- SUBBIAH, M.T. Mechanisms of cardioprotection by estrogens. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v.217, p.23-29, 1998.
- SUBBIAH, M.T.; ABPLANALP, W. Evidence of increased formation of products retaining strong antioxidant activity from estradiol-17beta oxidation in the presence of human plasma lipoproteins. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v.139, n.6, p.357-363, 2002.
- SULISTIYANI, R.W. ST.CLAIR. Effect of 17-beta-estradiol on metabolism of acetylated low-density lipoprotein by THP-1 macrophages in culture. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.17, n.9, p.1691-1700, 1997.
- SULLIVAN, J.M.; VANDER ZWAAG, R.; HUGHES, J.P.; MADDOCK, V.; KROETZ, F.W.; RAMANATHAN, K.B.; MIRVIS, D.M. Estrogen replacement and coronary artery disease: Effect on survival in postmenopausal women. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.150, p.2557-2562, 1990.
- TABAS, I. The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. **Curr. Opin. Lipidol.**, London, v.6, p.260-268, 1995.
- TAKAHASHI, S.; SAKAI, J.; FUJINO, T.; HATTORI, H.; ZENIMARU, Y.; SUZUKI, J.; MIYAMORI, I.; YAMAMOTO T.T. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. **J Atheroscler Thromb.**, Tokyo, v.11, n.4, p.200-208, 2004.
- TAKAHASHI, S.; SAKAI, J.; FUJINO, T.; MIYAMORI, I.; YAMAMOTO, T.T. The very low density lipoprotein (VLDL) receptor - a peripheral lipoprotein receptor for remnant lipoproteins into fatty acid active tissues. **Mol Cell Biochem.**, The Hague, v.248, n.1-2, p.121-127, 2003.

- TAMMI, A.; RONNEMAA, T.; VIIKARI, J.; JOKINEN, E.; LAPINLEIMU, H.; EHNHOLM, C.; SIMELL, O. Apolipoprotein E4 phenotype increases non-fasting serum triglyceride concentration in infants - the STRIP study. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.152, n.1, p.135-141, 2000.
- TEEDE, H.J.; MCGRATH, B.P.; SMOLICH, J.J.; MALAN, E.; KOTSOPOULOS, D.; LIANG, Y.L.; PEVERILL, R.E. Post-menopausal hormone replacement therapy increases both coagulation activity and fibrinolysis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.20, p.1404-1409, 2000.
- TEMPFER, C.B.; RIENER, E.K.; HEFLER, L.A.; HUBER, J.C.; MUENDLEIN, A. DNA microarray-based analysis of single nucleotide polymorphisms may be useful for assessing the risks and benefits of hormone therapy. **Fertil. Steril.**, New York, v.82, n.1, p.132-137, 2004.
- THE SCANDINAVIAN SIMVASTATINE SURVIVAL STUDY. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. **Lancet**, London, v.344, p.1383-1389, 1994.
- THE WRITING GROUP FOR THE PEPI TRIAL. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women: the postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. **JAMA**, Chicago, v.273, p.199-208, 1995.
- TIKKANEN, M.J. The menopause and hormone replacement therapy: lipids, lipoproteins coagulation and fibrinolytic factors. **Maturitas**, Amsterdam, v.23, p.209-216, 1996.
- TIKKANEN, M.J.; NIKKILÄ, E.; KUUSI, T.; SIPINEN, S.U. High density lipoprotein -2 and hepatic lipase: Reciprocal changes produced by estrogen and norgestrel. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.54, p.1113-1117, 1982.
- TIRET, L.; DE KNIJFF, P.; MENZEL, H-J.; EHNHOLM, C.; NICAUD, V.; HAVEKES, L.M. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.14, p.1617-1624, 1994.

- TOKUNAGA, K.; NAKAMURA, Y.; SAKATA, K.; FUJIMORI, K.; OHKUBO, M.; SAWADA, K.; SAKLYAMA, S. Enhanced expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancer. **Cancer Res.**, Chicago, v.47, p.5616-5619, 1987.
- TOLOSA, M.; PEIRÓ, S.; REAL, J.T.; CANO, A.; ASCASO, J.F.; CARMENA, R. The influence of apo E phenotypes on the plasma triglycerides response to hormonal replacement therapy during the menopause. **Maturitas**, Amsterdam, v.40, p.173-181, 2001.
- TSUDA, M.; SANADA, M.; NAKAGAWA, H.; KODAMA, I.; SAKASHITA, T.; OHAMA, K. Phenotype of apolipoprotein E influences the lipid metabolic response of menopausal women to hormone replacement therapy. **Maturitas**, Amsterdam, v.38, p.297-304, 2001.
- U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE - CLINICAL GUIDELINES. Postmenopausal hormone replacement therapy for primary prevention of chronic conditions: recommendations and rationale. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.137, p.834-839, 2002.
- UTERMANN, G. Genetic polymorphism of apolipoprotein E-impact on plasma lipoprotein metabolism. **Diabetes, Obesity and Hyperlipidemias** – III ed. Crepaldi, G.; Tiengo, A.; Baggio, G.; p.1-28. Elsevier Science, Amsterdam, 1985.
- UTERMANN, G.; KINDERMANN, I.; KAFFARNIK, H.; STEINMETZ, A. Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. **Hum. Genet.**, Berlin, v.65, p.232-236, 1984.
- UTERMANN, G.; STEINMETZ, A.; WEBER, W. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. **Hum. Genet.**, Berlin, v.60, p.344-351, 1982.
- VAN DIJK, K.W.; VAN VLIJMEN, B.J.M.; VAN'T HOF, H.B.; VAN DER ZEE, A.; SANTAMARINA-FOJO, S.; VAN BERKEL, T.J.; HAVEKES, L.M.; HOFKER, M.H. In LDL receptor-deficient mice, catabolism of remnant lipoproteins

- requires a high level of apo E but is inhibited by excess apo E. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.40, p.336-344, 1999.
- VARMA, T.R. Effect of long-term therapy with estrogen and progesterone on the endometrium of postmenopausal women. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, Copenhagen, v.64, p.41-46, 1985.
- VON ECKARDSTEIN, A. Cholesterol efflux from macrophages and other cells. **Curr. Opin. Lipidol.**, London, v.7, n.5, p.308-319, 1996.
- WALSH, B.W.; PAUL, S.; WILD, R.A.; DEAN, R.A.; TRACY, R.P.; COX, D.A.; ANDERSON, P.W. The effects of hormone replacement therapy and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v.85, p.214-218, 2000.
- WALSH, B.W.; SACKS, F.M. Effects of low dose oral contraceptives on very low density and low density lipoprotein metabolism. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.91, p.2126-2132, 1993.
- WALSH, B.W.; SCHIFF, I.; ROSNER, B.; GEENBERG, L.; RAVNIKAR, V.; SACKS, F.M. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.325, p.1196-1204, 1991.
- WANG, Y.X.; MARTIN-MCNULTY, B.; LY, H.; DA CUNHA, V.; POST, J.; HINCHMAN, J.; VERGONA, R.; SULLIVAN, M.E.; DOLE, W.; KAUSER, K. Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on the presence of apolipoprotein E. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.162, n.1, p.23-31, 2002.
- WEBER, N., WENDEL H.P., ZIEMER, G. Gene monitoring of surface-activated monocytes in circulating whole blood using duplex RT-PCR. **J. Biomed. Mater.**, Hoboken, N.J., v. 56, p.1-8, 2001.
- WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E: structure-function relationships. **Adv. Protein Chem.**, New York, v.45, p.249-302, 1994.
- WEISGRABER, K.H.; INNERARITY, T.L.; MAHLEY, R.W. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine

- interchange at a single site. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.257, p.2518-2521, 1982.
- WEISGRABER, K.H.; MAHLEY, R.W. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. **FASEB J.**, Bethesda, v.10, p.1485-1494, 1996.
- WETTERAU, J.R.; AGGERBECK, L.P.; RALL, S.C. JR.; WEISGRABER, K.H. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. Evidence for two structural domains. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.263, p.6240-6248, 1988.
- WHITEHEAD, M.I.; HILLARD, T.C.; CROOK, D. The role and use of progestogens. **Obstet. Gynecol.**, New York, v.75, p.S59-S76, 1990.
- WHITEHEAD, M.; LOBO, R.A. Consensus conference: progestagen use in postmenopausal women. **Lancet**, London, v.2, p.1243-1244, 1988.
- WILLIAMS, C.L.; STANCEL, G.M. Estrogens and progestins. In: Hardman, J.G.; Gilman, A.G.; Limbird, L.E. (Eds.), **Goodman and Gilman's-the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, p.1411-1440, 1995.
- WILLIS, D.B.; CALLE, E.E.; MIRACLE-MCMAHILL, H.L.; HEATH, JR. CW. Estrogen replacement therapy and risk of fatal breast cancer in a prospective cohort of postmenopausal women in the United States. **Cancer Causes Control.**, Oxford, v.7, p.449-457, 1996.
- WILSON, C.; MAU, T.; WEISGRABER, K.H.; WARDELL, M.R.; MAHLEY, R.W.; AGARD, D.A. Salt bridge relay triggers defective LDL receptor binding by a mutant apolipoprotein. **Structure**, London, v.2, p.713-718, 1994a.
- WILSON, C.; WARDELL, M.R.; WEISGRABER, K.H.; MAHLEY, R.W.; AGARD, D.A. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. **Science**, Washington, v.252, p.1817-1822, 1994b.
- WONG, J.; QUINN, C.M.; BROWN, A.J. Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver x receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, Dallas, v.12, n.2365-2371, 2004.

- WRITING GROUP FOR THE PEPI TRIAL. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. **JAMA**, Chicago, v.273, p.199-208, 1995.
- XU, C.F.; TALMUS, P.J.; ANGELICO, F.; DELBEN, M.; SAVILL, J.; HUMPHRIES, S.E. Apolipoprotein E polymorphism and plasma lipid, lipoprotein levels in Italian children. **Genet. Epidemiol.**, New York, v.8, p.389-398, 1991.
- YAMADA, N.; INOUE, I.; KAWAMURA, M.; HARADA, K.; WATANABE, Y.; SHIMANO, H.; GOTODA, T.; SHIMADA, M.; KOHZAKI, K.; TSUKADA, T. Apolipoprotein E prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.89, n.2, p.706-711, 1992.
- YAMAMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; SAKAI, J.; KAWARABAYASI, Y. The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE. **Trends Cardiovasc. Med.**, New York, v.3, p.144, 1993.
- YAMATO, K.; TAMASAWA, N.; MURAKAMI, H.; GUAN, J.Z.; TANABE, J.; MATSUI, J.; SUDA, T.; YASUJIMA, M. Quantitative analysis of apolipoprotein E secretion by human monocyte-derived macrophages in culture. **Tohoku J. Exp. Med.**, Sendai, v.201, n.1, p.47-54, 2003.
- YARNELL, J.W.; BAKER, I.A.; SWEETNAM, P.M.; BAINTON, D.; O'BRIEN, J.R.; WHITEHEAD, P.J.; ELWOOD, P.C. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. **Circulation**, Dallas, v.83, n.3, p.836-844, 1991.
- YEN, F.T.; MANN, C.J.; GUERMANI, L.M.; HANNOUCHE, N.F.; HUBERT, N.; HORNICK, C.A.; BORDEAU, V.N.; AGNANI, G.; BIHAIN, B.E. Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and

- the LDL-receptor-related protein. **Biochemistry**, Washington, v.33, p.1172-1180, 1994.
- YLIKORKALA, O.; LIM, P.; CAUBEL, P. Effects on serum lipid profiles of continuous 17-estradiol, intermittent norgestimate regimens versus continuous combined 17-estradiol/norethisterone acetate hormone replacement therapy. **Clin. Ther.**, Princeton, v.5, p.622-636, 2000.
- ZANNIS, V.I.; KAN, H.Y.; KRITIS, A.; ZANNI, E.; KARDASSIS, D. Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. **Front. Biosci.**, Tampa, v.6, p.D456-504, 2001.
- ZANNIS, V.I.; BRESLOW, J.L. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. **Biochemistry**, Washington, v.20, p.1033-1041, 1981.
- ZANNIS, V.I.; BRESLOW, J.L.; UTERMANN, G.; MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.H.; HAVEL, R.J.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; SCHONFELD, G.; HAZZARD, W.R.; BLUM, C. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. **J. Lipid Res.**, Memphis, v.23, p.911-914, 1982.
- ZANNIS, V.I.; VAN DER SPEK, J.; SILVERMAN, D. Intracellular modifications of human apolipoprotein E. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.261, p.13415-13421, 1986.
- ZHANG, W-Y.; GAYNOR, P.M.; KRUTH, H.S. Apolipoprotein E produced by human monocyte-derived macrophages mediates cholesterol efflux that occurs in the absence of added cholesterol acceptors. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.271, p.28641-28646, 1996.
- ZIEL, H.K.; FINKLE, W.D. Increased risk of endometrial cancer among users of conjugated estrogens. **N. Eng. J. Med.**, Boston, v.293, p.1167-1170, 1975.

ZOFKOVA, I.; ZAJICKOVA, K.; HILL, M.; HORINEK, A. Apolipoprotein E gene determines serum testosterone and dehydroepiandrosterone levels in postmenopausal women. **Eur J Endocrinol.**, Bristol, v.147, n.4, p.503-506, 2002.

8. ANEXOS