

**KÁTIA FRANCO QUARESMA DE MOURA**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE INTERLEUCINA 6,  
GST E DO GENE DOS RECEPTORES DE PROGESTERONA  
RELACIONADOS À OSTEOPOROSE APÓS A MENOPAUSA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção de Título de  
Mestre em Ciências

**São Paulo**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**KÁTIA FRANCO QUARESMA DE MOURA**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE INTERLEUCINA 6,  
GST E DO GENE DOS RECEPTORES DE PROGESTERONA  
RELACIONADOS À OSTEOPOROSE APÓS A MENOPAUSA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção de Título de  
Mestre em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Mauro Abi Haidar

**Co-orientador:** Prof. Dr. Ismael Dale C. G. da Silva

Dra. Ana Maria Massad Costa

Dr. Ivaldo da Silva

**São Paulo**

**2006**

Moura, Kátia Franco Quaresma de

**Análise do polimorfismo de interleucina 6, GST e do gene dos receptores de progesterona relacionados à osteoporose após a menopausa.** / Kátia Franco Quaresma de Moura. -- São Paulo, 2006.

ix, 50f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: Analysis of the relationship between post-menopause osteoporosis and interleucin-6, GST and progesterone receptor gene polymorphisms.

1. Polimorfismo (genética). 2. Interleucina-6. 3. Glutathione transferase. 4. Progesterona. 5. Osteoporose pós-menopausa.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA**

**Chefe do Departamento**

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

**Coordenador do Curso de Pós-graduação**

Prof. Dr. Vilmon de Freitas

## Dedicatória

*Aos meus pais, Nelson e Claudette,  
alicerces da minha formação, cujos exemplos mostram-me que, com  
determinação e amor pelo que fazemos, podemos atingir todas as nossas metas.*

*Ao meu marido Mário, ao lado de quem,  
com amor e companheirismo, estou realizando os meus maiores sonhos.*

*Aos meus filhos, Gustavo e Guilherme,  
sentido maior da minha vida, a quem dedico todos os meus dias.*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Mauro Abi Haidar, que tornou possível a realização desse trabalho, pelo apoio incansável, incentivo constante e amizade. Tenho muito orgulho de tê-lo como meu orientador.

Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, pela atenção com que me recebeu no laboratório de biologia molecular e pelo auxílio inestimável durante a execução desta tese.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, agradeço seus ensinamentos e suas correções.

À Naiara Corrêa Nogueira de Souza, com quem aprendi muito.

Ao Dr. José Maria Soares Júnior, pela ajuda constante.

À Dra. Ana Maria Massad Costa, por ter me incentivado a desenvolver esta tese.

A Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, a qual devo minha gratidão por todos os ensinamentos aqui adquiridos.

Aos colegas do laboratório de Ginecologia molecular que tanto me ajudaram: Cristina Valleta de Carvalho e Paulo D'Amora.

Aos colegas do Ambulatório do Climatério: Maria Cecília dos Santos, Maria de Lourdes Senna Moura, Cristina Barbosa e Rosimeire de Paula, pelo carinho e ajuda.

A todas as pacientes que permitiram a concretização deste trabalho.

À amiga, Carla Gimenez Gonçalves, pós-graduanda do Setor de Climatério, pela amizade desde o início desta tese.

À secretária da Pós-graduação do Departamento de Ginecologia da Unifesp-EPM, Karin Santos Martins, pelo apoio e atenção.

À funcionária do Departamento de Ginecologia da Unifesp-EPM, Valéria Miranda dos Santos Medina, sempre pronta para me auxiliar.

Ao meu marido Mário, por mais uma vez, ter sido fundamental no auxílio na área de informática e inglês.

## Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Resumo.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. PROPOSIÇÃO.....	15
3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	17
3.1 Casuística.....	18
3.2 Métodos.....	19
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	36
7. ANEXOS.....	38
8. REFERÊNCIAS.....	42
Abstract	

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> –	Estrutura de um nucleotídeo.....	5
<b>Figura 2</b> –	Estrutura das bandas do cromossomo 7 destacando em cinza a localização da interleucina 6.....	7
<b>Figura 3</b> –	Estrutura das bandas do cromossomo 11 destacando em cinza a localização do gene do receptor de progesterona.....	9
<b>Figura 4</b> –	Polimorfismo PROGINS – constituído por uma inserção Alu no gene do receptor de progesterona.....	10
<b>Figura 5</b> –	Representação esquemática das enzimas envolvidas na biossíntese e no metabolismo do estradiol, bem como dos produtos formados .....	13
<b>Figura 6</b> –	Padrão de bandas do cromossomo 1, evidenciando a localização do gene GSTM1.....	13
<b>Figura 7</b> –	Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR amplificados a partir do gene de interleucina 6. Na coluna M temos o marcador com peso molecular 100Bp; GG representam amostras com o IL-6 homozigoto selvagem (226pb); GC representam amostras com o IL-6 heterozigoto (226, 117, 109pb) .....	21
<b>Figura 8</b> –	Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR amplificados a partir do gene dos receptores de progesterona. Na coluna M temos o marcador de peso molecular 100 pb. P1/P1 representam os alelos selvagens = amostra com PROGINS homozigoto selvagem (149pb); P1/P2 = amostra com o PROGINS heterozigoto, com a presença de ambos os alelos (455, 149pb).....	22
<b>Figura 9</b> –	Gel de agarose a 2 %, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR amplificados a partir do gene GSTM1. Na coluna M temos o marcador de peso molecular 100Bp; 1/1=amostras com o gene GSTM1 presente (268pb); 0/0= amostras com o GSTM1 nulo.....	24

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar alguns fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento de osteoporose na pós-menopausa. **Casuística e Métodos:** Foram avaliadas 110 mulheres, nos primeiros cinco anos após a menopausa, sem uso de terapia hormonal prévia. O grupo foi analisado quanto à presença de polimorfismo de interleucina 6, GSTM1 do gene do receptor de progesterona, denominado PROGINS. Os dados clínicos foram registrados por meio de entrevistas com as pacientes. Avaliou-se a densitometria óssea de todas as pacientes, feita em aparelho Lunar para análise da densidade mineral óssea e do T escore em coluna lombar (L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub>). As genotipagens de interleucina 6, GSTM1 e PROGINS foram realizadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com DNA proveniente de raspado bucal. Utilizou-se, para análise estatística, o teste não paramétrico de Mann-Whitney ou o teste t de Student, a depender da variável estudada. Para cálculo da razão de chances, ou odds ratio (OR), para a ocorrência da doença, aplicou-se modelo de regressão logística. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) e o intervalo de confiança foi de 95% (95% IC). **Resultados:** A idade média foi de 51,96 anos. Em relação ao polimorfismo de IL6, 58,2% das pacientes eram homozigotas (GG) e 41,8% apresentaram a presença do alelo C (heterozigoto ou GC + homozigoto mutante ou CC). Quanto ao genótipo PROGINS, 58,2% eram negativas (homozigoto selvagem ou P1/P1) e 41,8% eram positivas (heterozigoto ou P1/P2). No que tange ao polimorfismo GSTM1, 72,7% das pacientes mostraram a presença do alelo (1/1) e 27,3% ausência. **Conclusão:** O polimorfismo do gene da IL-6 correlacionou-se com baixa densidade óssea, ao passo que o polimorfismo PROGINS e do gene GSTM1 não se relacionaram com a densidade mineral óssea.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

O real aumento da expectativa de vida nos últimos 60 anos faz com que a mulher permaneça mais de um terço de sua vida no período de transição menopausal e pós-menopausa. Essa maior longevidade trouxe consigo a necessidade de retardar ou mesmo prevenir o aparecimento de doenças crônico-degenerativas, com o intuito de melhorar a qualidade de vida (Bossemeyer et al, 1997).

Como se sabe, a transição menopausal e a pós-menopausa representam o período da vida em que a mulher sofre modificações regressivas, incluindo a falta de ovulação e a deficiência na síntese de estrogênio e de progesterona. Este período tem início após os 40 anos (Rodrigues de Lima, Baracat, 1995).

Para melhor compreendermos a fisiopatologia dessa importante fase da vida é imperioso conhecer a variação do número de folículos ovarianos ao longo da vida da mulher. Na vigésima semana de vida intra-uterina, as gônadas apresentam 6 a 7 milhões de folículos e, ao nascer, os ovários possuem cerca de 1 a 2 milhões; na menacme entre 300.000 e 400.000, sendo que na perimenopausa somente perto de 10 mil folículos ainda podem ser encontrados. Após a menopausa desaparecem por completo; desse modo instala-se primeiro a insuficiência gametocítica e, depois, a insuficiência hormonal (Haidar, 1991).

A transição menopausal constitui, portanto, a transição do período de maior capacidade reprodutiva (menacme) para o não reprodutivo (Utian, 1987).

Conceitua-se, a menopausa, como sendo o último fluxo menstrual após 12 meses de amenorréia. Assim, nada mais representa que um marcador biológico dentro dessa fase da vida da mulher (Rodrigues de Lima et al, 1981).

Nesse período nem sempre há sintomas, o que pode conferir falsa segurança à mulher, a qual acredita estar imune às eventuais alterações metabólicas, algumas delas de evolução silenciosa, em especial as que se instalam sobre o aparelho cardiovascular e o metabolismo ósseo (Bossemeyer et al, 1997).

---

Em resposta a essas necessidades, a terapia hormonal na pós-menopausa pode trazer benefícios, como melhoria dos sintomas vasomotores e da atrofia urogenital, prevenção da perda óssea e melhora do perfil lipídico, entre outros (Hirvonen et al, 1997; Malacara et al, 2003).

Do ponto de vista do metabolismo ósseo, a hormonioterapia parece diminuir a perda de massa óssea nesse período. A osteoporose, caracteriza-se pela deterioração da microarquitetura do osso, com redução da sua massa em níveis insuficientes para a função de sustentação, com ulterior aumento do risco de fratura (Lindsay, 1996; Chung et al, 2003).

Quando a terapia hormonal é analisada sobre o ponto de vista do metabolismo ósseo, torna-se necessário ressaltar que a osteoporose constitui um crescente problema de saúde pública devido à melhoria de condições de saúde dos idosos, medidas de saúde preventiva e subsequente aumento da expectativa de vida. Representa pois, real problema de saúde pública (Consensus Development Conference, 1991; Nordström et al, 2004).

Assim, particularmente nas mulheres que apresentam risco de 40% a 50% de fraturas por osteoporose, causa crescente de mortalidade e dor crônica, sobretudo no mundo ocidental (Chung et al, 2003; Huang et al, 2003; Norström et al, 2004).

É uma doença comum considerada como um resultado de múltiplos fatores genéticos e ambientais (Ota et al, 2001; Chung et al, 2003).

Vários estudos relataram grande número de fatores de risco para fraturas por osteoporose, incluindo idade avançada, fratura prévia, baixa densidade mineral óssea, baixo índice de massa óssea, enfraquecimento da musculatura, terapia com corticosteróide e uso de sedativos, entre outros. Contudo, poucos trabalhos investigaram se fatores genéticos contribuem para a ocorrência de fraturas ósseas (Nordström et al, 2004).

Os dados da literatura mostram que a terapia hormonal na transição menopausal e pós-menopausa confere benefícios variáveis às suas usuárias. Sabe-se que a densidade mineral óssea pode ser influenciada por fatores hormonais, nutricionais, estilo de vida e até mesmo genéticos. O mais importante preditor de fratura é a densidade mineral óssea, a qual é

---

influenciada por fatores genéticos e pelo estilo de vida. Conhecendo os fatores genéticos envolvidos na gênese da osteoporose, ter-se-ia maior embasamento no diagnóstico, prevenção e tratamento desta doença (Chung et al, 2003).

No que se refere aos aspectos genéticos do metabolismo ósseo, vários estudos mostraram ser esta variável um fator relevante a ser considerado (Slemenda et al, 1991; Sowers et al, 1992). Esses autores encontraram evidências que colocam entre 45% e 85% a influência da herança genética como determinante da densidade mineral óssea.

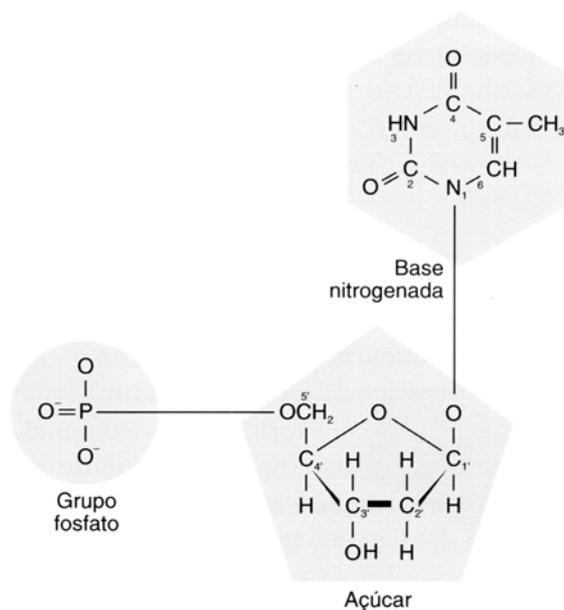
Dessa forma, ao que parece, o componente genético poderia influenciar de maneira significativa a resposta observada em mulheres durante a terapia hormonal (Sowers et al, 1992).

De fato, vários estudos têm demonstrado que alguns dos componentes genéticos, quanto à densidade mineral óssea, podem ser em parte acessados por meio da detecção de determinados polimorfismos na seqüência de vários genes, como aqueles presentes nos receptores de estrogênios, progesterona e vitamina D, osteocalcina, receptor antagonista de interleucina 1(IL1), receptor de calcitonina, interleucina 6(IL6), bem como no gene da lipase hepática (Deng et al, 2002; Herrington et al, 2002; Kobayashi et al, 2002; Yamakawa-Kobayashi 2002; Chung et al, 2003).

## 1.1 Polimorfismos Genômicos

O DNA genômico possui grande número de variações na composição de nucleotídeos entre os indivíduos. Essas variações (polimorfismos) são decorrentes de substituição de nucleotídeos, inserções e deleções de bases, que ocorreram durante milhares de anos ao longo do processo evolutivo humano, podendo ser transmitidos de geração a geração (Figura 1) (Grobstein, 1979; Watson, 1980; Drlica, 1992).

---



**Figura 1** – Estrutura de um nucleotídeo (Farah SB. DNA Segredos e mistérios, 1997).

As substituições de bases nitrogenadas são classificadas em transições e transversões. As substituições do tipo transição ocorrem entre bases derivadas da purina (G-A ou A-G) ou da pirimidina (C-T ou T-C). Estas substituições de bases com as mesmas características físicoquímicas são as mais freqüentes. Por outro lado, as substituições do tipo transversão se fazem entre bases com distintas características físicoquímicas, sendo de ocorrência mais rara (Grobstein, 1979; Watson, 1980; Drlica, 1992).

Quando as substituições ocorrem em regiões codificantes, podem acarretar mudanças na seqüência de aminoácidos da proteína. Conseqüentemente, podem causar alterações funcionais e estruturais significativas nas proteínas (Grobstein, 1979; Watson, 1980; Drlica, 1992).

Contudo, estas substituições podem modificar, por exemplo, a estrutura e a estabilidade do RNAm. Além disso, podem ter efeitos diversos como a eliminação ou geração de códons de terminação, modificações em promotores e regiões de splicing (Thompson, 1988; Majewski e Ott, 2002; Pharoah et al, 2004).

As substituições, inserções ou deleções que são transmitidas ao longo das gerações e que alcançam freqüências iguais ou superiores a um na população, são denominadas de polimorfismo (Kwok e Gu, 1999).

Quando se estuda a correlação entre a presença de polimorfismos gênicos com a densidade mineral óssea, alguns estudos mostraram resultados importantes. De fato, a metanálise realizada por Cooper et al (1996) conclui que pacientes com determinados polimorfismos (*BsmI* ou *TaqI*) no receptor de vitamina D se associam com maior densidade óssea.

Assim, a presença de polimorfismos no receptor de estrogênio vem despertando crescente interesse no tocante à sua associação com a densidade óssea. Importante estudo Finlandês populacional, randomizado, avaliou durante cinco anos um total de 322 mulheres na pós-menopausa, as quais receberam terapia hormonal ou placebo. Os resultados em relação à resposta óssea foram correlacionados com a presença de polimorfismos no gene que codifica o receptor de estrogênio (Salmen et al, 2000).

Os autores concluíram que mulheres com os genótipos *Pvu* PP e *Pvu* Pp apresentam-se como rápidas perdedoras de massa óssea, portanto, se beneficiariam mais com a terapia hormonal que as não tratadas. Outrossim, estudos recentes conduzidos por Kobayashi et al (2002) revelam conclusões semelhantes, no tocante à densidade mineral óssea, ao analisarem outros polimorfismos nesse mesmo receptor.

Outros estudos identificaram a interleucina 6 (IL6) como possível mediador da perda óssea por deficiência de estrogênio (Murray et al, 1997; Ota et al, 2001; Moffett et al, 2004).

Como na literatura há poucos trabalhos que correlacionam interleucina 6 com baixa densidade mineral óssea e não há trabalhos que relacionam o polimorfismo do gene *GSTM1* e *PROGINS* com densidade mineral óssea nos propusemos a desenvolver esta pesquisa.

## **1.2 Polimorfismo da interleucina 6 (IL6)**

As citocinas são glicoproteínas produzidas por uma variedade de células, sobretudo as mononucleares, que agem em nível local e sistêmico, controlando diversos processos de natureza hormonal, imune e inflamatória. Funcionam como mensageiros intercelulares e atuam como um dos principais mediadores da resposta inflamatória (Lowry, 1993).

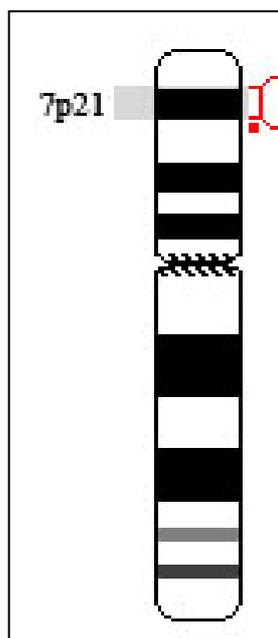
---

As citocinas são produzidas na dependência de estímulo por algum agente, havendo pouca ou nenhuma estocagem nas células produtoras. Depois de liberadas, agem intermediadas por receptores de membrana específicos, modulando a produção e a atividade de outras citocinas, bem como de outras substâncias importantes na resposta inflamatória (Nathan, Sporn, 1991).

Quando pequenas quantidades de citocinas são liberadas nos tecidos, predominam os efeitos benéficos, determinando ativação dos mecanismos de defesa do organismo contra o agente agressor; contudo a produção excessiva desses mediadores pode provocar efeitos maléficos ao organismo (Fahey, Tracey, 1999).

O fator de necrose tumoral alfa e as interleucinas 1 (IL1) e 6 (IL6) são exemplos de citocinas consideradas pró-inflamatórias, as quais, quando em desequilíbrio, podem se relacionar a uma grande gama de condições patológicas (Brasil et al, 1999).

A IL6 é uma glicoproteína fosforilada com 185 aminoácidos e está localizada no cromossomo 7p21; está presente em diferentes processos fisiológicos e patológicos (figura 2) (Asschert et al, 1999; Diehl & Rincon, 2002). A atividade individual das citocinas, entre outras, parece ser regulada pela presença de polimorfismos em sua estrutura. De fato, a troca C-G no nucleotídeo 174, afeta a transcrição desse gene no sentido de diminuir a sua expressão (Fishman et al, 1998).



**Figura 2** – Estrutura das bandas do cromossomo 7 destacando em cinza a localização da interleucina 6

A atividade transcricional do gene da IL6 reflete-se inclusive através de alteração dos seus níveis plasmáticos quando há polimorfismo na região promotora (-174 G/C). A presença do alelo mutante C no gene associa-se a baixos níveis plasmáticos de IL6; no entanto, a presença do alelo selvagem G relacionam-se a níveis plasmáticos elevados desta citocina (Fishman et al, 1998; Hulkonen et al, 2001).

A interleucina 6 é uma citoquina multifuncional essencial para a resposta imunológica, a hematopoiese e a reabsorção óssea. Como ela e seu receptor estimulam o desenvolvimento de osteoclastos e o processo de reabsorção óssea, são considerados como possíveis fatores patogênicos associados com a diminuição da massa óssea, especialmente em mulheres com deficiência de estrogênio (Ota et al, 2001; Chung et al, 2003).

Estimula a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea tanto na presença como na ausência do receptor de IL6. Estudos demonstraram que ocorre aumento dos níveis de IL6 na pós-menopausa em resposta aos níveis decrescentes de estradiol (Nordström et al, 2004).

A IL6 tem sido implicada como um mediador dos efeitos da IL1, um potente estimulador da reabsorção óssea. Estudos clínicos têm mostrado que a expressão RNAm – IL6 no osso, detectado pela reação de PCR, foi encontrada em 95% de pacientes com fratura óssea vertebral em comparação a 50% de pacientes controle na pós-menopausa.

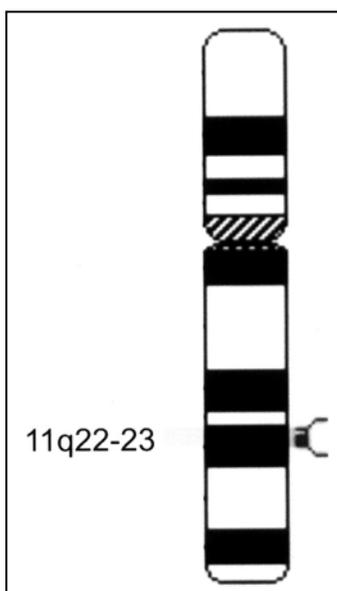
Estudos recentes revelaram a importância do polimorfismo da IL6 na diminuição da densidade mineral óssea, com associação significativa entre a presença deste polimorfismo e a ocorrência de osteoporose (Ferrari et al, 2004; Moffett et al, 2004).

### **1.3 Polimorfismo do gene dos receptores de progesterona (PROGINS)**

A progesterona regula funções biológicas por meio de receptores intracelulares. O gene dos receptores de progesterona em humanos (RP) é

---

único e localiza-se no braço longo do cromossomo 11, nas bandas q22-23 (figura 3) (Rousseau-Merk et al, 1987). O gene do hPR utiliza promotores e sítios de iniciação da tradução diferentes para a síntese de duas isoformas, denominadas RP-A e RP-B, diferenciadas pela adição de 165 aminoácidos presentes apenas no RP-B, em sua forma amino- terminal (Cramer et al, 2003; De Vivo et al, 2003).



**Figura 3** – Estrutura das bandas do cromossomo 11 destacando em cinza a localização do gene do receptor de progesterona (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=607311>)

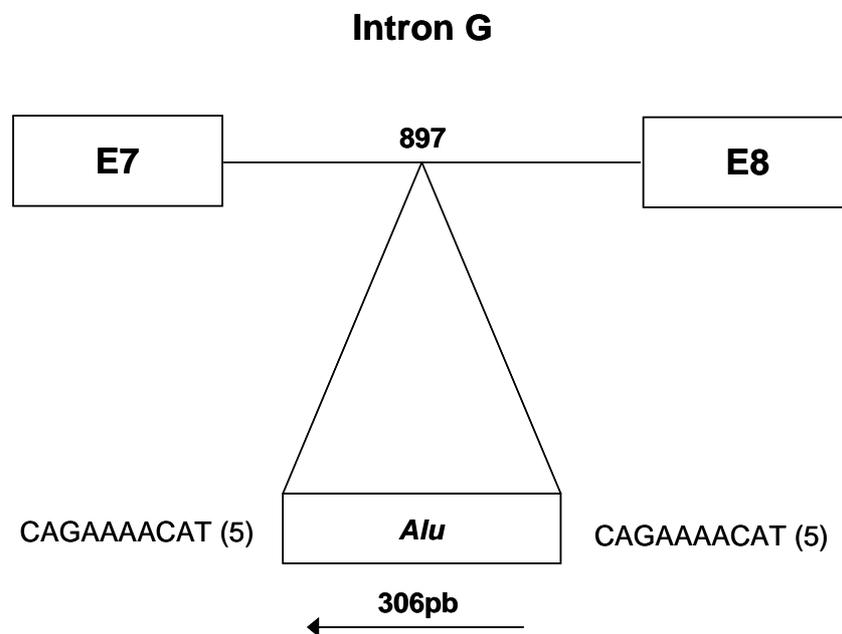
Ressalta-se a importância dos receptores de progesterona na formação dos órgãos reprodutores e a presença de anomalias na sua falta (Lydon et al, 1995). A abundância desses receptores, porém, poderia desequilibrar a quantidade de outros genes reguladores, como proto-oncogenes e genes dos fatores de crescimento (Brandon et al, 1993).

A ação de cada forma dos receptores de progesterona ainda não é totalmente conhecida, e a resposta celular final depende da proporção em que se encontram (Fujimoto et al, 1998).

Recentemente, variações do gene dos receptores de progesterona foram descritas. Dentre elas, destaca-se o polimorfismo PROGINS (figura 4), que consiste em uma inserção da família Alu, de 306 pares de base (pb), no íntron G, entre os éxons 7 e 8 (região codificante do domínio de ligação hormonal), freqüentemente somada a outras duas mutações – substituição de

uma base guanina (G) por timina (T) no éxon 4, levando a troca de um aminoácido valina (Val) por leucina (Leu) no receptor, e substituição de uma base citosina (C) por timina (T) no éxon 5 (Rowe et al, 1995; Tong et al, 2001).

A amplificação de repetições Alu no genoma humano é um processo em andamento. Essas inserções estão espalhadas pelo genoma e representam entre 2% e 5% de todo DNA humano, sendo consideradas como fatores na geração de diversas doenças (Lehrman et al, 1987; Wallace et al, 1991; Britten et al, 1994; Deininger, Batzer, 1999).



**Figura 4** – Polimorfismo PROGINS – constituído por uma inserção Alu no gene do receptor de progesterona.

Muitos elementos das jovens subfamílias Alu foram inseridos tão recentemente no genoma humano que são polimórficos, devido à sua ausência ou presença em diferentes indivíduos (Roy et al, 1999, 2000). Estes possuem um elemento polimórfico de inserção móvel, sendo herdado de um ancestral comum, gerando alelos idênticos para os descendentes (Batzer et al, 1994; Stoneking et al, 1997).

Donaldson et al (2002) estudaram o PROGINS em diferentes espécies de primatas e confirmaram a sua presença apenas em humanos, indicando que a inserção do elemento Alu em nosso genoma ocorreu somente após a divergência de outros primatas, o que deve ter acontecido entre quatro e seis milhões de anos atrás (Batzer et al, 1994). No mesmo estudo, realizou-se reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do PROGINS em 21 diferentes populações humanas. A frequência desse polimorfismo foi maior no grupo grego cipriótico (22%) e menor (zero) em dois grupos africanos, denominados Kung e Nguni, com frequência média do alelo mutante de 11% e índice médio de heterozigose de 18,8% nas populações estudadas, indicando, pela sua baixa frequência, que esse elemento tenha se integrado ao genoma humano em período relativamente recente.

Fabjani et al (2002) verificaram que a isoforma hPRA é a proteína envolvida com o polimorfismo PROGINS, o qual parece conferir decréscimo em sua estabilidade, com perda da sua capacidade de inibir a ativação dos receptores estrogênicos. Isso pode causar inadequado controle desses receptores, favorecendo aumento nos processos de divisão celular. Kieback et al (1998) acreditam que a isoforma hPRA, sob a ação do polimorfismo PROGINS, condicionaria também uma disfunção na atuação da isoforma hPRB.

Freqüências maiores de ocorrência desse polimorfismo têm sido observadas no genoma de pacientes com câncer de mama, de ovário, naquelas com perdas gestacionais recorrentes e até mesmo na endometriose (Rowe et al, 1995; Wieser et al, 2002; Lattuada et al, 2004; Gomes, 2005).

Hsieh et al (2005), em estudo sobre os níveis de prolactina e PROGINS, assim como Westberg et al (2004), sugeriram aumento dos níveis de prolactina na presença do polimorfismo do PROGINS.

Luo et al (2002) relataram ser a progesterona promotora da formação óssea, pois, estimula a proliferação e diferenciação de osteoblastos pelo aumento dos níveis dos fatores de crescimento  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$  nos osteoblastos. O osso é um grande reservatório de TGF- $\beta$ , que estimula a proliferação de osteoblastos e a produção de matriz extracelular como o colágeno. A sua atuação nos osteoclastos é ainda controversa.

---

Não estão disponíveis, até o momento, trabalhos na literatura que relacionam o polimorfismo do receptor de progesterona (PROGINS) com a osteoporose.

Com base nos dados encontrados na literatura, desenvolvemos este estudo com a intenção de avaliar se a presença do polimorfismo da interleucina 6, do GST e do PROGINS está associada com osteoporose em pacientes na pós-menopausa.

#### **1.4 Polimorfismo da superfamília da Glutathione S-transferase (GSTM1)**

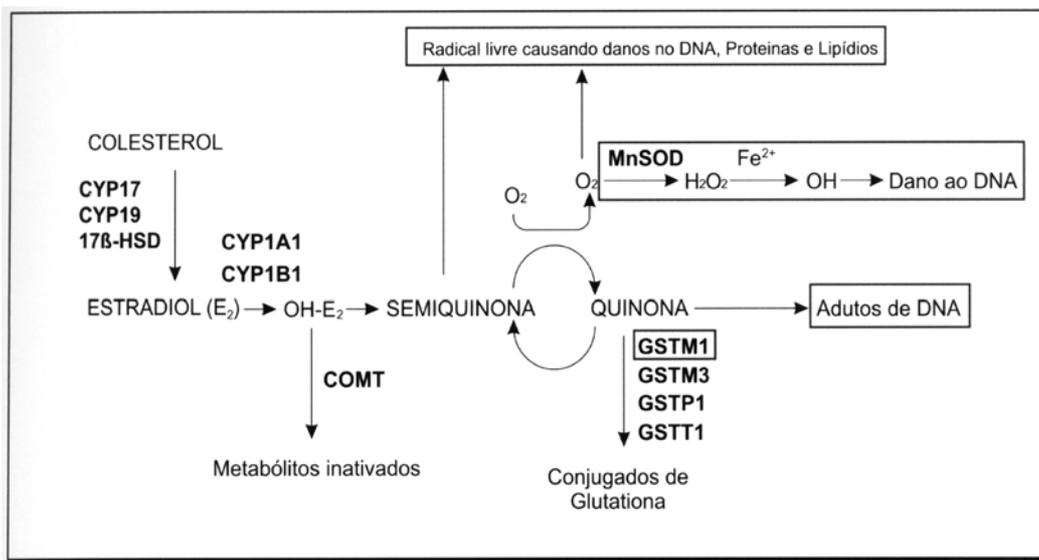
A glutathione (gama-glutamil-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo de ocorrência ubíqua na natureza, sendo encontrada em microorganismos, plantas e animais (Lamaestro, Malone, 1995; Rossini et al, 2002).

As GSTs catalisam a conjugação da glutathione, tripeptídeo composto de glicina, ácido glutâmico e cisteína, em compostos eletrolíticos, resultando em excreção mais fácil das glutathiones conjugadas. Substratos das reações catalisadas pelas GSTs incluem pré-carcinógenos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; drogas farmacológicas, incluindo paracetamol; agentes quimioterápicos e processos decorrentes do estresse oxidativo celular (Rossini et al, 2002).

Recentemente, as GSTs têm sido implicadas como importantes moléculas envolvidas na ativação de genes citoprotetores (Rossini et al, 2002). Outra correlação importante é a sua capacidade de metabolizar por peroxidação, os estrogênios e os lipídios (Figura 5) (Cavalieri et al, 1997).

Os genes das GSTs apresentam polimorfismos que podem ser responsáveis por uma variabilidade interindividual em diversos aspectos relativos ao desenvolvimento de doenças como câncer de pulmão, de pele, de bexiga e de cólon (Mitrunen, Hirvonen, 2003).

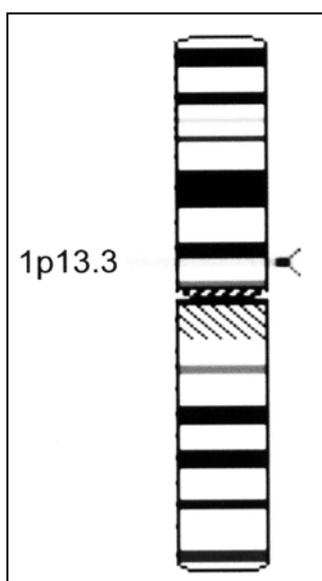
---



**Figura 5** – Representação esquemática das enzimas envolvidas na biossíntese e no metabolismo do estradiol, bem como dos produtos formados (Mitrunen e Hirvonen, 2003).

Os polimorfismos dos genes das GSTs têm sido bem caracterizados e a sua frequência encontra-se relacionada com fatores étnicos (Rossini et al, 2002). Existem três genes principais envolvidos com estes polimorfismos: GSTM1, GSTT1 e GSP1.

Seidgard et al (1999) referem que o GSTM1 é um gene localizado no cromossomo 1p13.3 e que 20% a 50% dos indivíduos não o expressam; são conhecidos como deleção gênica homocigótica ou alelo nulo (Figura 6). A porcentagem de indivíduos que não a expressa é maior entre os caucasianos e asiáticos (Maugard et al, 1998).



**Figura 6** – Padrão de bandas do cromossomo 1, evidenciando a localização do gene GSTM1. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=138350>)

A maioria dos polimorfismos de GST tem sido associados com diferentes suscetibilidades e a várias formas de câncer, em particular aqueles causados pelos efeitos do tabagismo (Strange et al, 1999; Park et al, 2004).

Além disso, vários autores sugerem que os polimorfismos do GSTM1, GSTT1 e GSTP1 se relacionam também à gênese do câncer de mama associada aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (Perera et al, 1995; Cavalieri et al, 1997).

Outros estudos demonstraram que as alterações genéticas relacionadas aos genes responsáveis pela metabolização do estrogênio, como o GSTM1, podem acarretar aumento dos níveis de estrogênios e/ou de catecolestrogênios circulantes, os quais estariam associados com a gênese de doenças estrogênio-dependentes (Huber et al, 2002; Kado et al, 2002; Worda et al, 2003).

Não encontramos, na literatura, trabalhos relacionando polimorfismo GSTM1 com osteoporose.

Assim, embasados nos dados da literatura, desenvolvemos este estudo, com a intenção de avaliar eventuais fatores de risco associados com osteoporose em mulheres na pós-menopausa, com ênfase em algumas características genéticas.

Para tanto, analisaremos os marcadores genéticos que possam prever a resposta à terapia hormonal e, assim, oferecer maiores subsídios para que se realize a hormonioterapia com maior chance de sucesso e menor risco para as mulheres na pós-menopausa.

---

## **2. PROPOSIÇÃO**

---

Propusemo-nos, no presente estudo, a avaliar a presença de polimorfismo de IL6, GST M1 e PROGINS como possíveis fatores relacionados com a ocorrência de osteoporose na pós-menopausa.

---

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---

---

Todas as etapas deste trabalho seguiram as normas de boas práticas em estudos envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e foram aprovadas previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo / Escola Paulista de Medicina (UNIFESP / EPM) (Anexo 1).

### **3.1 Casuística**

As pacientes elegíveis foram selecionadas no Setor de Transição Menopausal e Pós-menopausa da Disciplina de Endocrinologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia da UNIFESP / EPM, entre julho de 2003 e dezembro de 2004. Foram recrutadas pelo pesquisador principal por contato pessoal, e tiveram acesso ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo e assinando o mesmo (Anexo 2). Incluíram-se 110 mulheres na pós-menopausa, baseadas nas queixas clínicas e dosagens hormonais (FSH e estradiol) e na densitometria óssea realizada antes de iniciar a terapia hormonal.

#### **3.1.1 Critérios de Inclusão**

Mulheres com até 5 anos de pós-menopausa, cujos prontuários estivessem completos, com valores de FSH > 35mUI/mL e Estradiol < 20 pg/mL e densitometria óssea realizada antes de terapia hormonal prévia.

#### **3.1.2 Critérios de exclusão**

Pacientes sem densitometria óssea realizada antes do uso da terapia hormonal e usuárias de corticoesteróides.

---

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Coleta de dados clínicos

Realizamos anamnese, com registro dos dados pessoais, como idade, raça, idade da menopausa e medicamentos em uso (corticoesteróides). Em relação aos exames subsidiários necessários, teve importância a densitometria óssea, feita em aparelho Lunar para a avaliação da densidade mineral óssea e do T score em coluna lombar (L2-L4).

### 3.2.2 Coleta de material biológico

Foram coletadas amostras de raspado bucal através de escova do tipo Cytobrush friccionadas contra a mucosa de revestimento bucal, as quais foram colocadas em tubo *falcon* contendo tampão TE (Tris EDTA). As amostras citológicas assim obtidas foram conservadas em -80° C até posterior extração de DNA genômico.

### 3.2.3 Extração de DNA de raspado bucal

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo do Kit GFX® da Amersham-Pharmacia para células bucais.

O material celular, obtido com a escova cytobrush (esfregação bucal), foi inicialmente centrifugado, desprezando-se o excesso de TE. Ao “pellet” celular adicionaram-se 500µl de “Extraction Solution” agitando-se até que todo o pellet estivesse dissolvido. Essa etapa seguiu-se de centrifugação a 14.000 rpm / 1 minuto (Eppendorf modelo 5804 R), com o objetivo de separar restos celulares do sobrenadante, o qual foi colocado na coluna de filtragem. Após nova centrifugação a 14.000 rpm / 1 minuto, uma nova alíquota de 500µl de “Extraction Solution” foi colocada na coluna, com posterior centrifugação a 14.000 rpm / 1 minuto. Seguiu-se, então, a colocação de 500µl de “Wash Solution” com nova centrifugação a 14.000 rpm / 3 minutos. Nesse momento, adicionaram-se à coluna 100µl de água milli-Q autoclavada e pré-aquecida a 70°C, seguida de centrifugação a 14.000 rpm / 1 minuto, coletando-se o eluido em tubo do tipo Eppendorf.

O DNA assim obtido está pronto para ser utilizado em PCR.

---

### 3.2.4 Quantificação de DNA

A análise da quantidade de DNA obtida nas extrações foi feita através de espectrofotometria com comprimento de onda de 260nm de alíquotas do DNA purificado, em equipamento da Spectronic, modelo Genesys 5.

### 3.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a região promotora do gene da Interleucina-6

O polimorfismo da região promotora do gene da IL-6 foi pesquisado usando primers que amplificaram um pequeno fragmento de DNA contendo o sítio polimórfico. As seqüências de primers usadas foram:

Primer	Seqüência (5-3)
IL6 (senso)	5' - ATG CCA AGT GCT GAG TCA CTA - 3'
IL6 (anti-senso)	5' - GGA AAA TCC CAC ATT TGA TA - 3'

Nas reações foram usados 200ng do DNA genômico em um volume final de 25µl de reação contendo: 5pmol/µl de cada primer, 10µl de mix Promega (50UN/ml de Taq DNA polymerase com buffer de reação – pH8,5, 400µM de dATP, 400µM de dCTP, 400µM de dGTP, 400µM de dT e 3mM de MgCl<sub>2</sub>; Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 12µl H<sub>2</sub>O de “nuclease-free” Promega que foram submetidos ao termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) por 40 ciclos, onde a primeira etapa de desnaturação foi de 94°C por 30 segundos, anelamento a 52,8°C, por 30 segundos, e polimerização a 72°C por 45 segundos.

A eletroforese foi feita em gel de agarose 2% / brometo de etídio e o padrão obtido nesta reação foi de 226pb.

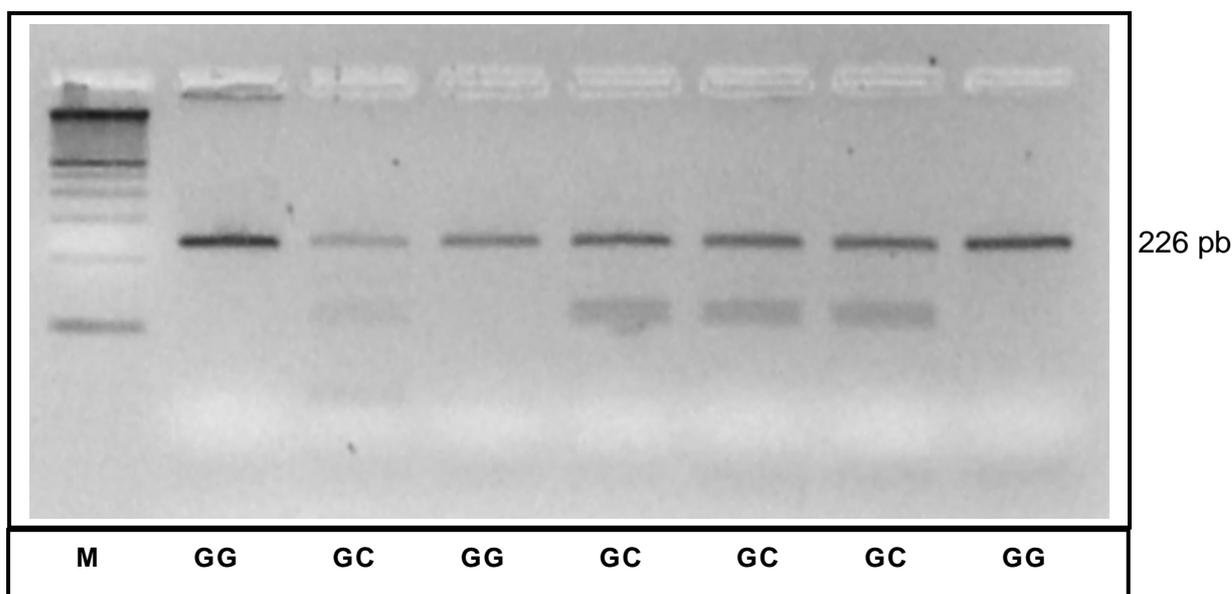
### 3.2.6 Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição – PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Para análise do polimorfismo presente no gene do IL-6, os produtos de PCR foram incubados em um volume final de 10µl a 37°C, por 4 horas, contendo: 3UN NLA III (New England Biolabs, Inc., US), 1µl do “NEBuffer 4”, 0,1µl BSA (Bovine Serum Albumin) e 8µl do produto do PCR (Fishman et al, 1998).

A enzima de restrição NLA III reconhece o seguinte trecho da seqüência do PCR amplificado do gene IL-6:



A eletroforese foi feita em gel de agarose 3% / brometo de etídio. Foram observados os padrões de digestões (Figura 7).



**Figura 7** – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR amplificados a partir do gene de interleucina 6. Na coluna M temos o marcador com peso molecular 100Bp; GG representam amostras com o IL-6 homocigoto selvagem (226pb); GC representam amostras com o IL-6 heterocigoto (226, 117, 109pb).

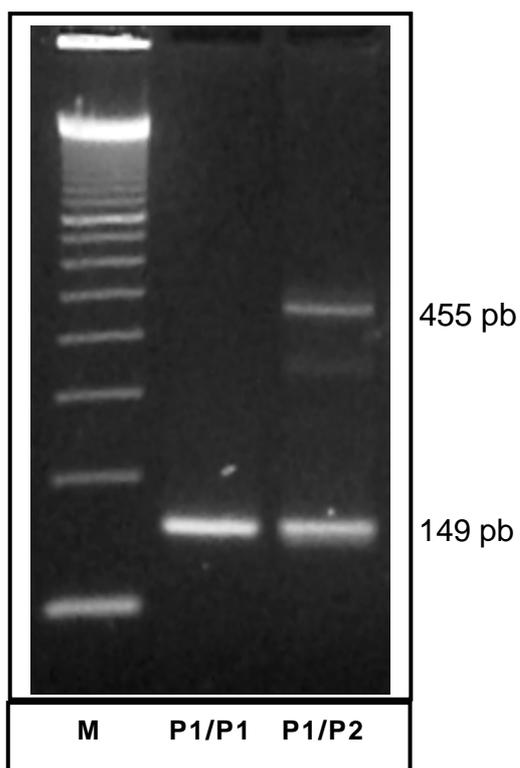
### 3.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o PROGINS

Nas reações de amplificação do gene dos receptores de progesterona foram utilizados os seguintes primers:

Primer	Seqüência (5-3)
PROGINS (senso)	5´ - GGC AGA AAG CAA AAT AAA AAG A - 3´
PROGINS (anti-senso)	5´ - AAA GTA TTT TCT TGC TAA ATG TC - 3´

Nas reações foram usados 200ng do DNA genômico em um volume final de 25 $\mu$ l de reação contendo: 5pmol/ $\mu$ l de cada primer, 10 $\mu$ l de mix Promega (50UN/ml de Taq DNA polymerase com buffer de reação – pH8,5, 400 $\mu$ M de dATP, 400 $\mu$ M de dCTP, 400 $\mu$ M de dGTP, 400 $\mu$ M de dT e 3mM de MgCl<sub>2</sub>; Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 12 $\mu$ l H<sub>2</sub>O de “nuclease-free” Promega, que foram submetidos ao termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) por 40 ciclos, onde a primeira etapa de desnaturação foi de 94°C, por 30 segundos, anelamento à 55°C por 45 segundos e polimerização a 72°C por 45 segundos.

A eletroforese foi feita em gel de agarose 2% / brometo de etídio e o padrão obtido nesta reação estão descritos na figura abaixo (Wiser et al 2002).



**Figura 8** – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR amplificados a partir do gene dos receptores de progesterona. Na coluna M temos o marcador de peso molecular 100 pb. P1/P1 representam os alelos selvagens = amostra com PROGINS homocigota selvagem (149pb); P1/P2 = amostra com o PROGINS heterocigota, com a presença de ambos os alelos (455, 149pb).

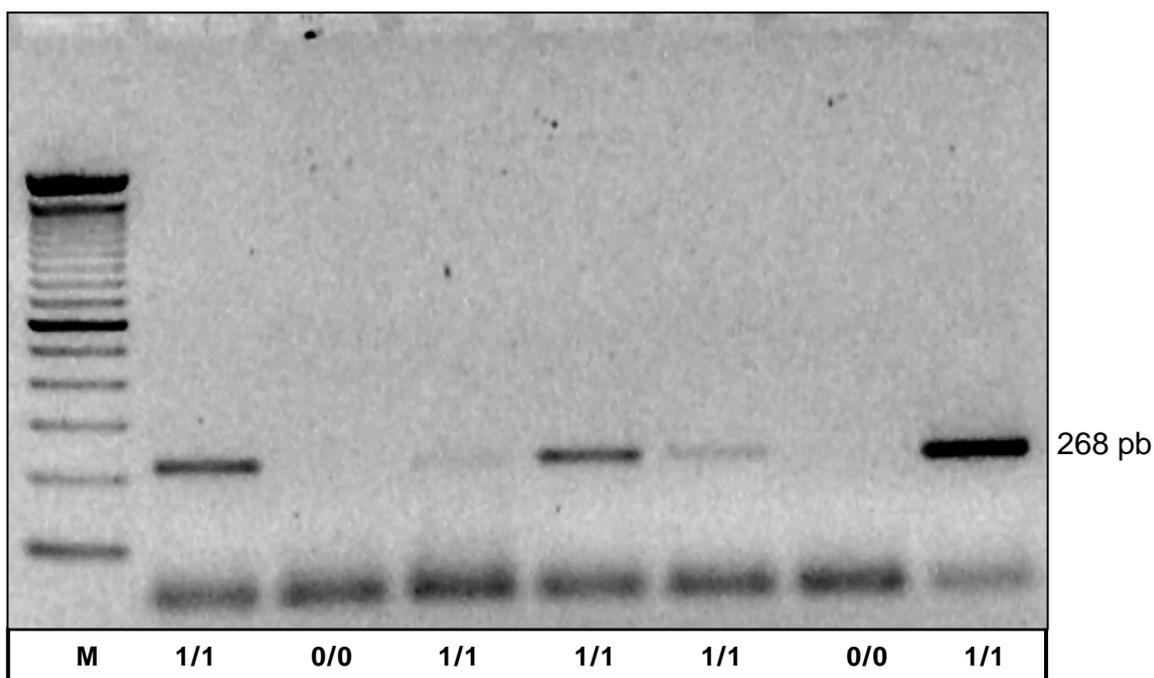
### 3.2.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para GSTM1

Nas reações de amplificação do gene GSTM1 foram utilizados os seguintes primers:

Primer	Seqüência (5-3)
GSTM1 (senso)	5' - GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C – 3'
GSTM1 (anti-senso)	5' - GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G – 3'

Nas reações foram usados 200ng do DNA genômico em um volume final de 25µl de reação contendo: 5pmol/µl de cada primer, 10µl de mix Promega (50UN/ml de Taq DNA polymerase com buffer de reação – pH8,5, 400µM de dATP, 400µM de dCTP, 400µM de dGTP, 400µM de dT e 3mM de MgCl<sub>2</sub>; Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 12µl H<sub>2</sub>O de “nuclease-free” Promega. que foram submetidos ao termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) por 40 ciclos, onde a primeira etapa de desnaturação foi de 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e polimerização a 72°C por 45 segundos.

A eletroforese foi feita em gel de agarose 2% / brometo de etídio e o padrão obtido nesta reação estão descritos na figura abaixo (Gattas et al, 2000).



**Figura 9** – Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR amplificados a partir do gene GSTM1. Na coluna M temos o marcador de peso molecular 100Bp; 1/1=amostras com o gene GSTM1 presente (268pb); 0/0= amostras com o GSTM1 nulo.

### 3.3 Análise Estatística

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas esta análise foi feita por meio da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias e desvios-padrão e medianas. Para as variáveis qualitativas calcularam-se freqüências absolutas e relativas.

Para a análise da hipótese de igualdade entre os dois grupos utilizou-se o teste t de Student. Quando a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada, utilizamos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Rosner, 1986).

O nível de significância estabelecido para os testes foi menor ou igual a 5% (Chiang, 2003; Higgins, 2004).

## ***4. RESULTADOS***

---

No que concerne às características do grupo estudado:

- Idade: variou de 41 a 63 anos, com média de 51,96 anos;
- Peso: variou de 40,50kg a 112kg, com média de 66,92 kg;
- Altura: variou entre 1,40m e 1,66m, com média de 1,54m;
- IMC: variou entre 20,09kg/m<sup>2</sup> e 52,4kg/m<sup>2</sup>, com média de 28,27kg/m<sup>2</sup>;
- BMD: variou entre 0,717g/cm<sup>2</sup> e 1,729g/cm<sup>2</sup>, com média de 1,11g/cm<sup>2</sup>;
- L<sub>2</sub>/L<sub>4</sub> T-score: variou entre -4,00 e 4,40, com média de -0,67.

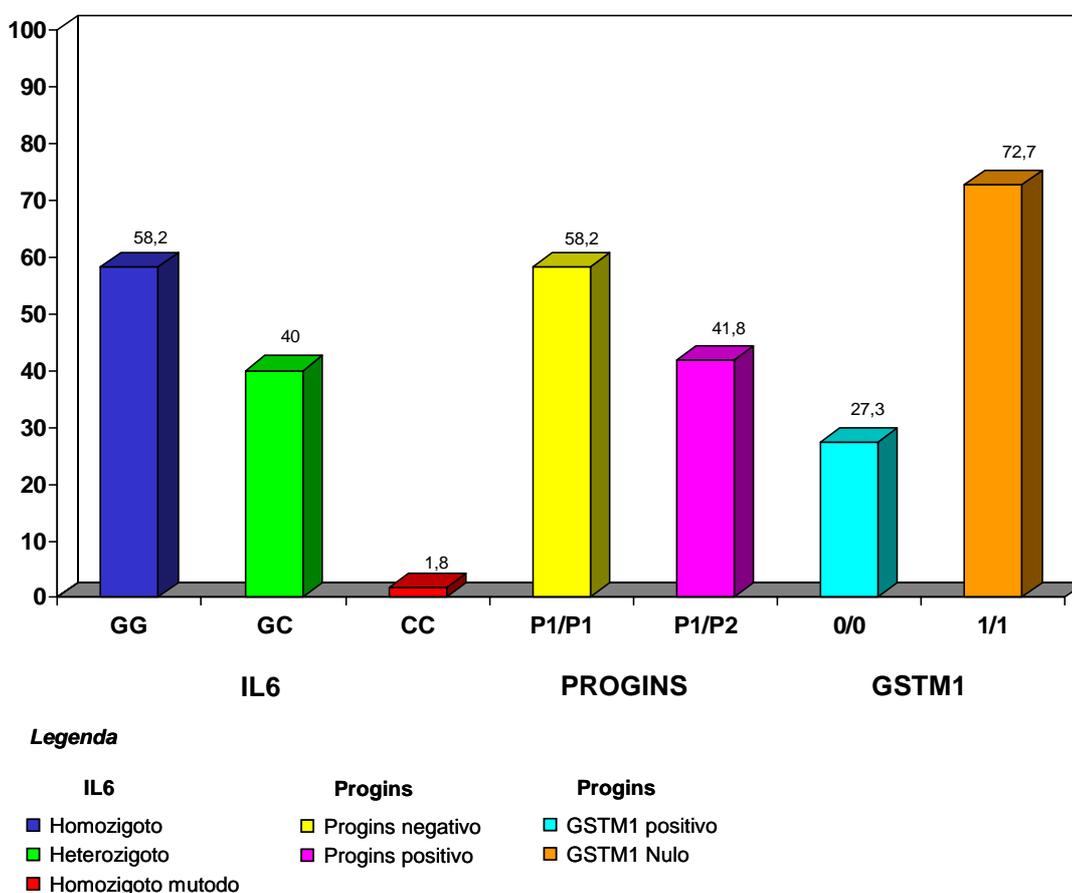
Os dados epidemiológicos acima descritos estão discriminados na Tabela 1. Queremos ressaltar a redução do N amostral, pois, das 110 pacientes 11 não apresentavam o resultado densitométrico.

**Tabela1** – Dados epidemiológicos

Variáveis	N amostral	Média (±dp)
Idade (anos)	110	51,96 (4,13)
Peso (kg)	110	66,92 (12,41)
Altura (m)	110	1,54 (0,06)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	110	28,27 (5,13)
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	110	1,11 (0,17)
L <sub>2</sub> /L <sub>4</sub> T-score	99	-0,67 (1,44)

Quanto aos polimorfismos estudados, em relação à IL-6, 64 mulheres eram GG (homozigota) e 46 GC (heterozigotos) e CC (presença do alelo C); destas últimas, 44 eram GC (heterozigotas) e 2 CC (mutado), as quais foram agrupadas para melhor estudo estatístico. Já no grupo do PROGINS, o N amostral foi genotipado, sendo 87 mulheres P1/P1 (homozigoto selvagem) e 23 com genótipos PROGINS positivo dos receptores de progesterona, P1/P2 (heterozigoto). Já no grupo GSTM1, 30 mulheres se apresentaram com o genótipo 0/0 (ausência do alelo) e 80 com o genótipo 1/1 (alelo presente).

Desta forma, em relação ao polimorfismo de IL6, 58,2% das pacientes eram homozigotas (GG) e 41,8% apresentaram a presença do alelo C (heterozigoto ou GC + homozigoto mutante ou CC); quanto ao genótipo PROGINS, 58,2% tinham genótipo PROGINS negativo (homozigoto selvagem ou P1/P1) e 41,8% eram PROGINS positivo (heterozigoto ou P1/P2); no que tange ao polimorfismo GSTM1, 72,7% das pacientes apresentaram a presença do alelo (1/1) e 27,3 ausência (0/0). A freqüência relativa dos polimorfismos estudados está demonstrada no Gráfico 1.



**Gráfico 1** – Freqüência (%) dos polimorfismos para IL-6, PROGINS e GST.

Quanto à análise do genótipo da IL-6, homozigoto ou GG e heterozigoto ou GC, com as variáveis estudadas (idade, peso, altura, IMC, BMD e L<sub>2</sub>/L<sub>4</sub> T-score), encontramos significância estatística do polimorfismo com a medida L<sub>2</sub>/L<sub>4</sub> T-score ( $p=0,0324$ ) e BMD ( $p=0,0513$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Análise das variáveis clínicas em relação aos genótipos da IL-6

Variáveis	N	Genótipos		P
		GG	GC	
		Média ( $\pm$ dp)	Média ( $\pm$ dp)	
Idade (anos)	110	51,57 (4,35)	52,50 (3,76)	0,2498 <sup>*A</sup>
Peso (kg)	110	67,18 (12,18)	66,54 (12,84)	0,7931 <sup>*A</sup>
Altura (m)	110	1,53 (0,05)	1,53 (0,06)	0,9525 <sup>*A</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	110	28,44 (5,48)	28,02 (4,64)	0,6790 <sup>*A</sup>
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	110	1,13 (0,17)	1,07 (0,15)	<b>0,0513<sup>*A</sup></b>
L <sub>2</sub> /L <sub>4</sub> T-score	99	-0,40 (1,44)	-1,04 (1,34)	<b>0,0324<sup>*B</sup></b>

<sup>\*A</sup> Teste t de student

<sup>\*B</sup> Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, observamos que os grupos apresentam diferença significativa em relação à variável L2/L4 T-escore ( $p=0,0324$ ) para o polimorfismo do gene da Interleucina-6. As mulheres que não tinham polimorfismo revelaram valores significativamente maiores que o grupo das heterozigotas.

Para melhor cálculo do *odds ratio*, a variável L2/L4 T-escore teve o ponto de corte ajustado para o valor  $-0,56$ . Assim, verificamos que as mulheres com o polimorfismo em um alelo, ou seja, heterozigota para o IL-6, possuem risco 2,3 vezes maior de terem valor do L2/L4 T-escore menor que  $-0,56$ , quando comparadas com as que não possuem o referido polimorfismo.

Em relação à análise das variáveis estudadas com os genótipos PROINS positivo (P1/P2) ou negativo (P1/P1), não encontramos significância estatística (Tabela 3).

**Tabela 3** – Análise das variáveis clínicas em relação aos genótipos PROGINs positivo ou negativo

Variáveis	N	Genótipos		P
		P1/P1	P1/P2	
		Média ( $\pm$ dp)	Média ( $\pm$ dp)	
Idade (anos)	110	51,78 (3,97)	52,65 (4,69)	0,3709 <sup>*A</sup>
Peso (kg)	110	67,19 (12,90)	65,86 (10,38)	0,6500 <sup>*A</sup>
Altura (m)	110	1,54 (0,05)	1,53 (0,057)	0,5066 <sup>*A</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	110	28,31 (5,28)	28,11 (4,59)	0,8740 <sup>*A</sup>
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	110	1,11 (0,17)	1,09 (0,15)	0,6239 <sup>*A</sup>
L <sub>2</sub> /L <sub>4</sub> T-score	99	-0,60 (1,47)	-0,89 (1,28)	0,4768 <sup>*B</sup>

<sup>\*A</sup> Teste t de student

<sup>\*B</sup> Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Em relação à análise das variáveis clínicas estudadas com o genótipo GSTM1 ausente (0/0) ou presente (1/1), também não houve nenhuma significância estatística (Tabela 4).

**Tabela 4** – Análise das variáveis clínicas em relação ao genótipo GSTM1

Variáveis	N	Genótipos		P
		1/1	0/0	
		Média ( $\pm$ dp)	Média ( $\pm$ dp)	
Idade (anos)	110	51,46 (4,71)	52,15 (3,90)	0,4415 <sup>*A</sup>
Peso (kg)	110	68,04 (10,47)	66,49 (13,09)	0,5622 <sup>*A</sup>
Altura (m)	110	1,53 (0,05)	1,54 (0,05)	0,5951 <sup>*A</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	110	28,96 (4,23)	28,01 (5,43)	0,3888 <sup>*A</sup>
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	110	1,12 (0,16)	1,10 (0,16)	0,5848 <sup>*A</sup>
L <sub>2</sub> /L <sub>4</sub> T-score	99	-0,53 (1,41)	-0,72 (1,45)	0,7648 <sup>*B</sup>

<sup>\*A</sup> Teste t de student

<sup>\*B</sup> Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Para estimar os riscos dos polimorfismos foi aplicado modelo de regressão logística para cada polimorfismo considerando o intervalo de confiança de 95%.

Pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, observamos que os grupos apresentam diferença significativa em relação à variável L2/L4 T-escore ( $p=0,0324$ ) para o polimorfismo do gene da interleucina-6. O grupo sem o polimorfismo (GG) apresentava valores de L2/L4 T-escore significativamente maiores do que os do outro grupo (GC).

---

## ***5. DISCUSSÃO***

---

---

Caracteriza-se a remodelação óssea pela remoção, por osteoclastos de uma quantidade de tecido ósseo, seguida pela formação da mesma quantidade de osso novo pelos osteoblastos. Os osteoclastos destroem (reabsorvem) o tecido ósseo provocando um microambiente ácido, que facilita a remoção do componente mineral; a secreção local de enzimas (metalproteinases e collagenases) se encarrega de remover o componente orgânico, formando uma cavidade (lacuna de Howship). Terminada a escavação da lacuna de reabsorção, os osteoblastos substituem os osteoclastos e passam a sintetizar tecido osteóide (matriz) por meio de secreção de colágeno, que é depositado em camadas na superfície das erosões até preenchê-las. Segue-se a mineralização, onde cristais de hidroxiapatita são depositados entre as fibras de colágeno. Forma-se, assim, um novo tecido ósseo. Quando o processo de reabsorção excede o de formação, pode ao longo do tempo comprometer a massa óssea e deteriorar a microarquitetura do osso, levando ao quadro de osteoporose com o conseqüente aumento do risco de fraturas (Anderson et al, 1997; Brandstrom et al, 1998; Bucay et al, 1998; Yasuda et al, 1998; Burges et al, 1999; Huang et al, 2003; Nordström et al, 2004).

A osteoporose é um dos grandes problemas de saúde pública, particularmente para as mulheres que têm risco de 40-50% de fraturas (Huang et al, 2003). A densidade mineral óssea baixa é um importante fator de risco para fraturas por osteoporose. Sabe-se que múltiplos fatores genéticos e ambientais atuam no conteúdo mineral ósseo (Dequeker et al, 1987; Pocock et al, 1987; Slemenda et al, 1991; Deng et al, 1999,2000; Huang et al, 2003).

O osteoblasto parece ser o regente do processo de remodelação óssea. Substâncias por ele produzidas influenciam a função dos osteoclastos. Existem substâncias produzidas nos osteoblastos, os OB-OCSF (osteoblast derived osteoclast stimulating factors), que estimulam a função dos osteoclastos. De fato, acredita-se que as interleucinas 1 e 6 podem ser o próprio OB-OCSF, que, por sua vez, sofre inibição da ação estrogênica.

Outras substâncias são consideradas como estimuladoras dos osteoclastos, como os fatores de necrose tumoral, de crescimento epidérmico e de transformação alfa, como também algumas prostaglandinas, particularmente

---

as da série E. Igualmente, existem citocinas produzidas pelos osteoblastos, os OB-OCIF (osteoblast derived osteoclast inhibiting factors), que inibem a função osteoclástica; entre elas as interleucinas 4, 10 e 13 (Anderson et al, 1997; Brandstrom et al, 1998; Bucay et al, 1998; Yasuda et al, 1998; Burges et al, 1999).

Sabe-se da existência de receptores para os fatores estimuladores dos osteoclastos, os quais também podem ser ocupados por substâncias inibitórias. As citocinas produzidas nos osteoblastos parecem induzir à expressão de um fator de membrana nos osteoclastos que, por sua vez, estimula a diferenciação dos precursores hematopoiéticos dos osteoclastos e a ativação dos osteoclastos maternos localizados no osso (Bucay et al, 1998; Yasuda et al, 1998; Burgess et al, 1999; Hofbauer et al, 1999).

Vários estudos têm mostrado que os fatores genéticos são os principais marcadores para variação do conteúdo mineral ósseo, entre eles o polimorfismo da interleucina 6.

Nosso estudo avaliou a IL6 e o polimorfismo dos genes PROGINs e GST em relação às variáveis idade, peso, IMC, BMD. Não encontramos significância estatística em relação a nenhuma delas.

Recentemente, as GSTs têm sido implicadas como importantes moléculas envolvidas na ativação de genes citoprotetores (Rossini, 2002), e na correlação com a mama devido à sua capacidade de metabolizar, por peroxidação, estrogênios e lipídios, diminuindo assim a exposição da glândula a esse hormônio (Cavaliere et al, 1997).

Não há, ao que parece, nenhum trabalho que correlacionou alteração da densidade mineral óssea com polimorfismo do gene GST.

Alguns estudos observaram que a progesterona estimula a proliferação das células ósseas e que o mecanismo em parte envolvido é o aumento da secreção do fator dois de crescimento da insulina (IGF-2), que pode potencialmente estimular a proliferação de osteoblastos. O fator de crescimento  $\beta$ , junto com o fator insulinóide, são os mais abundantes fatores de crescimento armazenados no osso, mas, o efeito da progesterona sobre os fatores de crescimento  $\beta$  em osteoblastos ainda é desconhecido (Pilkington et al, 2001; Quinn et al, 2001; Luo et al, 2002).

---

Luo et al(2002) demonstraram que a progesterona aumenta a síntese e secreção de TGFb em cultura de osteoblastos humanos. As TGFb estimulam a proliferação de osteoblastos e a produção de matriz extracelular (colágeno, fibronectina e osteonectina), ou seja, são estimuladores da formação óssea. Já os efeitos do TGFb sobre os osteoclastos são ainda controversos.

Vários autores relataram que a presença do alelo PROGINS está relacionada com maior suscetibilidade para desenvolver hiperprolactinemia (Westberg et al, 2004; Hsich et al, 2005).

Não há na literatura trabalhos que relacionem a presença do alelo PROGINS com osteoporose. Em nosso estudo não observamos a presença do alelo PROGINS em pacientes com essa afecção.

A IL6 é uma citocina que têm papel central nas respostas imune, inflamatória, hematopoiese, aterogenese e está intimamente relacionada com a absorção óssea. No osso, a IL6 é sintetizada por osteoblastos, monócitos e células T, levando à diferenciação e ativação de osteoclastos. É regulada no nível de expressão por diversos hormônios e citocinas, entre estas a IL1 e TNF alfa que a ativam, enquanto o estradiol e glicocorticóides reprimem a transcrição do gene IL6. Desta forma, a diminuição do estrogênio em mulheres na pós-menopausa, pode provocar aumento da expressão IL6, levando à absorção óssea e à perda de massa óssea (Ferrari et al, 2003).

Recentemente, diversas variações de alelos têm sido identificadas na região promotora da IL6. Um polimorfismo comum, como a troca G-C na posição 174, também pode interagir com receptores de estrogênio para regulação da expressão IL6. Há evidências de que este polimorfismo produz uma variante funcional em que o alelo 174C resulta em baixo estímulo da produção da IL6 e também de baixas concentrações dos níveis de IL6 na circulação comparada com a presença do G alelo (Ferrari et al, 2003; Moffett et al, 2004).

Ainda mais importante, o polimorfismo alélico na região do gene promotor IL6 coopera para a regulação da expressão da IL6, associada com o nível de osteocalcina, um marcador da atividade osteoclástica. Assim, a baixa BMD em coluna lombar em pacientes com polimorfismo IL6 na variante 572C e 174G, pode refletir uma aceleração no "turnover" na região trabecular óssea (Moffett et al, 2004).

---

Em nosso estudo, podemos relacionar a presença do polimorfismo G-C na região 174 do gene IL6 com baixa densidade mineral óssea. Encontramos associação entre a presença do G alelo (GG, GC) e baixa densidade mineral óssea. Tais dados sugerem que o polimorfismo IL6 contribui para a qualidade óssea.

Nordström et al (2004), avaliando 1044 mulheres, todas com aproximadamente 75 anos, relacionou a presença do G alelo localizado na região 174 do gene IL6 com forte influência para fraturas por osteoporose na pós-menopausa.

Desse modo, o conhecimento dos mecanismos genéticos relacionados com a osteoporose certamente virá ampliar nosso conhecimento a respeito dessa doença, possibilitando a sua prevenção, selecionar as mulheres para a terapêutica e melhor avaliar o prognóstico.

---

## **6. CONCLUSÕES**

---

---

1. O polimorfismo heterozigoto G/C no nucleotídeo -174 do gene da IL-6 correlacionou-se positivamente com baixa densidade óssea na pós-menopausa.
  2. Os polimorfismos PROGINS e GSTM1 não mostraram correlação com a densidade mineral óssea na pós-menopausa.
-

## **7. ANEXOS**

---

## Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 6 de junho de 2003.  
**CEP 0517/03**

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) KATIA FRANCO QUARESMA DE MOURA  
Disciplina/Departamento: Ginecologia da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Marcadores de resposta à terapia de reposição hormonal em mulheres climatéricas”**.

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **03/dezembro/2003**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **31/maio/2004**.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Resaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

## **Anexo 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Titulo do Projeto:** "Marcadores moleculares de resposta a terapia de reposição hormonal em mulheres climatéricas".

Devido ao aumento do tempo de vida da população mundial, as mulheres, na atualidade, têm passado boa parte de suas vidas na menopausa e em consequência disso uma grande quantidade de mulheres sofre as repercussões da diminuição de hormônios femininos que ocorrem nesse período.

Fraqueza nos ossos e problemas nas juntas, aumento de gordura no sangue, calores fortes pelo corpo e entupimento das artérias são alguns dos problemas que ocorrem.

Estamos fazendo um estudo para tentar achar uma maneira de conseguir dizer, antes de começar, quais mulheres responderão melhor ou pior ao tratamento com hormônios femininos. Isso é importante pois poderemos evitar o uso desnecessário de hormônios em uma mulher que vai responder pouco a esse tipo de tratamento. Com isso, efeitos indesejáveis desse tratamento como sangramentos do útero, náuseas, ganho de peso e até mesmo câncer de mama e útero poderiam ser diminuídos.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesse estudo.

As mulheres que serão incluídas nesse estudo serão aquelas atendidas no Setor de Climatério do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM onde participarão da rotina de atendimento do serviço.

Alem disso, realizarão entrevistas e exames. Os exames a serem realizados são necessários para o seu tratamento e fazem parte da rotina do ambulatório. Após a confirmação da certeza da necessidade de tratamento nos colheremos, com uma pequena escova delicada, algumas células de dentro da sua boca sem necessidade de coleta de sangue ou qualquer outro tipo de material.

Poderá existir benefício para o seu tratamento na dependência dos resultados desse estudo. A sua participação no estudo é totalmente voluntária e caso deseje, você poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem nenhuma necessidade de justificativa e sem nenhum prejuízo em seu tratamento que continuara sendo realizado normalmente.

Todas as informações colhidas e as identidades das pacientes serão mantidas em sigilo como informação confidencial. Não existem despesas pessoais para você em qualquer fase do nosso estudo, incluindo exames e consultas. Também não existira compensação financeira relacionada a sua participação.

A nossa equipe de pesquisadores se compromete a utilizar os dados e material coletados somente para esta pesquisa.

---

Estamos a sua disposição para qualquer informação relacionada a pesquisa ou qualquer problema relacionado a ela. Em qualquer etapa do estudo, a paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa (Dra. Katia F Q de Moura) que pode ser encontrada no Ambulatório de Climatério localizado na Rua Pedro de Toledo 592, Vila Clementino, São Paulo, SP ou na Secretaria do Departamento de Ginecologia na Rua Napoleão de Barros 715, 7º andar do Hospital São Paulo (telefone 55793321). Caso você tenha alguma dúvida ou consideração com relação aos aspectos éticos da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Botucatu, 572 - 1º andar -cj 14, tel 5571-1062, FAX: 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa denominada "*Marcadores moleculares de resposta a terapia de reposição hormonal em mulheres climatéricas*".

Discuti com a responsável pelo estudo (Dra. Katia F. Q. de Moura) sobre minha decisão em participar dessa pesquisa. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de benefícios que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse serviço.

---

Assinatura da Paciente/representante legal

Data e local:

---

Assinatura de testemunha

Data e Local:

---

Assinatura do Responsável pelo Estudo

Data e Local:

---

## **8. REFERÊNCIAS**

---

---

Asschert JG, Vellenga E, Ruiters MH, De Vries EG. Regulation of spontaneous and TNF/IFN-induced IL-6 expression in two human ovarian-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1999;82:244-9.

Batzer MA, Stoneking M, Alegria-Hartman M, Bazan H, Kass DH, Shaikh TH, Novick GE, Ioannou PA, Scheer WD, Herrera RJ, Deininger PL. African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12288-92.

Becker RC. Coronary heart disease in women: Risks and prevention. *Coron. Acute Care* 1992;3:2-10.

Bossemeyer RP et al. Consenso sobre os fundamentos e o manejo da terapia de reposição hormonal, São Paulo, 1997.

Boyd NF, Byng J, Jong R, Fishell E, Little L, Miller AB, Lockwood G, Tritchler D, Yaffe M: Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risks: results from the Canadian National Breast Screening Study. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:670-5.

Boyd NF, Lockwood GA, Martin LJ, Knight JA, Byng JW, Yaffe MJ, Tritchler DL: Mammographic densities and breast cancer risk. *Breast Disease* 1998;10:113-26.

Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:78-85.

Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Fonseca JHP, Branco JNR, Buffolo E. Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea. *Rev Brás Cir Cardiovasc* 1999; 14(3). São Paulo.

Braunstein J. Discovering new horizons. *Reflection* 1998; 24(4):18-23.

Brisson J, Sadowsky NL, Twaddle JA, Morrison AS, Cole P, Merletti F: The relation of mammographic features of the breast to breast cancer risk factors. *Am J Epidemiol* 115:438-443, 1982.

Britten RJ. Evidence the most human ALU sequences were inserted in a process that ceased about 30 million years ago. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6148-50.

Byrne C, Schairer C, Wolfe J, Parekh N, Salane M, Brinton LA, Hoover R, Haile R: Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age and menopause status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1622-9.

Cavaliere EL, Stack DE, Debanesan PD, et al. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1997;10937-42.

---

Chung HW, Seo JS, Hur SE, Kim HL, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women. *J Hum Genet* 2003; 48:243-48.

Consensus Development Conference. Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis. *Am J Med* 90: 107-110, 1991.

Cramer DW, Hornstein MD, McShane P, Powers RD, Lescault PJ, Vitonis AF, De Vivo I. Human progesterone receptor polymorphisms and implantation failure during in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1085-92.

De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res* 2003; 63:5236-8.

Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats human diseases. *Mol Genet Metab* 1999;67:183-93.

Deng HW, Deng HY, Liu YJ, Liu YZ, Xu FH, Shen H, Conway T, Li JL, Huang QY, Davies KM, Recker RR. A genomewide linkage scan for quantitative trait loci for obesity phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1138-51.

Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.*, 39: 531-536, 2002.

Donaldson CJ, Crapanzano JP, Watson JC, Levine EA, Batzer MA. PROGINs Alu insertion and human genomic diversity. *Mutation Research* 2002;501:137-41.

Drlica, K. *Understanding DNA and Gene Cloning: A guide for the curious*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1992,p.240.

Fahey TJ III & Tracey KJ. Cytokines, tumor necrosis factor and other mediators of sepsis. In: Brasil LA, Gomes WJ, Salomão R, Fonseca JHP, Branco JNR, Buffolo E. *Uso de corticóide como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea*. *Rev Brás Cir Cardiovasc* 1999 v.14 n.3 São Paulo.

Ferrari SL, Karasik D, Liu J, Karamohamed S, Herbert A, Cupples LA, Kiel DP. Interactions of interleukin-6 Promoter Polymorphisms With Dietary and Lifestyle Factors and Their Association With Bone Mass in Men and Women From the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2004; 19:552-559.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL6) gene on IL6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-76.

Fujimoto J, Hirose R, Ichigo S, Sakaguchi H, Li Y, Tamaya T. Expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in uterine leiomyoma. *Tumour Biol* 1998; 19:126-31.

---

Greendale GA, Reboussin BA, Sie A, Singh R, Olson LK, Gatewood O, Bassett LW, Wasilauskas C, Bush T, Barrett-Conner E for the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) investigators: Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammo-graphic parenchymal density. *Ann Intern Med* 130:262-269,1999.

Gomes MTV – Análise do polimorfismo do gene dos receptores de progesterona (PROGINS) da raça e da paridade como fatores relacionados ao desenvolvimento de leiomioma do útero. (Tese). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. 2005.

Grobstein,C. A Double Image of the DNA Helix: A Recombinant DNA Debate.W.H.Freeman and Company, San Francisco, 1979,p.177.

Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willet WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Eng J Med* 1996;335:453-61.

Grove JS, Goodman MJ, Gilbert FI, Mi MP: Factors associated with mammographic pattern. *Br J Radiol* 58:21-25, 1985.

Herrington DM; Howard TD, HawKins GA, Reboussin DM, Xu J, Zheng SL. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 967-974.

Hirvonen, E.; Lmberg-Allardt, C.; Lankinen, K. S.; Geurts, P.; Wilén-Rosenqvist, G. – Transdemal oestradiol gel in the treatment of the climaterium: a coparison to oral therapy. *Br, J. Obstret. Gynaecol.*, 104: 19-25, 1997.

Hsieh YY, Chan IP, Wang HI, Chang CC, Huang CW, Lin CS. PROGINS Alu sequence insertion is associated with hyperprolactinaemia but not leiomyoma susceptibility. *Clin Endocrinol (Oxf)*.2005;62(4):492-7.

Huang QY, Shen H, Deng HY, Conway T, Davies KM, Li JL, Recker RR, Deng HW. Linkage and association of the CA repeat polymorphism of the IL6 gene, obesity-related phenotypes, and bone mineral density (BMD) in two independent Caucasian populations. *J Hum Genet* 2003; 48:430-37.

Huber JC, Schneeberger C, Tempfer CB. Genetic modeling of the estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependant disorders. *Maturitas* 2002, 42: 1-12.

Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL-6 gene in primary Sjögren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology*; 2001 40:656-661.

---

- Hulley S; Grady D; Bush T et al Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 280: 605-13, 1998.
- Kiebak DG, Tong X, Weigel NL, Agounik IU. A genetic mutation in progesterone receptor (PROGINS) leads to an increased risk of non-familial breast and ovarian cancer causing inadequate control of estrogen receptor driven proliferation. *J Soc Gynecol Invest* 1998; 5 (suppl 1): 40A.
- Knopp, R. H. – Estrogen replacement therapy for reduction of cardiovascular risk in woman. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2: 240 –7, 1991.
- Kobayashi H, Ohshima S, Nishioka K, Yamaguchi N, Umeshita-Sasai M et al Antigen induced arthritis(AIA) can be transferred by bone marrow transplantation: evidence that interleukin 6 is essential for induction of AIA. *J Rheumatol*, 2002; 29(6):1176-82.
- Kwok DY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries:Why and how are we building them? *Mol Med Today*;1999;5(12):538-43.
- Lamaestro BM, Malone N. Glutathione in health and disease: farmotherapeutic issues. *Ann Pharmacother* 1995; 29(12):1263-73.
- Lattuada D, Somigliana E, Vigano P, Candiani M, Pardi G, Di Blasio AM. Genetics of endometriosis: a role for the progesterone receptor gene polymorphism PROGINS? *Clin Endocrinol* 2004;61:190-194.
- Laya MB, Gallagher JC, Schreiman JS, Larson EB, Watson P Weinstein L: Effect of postmenopausal hormonal replacement therapy on mammographic density and parenchymal pattern. *Radiology* 196:433-437, 1995.
- Lehrman MA, Russel RW, Goldstein JL, Brown MS. Alu-Alu recombination deletes silice acceptor sites and produces secreted low density lipoprotein receptor in a subject with familial hypercholesterolaemia. *J Biol Chem* 1987;262:3354-61.
- Lindsay, R. - The menopause and osteoporosis. *Obstret. Gynecol.*, 87: 16S – 19S, 1996.
- Lorry SF. Cytokines mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 1993; 128: 1235-41.
- Luo XH, Liao EY, Su X. Progesterone Upregulates TGF-b Isoforms (b1,b2, and b3) Expression in Normal Human Osteoblast-Like Cells. *Calcif Tissue Int*. 2002;71:329-334.
- Lyndon J, DeMayo F, Funk C, Mani S, Hughes A, Montgomery C Jr. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995;9:2266-78.
-

- Majeswski J, Ott J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res.*2002;12(12):1827-36.
- Maugard CM, Charrier J, Bignon YJ. Allelic detection at glutathione S-transferase M1 locus and its association with breast cancer susceptibility. *Chem Biol Interact* 1998;111(112):365-75.
- Mitrunen K, Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mut Res* 2003; 544: 9-41.
- Moffett SP, Zmuda JM, Cauley JA, Stone KT, Nevitt MC, Ensrud KE, Hillier TA, Hochberg MC, Joslyn G, Morin P, Cummings SR, and for the sof research group. Association of the G-174C Variant in the Interleukin-6 Promoter Region With Bone Loss and Fracture Risk in Older women. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004;19:1612-1618.
- Mosca L; Collins P; Herrington DM et al Hormone replacement and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 104: 499-503, 2001.
- Nathan C & Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991; 113 :981-6.
- Nordström A, Gerdhem P, Brändström H, Stiger F, Lerner UF, Lorentzon M, Obrant K, Nordström P, Akesson K. Interleukin-6 promoter polymorphism is associated with bone quality assessed by calcaneus ultrasound and previous fractures in cohort of 75-year-old women. *Osteoporos Int* 2004; 15:820-26.
- Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Shirai Y, Emi M. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. *J Hum Genet* 2001; 46:267-72.
- Oza AM, Boyd NF: Mammographic parenchymal patterns: a marker of breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:196-208, 1993.
- Park JH, Sohemy AE, Cornelis MC, Kim HA, Kim SY, Bae SC. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 gene polymorphisms and carotid atherosclerosis in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2004; 24:157-63.
- Perera FP, Estabrook A, Hewer A, Channing A, et al Carcinogen-DNA adducts in human breast tissue. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1995;4:233-8.
- Pharoah D, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF. Association studies for finding cancer susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer*,2004:850-60.
- Rodrigues de Lima, G.; & Baracat, E. C. - Síndrome do Climatério. In *Ginecologia Endócrina*. 1. Ed. Atheneu, São Paulo, 1995. p.253 – 267.
-

- Rodrigues de Lima, G.; Gomes Pinto, W.; Amoroso, J. J. G.; Vasseman, J. - Considerações sobre a Síntese do Climatério. *Ver. Brás. Clin. Terap.*, 10: 360 – 79, 1981.
- Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics*(Boston) Second edition, 1986: 584.
- Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF et al Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genetics and Molecular Research* 2002; 1(3):233-40.
- Rousseau-Merck MF, Mirashi M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-23. *Hum Genet* 1987; 77:280-2.
- Rowe SM, Coughlan SJ, McKenna NJ, Garret E, Kieback DG, Carney DN, Headon DR. Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res* 1995;55:2743-5.
- Saftlas AF, Szklo M: Mammographic parenchymal patterns and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 9:146-174, 1987.
- Salmen T, Heikkinen AM, Mahonen A, Kroger H, Komulainen M, Saorikoski S, Honkanen R, Maenpaor PH. Early postmenopausal bone loss is associated with PvuII estrogen receptor gene polymorphism in Finnish women: effect of hormone replacement therapy. *J Bone Miner Res.*2000,15(2):315-21.
- Seidgard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione S-transferase activity on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 85:7293-7.
- Slemenda CW; Christian JC; Williams CJ; Norton JA, Johnston CC Jr. Genetic determinants of bone mass in adult women: A reevaluation of the twin model and potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner res* 6: 561-567, 1991.
- Sowers MF; Boehnke M; Jannausch ML; Crutchfield M; Corton G; Burns TL; Familiarity and partitioning of variability of femoral neck bone mineral density of women of childbearing age. *Calcif Tissue Int* 50: 110-114, 1992.
- Stoneking M, Fontius JJ, Clifford SL, Soodyall H, Arcot SS, Saha N, Jenkins T, Tahir MA, Deininger PL, Batzer MA. Alu insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a larger population size in Africa. *Genome Res* 1997;7:1061-71
- Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferase: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *Metabolic Polymorphism and Susceptibility to Cancer* 1999;148:231-49.
-

Thompson WF, Flavelle RB. DNase sensitivity of ribosomal RNA genes in chromatin and nucleolar dominance in wheat. *J Mol Biol*,1988;204(3):535-48.

Tong D, Fabjani G, Heinze G, Obermair A, Leodolter S, Zeillinger R. Analysis of the human progesterone receptor gene polymorphism PROGINS in Austrian ovarian carcinoma patients. *Int J Cancer* 2001; 95(6):394-7.

Utian, W. H. - Overview on menopause. *Am J. Obst. Gynecol.*, 156: 1280-1283, 1987.

Worda C, Sator MO, Schneeberger C, Jantschev T, Ferlitsch K, Huber JC. Influence of the catechol-o-methyltransferase on estrogen levels in women. *Hum Rep.* 2003 18(2) 262-266.

Wallace MR, Andersen LB, Saulino AM, Gregory PE, Glover TW, Collins FS. A de novo ALU insertion results in neurofibromatosis type 1. *Nature* 1991;353:864-6.

Watson, J.D. *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*. W.W. Norton and Co.,New York, 1980, p.143.

Westberg L, Ho HP, Baghaei F, Nilsson S, Melke J, Rosmond R, Holm G, Bjorntorp P, Eriksson E. Polymorphisms in oestrogen and progesterone receptor genes: possible influence on prolactin levels in women. *Clin Endocrinol(Oxf)*.2004;61(2):216-23.

Wieser F, Scheneberger C, Tong D, Tempfer C, Huber JC, Wenzl R. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis. *Fert. Steril.* 2002;77(2):309-312.

Yamakawa-Kobayashi K, Somekawa Y, Fujimura M, Tomura S, Arinami T, Hamaguchi H. Relation of the -514C/T polymorphism in the hepatic lipase gene to serum HDL and LDL cholesterol levels in postmenopausal women under hormone replacement therapy. *Atherosclerosis* 2002; 162:17-27.

---

## Abstract

**Objective:** Evaluate the relation of genetic factors to the development of osteoporosis in post menopause. **Methods:** One hundred and ten women were evaluated in their first three post menopause years without the use of hormone therapy. The group was investigated for the presence of Interleucin 6 polymorphism, GSTM1 and the presence of a polymorfism of the progesterone receptor gene, PROGINS. The clinical data were obtained through patient interviews and the genotypes were analyzed through polimerase chain (PCR) with DNA from mouth raspado. The statistical analysis used the Mann-Whitney non-parametric test or the T-Student test, depending on the tested variable. The Logistical Regression model was used to obtain the odds ratio for the disease. The significance level adopted was 5% and the confidence interval was 95%. **Results:** Average age was 51.96 years. 58.2% of patients were homozygous (GG) for the IL6 polymorphism and 41.8% presented the C alelus. 58.2% were negative negative PROGINS genotype and 41.8% were positive. 72.7% presented the alelus (1/1) for polymorphism GSTM1 and 27.3% did not. **Conclusion:** The IL6 gene polymorphism correlated with low bone mass, while PROGINS and GSTM1 polymorphisms did not.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)