Universidade Federal de São Paulo

Escola Paulista de Medicina

Departamento de Medicina

Disciplina de Endocrinologia

Chefe do Departamento: Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do curso de pós-gradução: Prof. Dr. Sergio Atala Dib

Kelly Cristina de Oliveira

Análise dos polimorfismos, A637G do gene *TAP1*, A121C do gene *ENPP1*, C677T e A1298C do gene *MTHFR* e isoformas E2, E3 e E4 do gene *APOE* e de fatores de risco para Doença Cardiovascular em mulheres portadoras de Síndrome de Turner

Presidente da Banca: Profa. Dra. Monica Vannucci Nunes Lipay

Banca examinadora

Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli

Profa. Dra. Denise Maria Christofolini

Prof. Dr. Alexis Dourado Guedes

Aprovado em: 25/08/2010

Dedicatória

Aos meus pais José e Lúcia, exemplos de fortaleza e serenidade, ao meu irmão Roberto, exemplo de persistência, e ao meu esposo Anderson, exemplo máximo do amor.

Agradecimentos

Como é difícil agradecer, pois, sempre fica a sensação de esquecer algo ou alguém, que de alguma forma, por menor que seja, contribuiu para esta vitória. Não posso esquecer que isto não se iniciou há dois anos, quando me matriculei no mestrado, mas sim, no dia dezesseis de julho de mil novecentos e oitenta e um, dia que Deus me concedeu a vida. Desde deste dia tenho sido agraciada por Deus. Tudo o que aconteceu é projeto de Deus em minha vida.

Como esquecer minha infância e todos os exemplos de dignidade, amor, amizade, respeito, confiança e educação que recebi de meus pais. Pessoas simples, mas que sempre prezaram pela retidão da família. Pai e mãe, vocês são presentes de Deus em minha vida e os grandes responsáveis por esta conquista. Obrigado por serem meus pais. Eu amo vocês!!!!!!

Ah!! E as brigas e brincadeiras com meu irmão, que hoje se transformaram em ótimas conversas. Com ele aprendi que temos que lutar por nossos sonhos e assim eles se tornarão realidade e que o medo não pode fazer parte de nossas vidas. Beto você é exemplo de determinação. Te amo!!! Não posso me esquecer de te agradecer por trazer para nossa família a Angélica, uma pessoa maravilhosa que todos aprendemos a amar.

Não seria justo me esquecer de uma pessoa especial, que sempre ficou feliz com minhas vitórias e me estimulou. Tia Rose obrigado pelo carinho e pela minha pequena e amada Marina. Eu amo vocês: Rose, Paulinho e Marina.

E é claro que não iria me esquecer do meu grande amor: Anderson. O crescimento pessoal e profissional faz parte do nosso relacionamento. Quantas

conquistas!!! Ficamos felizes pelas vitórias um do outro e independente da situação estamos sempre juntos. Estava escrito nas estrelas que seríamos um. Eu te amo!!! Obrigado por toda louça lavada, por todo jantar preparado e sem dúvida alguma pelo amor demonstrado.

Estas são minhas fortalezas, desculpe se me esqueci de alguém, mas todos moram em meu coração.

No campo profissional, sempre digo que Deus coloca anjos em meu caminho. Anjos que contribuem para que eu seja uma pessoa melhor. Abaixo escreverei um pouquinho sobre eles:

Ivonne, apesar da diferença de idade, uma grande amiga. Guardo todos os seus conselhos em meu coração. Pode acreditar que você contribuiu muito para ser quem eu sou hoje. Obrigado.

Lilian, também uma grande amiga. Obrigado pelo carinho, por todas as receitas e pelo cuidado. Juntas viveremos muitos momentos engraçados, tristes e felizes. Você mora em meu coração.

Eduardo, um amigo para qualquer hora. Os ensinamento de HPLC não irei esquecer, assim como nossas conversas.

Bianca, uma menina-mulher, alguém que aprendi a admirar e amar. Hoje você é para mim uma grande amiga, exemplo de profissional. É por sua causa que

estou aqui hoje, afinal foi você que inicialmente acreditou e apostou em mim. Biazinha sou sua fã!!!

E a minha mãe Mônica, não há como esquecer. Você é exemplo de profissional e pessoa. Delicada e forte!!! Ama o que faz e quem faz. Obrigado pela paciência, pela sabedoria compartilhada. Sem querer parecer piegas, posso dizer com todas as letras que Eu amo você!!!

Não posso me esquecer de pessoas que contribuíram para a execução deste trabalho, como:

Alexis, amigo, que incansavelmente fez os cálculos estatísticos da APOE e sempre esteve presente.

Emmanuela, juntas compartilhamos as aflições do “final de tese”.

Dra Ieda que possibilitou o meu ingresso neste fascinante grupo de pesquisa.

Dr. Sergio Atala Dib representando a pós-graduação da disciplina de Endocrinologia.

FAPESP que contribuiu financeiramente para a execução deste projeto.

Obrigado meu Deus por este pouco que relatei de minha história e por todas as maravilhas do senhor em minha vida.

Sumário

Dedicatória.....v

Agradecimentos.....vii

Lista de tabelas.....xiv

Lista de abreviaturas.....xv

Lista de Figuras.....xviii

Resumo.....xx

Abstract.....xxii

1. Introdução.....1

2. Fundamentação teórica.....2

2.1 Doença Cardiovascular.....2

2.1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica.....3

2.1.1.1 Perfil Genético da HAS.....5

2.1.2 Diabetes *mellitus*.....6

2.1.2.1 Perfil Genético das alterações no metabolismo glicídico....10

2.1.3 Dislipidemias.....12

2.1.3.1 Perfil Genético das dislipidemias.....14

2.1.4 Hiper-homocisteinemia.....16

2.1.4.1 Perfil genético da hiper-homocisteinemia.....20

2.2 Síndrome de Turner.....23

2.2.1 Síndrome de Turner e a Doença Cardiovascular.....25

2.2.2 Hipertensão Arterial Sistêmica e Síndrome de Turner.....27

2.2.3 Metabolismo glicídico e Síndrome de Turner.....28

2.2.4 Síndrome de Turner e Dislipidemias.....28

2.2.5 Aspectos hormonais na Síndrome de Turner.....29

3. Objetivos.....32

4. Metodologia.....33

4.1 Caracterização da amostra.....33

4.2 Cariotipagem.....34

4.3 Extração de DNA.....34

4.4 Genotipagem.....35

4.4.1 Genotipagem *TAP1 – transporter-associated antigen processing* (6p21.3) por RFLP.....35

4.4.2 Genotipagem *ENPP1 - ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1* (6p22 e q23) por RFLP.....36

4.4.3 Genotipagem *APOE* – Apolipoproteina E (19q13.2) e *MTHFR* - metilenotetrahidrofolato redutase, códon 1298 por ensaio TaqMan.....38

4.4.4 Genotipagem *MTHFR* – metilenotetrahidrofolato redutase, códon 677 (1p36.3) por RFLP.....39

4.5 Análise estatística.....40

5. Resultados.....42

5.1 Polimorfismos do gene *TAP1- transporter-associated antigen processing* (6p21.3).....46

5.2 Polimorfismos no gene *ENPP1 - ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1* (6p22 e q23).....47

5.3 Polimorfismos do gene *APOE*.....48

5.4 Polimorfismos no gene da *MTHFR* - metilenotetrahidrofolato redutase (1p36.3).....49

5.4.1 códon 677.....49

5.4.2 códon 1298.....50

6. Discussão.....53

7. Conclusão.....60

8. Referências Bibliográficas.....61

9. Anexos.....96

9.1 Termo de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....96

9.2 Termo de consentimento livre e esclarecido.....98

9.3 Poster apresentado no 55º Congresso Brasileiro de Genética.....102

9.4 Poster apresentado no 43º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica.....103

9.5 Poster apresentado no ENDO 2010: The 92nd Annual Meeting & Expo….104

9.6 Artigo submetido para publicação……...105

FREQUENCY OF *TAP1* A637G, *ENPP1* A121C POLYMORPHISMS AND *APOE* ISOFORMS IN TURNER SYNDROME AND ITS RELATIONSHIP AS RISK FACTORS FOR CARDIOVASCULAR DISEASE (Submetido à Revista Disease Markers)……107

9.7 Outros artigos publicados durante o Mestrado junto ao grupo de pesquisa.....125

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores para diagnóstico de hipertensão de acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2006).....4

Tabela 2. Valores de glicose plasmática (em mg/dl) para diagnóstico de DM de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2007).....9

Tabela 3. Valores de referência para lipídeos plasmáticos de acordo com as Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose – Dislipidemia da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2001).....14

Tabela 4. Cariótipo das pacientes portadoras de Síndrome de Turner estudadas.....33

Tabela 5. Sequência e identificação dos *primers* e enzimas de restrição utilizadas na análise por RFLP.....41

Tabela 6. Caracterização clínica e laboratorial das 78 pacientes portadoras de Síndrome de Turner avaliadas.....42

Tabela 7. Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos A637G do gene *TAP1*, A121C do gene *ENPP1*, C677T e A1298C do gene *MTHFR* nas pacientes portadoras de ST e no grupo controle.....51

Tabela 8. Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos do gene *APOE* nas pacientes portadoras de ST e no grupo controle.....52

Lista de Abreviaturas

+ mar – cromossomo marcador adicional

Apo – apolipoproteína

APOE – apolipoproteína E

ATP – adenosina 5´trifosfato

AvaII – enzima de restrição

AVC – Acidente Vascular Cerebral

bp – base pair (pares de base)

CT – colesterol total

DAC – doença arterial coronariana

DCV – Doença Cardiovascular

DM – diabetes *mellitus*

DM1 – diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 – diabetes *mellitus* tipo 2

DNA – ácido desoxiribonucléico

dNTP – oligonucleotídeos

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ENPP1 – gene *pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*

EPM – Escola Paulista de Medicina

GH – hormônio do crescimento

GHr – hormônio do crescimento recombinante

HAS – hipertensão arterial sistêmica

HDL-C – lipoproteína de alta densidade

He – homocisteína

HLA – antígeno leucocitário humano

IDL-C – lipoproteína de densidade intermediária

IMC – índice de massa corpórea

KCl – cloreto de potássio

LDL-C – lipoproteína de baixa densidade

$MgCl_2$ – cloreto de magnésio

MHC – complexo maior de histocompatibilidade

MTHFR – gene *metilenotetrahidrofolato redutase*

NaCl – cloreto de sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – braço curto do cromossomo

PA – pressão arterial

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

q – braço longo do cromossomo

RFLP - Restriction fragment length polymorphisms (análise do polimorfismos dos fragmentos de restrição)

RNA – ácido ribonucléico

RR – risco relativo

SAH – S-adenosilomocisteína

SAM – S-adenosilmetionina

SHOX – gene *short stature homeobox*

ST – Síndrome de Turner

SUS – Sistema Único de Saúde

TAP1 – gene *transporter-associated antigen processing*

TRH – terapia de reposição hormonal

Tris-HCl – tampão tris com ácido clorídrico

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

VLDL-C – lipoproteína de baixíssima densidade

Xmill – enzima de restrição

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da localização do gene *TAP1* no cromossomo 6 (6p21.3).....5

Figura 2. Esquema básico das lipoproteínas, constituídas de um núcleo apolar, formado por triglicerídeos (TG) e ésteres de colesterol, envolto em um composto polar formado pelos fosfolipídeos e pelas apolipoproteínas.....13

Figura 3. Metabolismo da homocisteína e possível mecanismo de doença aterotrombótica.....19

Figura 4. Via dos folatos.....20

Figura 5. Cariótipo 45,X, característico de 50 – 60% das portadoras de ST.....24

Figura 6. Produto de amplificação da PCR correspondente ao gene *TAP1*, polimorfismo A637G, após digestão com enzima Xmi*I*.....36

Figura 7. Produto de amplificação da PCR correspondente ao gene *ENPP1*, polimorfismo A121C, após digestão com enzima AvaII.....37

Figura 8. Produto de amplificação da PCR correspondente ao *locus* 677 do gene da *MTHFR* após digestão com enzima *HinfI*.....40

Figura 9. Distribuição das portadoras de Síndrome de Turner em relação ao IMC.....43

Figura 10. Distribuição da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) nas portadoras de Síndrome de Turner.....44

Figura 11. Distribuição dos níveis de lipídeos plasmáticos nas portadoras de Síndrome de Turner.....45

Figura 12. Distribuição dos genótipos do gene *TAP1* nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.....46

Figura 13. Distribuição dos genótipos do gene *ENPP1* nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.....47

Figura 14. Distribuição dos genótipos do gene *APOE* nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.....48

Figura 15. Distribuição dos genótipos do gene *MTHFR*, polimorfismo códon 677, nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.....49

Figura 16. Distribuição dos genótipos do gene *MTHFR,* polimorfismo códon 1298, nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.....50

Resumo

Introdução: Estudos epidemiológicos demonstram uma redução de até 13 anos na expectativa de vida das portadoras de Síndrome de Turner (ST) em relação às mulheres normais, sendo a principal causa de mortalidade a Doença Cardiovascular (DCV). Hipertensão arterial sistêmica, Diabetes *mellitus*, alterações lipídicas e níveis elevados de Homocisteína são importantes fatores de risco para DCV. Os genes *TAP1, ENPP1, APOE e MTHFR* estão associados ao risco cardiovascular por, estarem envolvidos na patogênese da HAS, do DM, da hipercolesterolemia e da elevação dos níveis plasmáticos de He, respectivamente. O objetivo do presente estudo foi analisar a frequência de polimorfismo destes genes nas portadoras de ST e correlacioná-las como fatores de risco para DCV. **Material e métodos:** A amostra deste estudo compreende 78 portadoras de ST e 372 indivíduos saudáveis sem a presença e história pessoal e familiar de DCV. Os polimorfismo dos genes *TAP1*, *ENPP1 e C677T MTHFR* foram analisado por RFLP – Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição, e as isoformas do gene *APOE* e polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* foram genotipados através de ensaio TaqMan® SNP Genotyping Assays provenientes da Applied Biosystems®. As frequências dos alelos e dos genótipos foram comparadas às respectivas frequências do grupo controle. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste qui-quadrado (X2) no programa SPSS para Windows 9.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). O nível de significância considerado foi menor que 0,05 ($\alpha<0,05$). **Resultados:** Na análise do polimorfismo A637G do gene *TAP1* as frequências dos genótipos A637A, A637G e G637G nas pacientes com ST foi, respectivamente, 7,7%, 52,6% e 39,7%, enquanto que no grupo controle 11,0%, 55,0% e 34,0%, respectivamente. A frequência dos genótipos para o polimorfismo A121C do gene *ENPP1* nas pacientes ST foram: AA 42,3,0%, AC 48,7% e CC 9,0%. Em relação

ao grupo controle os genótipos AA, AC e CC se distribuíram da seguinte maneira, 45,0%, 42,0% e 12,0%, respectivamente. A frequência dos genótipos do gene da *APOE* nas pacientes com ST e nos controles, foi respectivamente: E3E3 68,3% e 61,5%, E2E3 6,3% e 12,4,0%, E3E4 24,1% e 22,6%, E2E2 0% e 1,0%, E4E4 0% e 1,3% e E2E4 1,3% e 1,1%. A frequência dos genótipos *MTHFR* 677CC, 677CT e 677TT nas 78 pacientes portadoras de ST foi, respectivamente, de 47,4%, 42,3% e 10,3%, enquanto que nos 372 indivíduos do grupo controle os genótipos 677CC, 677CT e 677TT foram encontrados nas seguintes frequências: 59,0%, 29,0% e 12,0% , respectivamente. As frequências dos genótipos para o polimorfismo A1298C no gene *MTHFR* nas pacientes com ST e grupo controle, foram, respectivamente: AA 46,2% e 64%, AC 35,9% e 31% e CC 17,9% e 5%. **Conclusão:** Não foi observada associação entre os polimorfismos dos genes *TAP1, ENPP1, APOE* e C677T MTHFR e o risco para DCV nas portadoras de ST. Entretanto o polimorfismo A1298C do gene MTHFR apresenta-se com frequência estatisticamente elevada nas pacientes ($p<.0001$), sendo considerado um fator de risco para a DCV nas portadoras. **Palavras-chave:** Síndrome de Turner, gene *TAP1, ENPP, APOE*, *MTHFR*, Doença cardiovascular.

Abstract

Background: Epidemiological studies show a reduction of up to 13 years in life expectancy of TS patients compared to normal women, being the main cause of CVD mortality. Hypertension (SAH), diabetes mellitus (DM), dislipidemy and homocysteine elevated levels are important risk factors for cardiovascular disease (CVD) that are highly prevalent in this syndrome. *TAP1*, *ENPP1*, *APOE* and *MTHFR* genes are associated with cardiovascular risk for being involved in the pathogenesis of hypertension, DM, hypercholesterolemia and elevation of plasma levels of He, respectively. The aim of this study was to analyze the frequency of polymorphism of these genes in TS patients correlating them to the risk factors for CVD. **Methods:** 78 TS patients and 372 healthy individuals with no personal or familial history of CVD were assessed for polymorphisms of genes *TAP1*, *ENPP1* and C677T *MTHFR* by RFLP. Isoforms of *APOE* gene and A1298C polymorphism of *MTHFR* were genotyped by qPCR, using TaqMan ® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems ®). Results: Analysis of A637G TAP1 polymorphism frequencies of the genotypes TAP1 A637A, G637G and A637G in TS patients were respectively 7.7%, 52.6% and 39.7%, while the control group presented 11, 0%, 55.0% and 34.0% respectively. The frequency of genotypes for A121C polymorphism of ENPP1 gene in the ST patients were: AA 42,3,0%, AC 48.7% and CC 9.0%. In controls, the genotypes AA, AC and CC were distributed as follows, 45.0%, 42.0% and 12.0% respectively. The frequency of genotypes of APOE gene in TS patients and controls were, respectively: E3E3 68.3% and 61.5%, 6.3% and E2E3 12,4,0%, 24.1% and 22 E3E4 , 6%, E2E2 0% and 1.0%, 0% E4E4 and E2E4 1.3% and 1.3% and 1.1%. The frequency of genotypes MTHFR 677CC, 677CT and 677TT in 78 patients with ST was respectively 47.4%, 42.3% and

10.3%, while in 372 control subjects genotypes 677CC, 677CT and 677TT was found in the following frequencies: 59.0%, 29.0% and 12.0% respectively. The frequencies of genotypes for the A1298C polymorphism in the MTHFR gene in patients with TS and control groups were, respectively: AA 46.2% and 64%, 35.9% AC and DC 31% and 17.9% and 5%. **Conclusion:** There were no correlations between the frequencies of polymorphisms of genes *TAP1, ENPP1*, *APOE* and C677T *MTHFR* and CVD risk in women with TS. However, the A1298C polymorphism of MTHFR gene presents with a statistically higher frequency in patients (p <.0001), being considered a risk factor for CVD in carriers

Keywords: Turner syndrome, *TAP1, ENPP1, APOE*, *MTHFR* and cardiovascular disease.

1. Introdução

As Doenças Cardiovasculares são a principal causa de morte das portadoras de Síndrome de Turner, reduzindo em até 13 anos a expectativa de vida destas, em relação às mulheres normais (Naeraa et al, 1995).

São considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular, os defeitos cardíacos congênitos e patologias, associadas à síndrome metabólica, tais como, hipertensão, dislipidemia, hiperinsulinemia e hiperuricemia, comuns nesta síndrome (Reaven, 1988).

A análise das alterações genéticas, associadas ao perfil metabólico destas pacientes, é importante, no que diz respeito ao entendimento e melhora no prognóstico desta síndrome.

2. Fundamentação Teórica

2.1. Doença Cardiovascular

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no Brasil (Lotufo, 1998), correspondendo a cerca de 30% dos óbitos nas diversas faixas etárias (DataSus, 2008). Além disso, representam a principal causa de gastos em assistência médica pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Buss, 1993). De acordo com um estudo norte-americano as mortes causadas por doença cardiovascular distribuem-se da seguinte forma: doenças coronarianas - 53%, acidente vascular cerebral (AVC) - 15%, e doenças arteriais periféricas - 5% (National Institute of Health, 1990).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os fatores de risco em dois grupos, um deles relacionado ao indivíduo e o outro relacionado ao ambiente. O primeiro grupo subdivide-se em: geral (idade, sexo, escolaridade, herança genética), associado ao estilo de vida (tabagismo, dieta inadequada e sedentarismo) e intermediários ou biológicos como, hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade e dislipidemia e Diabetes *mellitus* (DM) (IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2007). O fumo, a HAS, a idade e a DM são considerados fatores de risco independentes para a aterosclerose e consequente doença isquêmica do coração (Grundy, et al*,* 1999). Considerando-se o AVC, o mais importante fator de risco independente é a HAS (Grundy, et al*,* 1999). Ensaios clínicos controlados indicaram redução da morbimortalidade por doença cardiovascular em indivíduos que obtiveram redução terapêutica dos níveis pressóricos (Collins, et al*,* 1990). No segundo grupo estão as condições socioeconômicas, culturais, ambientais e de urbanização (Nobre, et al*,* 2006).

Há ainda, outros fatores que potencializam os fatores independentes, denominados fatores predisponentes, como história familiar de doença isquêmica do coração, obesidade, sedentarismo, etnia e fatores psicossociais (Coltro, et al, 2009). O aumento do IMC (índice de massa corpórea) também foi associado com prevalência elevada de HAS, DM, hipertrigliceridemia e HDL-C baixo (Cercato et al, 2004) e consequente elevação do risco para DCV.

2.1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

A elevação da pressão arterial (PA) representa um dos mais importantes fatores de risco para doença cardiovascular (Lewington et al, 2002; Yusuf et al, 2004). Estudos epidemiológicos apontam que a HAS aumenta o risco de doença vascular encefálica (Yusuf et al, 2004), doenças arteriais coronarianas (Mohr, 1983; Hennekens, 1996), insuficiência cardíaca congestiva (Smith, 1995), insuficiência renal crônica (Smith et al, 1995; Wachtell et al, 2004) e acometimento vascular (D'Ávila et al, 1999). A HAS pode ser classificada em primária ou essencial, quando não há causa reconhecível e secundária, quando tem um fator etiológico definido (Nocite, 1988) como, distúrbios renais, feocromocitoma, Síndrome de Cushing, entre outras (Correa et al, 2005).

Estudos populacionais realizados em algumas cidades do Brasil mostram prevalência de HAS (≥140/90 mmHg) de 22,3% a 43,9% (Matos e Ladeia, 2003; IV Brazilian Guidelines, 2004; Gus et al, 2004). No Brasil, em 2006, a Sociedade Brasileira de Hipertensão estimou a existência de 30 milhões de hipertensos, o que corresponde a 30% da população adulta, elevando estes números para 60%

na população com mais de 60 anos (V Diretrizes Brasileira de Hipertensão arterial, 2006). Entre os fatores de risco para mortalidade, HAS está associada a 40% das mortes por AVC e 25% da mortalidade por doença coronariana (Lewington et al, 2002). Aumentando progressivamente com a elevação da PA, a partir de 115/75 mmHg (The Seventh Report of the Joint National Committee, 2003). Os valores para diagnóstico de HAS se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Valores para diagnóstico de hipertensão de acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2006)

Classificação	Pressão Sistólica (mmHg)	Pressão Diastólica (mmHg)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Limítrofe	130 – 139	85 – 89
Hipertensão	≥140	≥90

O desenvolvimento de HAS depende da interação entre predisposição genética e fatores ambientais, embora os mecanismos de como estas interações ocorram ainda não estejam completamente elucidados. No entanto, a HAS é acompanhada por alterações funcionais no sistema nervoso autônomo simpático (Mancia et al, 1999; Smith et al, 2004) e no equilíbrio renina/angiotensina (Jin et al, 2006; Sim e Qui; 2003), entre outros, o que resulta em várias alterações estruturais do sistema cardiovascular.

2.1.1.1 Perfil Genético da HAS

Recentemente, diversos estudos confirmaram a associação de vários genes com a variação da pressão sanguínea e a HAS (Luft, 1998; Corvol et al, 1999; Jeunemaitre et al, 1999; Krushkal et al, 1999; Benjafield et al, 2005). Dentre esses estudos, podem ser destacados os que envolvem os polimorfismos do gene *TAP1* (*transporter-associated antigen processing)* (Gao et al, 2006). Este gene, localizado no cromossomo 6 (6p21.3), *locus* responsável pelo complexo MHC do tipo II, (Figura 1), juntamente com o gene *TAP2*, codifica uma proteína heterodimérica, responsável por transportar para o retículo endoplasmático, peptídeos provenientes da degradação de antígenos citoplasmáticos pelo complexo proteossoma, que posteriormente serão acoplados às moléculas HLA de classe I e apresentados aos linfócitos T-CD8^{+} (Neefjes et al, 1993).

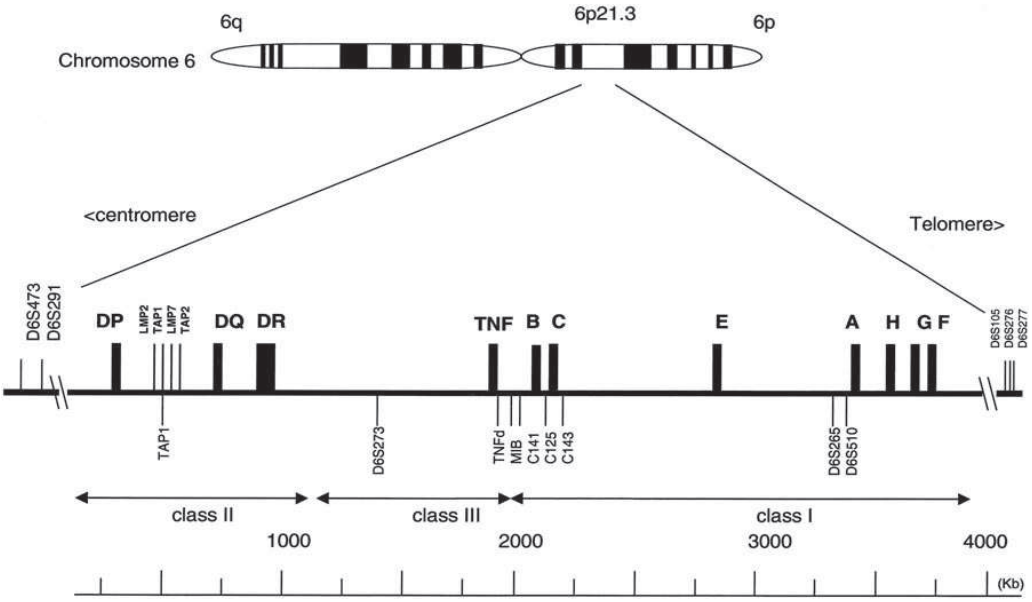


Figura 1. Representação esquemática da localização do gene *TAP1* no cromossomo 6 (6p21.3), Feenstra et al, 2000.

É um gene bastante polimórfico, cujas variações na sequência de aminoácidos, conferem diferentes afinidades de ligação aos peptídeos gerados, (Pociot e McDermott, 2002), o que gera tanto quadros de susceptibilidade, quanto proteção para diversas doenças (Ozba-Gerçeker e Ozguc, 2003). Alguns estudos sugerem que alterações neste gene estão associadas a doenças auto-imunes, como esclerose múltipla, diabetes tipo 2, *lupus* eritematoso e Doença de Graves (Faustman et al*,* 1991; Moins-Teisserenc et al*,* 1995; Rau et al*,* 1997). Acredita-se variantes deste gene tenham importante papel na disfunção endotelial aumentando à susceptibilidade a doença hipertensiva (Oshima et al, 2005; Mori et al, 2006; Yang et al, 2007).

O polimorfismo A/G no códon 637 do gene *TAP1* causa uma mudança do aminoácido Asparagina (GAC) para Glicina (GGC), o que pode estar correlacionado ao processo fisiopatológico da hipertensão por meio de disfunção endotelial, gerada pelo processamento errôneo de peptídeos e aminoácidos (Alberts et al*,* 2001; Ritz et al, 2003).

2.1.2 Diabetes *mellitus* (DM)

O Diabetes *mellitus* não e uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007). Essa hiperglicemia é o resultado de defeitos na ação e/ou secreção de insulina (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007). A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS)

(Albert e Zimmet, 1999) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) (*American Diabetes Association*, 1998) inclui quatro classes clinícas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional.

O DM tipo 1 (DM1), forma presente em 5%-10% dos casos, é o resultado da destruição das células beta pancreáticas, com consequente deficiência de insulina (Norwood, 2000; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007). Na maioria dos casos essa destruição celular é mediada por reações auto-imunes, exceto nos casos referidos como forma idiopática do DM1 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007). O DM tipo 2 (DM2) é a forma presente em 90%-95% dos casos e caracteriza- se por defeitos na ação e na secreção da insulina (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007) e deficiência na absorção de glicose pelas células musculares e adiposas (Norwood, 2000). Com a elucidação de novos marcadores e genético e mecanismos fisiopatológicos, novas categorias de DM têm sido relatadas. Duas categorias tem tido grande importância nos dias atuais: diabetes do adulto de início no jovem (Maturity Onset Diabetes of the Young - MODY) e diabetes de origem mitocondrial. O tipo MODY engloba um grupo heterogêneo de diabetes sem predisposição para a cetoacidose e sem obesidade, com hiperglicemia leve, com início antes dos 25 anos de idade e com várias gerações de familiares com diabetes, conFigurando uma herança autossômica dominante (Fajans et al, 2001). O diabetes de origem mitocondrial ou diabetes com surdez e herança materna caracteriza-se por ocorrer em indivíduos jovens e sem obesidade. Inicialmente a hiperglicemia é leve e pode progredir lentamente para graus mais avançados que necessitam emprego de insulina. Ocorre devido a uma mutação do DNA mitocondrial interferindo com a produção de energia. Os pacientes usualmente apresentam surdez

neurossensorial e distrofia macular e menos frequentemente pode haver miopatia, cardiomiopatia e doença renal (Guillausseau et al, 2001).O diabetes gestacional é definido como a tolerância diminuída aos carboidratos, de graus variados de intensidade, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (World Health Organization, 1999).

Indivíduos com DM1 apresentam prevalência aumentada de DCV, sendo 10 vezes maior que em controles não-diabéticos da mesma faixa etária (The Diabetes Control and Complications Trial, 2005; Thom, et al, 2006). A presença de DM dobra o risco de DCV em homens e triplica em mulheres (Kannel e McGee, 1979; Selvin, et al*,* 2004) e, eleva em 3 vezes a mortalidade por AVC (Smith, et al*,* 1984; Stamler, et al*,* 1993). Aproximadamente 13% dos pacientes com DM, acima de 65 anos, já tiveram um episódio de AVC (Kuller, 1995).

Um estudo de coorte inglês com mais de 23.000 indivíduos diabéticos, revelou que a doença isquêmica do coração foi responsável por 8% das mortes em homens e 11% em mulheres com menos de 40 anos (Laing et al*,* 2003). Nesta mesma coorte foi avaliada a mortalidade cerebrovascular destes pacientes, revelando que 4% das mortes em indivíduos com menos de 40 anos foram decorrentes de AVC (Laing, et al*,* 2003). Haffner et al (1998) mostraram que a presença de risco de evento coronariano isquêmico em pacientes diabéticos é similar ao de indivíduos não-diabéticos sabidamente coronariopatas.

Os eventos cardíacos que mais contribuem para a morbi-mortalidade nos portadores de DM são a doença arterial coronariana (DAC), AVC e a doença arterial periférica (Siqueira, et al*,* 2007; Santos, et al, 2009). Isto se dá pela maior

prevalência dos fatores de risco tradicionais entre os pacientes com DM, entre eles obesidade, dislipidemia e HAS (Siqueira et al*,* 2007).

O metabolismo glicídico vem sendo estudado com base nos valores da glicemia de jejum, glicemia de 2 horas pós-sobrecarga oral de glicose e hemoglobina glicada (Siqueira, et al*,* 2007). Na Tabela 2 encontram-se os valores para diagnóstico de DM. Dados recentes revelam que o risco cardiovascular é gradual e progressivo à medida que estes marcadores se elevam ainda mais em níveis pré-diabéticos (Gross, et al*,* 2003), e que o risco de morte se eleva significativamente por DCV e coronariopatia a partir de 126 mg/dL para glicemia de jejum (Barrett-Connor e Ferrara, 1998).

Tabela 2. Valores de glicose plasmática (em mg/dl) para diagnóstico de DM de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2007)

Categoria	Jejum*	2h após 75g de glicose	Casual**
Glicemia normal	<99	<140	
Tolerância à glicose diminuída	≥100 a <126	≥ 140 a <200	
Diabetes *mellitus*	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com sintomas clássicos)***

*O jejum é definido como a ausência de ingestão calórica por no mínimo 8 horas; **glicemia plasmática casual e aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição; ***os sintomas clássicos de DM incluem poliúria, polidipsia e perda não esclarecida de peso.

2.1.2.1 Perfil Genético das alterações no metabolismo glicídico

Muitos são os genes candidatos a anormalidades no metabolismo glicídico. Um deles, associado à ocorrência de DM e resistência insulínica, é o gene *ENPP1* (*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*), localizado no cromossomo 6 (6q22eq23), um *locus* relacionado à obesidade e ao diabetes, segundo alguns estudos (Duggirala et al, 2001; Arya et al, 2002; Meyre et al, 2004). Este gene codifica uma glicoproteína de membrana classe 2 que inibe à sinalização via tirosina quinase do receptor de insulina (Pizzuti, et al*,* 1999; Moehlecke et al*,* 2010). É amplamente expresso no músculo esquelético, fígado, túbulos renais, tecido adiposo, pâncreas e endotélio capilar do cérebro entre outros (Harahap et al, 1988). De acordo com alguns estudos a hiperexpressão do *ENPP1* em células de cultura reduz tanto a estimulação da insulina quanto a ativação do receptor de insulina (Grupe et al, 1995). Foi observada concentração elevada do seu produto nos tecidos de indivíduos insulino-resistentes (Frittitta et al, 1997; Maddux e Goldfine, 2000).

Alguns estudos demonstraram a associação entre polimorfismos do gene *ENPP1* (Lis/Glu no éxon 4 no códon 121 – A/C) com o risco de diabetes e obesidade (Meyre et al, 2004; Abate et al, 2005). A variante 121Q (alelo de risco) se liga ao receptor de insulina tirosina quinase com mais afinidade se comparado com seu alelo selvagem 121K, resultando em menor autofosforilação do receptor (Pizzuti, et al*,* 1999; Moehlecke, et al*,* 2010). Em um estudo multicêntrico, a variante 121Q foi associada com

maior risco de desenvolvimento precoce de DM2 e infarto agudo do miocárdio se comparado ao alelo 121K (Bacci, et al, 2005). Em uma meta-análise recente de 15.801 pacientes com DM2 e 26.241 indivíduos-controle, o alelo 121Q foi associado com um elevado risco de DM2, que foi modulado pelo IMC (McAteer, et al, 2008). Outros fenótipos associados a este polimorfismo incluem aceleração do processo de aterosclerose (Bacci, et al, 2005), elevação do risco para hipertensão (Kubaszek, et al, 2004) ou obesidade (Meyre, et al, 2005) e aumento da predisposição para o desenvolvimento de nefropatia diabética (Canani, et al, 2002).

No entanto, o papel preciso do polimorfismo K121Q no desenvolvimento de complicações vasculares da DM2, especialmente em relação à doença cardiovascular aterosclerótica, ainda não foi plenamente esclarecido (Moehlecke et al, 2010). Em indivíduos caucasianos, os efeitos do alelo Q variam, desde associação a obesidade (Meyre et al, 2005) até infarto do miocárdio precoce (Bacci et al, 2005). Em relação aos Sicilianos, Suíços e Finlandeses a variante Q parece influenciar na sensibilidade da insulina quando comparados com o alelo selvagem, porém isto não se repete em Dinamarqueses ou Hispânicos (Pizzuti, et al, 1999; Gu, et al, 2000; Rasmussen, et al, 2000; Gonzalez-Sanchez, et al, 2003; Kubaszek, et al, 2003).

2.1.3 Dislipidemias

O colesterol é um importante fator de risco para DAC, principal causa de morbidade e mortalidade nos dias atuais (Romaldini et al*,* 2004). O estudo prospectivo de Framingham (1948), realizado numa grande coorte de homens e mulheres saudáveis, demonstrou que o risco de manifestação de DAC é proporcional à curva dos níveis de colesterol total (CT) (Gordon et al*,* 1981; Skoglund-Andersson et al*,* 2003).

Os lipídeos, por serem substâncias hidrofóbicas, são transportados por compostos denominados lipoproteína, sendo possível o deslocamento na corrente sanguínea. As lipoproteínas plasmáticas apresentam diferentes densidades, de acordo com a quantidade de proteína que compõem os seus complexos. Podem-se identificar cinco tipos principais de lipoproteínas plasmáticas: quilomícrons, lipoproteínas de baixíssima densidade (VLDL-C), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL-C), lipoproteínas de densidade baixa (LDL-C) e lipoproteínas de densidade alta (HDL-C) (Moriguchi, 2001). As lipoproteínas são formadas por um núcleo contendo triglicerídeos e ésteres de colesterol envolto por uma superfície polar constituída por fosfolípideos, colesterol livre e por um componente protéico, denominado apolipoproteína ou apoproteína (Apo) (Lehninger, 1995) (Figura 2).

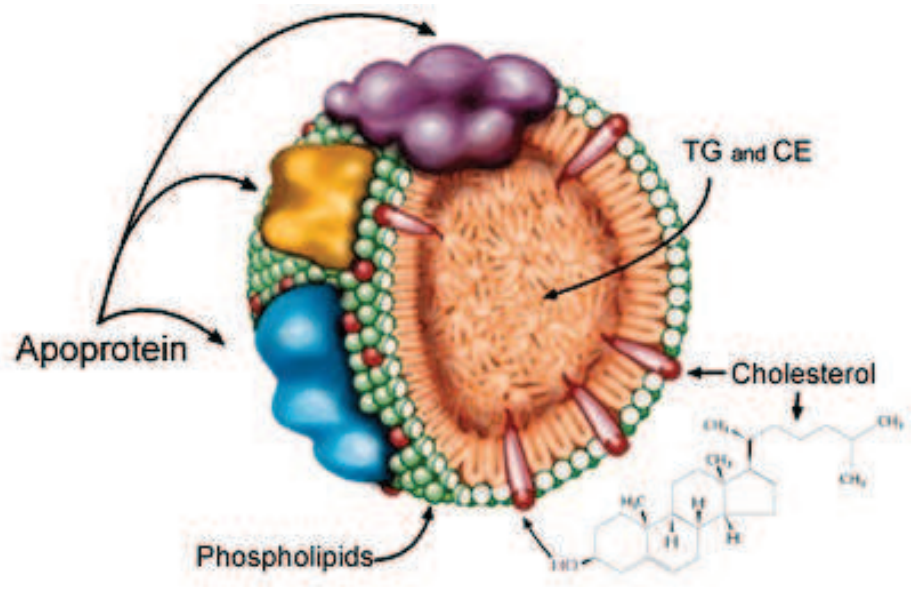


Figura 2. Esquema básico das lipoproteínas, constituídas de um núcleo apolar, formado por triglicerídeos (TG) e ésteres de colesterol, envolto em um composto polar formado pelos fosfolipídeos e pelas apolipoproteínas.

Alterações no metabolismo dos lipídeos têm implicações diretas na fisiopatologia da doença aterosclerótica. O risco de eventos cardiovasculares aumenta progressivamente com o aumento dos níveis de LDL-C e está inversamente relacionado aos níveis de HDL-C (Castelli et al, 1986). Partículas de LDL-C pequenas e densas são particularmente aterogênicas, causando lesão no endotélio e no músculo liso subjacente, especialmente após sofrer oxidação, glicação - DM ou mesmo incorporação aos imunocomplexos. Sua migração através do endotélio e posterior internalização por macrófagos desencadeia uma cascata inflamatória, que é responsável pela progressão da lesão aterosclerótica (Pimentel et al, 2001).

Na Tabela 3 encontram-se os valores para controle dos níveis plasmáticos de lipídeos.

Tabela 3. Valores de referência para lipídeos plasmáticos de acordo com as Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose – Dislipidemia da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2001)

Lipídeos	Desejável	Limítrofe	Elevado
Colesterol Total (mg/dL)	<200	200 - 239	≥240
Colesterol HDL (mg/dL)	≥40	NA	<40
Colesterol LDL (mg/dL)	<100	100 -159	≥160
Triglicerídeos (mg/dL)	≤150	151 - 199	≥200

NA – não aplicável.

2.1.3.1 Perfil genético das dislipidemias

A apolipoproteína E (APOE) foi descoberta nos anos 70 como um componente das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (Wislon et al*,* 1996; Mahley e Rall, 2000). Sua síntese e secreção ocorrem em muitos tecidos, como fígado, cérebro, pele, macrófagos, baço, glândulas adrenais, rins, ovários, testículos, coração e pulmões. Seu maior sítio de síntese e secreção vem das células parênquimatosas do fígado, as quais secretam APOE em associação com partículas de VLDL (Driscoll e Getz, 1984; Smith, 2000; Mahley e Rall, 2001; Martinez et al*,* 2000).

A APOE é uma glicoproteína de 299 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 34.000 Daltons (Greg et al*,* 1984; Mahley e Rall, 2000). O gene *APOE* humano está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2) (Olaisen et al, 1982; Das et al*,* 1985; Paik et al*,* 1985) e possuí três alelos polimórficos (ε2, ε3 e ε4), que codificam três

isoformas da Apo E: E2, E3 e E4, distintas entre si pelo conteúdo de cisteína e arginina nas posições dos códons 112 e 158 do exon 4 (Zannis et al, 1981; Utermann et al, 1982). A frequência estimada em população adulta branca do alelos ε2, ε3 e ε4 são, é respectivamente, 8%, 78% e 14% (Wilson et al, 1994).Estes alelos determinam seis fenótipos: E2/2, E3/3, E4/4, E2/3, E2/4 e E3/4 (Zannis et al., 1982; Wardell et al, 1982; Mahley e Rall, 2000; Martinez et al, 2001).

O fenótipo E3/3 é o mais comum, ocorrendo em 60% da população (Martins et al, 2008), portanto, a Apo E3 é considerada a forma original e as outras, suas variantes (Oliveira, 1995; Wilson et al, 1996; Mahley e Rall, 2000). Estes alelos são importantes marcadores genéticos para dislipidemia e doença coronariana (Wilson et al, 1994). Dados da literatura mostram uma contribuição de 4 - 15% do polimorfismo da APOE na variação dos níveis de colesterol na população em geral (Dreon et al, 1995; Mahley e Rall, 2000, Kolovou et al, 2003).

Vários são os mecanismos descritos sobre como as diferentes isoformas da APOE influenciam nas concentrações plasmáticas de colesterol, sendo os mais importante: a interferência na absorção de colesterol, na síntese endógena de colesterol, na eliminação do colesterol através dos ácidos biliares, na remoção dos quilomicrons remanescentes, na conversão do IDL em LDL-C, na cinética do LDL-C, na depuração hepática das gorduras da dieta, através de propriedades imunorregulatórias de afinidade aos receptores de lipoproteínas e na participação dessas isoformas no transporte reverso do colesterol (Dreon et al, 1995; Lehtimäki et al, 1995; Martinez et al, 2001).

As isoformas também diferem na afinidade na ligação aos receptores. Apo E3 e E4 apresentam grande afinidade de ligação aos receptores, enquanto a APOE2 mostra menos de 2% da afinidade normal. Devido à baixa afinidade de ligação ao receptor, a Apo E2 é geralmente associada aos níveis baixos de LDL-C e CT, enquanto a alta afinidade da Apo E4 ao receptor tem sido associada ao declínio da longevidade, ao aumento dos níveis plasmáticos de LDL-C e CT e ao aumento da prevalência de doença cardiovascular e à doença de Alzheimer (Smith, 2000; Hatters et al, 2006).

O alelo ε4 foi associado com risco aumentado de DCV em vários estudos, especulando-se, embora o mecanismo não esteja totalmente elucidado, que seja pela associação com as lipoproteínas ricas em triglicerídeos (Eicnher et al1993; Wilson et al*,* 1994; Mahley e Rall, 2000, Wilson et al*,* 1996; Ballantyne et al*,* 2000; Gerdes et al*,* 2000; Smith et al*,* 2000; Lahoz et al*,* 2001; Hagberg et al*,* 2002; Song et al*,* 2004).

2.1.4 Hiper-homocisteinemia

A homocisteína (He) é um aminoácido não essencial encontrado na forma de produto intermediário do metabolismo da metionina (Bailey e Gregory, 1999). Esse aminoácido não participa da produção de proteínas e está presente em duas vias metabólicas: remetilação à metionina e transulfuração à cisteína. Na reação de metilação, a He é revertida à metionina ao receber o grupamento metil do 5-metiltetraidrofolato proveniente do folato dietético, sendo a enzima MTHFR

responsável pela conversão do 5,10-metilenotetraidrofolato em 5-metiltetraidrofolato. Na reação de transulfuração a He condensa-se irreversivelmente com a serina para formar cistationina (Saw et al, 2001).

Quando alguma destas vias metabólicas sofre bloqueio, total ou parcial, há aumento na concentração de He circulante, uma vez que este aminoácido não se acumula nas células. Cerca de 70% da homocisteína presente no sangue está ligada a proteínas, principalmente albumina. Uma pequena fração permanece na forma livre e o restante, espontaneamente, forma disulfitos como homocistina (duas moléculas de He) ou cisteína-homocisteína. A expressão da He total refere-se à soma das concentrações de He livre, ligada a proteínas e na forma de dissulfitos (Harboe-Gonçalves et al, 2005).

Diversos estudos mostram que a concentração elevada de He plasmática é um fator de risco independente para a DCV (Selhu et al, 1995; Guba et al, 1996; Graham et al, 1997; Van den Brandhof, 2001; Wolfgang et al, 2003) e pode contribuir para manifestação prematura (Mager et al, 1999; Tsai et al, 1999) e para a severidade da DAC (Chao et al, 1999; Yoo et al,1999), além de representar um preditor de mortalidade, independente dos fatores de risco tradicionalmente conhecidos (Anderson et al, 2000).

McCully em 1969 mostrou evidências da associação entre aterosclerose e concentrações elevadas de He, dados confirmados em 1992 por Kang e colaboradores. Nos últimos anos foram realizados diversos estudos, transversais e de caso-controle, que reforçaram essa relação de risco (Coull et al, 1990; Clarke et al, 1991; Stampfer et al, 1992; Brattström et al, 1994; Arnesen et al, 1995; Graham et al, 1997). Muniz e et al (2006) observaram uma concentração

plasmática de He estatisticamente mais elevada nos pacientes com DAC do que nos controles, sugerindo uma possível participação desses fatores como agentes causais para os danos vasculares que podem levar à DAC.

As alterações mais frequentes causadas pela hiper-homocisteinemia são: lesão das células endoteliais, aumento da musculatura lisa vascular, maior adesividade plaquetária, aumento da oxidação do LDL-C com deposição na parede vascular e ativação direta da cascata da coagulação (Stenbeirg et al*,* 1989; Durand et al, 2001). Uma vez que o mecanismo fisiopatológico que leva à aterosclerose ainda não foi elucidado, alguns autores sugerem que a hiper-homocisteinemia é fator de risco para DAC (Stampfer et al*,* 1992; Neves et al*,* 2004; Gravina-Taddei et al*,* 2005), enquanto outros defendem ser consequência (Folsom et al*,* 1998).

A Figura 3 resume o metabolismo da He e o possível mecanismo da doença aterotrombótica (Hankey e Eikelboom, 2000).

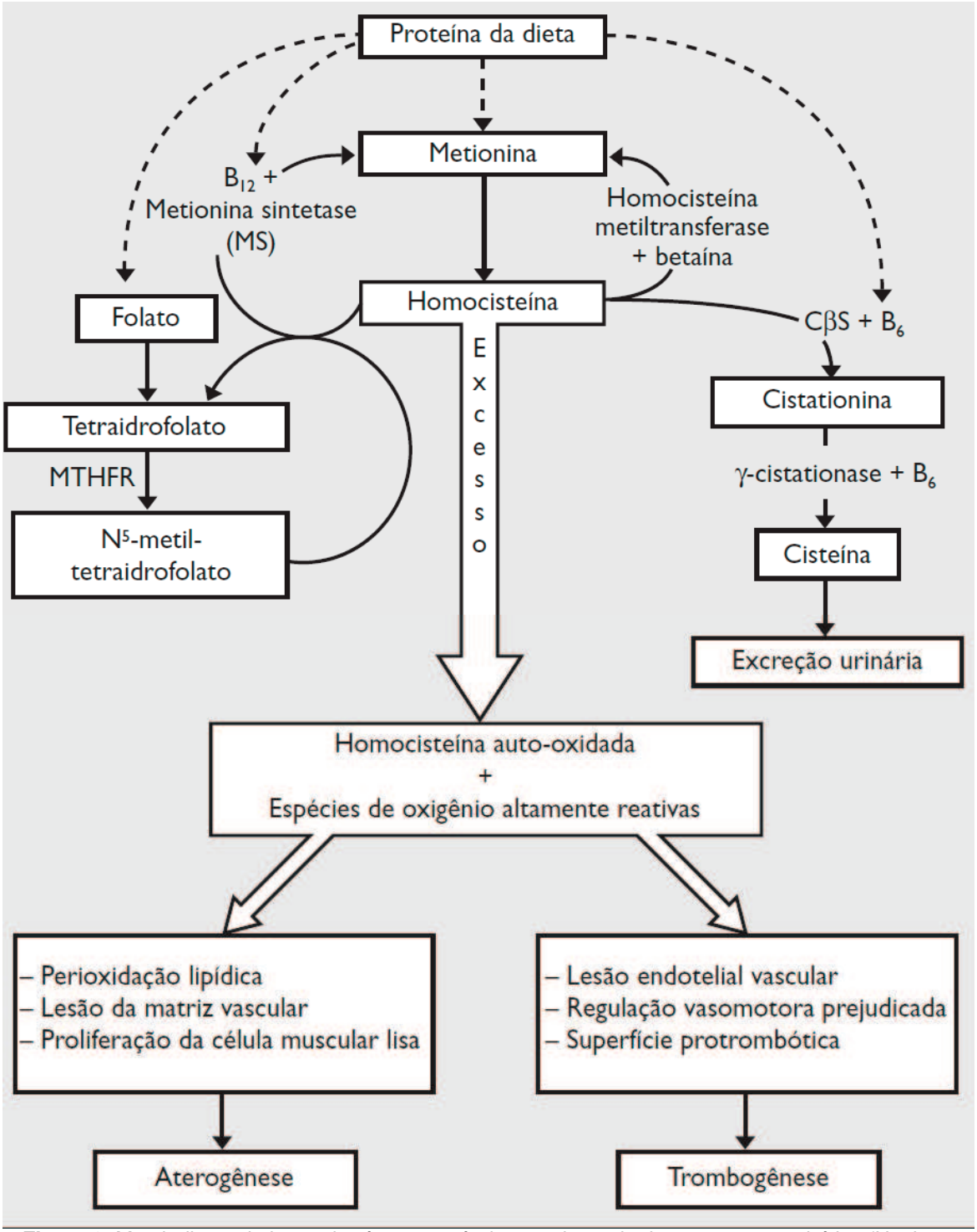


Figura 3. Metabolismo da homocisteína e possível mecanismo de doença aterotrombótica (Hankey e Eikelboom, 2000).

2.1.3.1 Perfil genético da hiper-homocisteinemia

Fatores fisiológicos, genéticos, nutricionais e hormonais determinam a hiper-homocisteinemia plasmática. A via dos folatos (Figura 4) é orquestrada principalmente pela metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), que catalisa a síntese de 5-metiltetrahidrofolato, o principal doador de metil para a remetilação de He para metionina.

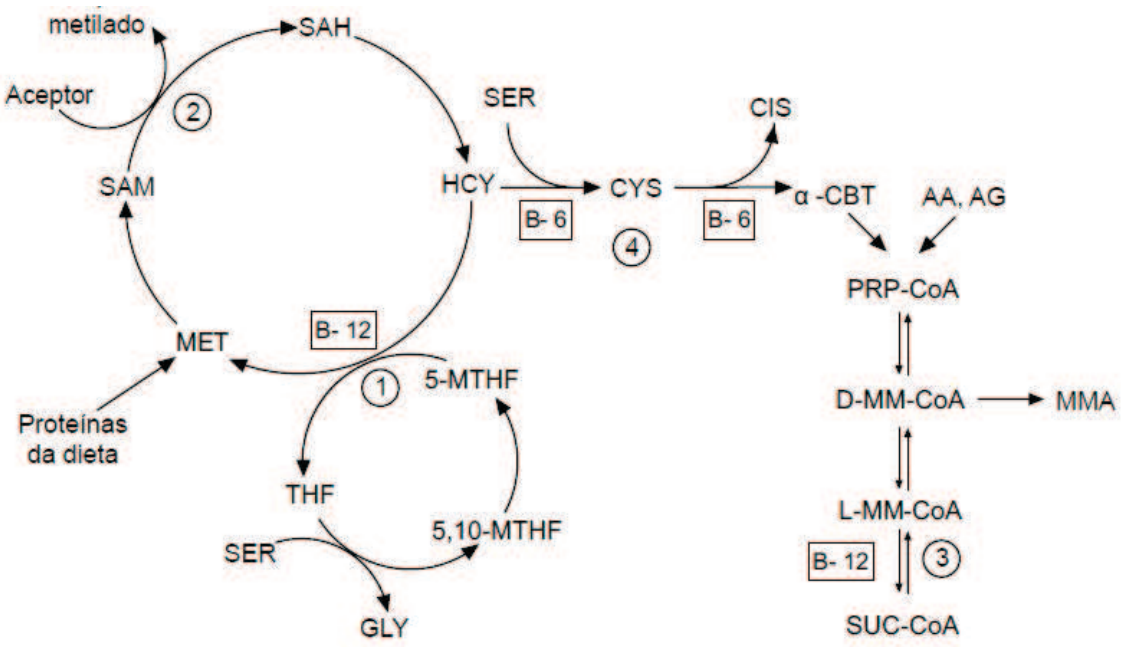


Figura 4. Via dos folatos. **1**. Reação de metilação da homocisteína (metionina sintase); **2**. Doação de grupamentos metil; **3.** Reação de isomerização do metilmalonil-coA para succinil-coA (L-metil malonil-CoA mutase); **4.** Reações da via de transulfuração dependentes de vitamina B6 (cistationina-ßsintase e cistationina-γ-liase). SAM, S-adenosil metionina; SAH, S-adenosil homocisteína; CYS, cistationina; CIS, cisteína; α-CBT, α-cetobutirato; PRP-CoA, propionil-CoA; THF, tetrahidrofolato; 5-MTHF, 5-metiltetrahidrofolato; 5,10-MTHF, 5,10 metileno tetrahidrofolato; AA, aminoácidos; AG, ácidos graxos (Herrmann et al, 2003; Paniz et al, 2005).

A metionina é o precursor para a síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador celular de metila para o DNA, RNA, proteínas e

metilação de fosfolipídeos (Bailey e Gregory, 1999). A S-adenosilmetionina é sintetizada de ATP e metionina pela ação da adenosilmetionina transferase (Lehninger et al, 1995).

A transferência de um grupo metila, do S-adenosilmetionina (SAM) para um receptor, libera S-adenosilomocisteína (SAH), que é subsequentemente quebrada em He e adenosina (Lehninger et al, 1995). A metionina é regenerada pela transferência de um grupo metila para a He em uma reação catalisada pela metionina sintase (Lehninger et al, 1995). A metionina é reconvertida em SAM para completar um ciclo do grupo metila ativado (Lehninger et al, 1995).

O gene da *MTHFR* localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.3) (Goyette et al*, 1994)* apresenta dez polimorfismos, descritos até o momento, sendo os mais estudados, os que envolvem os nucleotídeos C677T e A1298C, por apresentarem maior impacto na função enzimática. A frequência dos alelos varia com a população estudada e 8% da população geral é homozigota para a variante C677T (Neves et al*,* 2004).

A troca de C por T na posição 677 causa a substituição de alanina por valina na proteína MTHFR e consequente redução na atividade da enzima. A atividade específica da enzima MTHFR é reduzida em 35% na presença de heterozigose (C/T), em relação ao genótipo normal (C/C), e em 70% em homozigose (T/T) (Wainfan e Poirier, 1992; De Cabo et al, 1994; Balaghi e Wagner, 1993). O polimorfismo A1298C promove a substituição de um glutamato por uma valina, também causando uma

redução na atividade da enzima mais efetiva quando em homozigose (van der PUT et al,1998).

O polimorfismo C677T situa-se no domínio catalítico da proteína, enquanto o A1298C se encontra no domínio presumidamente regulatório (van der Put et al, 1998). O polimorfismo A1298C influencia na atividade específica da enzima e também na concentração de folato, mas com menos impacto que o polimorfismo C677T (van der Put et al,1998).

Uma redução na atividade da enzima MTHFR requer um aumento na ingesta de ácido fólico para manter normal a taxa de remetilação de He para metionina (Bailey e Gregory, 1999). Consequentemente, baixos níveis de folato em indivíduos com redução na atividade da enzima MTHFR, resultam em um aumento nos níveis de He na diminuição nos níveis de metionina. A presença desses polimorfismos tem sido correlacionada a uma maior ocorrência de eventos trombóticos e a ocorrência de diversos tipos de câncer (Shi et al, 2005).

2.2 Síndrome de Turner

A Síndrome de Turner (ST) foi descrita em 1938 por Henry Turner, sendo caracterizada pela monossomia completa ou parcial do cromossomo sexual em algumas ou todas as células, acometendo aproximadamente 1/2.500 nascidos vivos (Stochholm et al, 2006). O cariótipo clássico é o 45,X (Figura 5), todavia, estudos demonstram que este cariótipo está presente em apenas 50% das pacientes, sendo que o restante apresenta mosaicismo (presença de duas ou mais linhagens celulares como, 45,X/46,XX) ou aberrações cromossômicas estruturais, como cariótipos com isocromossomo de X ou cariótipos com a presença, parcial ou total, do cromossomo Y (Baena, 2004, Bianco et al, 2006; 2008; 2009; 2010).

Além da característica citogenética, baixa estatura e disgenesia gonadal estão presentes em até 90% das pacientes portadoras de ST (Bondy, 2008). Outros sinais encontrados podem incluir pavilhão auricular dismórfico com o eixo longitudinal em posição oblíqua, olhos com fundo palpebral antimongolóide, pregas epicânticas internas, palato em ogiva, retrognatismo, distância intermamilar aumentada, esterno curto, malformações cardiovasculares (válvula aórtica bicúspide, coarctação da aorta, estenose aórtica valvar, prolapso da valva mitral, dilatação e ruptura da aorta), malformações renais (como rim em ferradura, duplicação ureteral ou agenesia unilateral do rim) e hipoplasia do quarto ou quinto metacarpiano e metatarsiano (Beiguelman, 1982; Ranke et al, 1983; Lippe, 1991; Elsheikh et al, 2002; Stratakis e Rennert, 2005). O crescimento das mamas em portadoras desta síndrome é bem mais lento em relação ao restante da população feminina. Visto que as mulheres com ST apresentam disgenesia gonadal, as alterações endócrinas típicas de puberdade não

ocorrem, sendo frequentemente referida a amenorréia primária (Stratakis e Rennert, 1994).

O diagnóstico pós natal pode acontecer em três fases: infância (15%), adolescência (26%) e idade adulta (38%), sendo as principais queixas, linfedema durante a infância (97%), e baixa estatura em adolescentes (82%) (Hjerrild et al, 2008) e amenorréia nas paciente adultas (Sybert e McCauley, 2004).

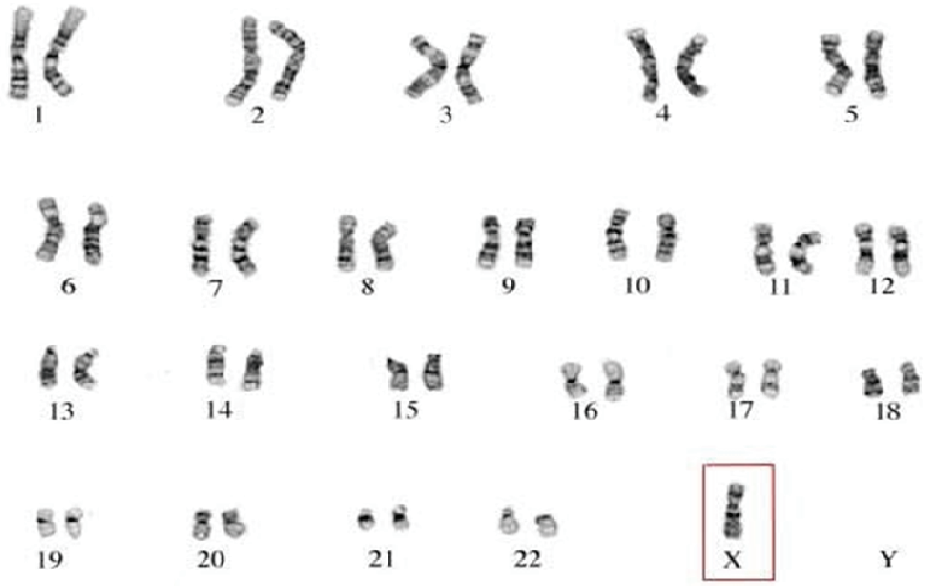


Figura 5. Cariótipo 45,X, característico de 50 – 60% das portadoras de ST.

Ao longo do tempo, diversas informações contribuíram para o conhecimento das principais causas de morbi-mortalidade nas pacientes, o que motivou novo enfoque na avaliação desta síndrome. Baena e et al(2004) compararam a incidência de determinadas doenças entre mulheres portadoras de ST e da população em geral e observaram que o risco relativo (RR) para doenças endócrinas apresentou-se significativamente elevado (RR 4,9), com importante aumento para hipotiroidismo (RR 5,8), corroborando com estudos anteriormente realizados (Gruneiro et al, 1987; Ivarsson et al, 1995; Chiovato et al, 1996; Gravholt et al, 1998). Em relação à DM1

(RR11,6) e à DM2 (RR 4,4) os achados confirmaram dados anteriormente apresentados por este mesmo grupo, num estudo multicêntrico realizado entre 1984 e 1993, envolvendo 594 pacientes (Gravholt et al, 1998). O risco para doença cardíaca isquêmica e aterosclerose (RR 2,1), hipertensão (RR 2,9), acidente vascular cerebral (RR 2,7), cirrose hepática (RR 5,7), osteoporose (RR 10,1), fraturas (RR 2,16) também se apresentou elevado. Quanto ao risco para câncer, apresentou-se elevado somente para câncer retal e de cólon.

A mortalidade também é maior nas pacientes portadoras de ST como demonstra um estudo de coorte inglês, que encontrou um aumento de 4,2 para morte prematura nestas pacientes. As causas de morte mais frequentes foram doenças do sistema nervoso, digestivo, cardiovascular, respiratório e genito-urinário (Swerdlow et al, 2001).

2.2.1. Síndrome de Turner e a Doença Cardiovascular

Estudos epidemiológicos demonstram uma redução de até 13 anos na expectativa de vida das portadoras de ST em relação às mulheres normais, sendo a principal causa de mortalidade a DCV (Naeraa et al, 1995). Sybert et al (1998) avaliaram 244 pacientes com ST com idade de 0 - 80 anos e encontraram diversas anormalidades cardiovasculares, incluindo defeitos estruturais, HAS e prolapso da válvula mitral, em 56% das pacientes, dados que posteriormente foram confirmados por outros pesquisadores (Völkl et al, 2005; Poprawski et al, 2009).

São frequentes, e bem descritas, as malformações no sistema cardiovascular destas pacientes (17-56% contra 2% da população geral) (Sybert, 1998; Elsheikh et al, 2001; Landin-Wilhelmsen et al, 2001), destacando-se a ocorrência de coarctação da aorta (10-21%), anormalidades na válvula aórtica (18-50%) (Dawson et al, 1992; Gotzsche et al, 1994; Gravholt et al, 1998; Mazzanti e Cacciari, 1998; Sybert, 1998; Ho et al, 2004; Poprawski et al, 2009), vasculopatia generalizada, caracterizada por dilatação arterial (Baguet et al, 2005; Lopez et al, 2008) e a hipoplasia do ventrículo esquerdo ou da aorta (Mazzanti et al, 1988; Hou et al, 1993; Mazzanti e Caccieri, 1998; Prandstraller et al, 1999; Stochholm et al, 2006). Alguns estudos relacionam estas anormalidades à presença de vários fatores de risco para a doença cardiovascular nestas pacientes, tais como, HAS – frequência de aproximadamente 1,4% em pacientes jovens (Lopez et al, 2008), hiperlipidemia, obesidade e DM (Baguet et al, 2005; Ostberg et al, 2005).

Diversos estudos relatam a associação das anormalidades cardiovasculares na ST com o cariótipo 45,X (45,X: 30-39%; mosaicos: 24% e aberrações cromossômicas: 11-12%) (Hou et al, 1993; Gotzsche et al, 1994; Gravholt et al, 1998; Mazzanti et al, 1988; Sybert, 1998; Prandstraller et al, 1999; Gravholt, 2001; Gravholt, 2004). Landin-Wilhelmsem et al(2001) encontraram uma associação de 88% quando analisaram malformação congênita e monossomia do X; assim como Gianzo et al (1996) e Goetzsche et al (1994) que encontraram forte relação entre defeitos cardíacos congênitos e cariótipo 45,X.

Alguns dados sugerem que além das malformações congênitas, patologias, associadas à síndrome metabólica, como, hipertensão, dislipidemia

(altos níveis de triglicerídeos e baixos níveis de HDL-C), hiperinsulinemia e hiperuricemia (Reaven, 1988), encontradas numa frequência consideravelmente maior em pacientes com cariótipos diferentes de 45,X, estejam envolvidas na patogênese da DCV em pacientes adultas (Gravholt, et al*,* 1998).

2.2.2 Hipertensão Arterial Sistêmica e Síndrome de Turner

A HAS é uma condição frequente em portadoras da ST, tendo sido relatada em grupos de crianças, adolescentes e adultas, com prevalência variando entre 20% e 50% (Gravholt et al, 1998; Nathwani et al, 2000; Elsheikh et al, 2001; Landin-wilhelmsen et al, 2001; Gravholt et al*,* 2006). Nestas pacientes, com propensão ao desenvolvimento de alterações aórticas, possivelmente por anomalias vasculares geneticamente determinadas (Ostberg et al, 2005), a HAS, particularmente a pressão sistólica, foi associada como principal fator de risco para a dilatação da raiz da aorta, acidentes vasculares cerebrais e doença isquêmica miocárdica (Larson et al, 1984; Gravholt et al, 2005; Stochholm et al*,* 2006), ainda que alterações renais e cardíacas possam contribuir com esta elevada prevalência (Elsheikh et al, 2001).

2.2.3 Metabolismo Glicídico e Síndrome de Turner

Alterações no metabolismo dos carboidratos foram também descritas com frequência aumentada na ST, sendo a intolerância à glicose relatada numa prevalência de 15 a 43% (Costin et al, 1985; Haeusler et al, 1992).

A patogênese do DM2 é complexa e envolve a interação de fatores genéticos e ambientais. Gravholt et al (1998), em um estudo populacional, descreveu uma frequência de DM2 quatro vezes maior nas pacientes com ST, quando comparada com a população normal na Dinamarca. A despeito desta notável incidência, os motivos para tal discrepância não foram facilmente detectados. Sob este aspecto, o tratamento com hormônio de crescimento recombinante (GHr) na ST leva a um aumento compensatório dos níveis de insulina, atribuindo uma resistência insulínica relativa (Sas et al, 2000). Tal efeito, ainda que reversível com a suspensão da medicação, pode elevar pelo menos transitoriamente os níveis glicêmicos (Van Pareren et al, 2002), sendo considerado como um possível viés na pesquisa desta via metabólica em ST.

2.2.4 Síndrome de Turner e dislipidemia

É bem conhecida a relação de alterações deletérias no perfil lipídico com a DCV (Brunzell et al, 2003). Contudo, a frequência de padrões dislipidêmicos, usualmente associados ao risco cardiovascular na ST, não foi ainda estabelecida. Fatores como idade, peso, IMC e comorbidades associadas variaram muito entre as amostras dos diversos trabalhos e, em alguns casos, dentro de uma mesma amostra. Todos esses fatores, em indivíduos normais,

podem contribuir para diferentes apresentações dos lipídios plasmáticos. Considerar a anomalia genética da ST como fator determinante da apresentação do perfil lipídico, sem considerar a influência de outros fatores interferentes, pode prejudicar a interpretação adequada dos dados.

Ross e et al (1995) avaliaram o perfil lipídico em meninas portadoras de ST e em meninas normais, divididas em dois grupos, menores e maiores de 11 anos de idade. Eles observaram uma elevação significativa do CT e LDL-C na pacientes portadoras de ST, com idade superior a 11 anos, em relação às meninas normais. Em pacientes adultas, ao comparar pacientes portadoras de ST e pacientes com falência ovariana prematura, Cooley et al (2003), observaram um aumento significativo nos níveis de CT, LDL-C e triglicérides nas portadoras de ST. Um segundo estudo deste mesmo grupo confirmou os dados anteriormente apresentados, além de demonstrar a presença de partículas LDL-C mais densas nas pacientes portadoras de ST, conferindo às mesmas um perfil lipídico mais aterogênico. Como os grupos não diferiam quanto à idade, IMC e características hormonais, os autores sugeriram que a monossomia do cromossomo sexual poderia ser responsável por estes achados (Van et al, 2006).

2.2.5 Aspectos hormonais na Síndrome de Turner

A baixa estatura presente nas pacientes portadoras de ST é causada por uma haploinsuficiência do gene *SHOX,* localizado no braço de ambos os cromossomos sexuais, X e Y (Gravholt, 2004). O gene *SHOX* atua na maturação

e diferenciação dos condrócitos, principalmente em placas de crescimento, e sua expressão inadequada pode ocasionar perdas estaturais e deformações ósseas (Blaschke e Rappold, 2006; Leka et al, 2006).

Apesar das portadoras de ST não apresentarem deficiências na produção do hormônio de crescimento (GH), é comum a administração deste hormônio recombinante (GHr) para atenuar o fenótipo de baixa estatura, porém este procedimento deve ser realizado de maneira criteriosa, levando-se em consideração os efeitos colaterais do tratamento (Guedes et al, 2008). Em jovens portadoras da ST, verifica-se uma alta incidência de intolerância a glicose (Nielsen et al, 1969; Menziger et al, 1966; Weise et al, 1993) e um aumento do risco de desenvolvimento de diabetes mellitus na idade adulta (Nielsen et al, 1969; Rasio et al, 1976; Van Campenhout e Rasio, 1979) , fato associado ao uso de GHr (Landom et al, 1962; Bratusch-Marrain et al, 1982; Godsland et al, 1986; Wilson et al, 1988)

Além da baixa estatura, a insuficiência gonadal é uma importante característcas das portadoras de ST, contribuindo para o atraso do desenvolvimento puberal e infertilidade (Gravholt, 2004). Alguns estudos associam o aumento do risco para doenças cardiovasculares com a deficiência de estrogênio nestas pacientes, e tratamento inapropriado de hipotiroidismo, condições associadas com a doença arterial coronariana, níveis elevados da fração LDL-C e da Apo B (Dean e Fowler, 1985; Arem e Patsch, 1990; Arem e Escalante, 1996). Porém não existem estudos que tenham acompanhado pacientes com ou sem terapia de reposição hormonal (TRH) por um longo tempo para relatar a contribuição deste tratamento. Especula-se que a TRH tenha

efeitos aórticos positivos, pois, jovens que iniciaram a reposição mais cedo apresentam uma pequena queda na PA de 24 horas (Gravholt, 2005).

A TRH também pode ter implicações deletérias no metabolismo glicídico das mulheres com ST. Gravholt e colaboradores, em 1998, demonstraram, que a implementação da TRH com 17-beta estradiol, nas apresentações oral e transdérmica, associada ao acetato de noretisterona, eleva os níveis glicêmicos séricos das mulheres com ST, além de sugerir um possível defeito primário na secreção da insulina, particularmente na primeira fase após estímulo, como fator contribuinte para a intolerância à glicose (Gravholt et al, 1998). Seis anos após, visando evitar interferência da TRH e do IMC, um grupo de pacientes com disgenesia gonadal pura 46,XX, foi comparado com pacientes com ST e um defeito primário na liberação pancreática de insulina foi finalmente demonstrado (Bakalov et al, 2004).

3. Objetivos

O presente estudo foi proposto para elucidar possíveis mecanismos genéticos do desenvolvimento da doença cardiovascular nas pacientes com Síndrome de Turner, comparando-as com uma população normal. Diante disto, podemos enumerar as considerações a serem respondidas da seguinte maneira:

1) Avaliação das frequências dos polimorfismos do gene *TAP1* (A637G), *ENPP1* (K121Q), *Apo E* (E2, E3 e E4) e *MTHFR* (C677T e A1298C) em mulheres portadoras de ST e no grupo controle.

2) Avaliação dos fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular em mulheres portadoras de síndrome de Turner.

4. Metodologia

4.1 Caracterização das amostras

A triagem dos indivíduos, que compreendeu coleta de sangue periférico, aferição da PA e avaliação bioquímica, foi realizada junto ao Ambulatório de Gônadas e Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP-EPM, sendo consideradas para o estudo 78 mulheres em acompanhamento clínico e com diagnóstico citogenético confirmado para a Síndrome de Turner, sendo 68% (53/78) com cariótipo 45,X e 32% (25/78) portadoras de mosaicismo cromossômico e/ou anormalidades estruturais (Tabela 4).

Tabela 4. Cariótipo das pacientes portadoras de Síndrome de Turner estudadas.

Cariótipo	Número de pacientes
45,X	53
45,X/46,X,i(X)(q10)	2
46,X,i(X)(q10)	5
45,X/46,X,+mar	2
45,X/46,XX	4
45,X/47,XXX	1
45,X/46,XX/47,XXX	1
45,X/45,X,add(15)(p11)	1
45,X/46,X, idic (X) (p11)	1
45,X/46,XX, p+	1
45,X/46,X,r(X)	1
45,X/46,X,r(?)	1
45,X/46,X, dup(X)(q25-q21)	1
46,X, idic,X(q25)	1
46,X,der(X)(p11.2)	1
45,X/46,XY	1
45,X/46,XX addX(p22)	1
TOTAL	**78**

O grupo controle compreende uma amostra de 372 indivíduos saudáveis, sem história pessoal e familiar de DCV, da comunidade, triadas em ambulatório, possibilitando assim o controle dos fatores associados ao risco cardiovascular, com verificação da PA e dosagem bioquímica de lipídeos e glicose.

As amostras de sangue periférico foram obtidas após exposição dos objetivos e da assinatura do termo de consentimento informado, segundo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM (No 2052/07) (anexo 1).

4.2 Cariotipagem

O cariótipo das portadoras de ST foi determinado por análise de linfócitos de sangue periférico, e o número de metáfases analisadas por bandamento G seguiu o critério de Hook´s (1977), que recomenda a análise de 40 metafáses para detecção de até 8% de mosaicismo, com intervalo de confiança de 95%.

4.3 Extração de DNA

A extração do DNA genômico das pacientes e controles foi realizada a partir de linfócitos de sangue periférico, de acordo com protocolo desenvolvido por Lahiri e Numberger (1991), com modificações.

4.4 Genotipagem

4.4.1 Genotipagem *TAP1 – transporter-associated antigen processing* (6p21.3) por RFLP.

A reação por PCR foi realizada com volume final de 25µL contendo 100ng de DNA genômico, $MgCl_2$ 10 mM, dNTP 1.0 mM, 2.0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), Tris- HCl (pH8,4) 10mM, KCl 50mM, 2,0µM de cada primer (Tabela 5). A reação foi processada em um termociclador (Corbett Research®, QIAGEN, Valencia, CA, USA) da seguinte maneira: desnaturação por 5 min a 95º C, seguida por 32 ciclos de 50 seg a 95ºC (desnaturação), 45 seg a 55ºC (anelamento) e 45 seg a 72ºC (extensão), com uma extensão de final de 5min a 72 ºC. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio.

Para a genotipagem foi utilizada a enzima de restrição *Xmill* (Fermentas Life Science Inc, Baltimore, USA). A digestão foi realizada em um volume final de 8,0 µL utilizando-se 3 µL do produto da PCR, 4,5 µL de água destilada, 0,25 U de enzima *Xmil* e 0,5 µL de solução tampão. As amostras foram incubadas a 37ºC - *overnight.* . A análise do tamanho dos fragmentos de restrição foi estabelecida após a separação dos produtos de PCR submetidos à digestão e, posteriormente à eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio.

O polimorfismo A637G do gene *TAP1* cria uma sequência de reconhecimento para a enzima de restrição *Xmil*, e isto é detectado através da

digestão do produto da PCR com 183 bp, gerando fragmentos de 51 e 132 bp para o polimorfismo em homozigose. O polimorfismo em heterozigose (A/G) é caracterizado no gel pela presença de três fragmentos, 183, 132 e 51bp, e em homozigose (G/G) caracteriza-se pela presença de dois fragmentos, 132 e 51bp (Figura 6).

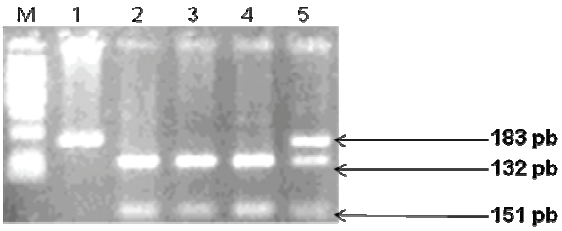


Figura 6. Produto de amplificação da PCR correspondente ao gene *TAP1*, polimorfismo A637G, após digestão com enzima XmiI. M – M – Marcador de tamanho de fragmento 50 bp, 1 genótipo AA, 2, 3 e 4 genótipo GG e 5 genótipo AG.

4.4.2 Genotipagem *ENPP1 - ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1* (6p22 e q23) por RFLP.

A região de interesse do gene *ENPP1* (Tabela 5) foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) nas seguintes condições: volume final de 25µL contend 100ng de DNA genomico, 10 mM de $MgCl_2$, 1.0 mM dNTP, 2.0 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen), 10mM de Tris- HCl (pH8,4), 50mM KCl, 1,0µM *de* cada *primer*.

A reação foi processada em um termociclador (Corbett Research®, QIAGEN, Valencia, CA, USA) por desnaturação inicial 2 min a 94º C, seguida por 30 ciclos de 1min a 94ºC (desnaturação), 40 seg a 55ºC (anelamento) e 40 seg a

72ºC (extensão), com uma extensão de final de 10min a 72 ºC. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

Para a genotipagem foi utilizada a enzima de restrição *Ava*II (Fermentas Life Science Inc, Baltimore, USA). A digestão foi realizada em um volume final de 8,0 µL utilizando-se 3 µL do produto da PCR, 4,5 µL água destilada, 2,5 unidades da enzima *Ava*II e 0,5 µL de solução tampão. As amostras foram incubadas por 2 horas a 37ºC. A análise do tamanho dos fragmentos de restrição foi estabelecida após a separação dos produtos de PCR submetidos à digestão e, posteriormente à eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio.

O polimorfismo A121C do gene *ENPP1* cria uma sequência de reconhecimento para a enzima de restrição *Ava*II, e isto é detectado através da digestão do produto da PCR de 208 bp, gerando fragmentos de 53 e 175 bp para o polimorfismo em homozigose. O polimorfismo em heterozigose (A/C) é caracterizado no gel pela presença de dois fragmentos, 208 pb e 175 bp, e em homozigose (C/C) caracterizado apenas por um fragmento de 175 bp (Figura 7).

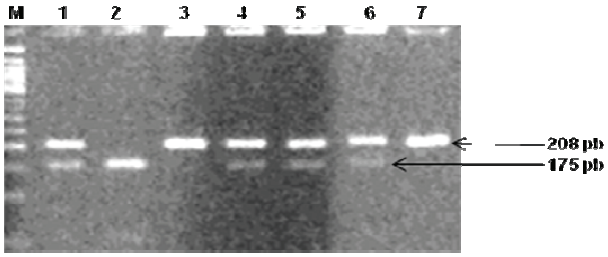


Figura 7. Produto de amplificação da PCR correspondente ao gene *ENPP1*, polimorfismo A121C, após digestão com enzima AvaII. M – Marcador de peso molecular 50 bp, 1, 4, 5 e 6 genótipo AC, 2 genótipo CC e 3 e7 genótipo AA.

4.4.3 Genotipagem *APOE* – Apolipoproteina E (19q13.2) e *MTHFR* - metilenotetrahidrofolato redutase, *locus* 1298 por ensaio TaqMan.

A genotipagem para os genes *MTHFR* – polimorfismo A1298C (*rs1801131*) e APOE (*rs7412/rs429358*) foi realizada através de ensaio TaqMan® SNP Genotyping Assays proveniente da Applied Biosystems®.

Os polimorfismos dos genes *MTHFR* A1298C e APOE foram identificados por PCR quantitativa em tempo real (Rotor gene 6000 HRM 5 Plex Platform, Corbett Life Science, QIAGEN, Valencia, CA, USA). O sinal fluorescente da reação quantitativa será gerado com uma sonda repórter 5´e um *quencher* 3´. Devido à ação de exonuclease 5´-3´, a Taq DNA polimerase cliva e libera a sonda repórter da sequência, que tem sua fluorescência detectada pelo equipamento de leitura. Depois de ultrapassado um nível de detecção mínimo, a amplificação por PCR Tempo Real resulta em um sinal de fluorescência proporcional ao fragmento gerado. Após a PCR, o genótipo de cada amostra foi automaticamente atribuído pelo sinal fluorescente alelo-específico.

Os ensaios foram realizados com Taqman Universal Master Mix® (Applied Biosystems®) com 10-20ng de DNA por reação. As condições da PCR foram pré-padronizadas pelo fabricante, segundo protocolo próprio (ensaio TaqMan® - Applied Biosystems®) e consistiram de 95 °C desnaturação inicial (15 min), seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C (15 seg) e 60 °C de anelamento e extensão (1 min).

4.4.4 Genotipagem *MTHFR* – metilenotetrahidrofolato redutase, *locus* 677 (1p36.3) por RFLP.

Os ensaios de PCR para o lócus 677 foram realizados em um volume final de 50µL utlizando-se 200-1000ng de DNA, 1,0mM dNTP, 2,5U de Taq DNA Polimerase, 10mM de Tris-HCl (pH8,4), 50mM KCl, 3,0mM $MgCl_2$, 0,2µM de cda primer (Tabela 5). As reações foram processadas com o auxílio de uma termocicladora (Corbett Research®, QIAGEN, Valencia, CA, USA) nas seguintes condições: desnaturação a 95ºC por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação de 1 minuto de desnaturação a 95ºC, 1 minuto de anelamento a 61ºC, e 1 minuto de extensão a 72ºC e uma extensão final de 72ºC por 7 minutos. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para a verificação do sucesso da amplificação.

Para identificação do polimorfismo C677T foi utilizada a enzima H*inf*I. A digestão com a enzima de restrição foi realizada em um volume final de 50 µL utilizando-se 30 µL do produto da PCR, 13,5 µL água destilada, 15 unidades enzima H*inf*I e 5,0 µL tampão. As amostras foram incubadas por no mínimo 3 horas a 37ºC. A análise do tamanho dos fragmentos de restrição foi realizada após a separação dos produtos da PCR digerido por gel de eletroforese contendo 3% de agarose e corados com brometo de etídio.

O polimorfismo C677T cria uma sequência de reconhecimento para a enzima de restrição *Hin*fI, e isto é detectado por meio da digestão do produto da PCR, originalmente, com 198 bp, gerando fragmentos de 23 e 175 bp para o

polimorfismo em homozigose (genótipo TT). No entanto este genótipo é caracterizado somente pela presença do fragmento de 175 bp, pois o fragmento de 23 bp não fica retido no gel. O genótipo CC (genótipo mais comum na população) é caracterizado pela presença de um fragmento de 198 bp e o genótipo CT (polimorfismo em heterozigose) é caracterizado pela presença de dois fragmentos, um de 198-bp e o outro de 175 bp (Figura 8).

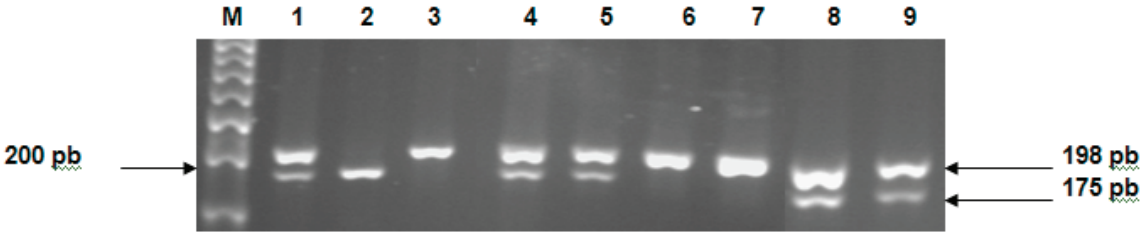


Figura 8. Produto de amplificação da PCR correspondente ao *locus* 677 do gene da *MTHFR* após digestão com enzima *HinfI*. M – Marcador de peso molecular 50 bp, pacientes portadoras da Síndrome de Turner 1,4,5,8 e 9 apresentam o genótipo CT, paciente 2 genótipo TT e pacientes 3, 6 e 7 apresentam o genótipo CC.

4.5 Análises estatística

As frequências dos alelos e dos genótipos foram comparadas às respectivas frequências do grupo controle. Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste qui-quadrado (X^2). A influência dos alelos e genótipos na ausência e presença da síndrome foi verificada pelo cálculo dos produtos cruzados (*odds ratio*), com intervalo de confiança (IC) de 95%. Admitiu-se erro α de até 5% com nível de significância para valor de $p \leq 0,05$.

Tabela 5. Sequência e identificação dos *primers* e enzimas de restrição utilizadas na análise por RFLP.

Gene	rs	Primer	Enzima	Referência
TAP1	135216	F 5´CCCTATCCAGCTACAACC3´	*Xmil*	Shen et al*,* 2007
		R 5´AACGCCACTGCCTGTCGCT3´		
ENPP1	1044498	F 5´GCAATTCTGTGTTCACTTTGGA3´	*Aval*I	Pizzuti et al, 1999
		R 5´GAGCACCTGACCTTGACACA 3´		
MTHFR 677	1801133	F 5´TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3´	*Hinf*I	Frosst et al*,* 1995
		R 5´-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3´		

5. Resultados

A média, o desvio padrão e mediana dos dados clínicos e laboratoriais das portadoras de ST estudadas se encontram na Tabela 6. O tempo de uso do hormônio do crescimento – GHr entre as pacientes variou de 6 a 92 meses, (mediana 34 meses). Seis pacientes (7,5%) faziam uso de anti-hipertensivos e/ou diuréticos, três (3,8%) de insulina e/ou hipoglicemiante e duas (2,5%) utilizavam anti-lipemiantes.

Tabela 6 - Caracterização clínica e laboratorial das 78 pacientes portadoras de Síndrome de Turner avaliadas.

	Média ± DP	**Mediana**
Idade (anos)	25,0±10,5	23,8
PAS (mm/Hg)	113,8±13,9	111,3
PAD (mm/Hg)	74,5±13,7	76,3
Colesterol Total (mg/dL)	169,4±30,3	169,5
HDL-C (mg/dL)	53,8±15,0	52,0
LDL-C (mg/dL)	97,4±22,3	94,0
Triglicerídeos (mg/dL)	81,7±39,6	72,0
Glicemia Jejum (mg/dL)	83,5±9,5	84,5

IMC: Índice de massa corporal; PAS e PAD: pressão arterial sistólica e diastólica, respectivamente.

Em relação ao IMC as pacientes foram classificadas, de acordo com as Diretrizes Sobrepeso e Obesidade da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2004) em, baixo peso 7,7% (6/78), normal 56,4% (44/78), sobrepeso 26,9% (21/78), Obeso 9,0% (7/78) (Figura 9).

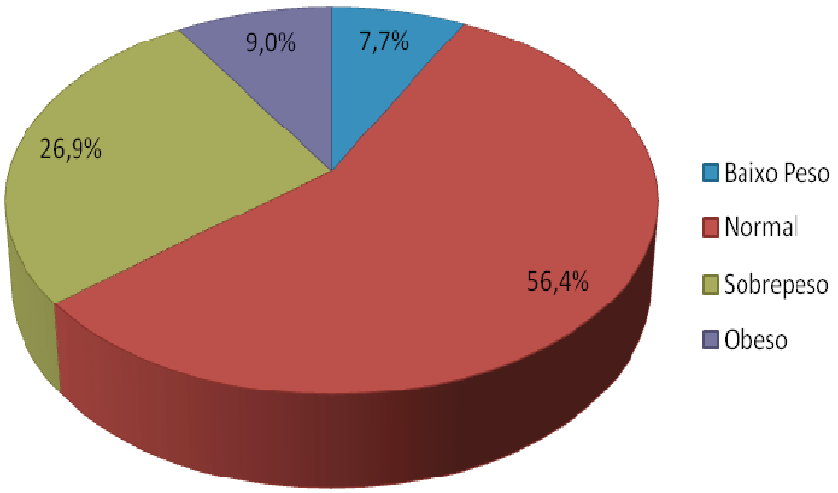


Figura 9. Distribuição das portadoras de Síndrome de Turner estudadas em relação ao IMC

De acordo com os valores de PA, 5,1% (4/78) das pacientes com ST, apresentaram valores ≥140 mmHg e 14,1% (11/78) apresentaram valores ≥90 mmHg para PAD, sendo consideradas hipertensas de acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2006) (Figura 10).

Para os níveis plasmáticos dos lipídeos nas pacientes foram observados os seguintes resultados: 87,2% (68/78) apresentam níveis desejávies para CT, 9,0% (7/78) níveis limítrofes e 3,8% (3/78) níveis elevados. Em relação ao HDL-C, 92,3% (72/78) apresentaram nívies desejáveis e 7,7% (6/78) níveis abaixo de 35 mg/dL, e para o LDL-C, 62,8% (49/78) apresentavam níveis desejáveis, 35,9% (28/78) níveis limítrofes e 1,3% (1/78) apresentavam níveis elevados. Quanto aos triglicerídeos, 93,6% (73/78) apresentaram níveis desejáveis, 3,8% (3/78) níveis limítrofes, 2,6% (2/78) apresentaram níveis elevados (Figura 11).

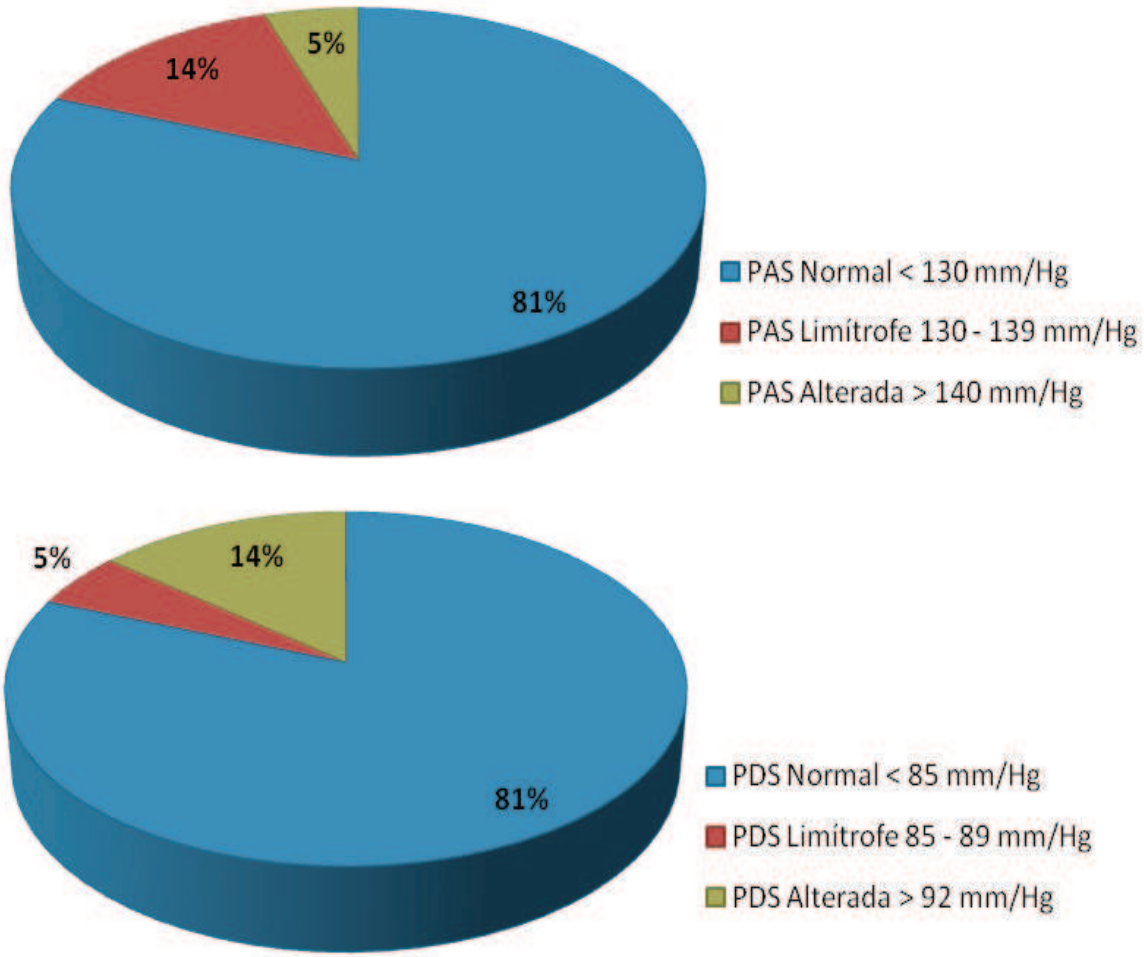


Figura 10. Distribuição da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) nas portadoras de Síndrome de Turner estudadas.

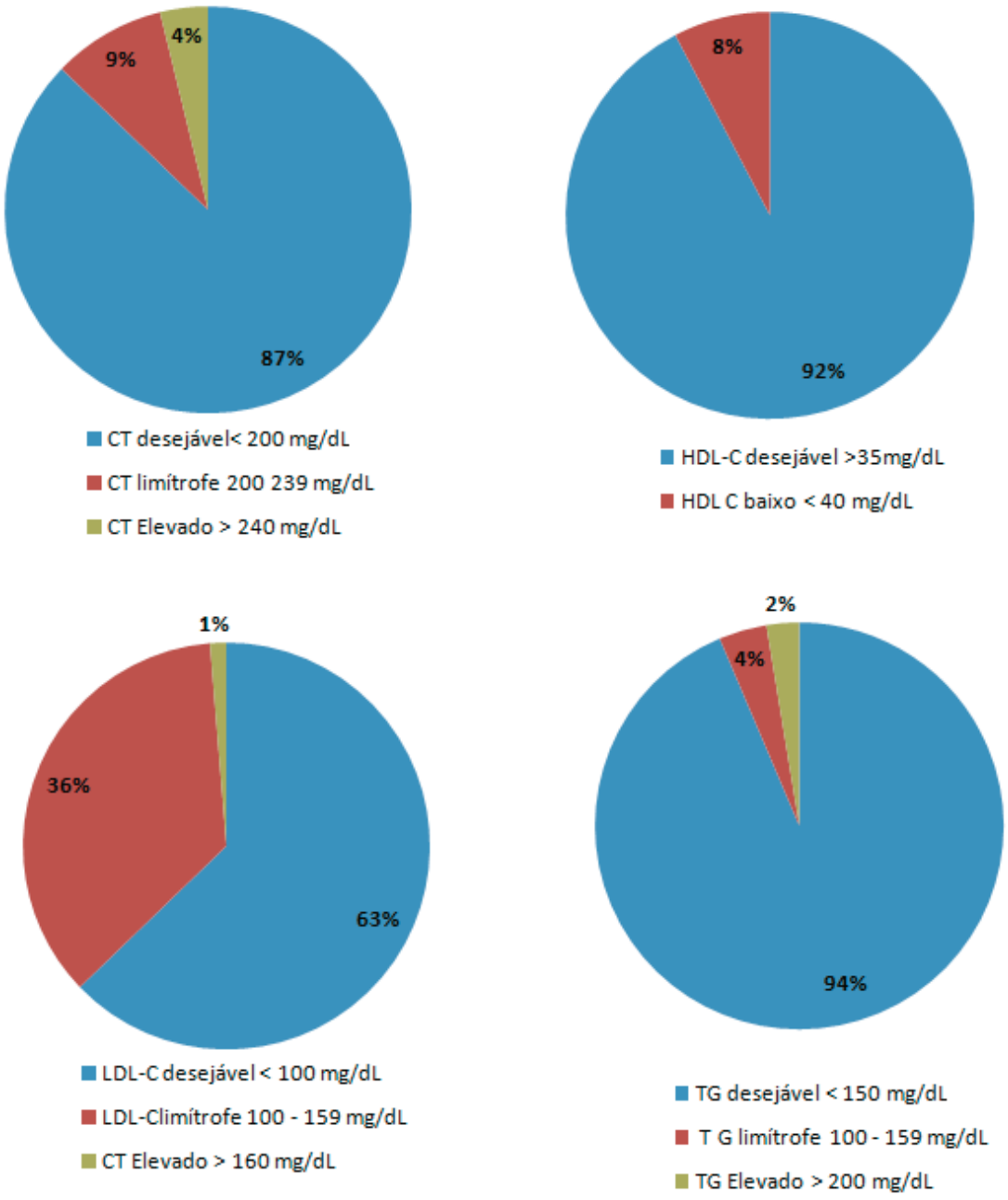


Figura 11. Distribuição dos níveis de lipídeos plasmáticos nas portadoras de Síndrome de Turner estudadas.

5.1 Polimorfismos do gene *TAP1- transporter-associated antigen processing* (6p21.3)

Na análise do polimorfismo A637G do gene *TAP1* as frequências dos genótipos A637A, A637G e G637G nas pacientes com ST foi, respectivamente, 7,7% (6/78), 52,6% (41/78) e 39,7% (31/78), enquanto que no grupo controle os genótipos 637AA, 637AG e 637GG: 11,0% (42/372), 55,0% (205/372) e 34,0% (125/372) (Figura12). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes, na frequência dos diferentes genótipos (p=0,4584) e também na distribuição alélica (p=0,2943, OR=1,23, 95% IC = 0,86 – 1,77). Nas pacientes com ST foi observada uma frequência de 34,0% para o alelo A e 6,0% para o alelo G e nos controle 39,0% alelo A e 61,0% alelo C (Tabela 7).

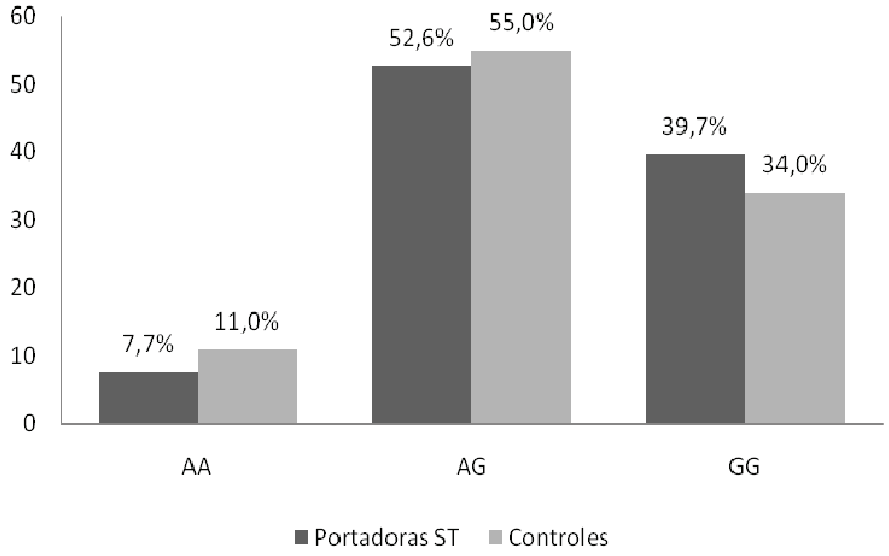


Figura 12. Distribuição dos genótipos do gene *TAP1* nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.

5.2 Polimorfismos no gene *ENPP1 - ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1* (6p22 e q23)

A frequência dos genótipos para o polimorfismo A121C do gene *ENPP1* nas pacientes ST foram: AA 42,3,0% (33/78), AC 48,7% (38/78) e CC 9,0% (7/78). Em relação ao grupo controle os genótipos AA, AC e CC se distribuíram da seguinte maneira, 45,0%, 42,0% e 12,0%, respectivamente (Figura 13). A diferença entre os genótipos não foi estatisticamente significante (p=0,5169), assim como na distribuição alélica (1,0). Nas pacientes com ST foi observada uma frequência de 66,7% para o alelo A e 33,3% para o alelo C e nos controle 66,0% alelo A e 34,0% alelo C (p=1,0 OR= 0,99, 95% IC=0,69 – 1,42) (Tabela 7).

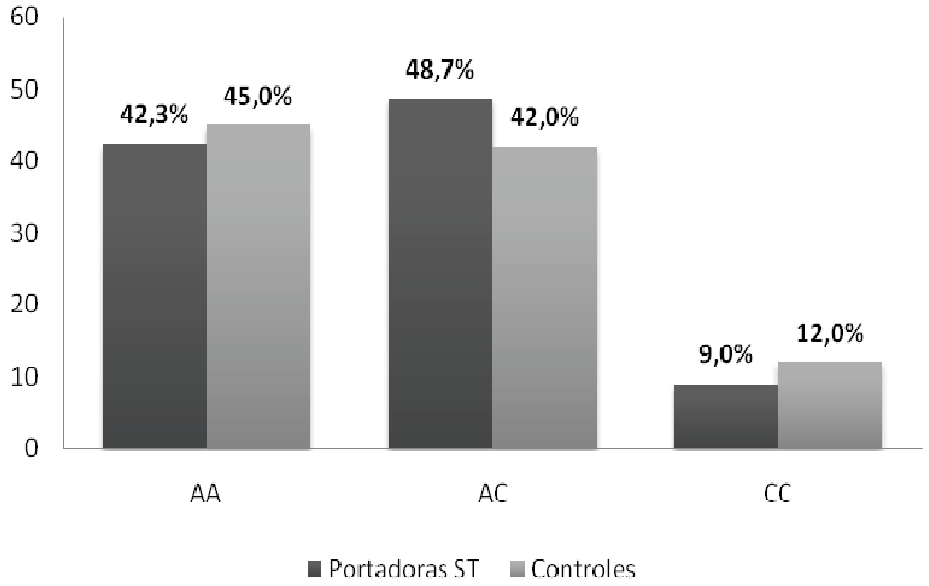


Figura 13. Distribuição dos genótipos do gene *ENPP1* nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.

5.3 Polimorfismos do gene *APOE*

A frequência dos genótipos do gene da *APOE* nas pacientes com ST e nos controles, foi respectivamente: E3E3 68,3% (54/78) e 61,5% (229/372), E2E3 6,3% (5/78) e 12,4,0% (46/372), E3E4 24,1% (19/78) e 22,6% (84/372), E2E2 0% e 1,0% (4/372), E4E4 0% e 1,3% (5/372) e E2E4 1,3% (1/78) e 1,1% (1/372) (Figura 14). A frequência dos alelos E3, E2 e E4 nsa pacientes com ST foi 83,5%, 3,8% e 12,7% e no grupo controle 79,0%, 7,8% e 13,2%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, relacionadas aos genótipos (p=0,864) e alelos (p=0,062), entre os grupos estudados (Tabelas 8).

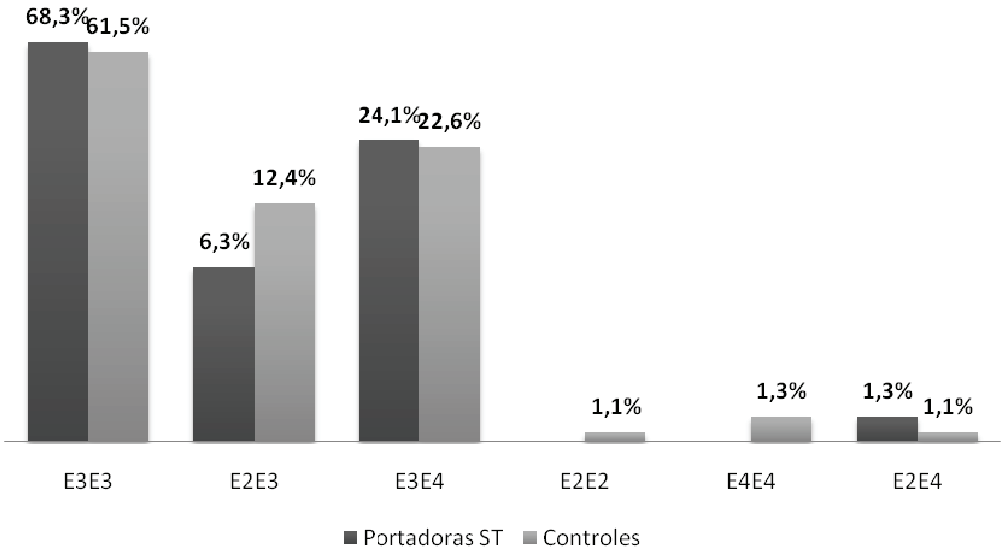


Figura 14. Distribuição dos genótipos do gene *APOE* nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.

5.4 Polimorfismos no gene da *MTHFR* - metilenotetrahidrofolato redutase (1p36.3)

5.4.1 códon 677

A frequência dos genótipos *MTHFR* 677CC, 677CT e 677TT nas 78 pacientes portadoras de ST foi, respectivamente, de 47,4% (37/78), 42,3% (33/78) e 10,3% (8/78), enquanto que nos 372 indivíduos do grupo controle os genótipos 677CC, 677CT e 677TT foram encontrados nas seguintes frequências: 59,0% (219/372), 29,0% (107/372) e 12,0% (46/372), respectivamente (Figura 15). Considerando-se os alelos, C estava frequente em 68,6% das pacientes com ST e 73% no grupo controle, enquanto o alelo T estava presente em 31,4% das portadoras de ST e 27% do grupo controle (Tabela 7). A diferença entre os genótipos não foi estatisticamente significante, com valor de p=0,0633, assim como na análise de distribuição dos alelos (p=0,2774, OR = 1,25, 95% IC= 0,86 – 1,82).

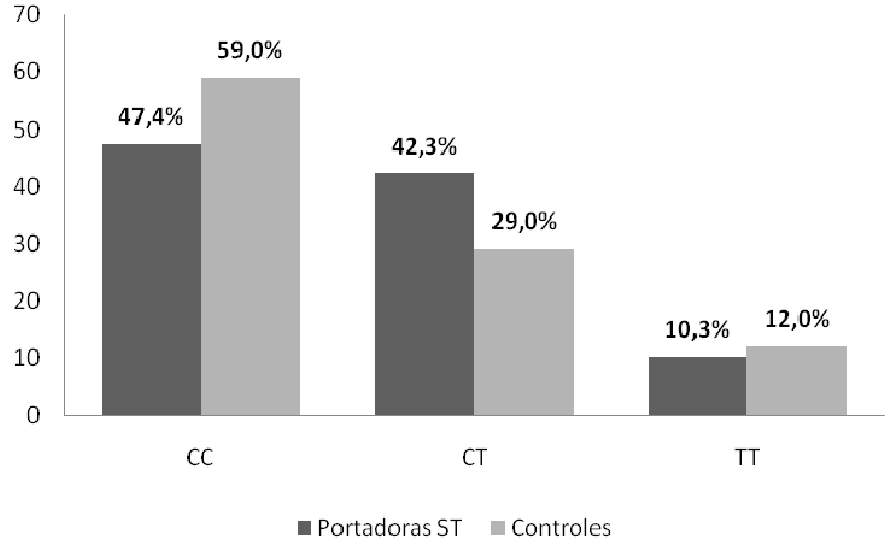


Figura 15. Distribuição dos genótipos do gene *MTHFR,* polimorfismo códon 677, nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.

5.4.2 códon 1298

As frequências dos genótipos para o polimorfismo A1298C no gene *MTHFR* (rs) nas pacientes com ST e grupo controle, foram, respectivamente: AA 46,2% (36/78) e 64% (239/372), AC 35,9% (28/79) e 31% (115/372) e CC 17,9% (14/78) e 5% (18/372) (Figura 16). Em relação aos alelos, observamos a seguinte distribuição: pacientes, alelo A 64,1% e alelo C 35,9%; grupo controle, alelo A 80% e alelo C 20%. As frequências dos genótipos mutantes foram estatisticamente diferentes entre as pacientes portadoras de ST e o grupo controle (p<.0001), mantendo-se na análise de distribuição dos alelos (p=<.0001, OR=2,20, 95% IC= 1,51 – 3,19) (Tabela 7).

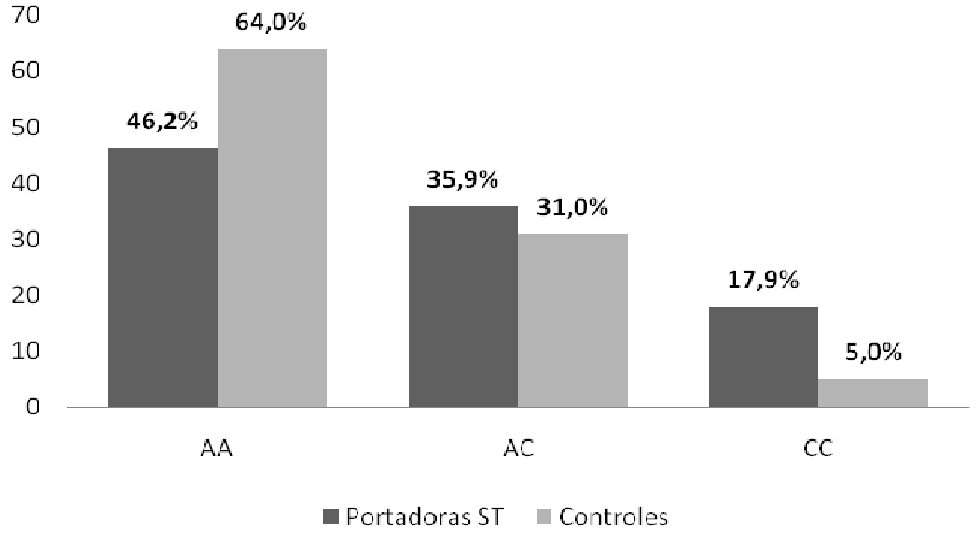


Figura 16. Distribuição dos genótipos do gene *MTHFR,* polimorfismo 1298, nas pacientes portadoras de Síndrome de Turner e no grupo controle.

Os polimorfismos A121C do gene *ENPP1*, A1298C do gene *MTHFR* e isoformas do gene *APOE* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém o mesmo não se manteve para os polimorfismo A637G do gene *TAP1* e C677T do gene *MTHFR*.

Tabela 7. Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos A637G do gene TAP1, A121C do gene ENPP1, C677T e A1298C do gene MTHFR nas pacientes portadoras de ST e no grupo controle.

		Síndrome de Turner (n = 78)	Controles (n = 372)	p	OR (95%IC)
TAP1					
Genótipos				0.4584	
	AA (%)	6 (7,7)	42 (11,0)		
	AG (%)	41 (52,6)	205 (55,0)		
	GG (%)	31 (39,7)	125 (34,0)		1,23 (0,86 – 1,77)
Alelos				0.2943	
	A (%)	53 (34,0)	289 (39,0)		
	G (%)	103 (66,0)	455 (61,0)		
ENPP1					
Genótipos				0.5169	
	AA (%)	33 (42,3)	168 (45,0)		
	AC (%)	38 (48,7)	158 (42,0)		
	CC (%)	7 (9,0)	46 (12,0)		0,99 (0,69 – 1,42)
Alelos				1.0	
	A (%)	104 (66,7)	494 (66,0)		
	C (%)	52 (33,3)	250 (34,0)		
***MTHFR* 677**					
Genótipos				0.0633	
	CC (%)	37 (47,4)	219 (59,0)		
	CT (%)	33 (42,3)	107 (29,0)		1,25 (0,86 – 1,82)
	TT (%)	8 (10,3)	46 (12,0)		
Alelos				0.2774	
	C (%)	107 (68,6)	545 (73,25)		
	T (%)	49 (31,4)	199 (26,75)		
***MTHFR* 1298**					
Genótipos				**<.0001**	
	AA (%)	36 (46,2)	239 (64,0)		
	AC (%)	28 (35,9)	115 (31,0)		**2,20 (1,51 – 3,19)**
	CC (%)	14 (17,9)	18 (5,0)		
Alelos				**<.0001**	
	A (%)	100 (64,1)	593 (80,0)		
	C (%)	56 (35,9)	151 (20,0)		

Valores significantes p<0,05

Tabela 8. Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos do gene *APOE* nas pacientes portadoras de ST e no grupo controle.

		Síndrome de Turner (n = 78)	Controles (n = 372)	p	OR (95%IC)
APOE					
Genótipos				0,864	
	E3E3 (%)	54 (68,3)	229 (61,5)		
	E2E3 (%)	5 (6,3)	46 (12,4)		
	E3E4 (%)	19 (24,1)	84 (22,6)		
	E2E2 (%)	0	4 (1,1)		
	E4E4 (%)	0	5 (1,3)		
	E2E4 (%)	1 (1,3)	4 (1,1)		
Alelos				0,062	0,74 (0,47 – 1,47)
	E3 (%)	132 (83,5)	588 (79,0)		
	E2 (%)	6 (3,8)	58 (7,8)		
	E4 (%)	20 (12,7)	98 (13,2)		

Valores significantes p<0,05

6. Discussão

A DCV manisfeta-se com grande frequência nas portadoras da ST (Naeraa et al, 1995), além disso, é a principal causa de mortes no Brasil, correspondendo a cerca de 30% dos óbitos nas diversas faixas etárias (Datasus, 2010). Inúmeros fatores de risco para DCV são conhecidos, tais como, HAS, DM, obesidade, dislipidemia, tabagismo e, mais recentemente, hiper-homocisteinemia. Uma abordagem adequada destes fatores, em relação à distribuição e aos mecanismos genéticos, pode contribuir para uma diminuição na incidência e na progressão da DCV nas portadoras de ST.

A prevalência de anomalias do aparelho cardiovascular nas pacientes portadoras de ST é de 17% a 45% (Haddad et al, 1959; Mazzanti et al, 1988; Moore et al, 1990; Hou et al, 1993; Gotzsche et al, 1994, Parchment e Clayton, 1995; Gianzo et al, 1996; Sybert, 1998). Os achados mais frequentes são: coarctação da aorta, anormalidades na válvula aórtica, vasculopatia generalizada, caracterizada por dilatação arterial e hipoplasia do ventrículo esquerdo ou da aorta (Gravholt et al, 1998; Reaven, 1988).

As anomalias cardiovasculares nas portadoras de ST são mais prevalentes em indivíduos com o cariótipo 45,X (Mazzanti et al, 1988; Hou et al, 1993; Gianzo et al, 1996; Wojda et al, 1997; Sybert, 1998; Prandstraller et al, 1999; Elsheikh et al, 2002; Völkl et al, 2005). Gravholt et al (2004) em uma revisão da literatura, relata que a frequência de indivíduos com ST e cariótipo 45,X associada a anomalias cardiovasculares é de 30 a 39% enquanto que para outros cariótipos, como mosaicos é de 24% e com outras anomalias estruturais de 11 a 12%. Na presente casuística, independentemente do cariótipo, pode-se verificar uma frequência baixa (3%) de anomalias cardiovasculares. Este fato pode ser atribuído à idade precoce das mesmas

(25,0±10,5 anos), o que pode influenciar na não percepção do desenvolvimento dessas anormalidades ou mesmo a magnitude ao longo do tempo de vida, como foi observado em outros estudos (Gotzsche et al, 1994, Parchment e Clayton, 1995; Gianzo et al, 1996; Sybert, 1998).Todavia, ocorreu uma maior incidência entre portadoras de ST e com cariótipo 45,X (3/4 pacientes).

Em relação às doenças descritas como fatores de risco para a DCV, a HAS tem grande importância e, em portadoras da ST tem uma prevalência que varia entre 20% e 50% (Gravholt, et al, 1998; Nathwani et al, 2000; Elsheikh et al, 2001; Landin-Wilhelmsen et al, 2001; Gravholt et al, 2006). As alterações de PA estão geralmente associadas à idade, sendo que a sua prevalência é menor em crianças e adolescentes quando comparada aos adultos (Fixler e Laird,1983; Sinaiko et al,1989). No presente estudo, observou-se uma prevalência de HAS, considerando tanto valores de pressão arterial alterada e pacientes sob uso de anti-hipertensivos (26,9%), de acordo com a descrita na literatura, apesar da idade jovem das mesmas.

É de grande importância a elucidação do mecanismo genético causador da HAS, para o tratamento e prevenção desta patologia na ST. Porém, isto se torna extremamente difícil, pois, além dos aspectos ambientais e genéticos, existem teorias fisiopatológicas que determinam a maior prevalência nessa síndrome, como por exemplo o desequilíbrio no tônus simpatovaga (Gravholt et al, 2006). Nos últimos anos muitos foram os genes apontados como contribuintes para este processo patológico, entre eles, o *TAP1* (*transporter-associated antigen processing)* (Gao et al, 2006). O polimorfismo A637G deste gene tem sido associado a um aumento da disfunção endotelial e consequente elevação do risco para HAS (Alberts et al, 2001; Ritz et al, 2003).

Shen et al (2007) estudaram 277 indivíduos hipertensos Coreanos e 227 controles e encontram uma frequência do alelo G de 25,6% e 17,6% respectivamente (p=0,002). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que indivíduos portadores do genótipo GG têm, 2,9 vezes mais chance de desenvolver HAS.

Em um estudo realizado no Brasil, com indivíduos das etnias Guarani (n=93), Kaingangs (n=241) e caucasóides (n=93) (Faucz et al*,* 2000), a frequência do alelo G observada para a etnia Guarani (62%) foi substancialmente distinta dos demais estudos da literatura (Barron et al*,* 1995; Chevrier et al*,* 1995; Moins-Teisserene et al*,* 1995; Djilali-Saiah et al*,* 1996; Höhler et al, 1996; Ismail et al*,* 1997; Lee et al*,* 2001; Zhang et al*,* 2002; Pyo et al*,* 2003; Whang et al*,* 2005*;* Shen et al*,* 2007). Os autores justificam essa disparidade como reflexo da neutralidade desse polimorfismo nas populações. No presente estudo, pode-se verificar uma frequência do alelo polimórfico G (66,0%) semelhante à observada previamentes nesse estudo (Faucz et al*,* 2000) para etnia Guarani. Tais achados refletem uma possível diferença na distribuição do alelo polimórfico G na população do Sudeste e Centro-Oeste brasileiro, alvo da atual pesquisa. Desse modo, não foi verificada alteração significativa de frequência alélica nas portadoras de ST em relação ao grupo controle.

A DM é também um importante fator de risco para DCV (Haffner et al*,* 1998; Thom et al, 2006), sua presença dobra o risco desta patologia em homens e triplica em mulheres (Kannel e McGee, 1979; Selvin et al*,* 2004). Além de, elevar em 3 vezes a mortalidade por AVC (Smith et al*,* 1984; Stamler et al*,* 1993). Distúrbios no metabolismo glicídico são frequentes nas portadoras de ST, com a intolerância à glicose relatada numa prevalência de 15 a 43% (Costin et al, 1985; Haeusler e Frisch, 1992). A frequência baixa de patologias associadas ao metabolismo glicídico na amostra estudada (1,4%) pode ser fruto da idade jovem das pacientes, pois, a

resistência insulínica tem sido frequentemente associada a mulheres adultas, obesas e que realizam reposição estrogênica (Nielsen et al*,* 1969; Cicognani et al*,* 1988; Caprio et al*,* 1991; Holl et al*,* 1994; Gravholt et al*,* 1998). É importante ressaltar que a utilização do GHr pode, mesmo que transitoriamente, elevar os níveis de glicose e/ou insulina, causando nestas pacientes um quadro de resistência insulínica.

Em humanos, o polimorfismo A121C do gene *ENPP1* (*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*) apresenta uma associação positiva com DM (Gu et al*,* 2000; Abate et al*,* 2003; Kubaszek *et al,* 2004; Abate et al*,* 2005; Meyre et al*,* 2005; Grarup et al*,* 2006) e com a resistência insulínica (Pizzuti et al, 1999; Duggirala et al, 2001; Arya et al, 2002; Kubaszek et al, 2003; Meyre et al, 2004) em diversas populações. Porém, há na literatura dados conflitantes sobre a associação ou não deste polimorfismo com distúrbios glicídicos em diferentes populações. Foi demonstrada uma associação positiva em indivíduos brancos e diabéticos dos Estados Unidos (Abate et al*,* 2003; Abate et al*,* 2005) e da Finlândia (Kubaszek et al*,* 2004), mas, o mesmo não foi observado em indivíduos diabéticos Suecos (Gu et al*,* 2000), Dinamarqueses (Rasmussen et al*,* 2000; Grarup et al*,* 2006) e Americanos ou Poloneses (Lyon et al*,* 2006). No presente estudo não foi constatada uma frequência mais elevada do alelo C e/ou genótipos AC e CC nas portadoras de ST.

Alguns estudos destacam a importância da determinação do perfil lipídico em portadoras da ST (Ross et al, 1995 e Cooley et al, 2003). Todavia, tais esforços não foram suficientes para estabelecer os mecanismos que levam a alterações lipídicas nestas pacientes. Uma vez que, os parâmetros avaliados são obtidos em relação ao IMC, idade, estatura e perfil hormonal, parêmetros sabidamente alterados nesta síndrome, acredita-se que seja necessário estabelecer novas diretrizes de avaliação. Guedes (comunicação pessoal) demonstrou o impacto destas alterações, relatando

que o índice cintura-estatura é melhor que o IMC para classificar pacientes com ST, quanto à obesidade. Em nossa amostra observamos alterações discretas nos níveis lipídicos, porém sem relação com obesidade, hiperglicemia e HAS, doenças que poderiam explicar tais achados.

Elucidar os mecanismos genéticos das dislipidemias é de extrema importância para prevenção das DCV´s. O gene da *APOE* é responsável por distúrbios no perfil lipídico. Diversos estudos observaram associação positiva entre polimorfismos deste gene e aterosclerose (Wilson et al*,* 1994; Dreon et al*,* 1995; Mahley e Rall, 2000, Kolovou et al*,* 2003). As isoformas APOE3 e E4 apresentam grande afinidade de ligação aos receptores de LDL-C, enquanto a APOE2 mostra menos de 2% da afinidade normal. Devido à baixa afinidade de ligação a este receptor, a APOE2 é geralmente associada aos níveis baixos de LDL-C e CT, enquanto a alta afinidade da APOE4 ao receptor tem sido associada ao declínio da longevidade, ao aumento dos níveis plasmáticos de LDL-C e CT e ao aumento da prevalência de doença cardiovascular e à doença de Alzheimer (Eichner et al, 1993; Wilson et al*,* 1994; Wilson et al*,* 1996; Ballantyne et al*,* 2000; Gerdes et al*,* 2000; Mahley e Rall, 2000; Hagberg et al*,* 2000; Smith et al*,* 2000; Lahoz et al*,* 2001; Song et al*,* 2004; Hatters et al, 2006). Na presente amostra não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na distribuição das isoformas da APOE nas portadoras de ST.

O impacto social nos útlimos tempos motivou o aparecimento de diversos estudos com o objetivo de identificar novos fatores de risco e prevenir a ocorrência das DCV´s. Sabe-se que a aterosclerose é uma das patologias mais frequentes, sendo a principal responsável pelos casos de AVC. Em 1969, McCully relatou fortes evidências da associação entre aterosclerose e concentrações elevadas de He, dados que posteriormente foram confirmados por diversos estudos (Brattström et al, 1984; Coull et

al, 1990; Clarke et al, 1991; Kang et al., 1992; Stampfer et al, 1992; Brattström et al, 1994; Arnesen et al, 1995; Graham et al, 1997, Muniz et al, 2006).

A enzima MTHFR está envolvida na conversão de He a metionina no organismo (Saw et al., 2001). O gene *MTHFR* apresenta dez polimorfismos descritos até o momento, sendo os mais estudados, os que envolvem os códons C677T e A1298C, por apresentarem maior impacto na função enzimática, elevando as concentrações de He, principalmente quando o nível sérico de folato está baixo (Lobo et al, 1999).

Dudmam (1999) sugere que a He seja um regulador natural dos leucócitos, incluindo adesão endotelial e migração transendotelial. Em seu estudo, demonstrou que a He ativa, independentemente, os leucócitos e as células endoteliais. Neutrófilos e monócitos expostos a He e co-cultivados com células endoteliais, desenvolveram mecanismos que envolveram a formação de peróxidos de hidrogênio. Além disso, a migração endotelial e transendotelial é mediada pela mudança no padrão de expressão de proteína de quimioatração de monócitos e pelas interleucinas, responsáveis por sinalização de neutrófilos e pelas respostas celulares com, liberação de citocinas e agonistas inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (Dudmam, 1999).

Estudos relacionados às variantes alélicas da enzima MTHFR, que poderiam influenciar na concentração plasmática de He e contribuir para o aparecimento da DCV, são bastante controversos. Muniz et al (2006) encontraram uma associação positiva entre níveis elevados de He e DAC, porém não foram observadas relações positivas entre o alelo T mutante e níveis de He plasmática, dados posteriormente confirmados por Guerzoni et al (2009). Harmon et al (1996) demonstraram uma relação positiva entre o genótipo T677T e níveis elevados de He, dados confirmados por Spotilla et al (2003).

Em um estudo anteriormente realizado para esclarecer o mecanismo de não-disjunção presente nas portadoras de ST, nosso grupo observou uma frequência elevada do polimorfimo A1298C nestas pacientes, sugerindo possíveis contribuições do alelo C neste mecanismo (Oliveira et al, 2008). No presente estudo observou-se uma distinção significativa na distribuição do alelo polimórfico A1298C ($p<0,0001$) entre as pacientes com ST e o grupo controle, indicando este polimorfimo como um possível fator de risco, nas portadoras de ST para a DCV, considerando o seu envolvimento no metabolismo da He. Apesar do impacto menor na atividade enzimática, o polimorfismo A1298C mostra-se envolvido em possíveis mecanismos patológicos nesta síndrome, sendo importante o estudo de outras variantes genética envolvidas no metabolismo dos folatos e associações à enzima MTHFR (van der Put et al,1998).

A distribuição do polimorfismo C677T deste mesmo gene, não diferiu estatisticamente, entre as portadoras de ST e o grupo controle.

O grupo controle tanto para o polimorfismo do gene *TAP1* quanto para o *MTHFR* C677T não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Uma vez que acreditamos que não houve erro na observação dos genótipos, supostamente que este evento pode estar relacionado ao tamanho da amostra. Estudos em uma grande amostra devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

7. Conclusão

Com os dados apresentados neste trabalho, é possível concluir que:

1) Os polimorfismos A637G do gene *TAP1,* A121C do gene *ENPP1,* assim como as isoformas E2 e E4 do gene *APOE* e o polimorfismo do C677T do gene *MTHFR*, não apresentaram uma distribuição diferenciada, estatisticamente significante, nas portadoras de ST estudadas quando comparadas com um grupo controle normal.

2) O polimorfismo A1298C do gene *MTHFR*, apresentou uma frequência aumentada nas portadoras de ST estudadas, quando comparadas com o grupo controle ($p=<.0001$).

3) Em relação à hipertensão arterial sistêmica, às alterações no metabolismo glicídico e aos distúrbios lipídicos, não foi possível correlacionar os polimorfismos acima citados com a presença destas patologias na ST.

8. Referências Bibliográficas

Abate N, Carulli L, Cabo-Chan A Jr, Chandalia M, Snell PG, Grundy SM. Genetic polymorphism PC-1 K121Q and ethnic susceptibility to insulin resistance. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:5927–5934.

Abate N, Chandalia M, Satija P, Adams-Huet B, Grundy SM, Sandeep S, Radha V, Deepa R, Mohan V. ENPP1/PC-1 K121Q polymorphism and genetic susceptibility to type 2 diabetes. Diabetes 2005;54(4):1207-1213.

Alberts P, Daumke O, Deverson EV, et al Distinct functional properties of the TAP subunits coordinate the nucleotide-dependent transport cycle. Curr Biol 2001;11: 242-251.

American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1998; 21Suppl 1: S5.

Anderson JL, Muhlesteim JB, Horne BD, Carlquist JF, Bair TL. Madsem TE, et al. Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. Circulation 2000;102:1227-1232.

Arem R, Escalante D. Subclinical hypothyroidism: epidemiology, diagnosis and significance. Advances in Internal Medicine 1996;213-250.

Arem R, Patsch W. Lipoprotein and apolipoprotein levels in subclinical hypothyroidism. Effect of levothyroxine therapy.nArch Intern Med 1990;150:2097–2100.

Armani MCA, Baldin AD, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Maciel-Guerra AT, Guerra-Jr G. Avaliação da Resistência Insulínica e do Perfil Lipídico na Síndrome de Turner. Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49(2):278-285.

Arnesen E, Refsum H, Bonaa KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. Int J Epidemiol 1995;24:704-709.

Arya R, Blangero J, Williams K, Almasy L, Dyer TD, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP, Duggirala R. Factors of insulin resistance syndrome--related phenotypes are linked to genetic locations on chromosomes 6 and 7 in nondiabetic mexican-americans. Diabetes 2002;51(3):841-847.

Bacci s, Ludovico O, Prudente S, Zhang YY, Di Paola R, Mangiacotti D, Rauseo A, D Nolan, Duffy J, Fini G, Salvemini L, Amico C, Vigna C, Pellegrini F, Menzaghi C, Doria A, Trischitta V. The K121Q Polymorphism of the *ENPP1/PC-1* Gene Is Associated With Insulin Resistance/Atherogenic Phenotypes, Including Earlier Onset of Type 2 Diabetes and Myocardial Infarction. Diabetes 2005;54:3021-3025.

Baena N, Vigan C,Cariati E, et al. Turner syndrome: Evaluation of prenatal diagnosis in 19 European registries. Am J Med Genet 2004;129A:16-20.

Baguet JP, Douchin S, Pierre H, Rossignol AM, Bost M, Mallion JM. Structural and functional abnormalities of large arteries in Turner syndrome. Heart 2005; 91:1442-1446.

Bailey LB, Gregory J. Polimorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks, and impact on folate requiremente. J Nutr**.** 1999;129: 919-922.

Bakalov VK, Cooley MM, Quon MJ, Luo ML, Yanovski JA, Nelson LM, Sullivan G, Bondy CA. Impaired insulin secretion in the Turner metabolic syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(7):3516-3520.

Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency-use of CpG methylase. Biochem Biophys Res Commun 1993;193:1184-1190.

Ballantyne CM, Herd JA, Stein EA, Ferlic LL, Dunn JK, Gotto AM, et al. APOlipoprotein E Genotypes and Response of Plasma Lipids and Progression-Regression of Coronary Atherosclerosis to Lipid-Lowering Drug Therapy. Journal of the American College of Cardiology 2000;36(5):1572-1578.

Barrett-Connor E, Ferrara A. Isolated postchallenge hyperglycemia and the risk of fatal cardiovascular disease in older women and men: The Rancho Bernardo Study. Diabetes Care 1998;21:236-239.

Barron KS, Reveille JD, Carrington M, et al Susceptibility to Reiter´s syndrome is associated with alleles of TAP genes. Arthritis Rhum 1995;38:684-689.

Beiguelman B. Citogenética Humana. Editora Guanabara. Rio de Janeiro. 1982.

Benjafield AV, Wang WY, Speirs HJ, Morris BJ. Genome-wide scan for hypertension in Sydney Sibships: the GENIHUSS study. Am J Hypertens 2005;18(6):828-832.

Bianco B, Lipay M, Guedes A, Oliveira K, Verreschi IT. SRY gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoral gonadal lesions in Turner syndrome. Int J Gynecol Pathol 2009;28(2):197-202.

Bianco B, Lipay MV, Melaragno MI, Guedes AD, Verreschi IT. Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. J Pediatr Endocrinol Metab 2006;19(9):1113-7.

Bianco B, Nunes Lipay MV, Guedes AD, Verreschi IT. Clinical implications of the detection of Y-chromosome mosaicism in Turner's syndrome: report of 3 cases. Fertil Steril 2008;90(4):1197.e17-20. Epub 2008 Mar 4.

Bianco B, Oliveira KC, Guedes AD, Barbosa CP, Lipay MV, Verreschi IT. OCT4 gonadal gene expression related to the presence of Y-chromosome sequences in Turner syndrome. Fertil Steril 2010:26. [Epub ahead of print].

Blaschke RJ, Rappold G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. Curr Opin Genet Dev 2006;16(3):233-239.

Bondy CA. Congenital Cardiovascular Disease in Turner Syndrome. Congenit Heart Dis 2008;3: 2-15.

Brattström L, Lindgren A, Israelsson A, Hultberg B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. J Intern Med 1994;236:633-641.

Brattström LE, Hardebo JE, Hultberg BL. Moderate hyperhomocysteinemia: a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. Stroke 1984;15:1012-1016.

Bratusch-Marrain PR, Smith D, DeFronzo RA. The effect of growth hormone on glucose metabolism and insulin secretion in man. J Clin Endocrinol Metab 1982;55:973-982.

Brunzell JD, Ayyobi AF. Dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Am J Med 2003;115(8A):24S-28S.

Buss PM. Assistência hospitalar no Brasil (1984-1991): uma análise preliminar baseada no Sistema de Informação Hospitalar do SUS. Inf Epidemiol SUS 1993;2:5-44.

Canani LH, Ng DP, Smiles A, Rogus JJ, Warram JH, Krolewski AS. Polymorphism in ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1 gene (ENPP1/PC-1) and early development of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes. Diabetes 2002;51:1188-1193.

Caprio S, Boulware S, Diamond M, Sherwin RS, Carpenter TO, Rubin K, Amiel S, Press M, Tamborlane WV. Insulin resistance: an early metabolic defect of Turner´s syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1991;72:832-836.

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbot RD, Kalousdian S, Kannel WN. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Heart Study. JAMA 1986;256:2835-2838.

Cercato C, Mancini MC, Arguello AMC, Passos VQ, Villares SMF, Halpern A. Hipertensão arterial, diabetes melito e dislipidemia de acordo com o índice de massa corpórea: estudo em uma população Brasileira. Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo 2004;59:113-8.

Chao CL, Tsai MY, Lee CM, Hsu SM, Kao JT, Chien KL, Sung FC, Lee YT. The graded effect of hyperhomocysteinemia on the severity and extent of coronary atherosclerosis. Atherosclerosis 1999;147:379-380.

Chevrier D, Giral M, Braud V, Bourbigot B, Muller JY, Bignon JD, Soulillou JP. Effects of MHC-encoded TAP1 and TAP2 gene polymporphism and matching on kidney graft rejection. Transplantation 1995;60:292-296.

Chiovato L, Larizza D, Bendinelli G, Tonacchera M, Marino M, Mammoli C, Lorini R, Severi F, Pinchera A. Autoimmune hypothyroidism and hyperthyroidism in patients with Turner´s syndrome. Eur J Endocrinol 1996;134:568-575.

Cicognani A, Mazzanti L, Tassinari K, Pellacani A, Forobosco A, Landi L, Pifferi C, Cacciari E. Differences in carbohydrate tolerance in Turner´s syndrome depending on age and karyotype. Eur J 1988;148(1):64-68.

Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. N Engl J Med 1991;324:1149-1155.

Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, Godwin J, Qizilbash N, Taylor JO, Hennekens CH. Blood pressure, stroke and coronary heart disease. Part 2, short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. Lancet. 1990;335:827-838.

Coltro RS, Mizutani BM, Mutti A, Délia MPB, Martinelli LMB, Cogni AL, Matsubara BB. Frequência de fatores de risco cardiovascular em voluntários participantes de evento de educação em saúde. Rev Assoc Med Bras 2009;55(5):606-610.

Cooley M, Bakalov V, Bondy CA. Lipid profiles in womem with 45,X v*s* 46,XX primary ovarian failure. JAMA 2003;290(16):2127-2128.

Corrêa TD, Namura JJ, Silva CAP, Castro MG, Meneghini A, Ferreira C. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. Arq Med ABC 2005;31(2):91-101.

Corvol P, Persu A, Gimenez-Roqueplo A, Jeunemaitre X. Seven lessons from 2 candidate genes in human essential hypertension. Hypertension 1999;33:1324 – 1331.

Costin G, Kogut MD. Carbohydrate intolerance in gonadal dysgenesis: evidence for insulin resistance and hyperglucagonemia. Horm Res 1985;22(4):260-269.

Coull BM, Malinow MR, Beamer N, Sexton G, Nordt F, de Garmo P. Elevated plasma homocyst(e)ine concentration as a possible independent risk factor for stroke. Stroke 1990;21:572-576.

Das HK, Mcpherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human APOlipoprotein E gene. J Biol Chem 1985;260:6240-6247.

DATASUS, Banco de dados do Sistema Único de Saúde. A principal causa de óbitos no Brasil. [citado 10 Fev 2010]. Disponível em: http://www.datasus.gov.br.

D'Ávila R, Guerra EMM, Rodrigues CIS, Fernandes FA, Cardaval RAM, Almeida FA. Sobrevida de pacientes renais crônicos em diálise peritoneal e hemodiálise. J Bras Nefrol 1999;21:13-21.

Dawson FKL, Wright AM, Bakker B, Pitlick PT, Rosenfeld RG. Cardiovascular evaluation in Turner syndrome: utility of Mr imaging. Austr Radiol 1992;36:204-209.

De Cabo SF, Hazen MJ, Molero ML, Fernandez-Piqueras J. S-adenosyl-L-homocysteine: a non-cytotoxic hypomethylating agent. Experientia 1994;50:658-659.

Dean JW, Fowler PB. Exaggerated responsiveness to thyrotrophin releasing hormone: A risk factor in women with coronary artery disese. BMJ 1985;290:1555-1561.

Djilali-Saiah I, Benini V, Daniel S, Assan R, Bach JF, Caillat-Zucman S. Linkage disequilibrium between hlA class II (DR, DQ, DP) and antigen processing (LMP, TAP, DM) genes of the major histocompatibility complex. Tissue Antigens 1996; 48: 87-92.

Dreon DM, Fernstrom HA, Miller B, Krauss RM. APOlipoprotein E Isoform Phenotype and LDL Subclass Response to a Reduced-Fat Diet. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1995;15(1):105-111.

Driscoll DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of APOlipoprotein E. Journal of Lipid Research 1984;25:1368-1379.

Dudmam NPB. Na alternative view of homocysteine. Lancet 1999;8:65-68.

Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Arya R, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP. A major locus for fasting insulin concentrations and insulin resistance on chromosome 6q with strong pleiotropic effects on obesity-related phenotypes in nondiabetic Mexican Americans. Am J Hum Genet 2001;68(5):1149-1164.

Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. Lab Invest 2001; 81(5): 642-672.

Eichner JE, Kuller L, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, Neaton JD. Relation of APOlipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. The American Journal of Cardiology 1993;71:160-165.

Elsheikh M, Casadei B, Conway GS, Wass JA. Hypertension is a major risk for aortic dilatation in women with Turner´s syndrome. Clin Endocrinol 2001;54:69-73.

Elsheikh M, Casadei B, Conway GS, Wass JA. Turner`s syndrome in adult-hood. Endocr Rev 2002;23:120-140.

Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. N Engl J Med 2001;345:971-890.

Faucz FR, Probst CM, Petzl-Erler ML. Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. Eur J Immunogenet 2000; 27:5-16.

Faustman D, Li XP, Lin HY, Fu YE, Eisenbarth G, Avruch J, Guo J. Linkage of faulty major histocompatibility complex class I to autoimmune diabetes. Science 1991; 254:1756.

Feenstra M, Verdaasdonk M, van der Zwan AW, Weger R, SlootwegP, Tilanus M. Microsatellite Analysis of Microdissected Tumor Cells and 6p High Density Microsatellite Analysis in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas with Down-Regulated Human Leukocyte Antigen Class I Expression. Lab Invest 2000;80:405–414.

Fixler DE, Laird WP. Validity of mass blood pressure screeningin children. Pediatrics 1983;72:459-463.

Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt JH, Hess DL, Davis CE. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fstin total homocysteine, related genetic polimorphisms and B vitamins. The atherosclerosis risk in Communites (ARIC) study. Circulation 1998;98:204-210.

Frittitta L, Cerrato A, Sacco MG, Weidner N, Goldfine ID, Vigneri R. The insulin receptor content is increased in breast cancers initiated by three different oncogenes in transgenic mice. Breast Cancer Res Treat 1997;45(2):141-1477.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995;10:111–113.

Gao MY, Wu AH, Wen CX, She DX, Chen SQ. Investigating the correlation between polymorphisms with couple sharing rate of TAP gene and hypertensive disorder complicating pregnancy. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 2006;23(2):165-168.

Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen IC, Hansen PS, Kesäniemi YA, Faergeman O. The APOlipoprotein e4 Allele Determines Prognosis and the Effect on Prognosis of Simvastatin in Survivors of Myocardial Infarction. Circulation 2000;101:1366-1371.

Gianzo JAC, Cobeta RP, Siebert MF, Conde JB, Arias MP. Síndrome de Turner y alteraciones cardiovasculares. An Esp Pediatr 1996;44:242–244.

Godsland IF, Shennan NM, Wynn V. Insulin action and dynamics modeled in patients taking the anabolic steroid methandienone (Dianabol). Clin Sci (Colch) 1986;71:665-673.

Gonzalez-Sanchez JL, Martinez-Larrad MT, Fernandez- Perez C, Kubaszek A, Laakso M, Serrano-Rios M. K121Q PC-1 gene polymorphism is not associated with insulin resistance in a Spanish population. Obes Res 2003;11:603-605.

Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease and death. The Framingham study. Archives of Internal Medicine 1981;141(9):1128-1131.

Gotzsche CO, Krag OB, Nielsen J, Sorensen KE, Kristensen BO. Prevalence of cardiovascular malformations and association with karyotypes in Turne´s syndrome. Arch Dis Child 1994;71:433-436.

Goyette P, Summer JS, Milos R, Dincan AMV, Rosenblatt DS, Mathews, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. Nat Genet 1994;7:195-200.

Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: The European concerted action project. JAMA 1997; 277: 1775-1781.

Grarup N, Urhammer SA, Ek J, Albrechtsen A, Glumer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, Pedersen O. Studies of the relationship between the ENPP1 K121Q polymorphism and type 2 diabetes, insulin resistance and obesity in 7, 333 Danish white subjects. Diabetologia 2006;49:2097–2104.

Gravholt CH. Aspects of the treatment of Turner syndrome. Expert Opin Pharmacother 2001;2:1633-1647.

Gravholt CH. Medical problems of adult Turner´s syndrome. Horm Res 2001;56:44-50.

Gravholt CH. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. Eur J Endocrinol 2004;151:657-687.

Gravholt CH. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49(1):145-156.

Gravholt CH, Juul S, Naeraa RW, Hansen J. Morbidity in Turner Syndrome. J Clin Epidemiol 1998;51(2):147-158.

Gravholt CH, Naeraa RW, Nyholm B, Gerdes LU, Christiansen E, Schmitz O, Christiansen JS. Glucose metabolism, lipid metabolism, and cardiovascular risk factors in adult Turner syndrome: the impact of sex hormone replacement. Diabetes Care 1998;21:1062-1070.

Gravholt CH, Hansen KW, Erlandsen M, Ebbehøj E, Christiansen JS. Nocturnal hypertension an impaired sympathovagal tone in Turner syndrome. J Hypertens 2006;24:353-360.

Gravina-Taddei CF, Batlouni M, Sarteschi C, Baltar VT, Salvarini NA, Bertolami MC, Sousa JEMR. Hiper-homocisteinemia como fator de risco para doença aterosclerótica coronariana em idosos. Arq Bras Cardiol 2005;85:166-173.

Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Brewer HB, Jr. APOlipoprotein E metabolism in normolipoproteinemic human subjects. Journal of Lipid Research 1984;25:1167-1176.

Gross JL, Ferreira SRG, Oliveira JE. Glicemia pós-prandial. Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47(6)728-738.

Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S JR, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiplerisk- factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. Circulation 1999;100:1481-1492.

Gruneiro, Iorcansky S, Coco R, Rivarola MA, Bergada C. High incidence of thyroid disturbances in 49 children with Turner syndrome. J Pediatr 1987;111:258-261.

Grupe A, Alleman J, Goldfine ID, Sadick M, Stewart TA. Inhibition of insulin receptor phosphorylation by PC-1 is not mediated by the hydrolysis of adenosine triphosphate or the generation of adenosine. J Biol Chem 1995;270(38):22085-22088.

Gu HF, Almgren P, Lindholm E, Frittitta L, Pizzuti A, Trischitta V, Groop LC. Association between the human glycoprotein PC-1 gene and elevated glucose and insulin levels in a paired-sibling analysis. Diabetes 2000;49:1601–1603.

Guba SC, Fink IM, Fonseca V. Hyperhomocysteinemia an emergin and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. Am J Clin Pat 1996;105: 709-722.

Guedes AD, Bianco B, Callou EQ, Gomes AL, Lipay MV, Verreschi IT. Growth hormone treatment in Turner syndrome: data and reflections. Arq Bras Endocrinol Metabol 2008;52(5):757-764

Guerzoni AR, Biselli PM, Godoy MF, Souza DR, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. Homocysteine and MTHFR and VEGF gene polymorphisms: impact on coronary artery disease. Arq Bras Cardiol 2009; 92(4):263-268.

Guillausseau PJ, Massin P, Dubois-LaForgue D, Timsit J, Virally M, Gin H et al. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. Ann Intern Med 2001;134:721-728.

Gus I, Harzheim E, Zaslavsky C, Medina C, Gus M. Prevalence, Awareness, and Control of Systemic Arterial Hypertension in the State of Rio Grande do Sul. Arq Bras Cardiol 2004;83(5):429-433.

Haddad HM, Wilkins L. Congenital anomalies associated with gonadal aplasia. Pediatrics1959;23:885–902.

Haeusler G, Frisch H. Growth hormone treatment in Turner's syndrome: short and long-term effects on metabolic parameters. Clin Endocrinol (Oxf) 1992;36(3):247-253.

Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabete and in nondiabetic subjetcs with or without prior myorcadio infarction. N Engl J Med 1998;339:229-234.

Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. Physiology of Genomics 2000;4:101-108. 76. Peña R, Lahoz C, Mostaza JM, Jiménez J, Subirats E, Pintó X, et al. Effect of APO E genotype on the hypolipidaemic response to pravastatin in an outpatient setting. Journal of Internal Medicine 2002;251:518-525.

Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. IHJ 2000; 52:S18-26.

Harahap AR, Goding JW. Distribution of the murine plasma cell antigen PC-1 in non-lymphoid tissues. J Immunol. 1988;141(7):2317-20.

Harboe-Gonçalves L, Vaz LS, Buzzi M. Associação entre níveis plasmáticos de homocisteína e acidente vascular cerebral isquêmico. Arq Neuropsquiatr 2005; 63(1):97-103.

Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, McCrum EE, Gey KF, Whitehead AS, Evans AE. The common “thermolabile” variant of methylenetetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinemia. QJM 1996;89:571–577.

Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. Trends Biochem Sci 2006;31(8):445-54.

Hennekens CH, Albert CM, Godfriend SL, Gaziano JM, Buring JE. Adjunctive drug therapy of acute myocardial infarction - evidence from clinical trials. N Engl J Med 1996;26:292-294.

Herrmann W, Schorr H, Purschwitz K, Rassoul, Richter V. Total homocysteine, vitamin B(12), and total antioxidant status in vegetarians. Clin Chem 2001;47(6):1094-1101.

Hjerrild BE, Mortensen KH, Gravholt HC. Turner syndrome and clinical treatment. British Medical Bulletin 2008;86:77–93

Ho VB, Bakalov VK, Cooley M, Van PL, Hood MN, Burklow TR, Bondy CA. Major vascular anomalies in turner syndrome: prevalenceand magnetic resonance angiographic features. Circulation 2004;110:694-700.

Höhler T, Weinmann A, Schneider PM, Rittner C, Schopf RE, Knop J, Hasenclever P, Meyer zum Buschenfelde KH, Märker-Hermann E. TAP-polymorphisms in juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. Hum Immunol 1996;51:49-54.

Holl RW, Kunze K, Etzrodt H, Tller W, Heinze E. Turner´s syndrome final height, glucose tolerance, bone density and psychosocial status in 25 adult patients. Eur J Pediatr 1994;153:11-16.

Hou JW, Hwu WL, Tsai WY, Lee JS, Wang TR, Lue HC. Cardio-vascular disorders in Turner's syndrome and its correlation to karyotype. J Formos Med Assoc 1993;92:188–189.

Ismail A, Bousaffara R, Kaziz J, et al Polymorphism in transporter antigen peptides gene (TAP1) associated with atopy in Tunisians. J Allergy Clin Immunol 1997;99:216-223.

IV Brazilian Guidelines in Arterial Hypertension. Arq Bras Cardiol 2004; 82(suppl 4):7-22.

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol. 2007;88:2-19. 0007/Diretrizes_SBD_2007.pdf

Ivarsson SA, Ericsson UB, Nilsson KO, Gustafsson J, Hagenäs L, Häger A, Moell C, Tuvemo T, Westphal O, Albertsson-Wikland K, et al. Thyroid autoantibodies, Turner´s syndrome and grow hormone therapy. Acta Paediatr 1995; 84:63-65.

Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo A, Celerier J, Soubrier F, Corvol P. Angiotensinogen and hypertension. In: Dominiczak A, Connell J, Soubrier F, eds. Molecular Genetics of Hypertension 1999;1–352.

Jin X, Xia L, Wang LS, Shi JZ, Zheng Y, Chen WL, Zhang L, Liu ZG, Chen GQ, Fang NY. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats Proteomics. 2006;6:1948-1956.

Kang S-S, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. Annu Rev Nutr 1992;12:279-298.

Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framigham Study. Circulation 1979;59:8-13.

Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet 2005;365:217-23.

Kolovou G, Daskalova D, Mikhailidis D. APOlipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. Angiology 2003;54(1):59-71.

Krushkal J, Ferrell R, Mockrin SC, Turner ST, Sing CF, Boierwinkle E. Genome-wide linkage analysis of systolic blood pressure using highly discordant siblings. Circulation. 1999;99:1407–1410.

Kubaszek A, Markkanen A, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C, Barker DJP, Laaksol M. The association of the K121Q polymorphism of the plasma cell glycoprotein-1 gene with type 2 diabetes and hypertension depends on size at birth. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2044–2047.

Kubaszek A, Pihlajamaki J, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M. The K121Q polymorphism of the PC-1 gene is associated with insulin resistance but not with dyslipidemia. Diabetes Care 2003;26:464–467.

Kuller LH. National Diabetes Data Group. Stroke na diabetes. In: Diabetes in America. Bethesda: National Institute of Health/National Institute of Diabetes/Digestive an Kidney Diseases 1995;449-456.

Lahiri DK; Nurnberger JL Jr. A rapid non-enzimatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Res.1991;19:5444.

Lahoz C, Schaefer EJ, Cupples LA, Wilson PW, Levy D, Osgood D, Parpos S, Pedro-Botet J, Daly JA, Ordovas JM. APOlipoprotein E Genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. Atherosclerosis 2001;154:529-537.

Laing SP, Swerdlow AJ, Carpenter LM, Slater SD, Burden AC, Botha JL, Morris AD, Waugh NR, Gatling W, Gale EA, Patterson CC, Qiao Z, Keen H. Mortality from cerebrovascular disease in a cohort of of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. Stroke 2003;34:418-421.

Landin-Wilhelmsen K, Bryman I, Wilhelmsen L. Cardiac malformations and hypertension, but not metabolic risk factors, are common in Turner syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:4166-4170.

Landon J, Wynn V, Cooke JNC. Effect of anabolic steroid methandienone on carbohydrate metabolism in man. Metabolism 1962;11:501-507.

Larson EW, Edwards WD. Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. Am J Cardiol 1984;53(6):849-855.

Lee HJ, Ha SJ, Han H, Kim JW.Distribuition of HLA-A, B alleles and polymorphism of TAP and LMP genes in Korean patients with atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2001,31:1867-1874.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica. 2 ed. São Paulo:Sarvier, 1995.

Lehtimäki T, Moilanen T, Porkka K, Akerblom HK, Rönnemaa T, Räsänen L, Viikari J, Ehnholm C, Nikkari T. Association between serum lipids and APOlipoprotein E phenotype is influenced by diet in a population-based sample of free-living children and young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. Journal of Lipid Research 1995;36:653-661.

Leka SK, Kitsiou-Tzeli S, Kalpini-Mavrou A, Kanavakis E. Short stature and dysmorphology associated with defects in the SHOX gene. Hormones (Athens) 2006;5(2):107-118.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, for the Prospective studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet 2002;360:1903-1913.

Lippe B. Turner syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am 1991;20:121-152.

Lobo A, Naso A, Arheart K, Kruger WD, Abou-Ghazala T, Alsous F, Nahlawi M, Gupta A, Moustapha A, van Lente F, Jacobsen DW, Robinson K. Reduction of homocysteine levels in coronary artery disease by low-dose folic acid combined with vitamins B6 and B12. Am J Cardiol 1999;83:821-5.

Lopez L, Arheart KL, Colan SD, Stein NS, Lopez-Mitnik G, Lin AE, Reller MD, Ventura R, Silberbach M. Turner Syndrome is an independente risk factor for aortic dilation in the young. Pediatrics 2008;121(6):1622-1627.

Lotufo PA. Mortalidade precoce por doenças do coração no Brasil. Comparação com outros países. Arq Bras Cardiol 1998;70(5):321-325.

Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. J Hypertens. 1998;16:1871–1878.

Lyon HN, Florez JC, Bersaglieri T, Saxena R, Winckler W, Almgren P, Lindblad U, Tuomi T, Gaudet D, Zhu X, Cooper R, Ardlie KG, Daly MJ, Altshuler D, Groop L, Hirschhorn JN. Common variants in the ENPP1 gene are not reproducibly associated with diabetes or obesity. Diabetes 2006;55:3180–3184.

Maddux BA, Goldfine ID. Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. Diabetes 2000;49(1):13-19.

Mager A, Lalezari S, Shohat T, Birnbaum Y, Adler Y, Magal N, Shohat M. Methylenotetrahydrofolate reductase genotypes and early-onset coronary artery disease. Circulation 1999;100:2406-2410.

Mahley RW, Rall SC, Jr. APOlipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. Annual Rev. Genomics Hum. Genet. 2000;1:507-537.

Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. Hypertension. 1999;34:724-8.

Martinez TLR, Janovich H, Lopes IL, Pinto LESA, Silva EP, Relvas G. APOlipoproteína E, dislipidemia e aterosclerose. Dislipidemia Today 2001;Ano 2 Maio(2):3-7.

Martins MC, Faleiro LL, Rodrigues MO, Alabergaria I, Fonseca A. Influência dos Polimorfismos da *APOE* em Alguns Factores de Risco de Aterosclerose**.** Acta Med Port. 2008; 21(5):433-440

Matos AC, Ladeia AM. Assessment of Cardiovascular Risk Factors in a Rural Community in the Brazilian State of Bahia. Arq Bras Cardiol 2003;81(3):297-302.

Mazzanti L, Cacciari E. Congenital heart disease in patients with Turner´s syndrome. Italian Study Group for Turner syndrome (ISGTS). J Pediatr 1998;133:688-692.

Mazzanti L, Prandstraller D, Tassinari D, Rubino I, Santucci S, Picchio FM, Forabosco A, Cacciari E. Heart disease in Turner's syndrome. Helv Pediatr Acta 1988;43:25–31.

McAteer JB, Prudente S, Bacci S, Lyon HN, Hirschhorn JN, Trischitta V, Florez JC; ENPP1 Consortium. The ENPP1 K121Q polymorphism is associated with type 2 diabetes in European populations: evidence from an updated meta-analysis in 42,042 subjects. Diabetes 2008;57(4):1125-30.

McCully KS. Vascular pathology of homocyseinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. Am J Pathol 1969; 56(1):111-128.

Menziger G, Fallucca F, Andreani D. Gonadal dysgenesis and diabetes. Lancet 1966; i:324.

Meyre D, Lecoeur C, Delplanque J, Francke S, Vatin V, Durand E, Weill J, Dina C, Froguel P. A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31-q23.2. Diabetes 2004;53(3):803-811.

Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A, Samson C, Lecoeur C, Vatin V, Ghoussaini M, Wachter C, Hercberg S, Charpentier G, Patsch W, Pattou F, Charles MA, Tounian P, Clément K, Jouret B, Weill J, Maddux BA, Goldfine ID, Walley A, Boutin P, Dina C, Froguel P. Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. Nat Genet 2005;37:863-867.

Moehlecke M, Kramer CK, Leitão CB, Krahe AL, IBalbosco I, Azevedo MJ, Jorge L. Gross JL, Canani LH. Polimorfismo K121Qdo Gene ENPP1 e Cardiopatia Isquêmica em Pacientes com Diabete Melito. Arq Bras Cardiol 2010;94(2):168-173.

Mohr JP. Lacunes. Neurol Clin North Am 1983;1:201-221.

Moins-Teisserenc H, Semana G, Alizadeh M, Loiseau P, Bobrynina V, Deschamps I, Edan G, Birebent B, Genetet B, Sabouraud O, Charron D: TAP2 gene polymorphism contributes to genetic susceptibility to multiple sclerosis. Hum Immunol 1995;42:195.

Moore JW, Kirby WC, Rogers WM, Poth MA. Partial pulmonary venous drain age associated with 45,X Turner's syndrome. Pediatrics 1990;86:273–276.

Mori Y, Ohyanagi M, Koida S, Ueda A, Ishiko K, Iwasaki T. Effects of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Nitric Oxide on Endothelial Function in Femoral Resistance Arteries of Spontaneously Hypertensive Rats. Hypertension Research 2006;29:187–195.

Moriguchi EH. Metabolismo das Lipoproteínas. Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul 2001;12-18.

Muniz MTC, Siqueira ERF, Fonseca RA, D´Almeida V, Hotta JK, Santos JE, Cavalcanti MSM, Sampaio CAM. Avaliação da relação entre o polimorfimso C677T no gene para MTHFR e a concentração plasmática de homocisteína na Doença Arterial Coronariana. Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50(6):1059-1065.

Naeraa Rw, Gravholt CH, Hansen J, et al. Mortality in Turner syndrome. In: Albertsson-Wikland k, Ranke MB, Eds. Turner syndrome in a Life Span Perspective: Research and Clinical Aspects. Amsterdam: Elsevier; 1995:323.

Naeraa RW, Nielsen J. Standards for growth and final height in Turner's syndrome. Acta Paediatr Scand 1990;79(2):182-90.

Nathwani NC, Unwin R, Brook CGD, Hindmarsh PC. Blood pressure and Turner syndrome. Clinical Endocrinology 2000;52:363-370.

National Institute of Health. Morbity and mortality chartbook on cardiovascular, lung and blood service. Bethesda: National Institute of Health 1990.

Neefjes JJ, Momburg F, Hämmerling GJ. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. Science 1993;261(5122):769-71.

Neter JE, Stam BE, Kok FJ, Grobbee DE, and Geleijnse JM. Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. Hypertension 2003;42:878–84.

Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. Bras Patol Med Lab 2004;40(5):311-320.

Nielsen J, Johansen k, Yale K. The frequency of diabetes mellitus in patients with Turner´s syndrome and pure gonadal dysgenesis. Blood glucose, plasma insulin

and growth hormone level durin an oral glucose tolerance test. Acta Endocrinol (Copenh) 1969; 62(2):251-269.

Nobre RCN, Domingues RZL, Silva AR, Colugnati, FAB, Tadde, JAAC. Prevalências de sobrepeso, obesidade e hábitos de vida associados ao risco cardiovascular em alunos do ensino fundamental. Rev Assoc Med Bras 2006;52:118-124.

Nocite JR. Fisiopatologia da Hipertensão Arterial e Avaliação do Paciente Hipertens. Rev Bras Anest 1988;38:4:257-262.

Norwood, Janet W. & Inlander, Charles B. Entendendo a Diabetes – Para educação do Paciente. Julio Louzada Publicações. São Paulo, 2000.

Olaisen B, Teisberg P, Gedd-Dahl TJR. The locus for APOlipoprotein E (APOE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. Hum Genet 1982;62:233-6.

Oliveira HCF. Bases moleculares das dislipidemias e da aterosclerose. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo 1995;5(2):200-208.

Oliveira KC, Bianco B, Verreschi ITN, Galera BB, Galera MF, Barbosa CP, Lipay MVN. Prevalence of the Polymorphism *MTHFR* A1298C and not *MTHFR* C677T Is Related to Chromosomal Aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome Patients. Arq Bras Endocrinol Metab 2008;52(8):1373-1381.

Oshima T, Ozono R, Yano Y, Higashi Y, Teragawa H, Miho N, Ishida T, Ishida M, Yoshizumi M, Kambe M. Beneficial effect of T-type calcium channel blockers on endothelial function in patients with essential hypertension. Hypertens Res 2005;28(11):889-894.

Ostberg JE, Thomas EL, Hamilton G, Attar MJ, Bell JD, Conway GS. Excess visceral and hepatic adipose tissue in Turner syndrome determined by magnetic resonance imaging: estrogen deficiency associated with hepatic adipose content. J Clin Endocrinol Metab 2005;90(5):2631-2635.

Ozba-Gerçeker F, e Ozguc M. Frequencies of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms in the Anatolian population. European Journal of Immunogenetics 2003;30:97–99.

Paffenbarger RS Jr, Jung DL, Leung RW, Hyde RT. Physical activity and hypertension: an epidemiological view. Ann Med 1991;23:319–327.

Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human APOlipoprotein E gene. Proc Natl Acad Sci 1985;82:3445-3449.

Paniz C, Grotto C, Schmitt CG, Valentini J, Schott KL; Pomblum VJ, Garcia SC. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. J Bras Patol Med Lab 2005; 41(5):323-334.

Parchment C ,Clayton-Smith J. Cardiovascular malformations in Turner's syndrome. Arch Dis Child 1995;72:543(Letter).

Pimentel M, Biolo A, Clausell N. Dislipidemias. Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul 2001:5-11.

Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID, Bozzali M, Ercolino T, Scarlato G, Iacoviello L, Vigneri R, Tassi V, Trischitta V. A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. Diabetes 1999;48:1881–1884

Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. Genes Immun 2002;3:235-249.

Poprawski K, Michalski M, Lawniczak M, Lacka K. Cardiovascular abnormalities in patients with Turner syndrome accordin to karyotype. Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej 2009;119(7-8):453-459.

Prandstraller D, Mazzanti L, Picchio FM, Magnani R, Bergamaschi A, Perri E, Tsingos Cacciari E. Turner´s syndrome: cardiologic profile according to the different chromosomal patients and long-term clinical follow-up of 136 nonpreselected patients. Pediatr Cardiol 1999;20:108-112.

Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Kim TY, Kim TG. Association of TAP and HLA-DM genes with psoriasis in Koreans. J Invest Dermatol 2003; 120:616-622.

Ranke MB, Plfuger H, Rosendahl W, Sstubbe P, Enders H, Bierich JR, Majewski F. Turner syndrome: spontaneous growth in 150 cases and review of the literature. Eur J Pediatr 1983,141:81-88.

Rasio E, Antaki A, Van Champenhout J. Diabetes mellitus in gonadal dysgenesis: Studies of insulin and growth hormone secretion. Eur J Clin Invest 1976;6:59-66.

Rasmussen SK, Urhammer SA, Pizzuti A, Echwald SM, Ekstrøm CT, Hansen L, Hansen T, Borch-Johnsen K, Frittitta L, Trischitta V, Pedersen O. The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. Diabetes 2000;49:1608–1611.

Rau H, Nicolay A, Usadel KH, Finke R, Donner H, Walfish PG, Badenhoop K. Polymorphisms of *TAP1* and TAP2 genes in Graves' disease. Tissue Antigens 1977;49:16.

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 1988;37:1595-1607.

Ritz U, Drexler I, Sutter D, Abele R, Huber C, Seliger B. Impaired transporter associated with antigen processing (TAP) function attributable to a single amino acid alteration in the peptide TAP subunit TAP1. J Immunol 2003;170(2):941-6.

Romaldini CC, Issler H, Cardoso AL, Diament J, Forti N. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial coronariana prematura. Jornal de Pediatria 2004;80(2):135-140.

Ross JL, Feuillan P, Long LM, Kowal K, Kushner H, Cutler GB, Jr. Lipid abnormalities in Turner syndrome. J Pediatr 1995:126(2):242-245.

Santo ALT, Weiss T, Duarte CK, Azevedo MJ, Zelmanovitz. Análise crítica das recomendações da Associação Americana de Diabetes para doença cardiovascular no diabetes melito. Arq Bras Endocrinol Metab 2009;53(5):657-666.

Sas TC, de Muinck Keizer-Schrama SM, Stijnen T, Aanstoot HJ, Drop SL. Carbohydrate metabolism during long-term growth hormone (GH) treatment and after discontinuation of GH treatment in girls with Turner syndrome participating in a randomized dose-response study. Dutch Advisory Group on Growth Hormone. J Clin Endocrinol Metab 2000;85(2):769-775.

Saw SM, Yuan JM, Ong CN, Arakawa K, Lee HP, Coetzee GA, Yu MC. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of plasma homocysteine concentrations in middle-aged and older Chinese men and women in Singapore. Am J Clin Nutr. 2001;73(2):232-9.

Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Rush D, Schaefer EJ, Rosenberg IH. Association between plasma homocysteine concentrations and extra cranial carotid-artery stenosis. N Engl J Med 1995;332:286-291.

Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. Ann Int Med 2004;141(6):421-431.

Shen C, Guo Z, Wu M, Hu X, Yang G, Yu R, Shen H, Xu Y, Yao C. Association study between hypertension and A/G polymporphism at codon 637 of the transporter associated with antigen processin 1 gene. Hypertension Res 2007;30(8):683-690.

Shi Q, Zhang Z, Li G, Pillow PC, Hernandez LM, Spitz MR, Wei Q. Sex differences in risk of lung cancer associated with methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14(6):1477-1484.

Sim MK, Qui XS. Angiotensins in plasma of hypertensive rats and human. Regul Pept 2003;111:179-82.

Sinaiko AR, Gomez-Marin O, Prineas RJ. Prevalence of significant hypertension in junior highschool aged children: the Children and Adolescent Blood Pressure Program. Journal of Pediatrics 1989;114:664-669.

Siqueira AFA, Almeida-Pititto BA, Ferreira SRG. Doença cardiovascular no Diabetes Mellitus: análise dos fatores de risco clássicos e não-clássicos. Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51(2):257-267.

Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E, Fischer RM, Olivecrona G, Hamsten A, Karpe F. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. Atherosclerosis 2003;167:311-317.

Smith JD. APOlipoprotein E4: an allele associated with many diseases. Annals of Medicine 2000;32(2):118-127.

Smith JW, Marcus FI, Serokman R. Prognosis os patients with diabetes mellitus after acute myocardial infarction. AM J Cardiol 1984;54:718-721.

Smith PA, Graham LN, Mackintosh AF, Stoker JB, Mary DA. Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. Am J Hypertens 2004;17:217-22.

Smith SC Jr, Blair SN, Criqui MH, Fletcher GF, Fuster V, Gersh BJ, et al. The Secondary Prevention Panel: prevention heart attack and death in patients with coronary disease. J Am Coll Cardiol 1995;26:292-4.

Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Rev Bras Hipertens 2006;13(4):260-312.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. [citado 22 Fev 2010]. Disponível em: http://ww2.prefeitura.sp.gov.br//arquivos/secretarias/saude/programas/

Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-Analysis: APOlipoprotein E Genotypes and Risk for Coronary Heart Disease. Annals of Internal Medicine 2004;141:137-147.

Spotila LD, Jacques PF, Berger PB, Ballman KV, Ellison RC, Rozen R. Age dependence of the influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype on plasma homocysteine level. Am J Epidemiol 2003;158:871–877.

Stamler J, Vaccaro O, Neaton JK, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality form men Srcreened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). Diabetes Care 1993;16:434-444.

Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. JAMA 1992;268:877-881.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenecity. NEJM 1989;320:915-989.

Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW, Hojbjerg Gravholt C. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91:3897-3902.

Stratakis CA, Rennert OM. Turner Syndrome – An Update. The Endocrinologist 2005;15:27-36.

Stratakis CA, Rennert OM. Turner Syndrome: molecular and cytogenetics, dysmorphology, endocrine, and other clinical manifestations and their management. The Endocrinologist. 1994;4:442-453.

Swerdlow AJ, Hermon C, Jacobs PA, Alberman E, Beral V, Daker M, Fordyce A, Youings S. Mortality and cancer incidence in persons with numerical sex chromosome abonormalities: a cohort study. Ann Hum Genet 2001;65:177-188.

Sybert V. Cardiovascular malformations and complications in Turner syndrome. Pediatrics 1998; 101:1-7.

Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. N Engl J Med 2004;351:1227-1238.

The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatmente and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. N Eng J Med 2005;353:2643-2653.

The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. JAMA 2003;289(19):2560-2572.

Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng ZJ, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff DC Jr, Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie P, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation 2006;113(6):e85-151.

Tsai MY, Welge BG, Hanson NQ, Bignell MK, Vessey J, Schwichtenberg K, Yang F, Bullemer FE, Rasmussen R, Graham KJ. Genetic causes of mild hyper-homocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. Atherosclerosis 1999;143:163-170.

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 1982;60:344-351.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2006. Acesso em Outubro/2009. Link http://itpack31.itarget.com.br/uploads/sbh/arquivos/14.pdf.

Van Champenhout J, Rasio E. Carbohydrate tolerance in gonadal dysgenesis. Am J Obstet Gynecol 1979;135:863-875.

Van der Put NMJ, Gabreels F; Stevens EM, Smeitink JÁ, Trijbels FJ, Eskes TK, Van Den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene: An additional risk for neural-tube defects? Am J Hum Genet 1998;62:1044-1051.

Van Pareren YK, de Muinck Keizer-Schrama SM, Stijnen T, Sas TC, Drop SL. Effect of discontinuation of long-term growth hormone treatment on carbohydrate metabolism and risk factors for cardiovascular disease in girls with Turner syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(12):5442-5448.

Van PL, Bakalov VK, Bondy CA. Monosomy for the X-chromosome is associated with an atherogenic lipid profile. J Clin Endocrinol Metab 2006;91(8):2867-2870.

Vand den Brandhoj WE. The relation between plasma cysteine, plasma homocysteine and coronary atherosclerosis. Atherosclerosis 2001; 157: 403-409.

Völkl TM, Degenhardt K, Koch A, Simm D, Dörr HG, Singer H. Cardiovascular anomalies in children and young adults with Ulrich-Turner syndrome the Erlangen experience. Clin Cardiol 2005;28:88-92.

Wachtell K, Papademetriou V, Smith G, Gerdts E, Dahlöf B, Engblom E, Aurigemma GP, Bella JN, Ibsen H, Rokkedal J, Devereux RB. Relation of impaired left ventricular filling to systolic midwall mechanics in hypertensive patients with normal left ventricular systolic chamber function: The Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension (LIFE) study. Am Heart J. 2004; 148: 538-44.

Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcionogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. Cancer Res 1992;52:2071s-2077s.

Wardell MR, Suckling PA, Janus ED. Genetic variation in human APOlipoprotein E. Journal of Lipid Research 1982;23:1174-1182.

Weise M, James D, Leitner CH, Hartmann KKP, Böhles HJ, Attanasio A, and the German Lilly UTS Study Group. Glucose metabolismin Ullrich-Turner syndrome: long-term effects of therapy with human growth hormone. Horm Res 1993;39:36-41.

Whang DH, Park H, Roh EY, Park MH. TAP1 e TAP2 gene polymorphism and HLA-TAP haplotypes in Koreans based on 90 familes. Hum Immunol 2005;66:998-1007.

Wilson DM, Frane JW, Sherman B, Johanson AJ, Hintz R, Rosenfeld RG, and the Genetech Turner´s Collaborative Group. Carbohydrate and lipid metabolism inTurner syndrome: Effect of therapy with growth hormone, oxandrolone, and a combination of both. J Pediatr 1988;112:210-217.

Wilson PWF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. APOlipoprotein E Alleles, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease: The Framingham Offspring Study. JAMA 1994;272(21):1666-1671.

Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. APOlipoprotein E Alleles and Risk of Coronary Disease: A Meta-analysis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 1996;16:1250-1255.

Wojda A, Kołowska J, Łącka K, et al. Sex chromosome aberrations and mosaicism in Turner syndrome – studies with FISH. Ginekol Pol 1997;68:56‑65.

Wolfgang H, Obeid R, Jouma M. Hyperhomocysteinemia and vitamin B-12 deficiency mor striking in Syrians than in Germans – causes and implications. Atherosclerosis 2003;166:143-150.

World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva, World Health Organization, 1999;59p.

Yang Z, Venardos K, Jones E, Morris BJ, Chin-Dusting J, Kaye DM. Identification of a novel polymorphism in the 3'UTR of the L-arginine transporter gene SLC7A1: contribution to hypertension and endothelial dysfunction. Circulation 2007;115(10):1269-1274.

Yoo JH, Park JE, Hong KP, Lee SH, Kim DK, Lee WR, Park SC. Moderate hypermocysteinemia is associated with the presence o coronary artery disease and the serverity of coronary atherosclerosis in Koreans. Throm Res 1999; 94:45-52.

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet. 2004;364:937-52.

Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. Am J Hum Genet 1981;33:11-24.

Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. Proposed nomenclature of APOE isoproteins, APOE genotypes, and phenotypes. Journal of Lipid Research 1982;23:911-914.

Zhang SL, Chabod J, Penfornis A, Reviron D, Tiberghien P, Wendling D, Toussirot E. TAP1 and TAP2 gene polymorphism in rheumatoid arthritis in a population in castern France. Eur J Immunogenet 2002; 29:241-249.

9. Anexos

9.1 Aprovação comitê de ética em pesquisa (CEP)

UNIFESP PAULISTA

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 20 de março de 2008
CEP 2052/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) KELLY CRISTINA DE OLIVEIRA
Co-Investigadores: Bianca Alves vieira Bianco, Mônica Vannucci Nunes Lipay, Alexis Dourado Guedes, Eduardo Kinio Sugawara, Luciane Ribeiro Neto, Ieda Therezinha do Nascimento Verreschi (orientadora)
Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Análise dos polimorfismos dos genes MTHFR, TAP1, Apo E e ENPP1 em mulheres portadoras da sindrome de turner e sua interação como fatores de risco para doença cardiovascular".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo caso controle.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.
OBJETIVOS: Avaliar os polimorfismos do gene MTHFR, TAP1, Apo E e ENPP1 em mulheres portadoras de Síndrome de Turner (ST) e no grupo controle. Dosar os níveis séricos de homocisteína por HPLC e correlacioná-lo aos polimorfismos do gene MTHFR. Estabelecer a origem parental do cromossomo X nas mulheres com ST. Correlacionar os achados como fatores de risco para o desenvolvimento de DVC..
RESUMO: Participarão do estudo 100 pacientes com ST, com confirmação por cariótipo, provenientes do ambulatório de Gônadas e Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP. Haverá um grupo controle constituido por 100 mulheres sadias, da comunidade, sem história prévia de DCV. Na admissão , serão colhidos dados de história clínica em protocolo padronizado e realizado exame físico completo. Serão colhidas amostras de sangue para dosagem de homocisteína por HPLC. A análise do DNA genômico será realizada no laboratório de genética do Departamento de Morfologia da UNIFESP, analisando-se os genes MTHFR, TAP1, ApoE e ENPP1 por reação em cadeia da polimerase. Para avaliação da origem parental do cromossomo X, além do sangue colhido das pacientes serão também colhidas amostras dos respectivos pais, para extração de DNA marcadores de microssatélite: DXS987, DXS1001, DXS1047, DXS1214, DXS1060, DXS1226 e DXS8091..
FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudos epidemiológicos demonstraram uma redução de até 13 anos na expectativa de vida das portadoras de ST sendo a principal causa de mortalidade, a doença cardio vascular. Os indivíduos portadores da síndrome apresentam um fenótipo extremamente variável e as razões para essa variabilidade fenotípica não estão totalmente claras. Este estudo visa avaliar os polimorfismos de genes relacionados com alguns fatores de risco para doença cardiovascular, em mulheres portadoras de ST e grupo controle.
MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados, com participação interdisciplinar.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

TCLE: apresentado adequadamente para as duas populações que serão estudadas.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **20/3/2009** e **20/3/2010**.

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

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. 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.

Atenciosamente,

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

CEP 2052/07

9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de consentimento livre e esclarecido

ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *MTHFR*, *TAP1*, *Apo E* e *ENPP1* EM MULHERES PORTADORAS DA SÍNDROME DE TURNER E SUA INTERAÇÃO COMO FATORES DE RISCO PARA DOENÇA CARDIOVASCULAR

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesse estudo.

Serão estudadas mulheres portadoras da Síndrome de Turner procurando identificar fatores genéticos de risco para doenças cardiovasculares. O material genético obtido será analisado em sangue periférico.

Para o estudo serão coletadas amostras de 5 mL de sangue periférico, por punção venosa da veia do antebraço. Será utilizado material estéril e descartável. Para tal procedimento não é necessário jejum. Os desconfortos decorrentes da punção podem ser dor e vermelhidão local, porém esse procedimento não apresenta complicações na clínica diária.

A qualquer etapa do estudo o indíviduo ou seu responsável terá acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para o esclarecimento de dúvidas. Os principais investigadores são Kelly Cristina de Oliveira, MS Bianca Bianco e Profa. Dra. Ieda Verreschi, da Disciplina de Endocrinologia - Departamento de Medicina da UNIFESP/EPM, rua Pedro de Toledo, nº 781, 13º andar, telefone 11 5574- 6502 e Profa. Dra Mônica Lipay,da Disciplina de Genética – Departamento de Morfologia da UNIFESP/EPM, rua Botucatu, nº 740, telefone 11 5576- 4260. Se houver alguma consideração a fazer ou dúvida sobre a ética dessa pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), rua Botucatu, nº 572, 1º andar, cj 14 – telefone 11 5571- 1062, FAX 11 5539- 7162.

Fui informado também que esse estudo não prejudica de modo algum o meu tratamento, e que é garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento que eu queira deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do meu tratamento na Instituição,

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum indivíduo. Os resultados obtidos estarão a disposição de todos os participantes das pesquisa.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Na eventualidade de ocorrer qualquer dano pessoal causado direta ou indiretamente pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado),

o participante terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido/a a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim.

Eu,_____discuti com _____ sobre a minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confiabilidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar se necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____ Data __/__/____.

Assinatura do participante/ representante legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou seu representante legal para participação neste estudo.

_____ Data __/__/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Termo de consentimento livre e esclarecido

ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *MTHFR*, *TAP1*, *Apo E* e *ENPP1* EM MULHERES PORTADORAS DA SÍNDROME DE TURNER E SUA INTERAÇÃO COMO FATORES DE RISCO PARA DOENÇA CARDIOVASCULAR

Grupo Controle

As seguintes informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesse estudo.

Serão estudadas mulheres portadoras da Síndrome de Turner, procurando identificar fatores genéticos de risco para doenças cardiovasculares. Para tanto é necessária a comparação com um grupo de pessoas saudáveis (grupo controle) sem história prévia de doença cardiovascular. O material genético obtido será analisado em sangue periférico.

Para o estudo serão coletadas amostras de 5 mL de sangue periférico, por punção venosa da veia do antebraço. Será utilizado material estéril e descartável. Para tal procedimento não é necessário jejum. Os desconfortos decorrentes da punção podem ser dor e vermelhidão local, porém esse procedimento não apresenta complicações na clínica diária.

A qualquer etapa do estudo o indíviduo ou seu responsável terá acesso aos profissionais relacionados com a pesquisa para o esclarecimento de dúvidas. Os principais investigadores são **Kelly Cristina de Oliveira**, **MS Bianca Bianco** e **Profa. Dra. Ieda Verreschi**, da Disciplina de Endocrinologia - Departamento de Medicina da UNIFESP/EPM, rua Pedro de Toledo, nº 781, 13º andar, telefone 11 5574- 6502 e **Profa. Dra Mônica Lipay**,da Disciplina de Genética – Departamento de Morfologia da UNIFESP/EPM, rua Botucatu, nº 740, telefone 11 5576- 4260. Se houver alguma consideração a fazer ou dúvida sobre a ética dessa pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), rua Botucatu, nº 572, 1º andar, cj 14 – telefone 11 5571- 1062, FAX 11 5539- 7162.

Fui informado também é garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento que eu queira deixar de participar do estudo.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros indivíduos participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum indivíduo. Os resultados obtidos estarão a disposição de todos os participantes das pesquisa.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Na eventualidade de ocorrer qualquer dano pessoal causado direta ou indiretamente pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado),

o participante terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido/a a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim.

Eu,_____discuti com _____ sobre a minha decisão de participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confiabilidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar se necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____ Data __/__/____.

Assinatura do participante/ representante legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou seu representante legal para participação neste estudo.

_____ Data __/__/____

Assinatura do responsável pelo estudo

9.3 Poster apresentado no 55º Congresso Brasileiro de Genética

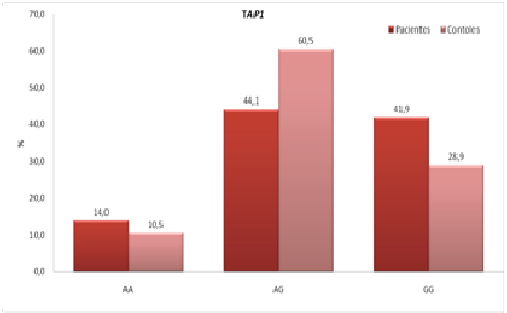
ESTUDOS FATORES DE RISCO PARA DOENÇA CARDIOVASCULAR EM MULHERES PORTADORAS DE SÍNDROME DE TURNER

Kelly Cristina de Oliveira[1], Bianca Bianco[1], Alexis D Guedes[1], Bianca Borsato Galera[2], Marcial Francis Galera[2], Monica Lipay[1], Ieda T N Verreschi[1]

[1] Disciplina de Endocrinologia – Departamento de Medicina - Universidade Federal de São Paulo
[2] Unidade de Biologia Molecular – Hospital Geral Universitário - Universidade de Cuiabá

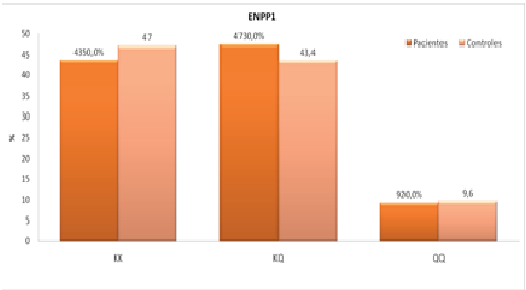
INTRODUÇÃO: Estudos epidemiológicos demonstraram uma redução de até 13 anos na expectativa de vida de portadora de Síndrome de Turner (ST), em relação às mulheres normais, sendo a principal causa de mortalidade a doença cardiovascular (DCV). Fatores de risco para DCV, como hipertensão arterial sistêmica e alterações no metabolismo glicídico, tem sido detectados com maior freqüência em portadoras desta síndrome. Acredita-se que o polimorfismo A637G do gene *TAP1* (*transporter 1, ATP-binding cassette*), tem importante papel na disfunção endotelial aumentando a susceptibilidade à doença hipertensiva. Este polimorfismo causa uma mudança do aminoácido Ácido Áspartico (GAC) para Glicina (GGC), o que pode ser importante nas alterações funcionais desse gene. Um dos candidatos a causa da resistência insulínica é o gene *ENPP1 (ectoenzyme nucleotide pyrophosphate phosphodiesterase 1)*, inibidor da ativação do receptor de insulina, que apresenta um polimorfismo no codon A121C, responsável pela troca de um aminoácio lisina por um glutamina. Estudos recentes demonstram associação entre este polimorfismo ao risco de diabetes e obesidade. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar a freqüência dos polimorfismos A637G do gene *TAP1* e A121C do gene *ENPP1* em mulheres portadoras de ST em comparação a um grupo controle livre de doenças, tais como, hipertensão, diabetes e obesidade

MATERIAIS E MÉTODOS: As pacients estudas são provenientes do Ambulatório de Gônadas e Desenvolvimento da UNIFESP/EPM e do Ambulatório de Genética Médica da Unidade de Biologia Molecular do Hospital Geral da Universidade de Cuiabá, e o grupo controle é composto por indivíduos saudáveis sem história familiar de DCV, da comunidade. Para avaliação do polimorfismo A121C no gene *ENPP1* foram estudas até o momento, 131 pacientes e 83 indivíduos controles. Com relação ao polimorfismo A637G foram estudadas 136 pacientes e 76 controls. Os polimorfismos em questão foram identificados por PCR-RFLP. Os resultados foram analisados pelo teste X^2 e o nível de significância considerado foi $p<0.05$.



População	N	Genótipo *TAP1*			p	Alelos		p
		AA (%)	AG (%)	GG (%)		A (%)	G (%)	
Síndrome de Turner	136	19 (14.0)	60 (44.0)	57 (42.0)	0.3714	98 (36.0)	174 (64.0)	0.3886
Controles	76	8 (10.5)	46 (60.5)	22 (29.0)		62 (40.8)	90 (59.2)	

População	N	Genótipo *ENPP1*			p	Alelos		p
		AA (%)	AC (%)	CC(%)		A (%)	C (%)	
Síndrome de Turner	131	57 (43.5)	62 (47.3)	12 (9.2)	0.8529	176 (67.2)	86 (32.8)	0.8294
Controles	83	39 (47.0)	36 (43.4)	8 (9.6)		114 (68.7)	52 (31.3)	



CONCLUSÃO: Na amostra avaliada os polimorfismos A121C do gene *ENPP1* e A637G no gene *TAP1*, aparentemente, não contribuem como fatores de risco para o desenvolvimento da doença cardiovascular na Síndrome de Turner, uma vez que as frequências dos diferentes genótipos não difere significativamente entre os grupos estudados.

APOIO FAPESP (Processo No.2008/03597-0)

9.4 Poster apresentado no 43º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica

Aplicação da cromatografia a líquido em fase reversa para a determinação de Coenzima Q10

Kelly C. Oliveira1; Eduardo K. Sugawara1; Luciane M.R. Neto1,2; Ieda T.N. Verreschi1

1 - Laboratório de Esteróides -Disciplina de Endocrinologia - Departamento de Medicina – UNIFESP
2- Curso de Farmácia - Centro Universitário São Camilo

Objetivo

Estudos precedentes indicam que a determinação de coenzima Q10 (CoQ10) é de extrema importância para o diagnóstico de doenças, tais como: ataxia cerebelar familial, miopatia pura e encefalomiopatia1. A CoQ10 atua na transferência de elétrons na cadeia respiratória oxidativa das mitocôndrias, tendo como principal função a produção de adenosina trifosfato (ATP) 2. Visando rapidez e confiabilidade na determinação de CoQ10 propõem-se metodologia analítica empregando cromatografia líquido em fase reversa (RP-HPLC).

Casuística e Métodos

Amostras analisadas

Utilizou-se plasma proveniente de controle higidos, coletado em tubo com EDTA por punção venosa periférica, centrifugado e armazenado à -20oC. Foi analisado também amostra de paciente, sexo feminino, admitida em nosso serviço em 1998 por puberdade precoce, suspeita de apresentar deficiência de CoQ10. A paciente apresenta retardo mental, estrabismo, deformidades esqueléticas e clitorimegalia. Os exames neurológicos sugerem degeneração espinocerebelar. Tais achados como ataxia cerebelar, hipogadismo e deficiência da CoQ10 são compatíveis com a Síndrome de Gordon Holmes3.

RP-HPLC

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido (Hewlett Packard®), coluna Nucleosil 100® C18 (125x4mm, 5µm), mantida à 35 C, e fase móvel metanol-hexano (85:15: v/v) a 1.0 mL/min. A detecção deu-se em 276 nm.

Preparação das amostras

Adicionou-se 2,0 mL de metanol a 1,0 ml de plasma, que foram extraídos com 1,0 mL de hexano. Após centrifugação a 2.196 g/10 min/4 C, os extratos foram evaporados sob N_2. Os resíduos foram ressuspendidos com 250 µL de fase móvel e destes, 40 µL foram analisados por RP-HPLC.

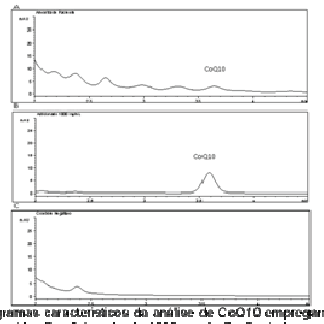


Figura 1. Cromatogramas característicos da análise de CoQ10 empregando-se RP-HPLC. A: amostra desconhecida B: adicionado de 1000ng/mL. C: Controle negativo

Validação analítica

A validação analítica foi realizada conforme rege ANVISA RE 899/034. A linearidade foi verificada na faixa de concentração de 100 à 1000 ng/mL e a precisão foi demonstrada através do coeficiente de variação médio (CV%). A exatidão do método foi verificada por análise de amostras de concentração conhecida.

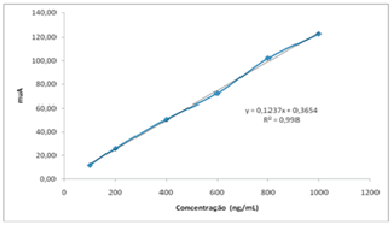


Figura 2 Representação gráfica da linearidade do método por RP-HPLC

Resultados e conclusões

O presente método mostrou-se rápido e eficiente na determinação da CoQ10 plasmática. Os resultados demonstram cromatogramas livres de interferentes, demonstrando a especificidade do método proposto (Figura 1). Obteve-se linearidade na faixa de 100 à 1000 ng/mL (R2=0,998) (Figura 2). O limite de detecção e de quantificação foram respectivamente 50 e 100 ng/mL. O CV% intraensaio médio foi inferior a 5% e o CV% interensaio médio foi menor que 10% (Tabela 1). A recuperação de extração foi de 84%. A exatidão na faixa de concentração estudada foi de 86,5 a 103,7%. A amostra mostrou-se estável durante três ciclos de congelamento e descongelamento. O método foi aplicado em amostras de indivíduos higidos mostrando-se compatível com os valores de referência (400 – 2300 ng/mL)5, cujo os valores oscilaram entre 412 e 535 ng/mL. O resultado abaixo do valor de referência (300ng/mL) encontrado para a paciente avaliada sugere deficiência CoQ10. O método mostrou-se seguro dentro das exigências para um ensaio clínico, assim como, aplicável para avaliação da deficiência da CoQ10.

Tabela 1. Resultados da validação analítica obtidos nos estudos de precisão e exatidão.

CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	PRECISÃO (CV %) INTRAENSAIO (n=5)	PRECISÃO (CV %) INTERENSAIO (n=15)	EXATIDÃO (%)
100	3,85	9,89	91,8
200	2,28	ND	103,7
400	4,08	8,94	102,1
600	2,83	ND	86,5
800	3,09	ND	102,8
1000	2,68	9,40	99,0

Referências bibliográficas

1 C.M. Quinzii et al. / Mitochondrion 7S (2007) S122–S126
2 Kumar, A., et al., Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. Pharmacology & Therapeutics (2009)
3 Holmes G.A. A form familial degeneration of the cerebellum. Brain. 1907;30:466-489
3 http://www.anvisa.gov.br/legislacao/resol/2003/re/899_03re.htm. Consultado em 10/02/2009.
4 http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/print.php?unit_code=87853. Consultado em 20/03/2009.

9.5 Poster apresentado no ENDO 2010: The 92nd Annual Meeting & Expo

GENE POLYMORPHYSMS OF *ENPP1* AND *MTHFR* AS RISK FACTORS TO CARDIOVASCULAR DISEASE IN TURNER SYNDROME PATIENTS

Kelly Cristina de Oliveira[1], Bianca Bianco, PhD[1], Alexis D Guedes, MD, PhD[1], Bianca Borsato Galera, PhD[1], Marcial Francis Galera, MD, PhD[2], Ieda T X Verreschi, MD, PhD[1], Monica V X Lipay, PhD[1,3]

1 Division of Endocrinology – Department of Medicine – Federal University of São Paulo/SP, Brazil
2 Division of Molecular Biology – General Hospital - Cuiabá University, Cuiabá/MT, Brazil
3 Genetics Division – Medicine College – Jundiaí/SP, Brazil
corresponding author: *malipay@uol.com.br

#P1-517

BACKGROUND: Epidemiological studies had revealed a decrease on life expectance of until 13 years of Turner syndrome (TS) patients related to normal women. The main death cause is cardiovascular diseases (CVD), which are a common, multifactorial disorder likely to be influenced by multiple genes of modest effect. Risk factors to CVD, as systemic arterial hypertension and glicidic metabolism abnormalities have a higher frequency on TS carriers. The A121C variant of the ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1 (*ENPP1*) gene is associated with obesity, insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular morbidity in various ethnic populations.

Abnormal folate/homocysteine metabolism due to polymorphisms in genes involved in this pathway, including the two most commonly occurring variants, C677T and A1298C, in the MTHFR gene, has been implicated as an etiologic factor in CVD. In a previous study, our group had observed that the *MTHFR* gene polymorphism C1298C, that reduces the enzyme efficiency, was more frequent in TS patients, suggesting its involvement in chromosomal imbalances (Oliveira et al., Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009; 53:115). Considering the association between these gene polymorphisms with CVD, therefore, we hypothesized that they might also be associated with these conditions on TS patients.

***IN VITRO* STUDIES:** A hundred and twenty-five TS patients and 294 unrelated healthy controls, with no familiar history of CVD were evaluated for *ENPP1* A121C gene polymorphism and also for C677T and A1298C, in the *MTHFR* gene. Genotypes were assessed by PCR-RFLP and qPCR.

ENPP1 frequency of genotypes (AA, AC, CC) and C677T polymorphism (*MTHFR*) in patients

	ENPP1				*MTHFR*				*MTHFR* 1298			
	AA	AC	CC	p	CC	CT	TT	p	AA	AC	CC	p
	[illegible]	[illegible]			[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	
TS patients	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.0083	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0.000
	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	
Controls	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]		[illegible]	
	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	

[illegible]

RESULTS: The frequencies of AA, AC and CC genotypes of the *ENPP1* polymorphism in TS patients were 43%, 47% and 10% (p=0.5655), and 44%, 43% and 13% in control group. Regarding the *MTHFR* C677T polymorphism, the frequencies of genotypes CC, CT and TT in TS patients were 50%, 42% and 8% (p=0.0083) and 56%, 30% and 14% in control group. Considering the *MTHFR* A1298C, the frequencies of genotypes AA, AC and CC in TS patients were 44%, 38% and 18% (p=<.0001) and 65%, 30% and 5% in control group.

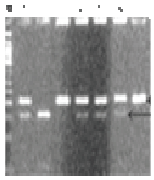
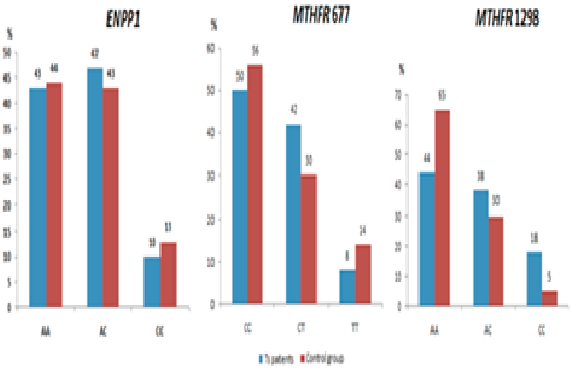


Figure 1 PCR amplification product from *ENPP1* gene, A121C polymorphism, analised by RFLP, after AccII digestion M – lenght fragment DNA marker (50 pb), lanes 1, 4, 5 and 6 AC genotype samples, lane 2 CC genotype sample and lanes 3 and 7 AA genotype.



CONCLUSION: No significant associations were observed for the *ENPP1* polymorphisms on TS patients which could reflect a specific risk of occurrence. However, both the *MTHFR* gene polymorphism at position 1298 and 677, was more frequent in the group of TS patients. The findings of the present study support the hypothesis that the polymorphisms in *MTHFR* gene are associated with the genetic susceptibility for CVD in patients with TS.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors wish to thank FAPESP (Grants No. 2008 03597-0 and 2009 05250-0).

9.6 Artigos submetido para publicação

Dear Kelly Oliveira,

This message confirms receipt of the manuscript titled "FREQUENCY OF TAP1 A637G, ENPP1 A121C POLYMORPHISMS AND APOE ISOFORMS IN TURNER SYNDROME AND ITS RELATIONSHIP AS RISK FACTORS FOR CARDIOVASCULAR DISEASE" by the Disease Markers.

Another e-mail will be sent to you when the manuscript is accessioned by the editorial office. This message will include the manuscript's tracking number and information about accessing its history and current status report.

FREQUENCY OF *TAP1* A637G, *ENPP1* A121C POLYMORPHISMS AND *APOE* ISOFORMS IN TURNER SYNDROME AND ITS RELATIONSHIP AS RISK FACTORS FOR CARDIOVASCULAR DISEASE

***TAP1* A637G, *ENPP1* A121C POLYMORPHISMS AND *APOE* ISOFORMS AS RISK FACTORS FOR CARDIOVASCULAR DISEASE IN TURNER SYNDROME**

Kelly C Oliveira, Bianca Bianco, Ieda T N Verreschi, Alexis D Guedes,

Monica VN Lipay*

** Corresponding author*

Mônica Vannucci Nunes Lipay

Disciplina de Endocrinologia

Rua Pedro de Toledo, 781 - 13º Andar

04039-032 - São Paulo/SP

Tel/Fax: +55 11 5574-6502

E-mail: malipay@uol.com.br

ABSTRACT

Background: Epidemiological studies showed a reduction of up to 13 years in life expectancy of Turner Syndrome (TS) patients compared to normal women, being the main cause of cardiovascular disease (CVD) mortality. Hypertension (SAH) diabetes mellitus (DM) and dislipidemy are important risk factors for CVD that are highly prevalent in this syndrome. *TAP1*, *ENPP1* and *APOE* genes are associated with cardiovascular risk for being involved in the pathogenesis of hypertension, DM and hypercholesterolemia, respectively. The aim of this study was to analyze the frequency of polymorphism of these genes in TS patients. **Methods:** Seventy eight TS patients and 372 healthy individuals with no personal and familial history of CVD were assessed for polymorphisms of genes *TAP1* and *ENPP1* by Restriction fragment length polymorphism (RFLP). Isoforms of *APOE* gene were genotyped by qPCR. **Results:** Analysis of AA, GG and AG genotypes frequencies of A637G *TAP1* polymorphism in TS patients were, respectively, 7.7%, 52.6% and 39.7%, while the control group presented 11.0%, 55.0% and 34.0% (p=0.4584). The frequency of genotypes for *ENPP1* A121C polymorphism in the ST patients were: AA 42,3,0%, AC 48.7% and CC 9.0% and 45.0%, 42.0% and 12.0% in controls (p=0.5169). The frequency of genotypes of *APOE* gene in TS patients and controls were, respectively: E3E3 68.3% and 61.5%, E2E3 6.3% and 12,4%, E3E4 24.1% and 22,6%, E2E2 0% and 1.0%, E4E4 0% and 1.3% and E2E4 1.3% and 1.1%, (p=0,864). **Conclusion:** There were no correlations between the frequencies of *TAP1*, *ENPP1* and *APOE* polymorphisms and CVD risk in women with TS.

Keywords: Turner syndrome, *TAP1*, *ENPP1*, *APOE* and cardiovascular disease.

1. Introduction

Turner Syndrome (TS) is characterized by complete or partial monosomy of the sex chromosome in some or all cells, affecting approximately 1/2.500 births [1]). Epidemiological studies show a reduction of up to 13 years in life expectancy of TS patients compared to normal women. The main cause of mortality is cardiovascular disease (CVD) [2]. Malformations in the cardiovascular system of these patients are frequent and well described, 17-56% versus 2% of the general population [3], as well as metabolic abnormalities involved in the pathogenesis of CVD, such as hypertension (SHA), diabetes mellitus (DM), dyslipidemia and obesity [4].

When comparing the incidence of some diseases among TS women to the general population, Baena et al [4] observed a significantly elevated relative risk for DM1 (RR11, 6), DM2 (RR 4.4) and ischemic heart disease atherosclerosis (RR 2.1), besides hypertension (RR 2.9) and stroke (RR 2.7), among other pathologies.

The introduction of polymorphisms studies associated with risk factors for common diseases in adulthood can provide information that may be useful in diagnosis, prevention and understanding of these disorders. *TAP1, APOE* and *ENPP1* genes have been associated with hypertension, dyslipidemy and diabetes in different populations, such as hereditary determinants of increased risk for these diseases.

Thus, the objectives of the study were to establish the frequencies of *TAP1, ENPP1* and *APOE* polymorphisms in Turner syndrome patients and to correlate them to risk factors for CVD present in these patients.

2. Materials and Methods

2.1 Patients

Seventy eight TS patients from Endocrinology Outpatient Clinic of Federal University of São Paulo were studied in a prospective and unbiased approach based on diagnostic criteria that

included clinical, hormonal, and cytogenetic analysis. The control group was composed of 372 healthy subjects without personal and family history of CVD from the community.

Clinical data and peripheral blood samples were collected only after disclosure of the objectives of the study and signed informed consent from the participants, as approved by the local ethics committee.

We had collected general information of the patients such as age, weight, exams data and refereed use of antihypertensive medications, hypoglycemic agents or insulin and antilipemic drugs and time of GHr using.

2.2 Methods

2.2.1 Karyotype

Karyotypes were determined by standard analysis of peripheral blood lymphocytes, and the number of metaphases analyzed by G banding followed Hook [5] criteria for detecting 8% mosaicism in 40 metaphases, with a confidence interval of 95%. TS patient's karyotypes were distributed as shown in Table 1.

2.2.2 DNA extraction

Peripheral blood was collected for genomic DNA extraction according to the protocol developed by Lahiri and Numberger [6], with modifications.

2.2.3 Genotyping

Genotyping for *TAP1* A637G (rs135216) and *ENPP1* A121C (rs1044498) polymorphisms was carried out using the technique of analysis of restriction fragment polymorphism (RFLP), according to Shen et al [7] and Pizzuti et al [8] protocols (Fig. 1 and Fig. 2). Detection of the *APOE* isoforms (rs7412/rs429358) was made by TaqMan real-time PCR, using the Rotor-Gene Q 6 plex Platform (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Commercially available Taqman primers and probes for *APOE* isoform (Applied Biosystems®) were used (C_308479_30/C_904973_10). Assays were performed with Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems), with 50ng of DNA per reaction. PCR conditions were as recommended

by the manufacturer: initial denaturation at 95°C (15 min), followed by 40 denaturation cycles at 95°C (15 sec), and a final annealing/extension cycle at 60°C (1 min).

2.3 Statistical analysis

The chi-square test was used to compare allele and genotype frequencies between groups and to estimate the Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical tests of significance and $\chi 2$ analysis were carried out using SPSS for Windows 11.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). All p-values were two-tailed, and 95% confidence intervals (CIs) were calculated. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

The mean, standard deviation and median of clinical and laboratory datas obtained from TS patients studied are in Table 2. Six patients (7.5%) were in use of antihypertensive drugs and/or diuretics, three (3.8%) of insulin and /or hypoglycemic inductors and two (2.5%) were in use of anti-lipidic drugs.

The results of genotyping for A637G *TAP1*, A121C *ENPP1* polymorphisms and isoforms of the *APOE* gene are shown in Table 3.

Analysis of AA, GG and AG genotypes frequencies of A637G *TAP1* polymorphism in TS patients were, respectively, 7.7%, 52.6% and 39.7%, while the control group presented 11.0%, 55.0% and 34.0%, p=0.4584. Considering the *ENPP1* A121C polymorphism, the frequency of genotypes in the ST patients were: AA 42,3,0%, AC 48.7% and CC 9.0% and 45.0%, 42.0% and 12.0% in controls, p=0.5169. Regarding the frequency of genotypes of *APOE* gene in TS patients and controls were, respectively: E3E3 68.3% and 61.5%, E2E3 6.3% and 12,4%, E3E4 24.1% and 22,6%, E2E2 0% and 1.0%, E4E4 0% and 1.3% and E2E4 1.3% and 1.1%, p=0,864.

4. Discussion

Many risk factors for CVD are known, such as hypertension, DM, obesity, dyslipidemy, smoking and, more recently, hyperhomocysteinemy. An appropriate approach of these factors concerning their relation to population distribution and genetic mechanisms may contribute to a decrease in the incidence and progression of CVD in women with TS.

Considering the diseases described as risk factors for CVD, hypertension is of great importance, and TS patients have a ranging of prevalence between 20% and 50% [3,9] that could be associated as a major risk factor for aortic root dilatation, stroke and ischemic myocardial disease in these patients [1,10]. In this study, we observed a prevalence of hypertension abnormalities according to that described in the literature (26.9%), considering blood pressure values and the use of antihypertensive drugs, despite the young age of our patients.

The elucidation of genetic features that are causing hypertension is of great importance for the treatment and prevention of this disease. However, this is hindered by the polygenic and multifactorial nature of these mechanisms. In recent years many genes have been identified as contributors to this pathological process, among them the *TAP1* (transporter-associated antigen processing), located at 6p21.3 [11]. The A637G polymorphism of this gene has been associated with an increase of endothelial dysfunction and consequent increased risk for hypertension [12]. Shen et al [7] studied 277 hypertensive patients and 227 Korean controls and found a frequency of allele G of 25.6% and 17.6% respectively ($p = 0.002$), whereas individuals carrying the GG genotype have 2.9 times more likely to develop hypertension.

In a study conducted in Brazil with individuals of ethnic group Guarani (n=93), Kaingangs (n=241) and Caucasians (n=93) [13], the G allele frequency observed for ethnic group Guarani (62%) was substantially different from other published studies, with values ranging between 12.7% and 24.2% [7,13-15]. The authors justify this disparity as a reflection of the neutrality of this polymorphism in populations. In the present study, we can verify a frequency of the polymorphic allele G (66.0%) similar to that observed for ethnic group Guarani [13]. These findings reflect a possible difference in the distribution of polymorphic G allele in

the population of the Southeast and Midwest regions of Brazil, the target of current research. Thus, there was no significant change in allele frequency in TS patients compared to controls (p=0.4584). Besides the high prevalence of hypertension, changes in carbohydrate metabolism such as glucose intolerance and T2 DM, have been described with increased frequency in TS (15-43%) [16]. This study detected a low frequency of diseases associated with glucose metabolism (1.4%), which can be explained by the fact that patients are young (mean age 25,0±10,5 years), as insulin resistance has often been associated with adultwood in women, obesity that are submitted to estrogen replacement [17].

Many genes are involved in glucose metabolism. Associated with the occurrence of diabetes and insulin resistance, the gene *ENPP1* (Ectonucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1), located on chromosome 6 (6q22-q23), is a locus previously linked to obesity and diabetes [18]. The A121C polymorphism in exon 4, promotes the exchange of a lysine by a glutamic acid and the 121Q variant (risk allele) binds to insulin receptor tyrosine kinase with greater affinity compared to its wild allele 121K, resulting in lower autophosphorylation of the receptor [8] and, consequently, increased risk for diabetes and obesity [19].

There are conflicting data in the literature about the association of this polymorphism with glucidic disorders in different populations. Some studies demonstrated a positive association in whites and diabetics in the United States [19] and Finland [20], but the same was not observed in diabetic Danes [21] and Americans or Poles [22]. In the present study we did not observed a higher frequency of allele C and/or AC and CC genotypes in women with TS.

Some studies have noted the importance of determining the lipid profile in individuals with ST [23] since changes in this profile are strongly associated with atherosclerosis and CVD. The risk of cardiovascular events increases progressively with increasing levels of LDL-C and inversely related to HDL-C [24]. In our sample we observed subtle changes in lipid levels, but

not related to obesity, hyperglycemia and hypertension, diseases that could explain those findings.

Elucidating the genetic mechanisms of dyslypidemy is extremely important for prevention of CVD. Some studies have observed positive association between *APOE* gene polymorphisms and atherosclerosis [25]. This gene is located on chromosome 19 (19q13.2) [26] and possess three polymorphic alleles (ε2, ε3 e ε4) that encode three isoforms of Apo E: E2, E3 and E4, differing among themselves for the content of cysteine and arginine in positions of codons 112 and 158 of exon 4 [27] and that differ in receptor binding affinity in LDL-C [25].

ApoE3 and E4 isoforms exhibit high affinity receptor binding of LDL-C, as ApoE4 was associated with declining longevity, increased plasma levels of LDL-C and TC and increased prevalence of CVD and Alzheimer's disease. Already APOE2 shows less than 2% of normal affinity and it is generally associated with low levels of LDL-C and TC, conferring a protective effect [25]. In the present approach, we were unable to detect significant differences in prevalence prevalence of the E2 and E4 isoforms in TS patients studied compared to controls. There is not a panel of informative polymorphic variants that can be applied unreservedly to different populations or individuals with a certain condition karyotype, such as TS, this is due both to the exuberance of risk factors and to the large number of genes involved.

In conclusion, there were no correlations between the frequencies of *TAP1*, *ENPP1* and *APOE* polymorphisms and CVD risk in women with TS. Thus, further studies are needed to investigate possible gene interactions and to define the risk of CVD in these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank FAPESP (2008/03597-0).

CONFLICT OF INTEREST: The authors disclosed no conflict of interest.

5. References

[1] K. Stochholm, S. Juul, K. Juel, R.W. Naeraa, C.H. Gravholt, Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner, *J Clin Endocrinol Metab* 91 (2006), 3897-3902.

[2] C.H. Gravholt, S. Juul, R.W. Naeraa, J. Hansen J, Morbidity in Turner syndrome, *J Clin Epidemiol* 51 (1998), 147-158.

[3] K. Landin-Wilhelmsen, I. Bryman, L. Wilhelmsen, Cardiac malformations and hypertension, but not metabolic risk factors, are common in Turner syndrome, *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001), 4166-4170.

[4] N. Baena, C. Vigan, E. Cariati, et al, Turner syndrome: Evaluation of prenatal diagnosis in 19 European registries, *Am J Med Genet* 129A (2004), 16-20.

[5] E.B Hook, Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use, *Am J Hum Genet* 29 (1977), 94-97.

[6] D.K. Lahiri, J.L. Nurnberger , A rapid non-enzimatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res* 19 (1991), 5444.

[7] C. Shen, Z. Guo, M. Wu, X. Hu, G. Yang, R. Yu, H. Shen, Y. Xu, C. Yao, Association study between hypertension and A/G polymorphism at codon 637 of the transporter associated with antigen processing 1 gene, *Hypertension Res* 30 (2007), 683-690.

[8] A. Pizzuti, L. Frittitta, A. Argiolas, R. Baratta, I.D. Goldfine, M. Bozzali, T. Ercolino, G. Scarlato, L. Iacoviello, R. Vigneri, V. Tassi, V. Trischitta, A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance, *Diabetes* 48 (1999), 1881–1884.

[9] C.H. Gravholt, K.W. Hansen, M. Erlandsen, E. Ebbehøj, J.S. Christiansen, Nocturnal hypertension an impaired sympathovagal tone in Turner syndrome, *J Hypertens* 24 (2006), 353-360.

[10] C.H. Gravholt, Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome, *Arq Bras Endocrinol Metab* 49 (2005), 145-156.

[11] M.Y. Gao, A.H. Wu, C.X. Wen, D.X. She, S.Q. Chen, Investigating the correlation between polymorphisms with couple sharing rate of TAP gene and hypertensive disorder complicating pregnancy, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 23 (2006), 165-168.

[12] U. Ritz, I. Drexler, D. Sutter, R. Abele, C. Huber, B. Seliger, Impaired transporter associated with antigen processing (TAP) function attributable to a single amino acid alteration in the peptide TAP subunit *TAP1*, *J Immunol* 170 (2003), 941-946.

[13] F.R. Faucz, C.M. Probst, M.L. Petzl-Erler, Polymorphism of LMP2, *TAP1*, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity, *Eur J Immunogenet* 27 (2000), 5-16.

[14] K.S. Barron, J.D. Reveille, M. Carrington M, et al, Susceptibility to Reiter´s syndrome is associated with alleles of TAP genes, *Arthritis Rhum* 38 (1995), 684-689.

[15] H.J. Lee, S.J. Ha, H. Han, J.W. Kim, Distribuition of HLA-A, B alleles and polymorphism of TAP and LMP genes in Korean patients with atopic dermatitis, *Clin Exp Allergy* 31 (2001), 1867-1874.

[16] G. Haeusler, H. Frisch, Growth hormone treatment in Turner's syndrome: short and long-term effects on metabolic parameters, *Clin Endocrinol* 36 (1992), 247-253.

[17] S. Caprio, S. Boulware, M. Diamond, R.S. Sherwin, T.O. Carpenter, K. Rubin, S. Amiel, M. Press, W.V. Tamborlane, Insulin resistance: an early metabolic defect of Turner´s syndrome, *J Clin Endocrinol Metab* 72 (1991), 832-836.

[18] R. Arya, J. Blangero, K. Williams, L. Almasy, T.D. Dyer, R.J. Leach, P. O'Connell, M.P Stern, R. Duggirala, Factors of insulin resistance syndrome--related phenotypes are linked to genetic locations on chromosomes 6 and 7 in nondiabetic mexican-americans, *Diabetes* 51 (2002), 841-847.

[19] N. Abate, M. Chandalia, P, Satija, B, Adams-Huet, S.M. Grundy, S. Sandeep, V. Radha, R. Deepa, V. Mohan, ENPP1/PC-1 K121Q polymorphism and genetic susceptibility to type 2 diabetes, *Diabetes* 54 (2005), 1207-1213.

[20] A. Kubaszek, A. Markkanen, J.G. Eriksson, T. Forsen, C. Osmond, D.J.P. Barker, M. Laaksol, The association of the K121Q polymorphism of the plasma cell glycoprotein-1 gene with type 2 diabetes and hypertension depends on size at birth, *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004), 2044–2047.

[21] N. Grarup, S.A. Urhammer, J. Ek, A. Albrechtsen, C. Glümer, K. Borch-Johnsen, T. Jørgensen, T. Hansen, O. Pedersen, Studies of the relationship between the *ENPP1* K121Q polymorphism and type 2 diabetes, insulin resistance and obesity in 7, 333 Danish white subjects, *Diabetologia* 49 (2006), 2097–2104.

[22] H.N. Lyon, J.C. Florez, T. Bersaglieri, R. Saxena, W. Winckler, P. Almgren, U. Lindblad, T. Tuomi, D. Gaudet, X. Zhu, R. Cooper, K.G. Ardlie, M.J. Daly, D. Altshuler, L. Groop, J.N. Hirschhorn, Common variants in the *ENPP1* gene are not reproducibly associated with diabetes or obesity, *Diabetes* 55 (2006), 3180–3184.

[23] M. Cooley, V. Bakalov, C.A. Bondy, Lipid profiles in women with 45,X vs 46,XX primary ovarian failure, *JAMA* 290 (2003), 2127-2128.

[24] W.P. Castelli, R,J. Garrison, P.W.F. Wilson, R.D. Abbot, S. Kalousdian, W.N. Kannel, Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Heart Study, *JAMA* 256 (1986), 2835-2838.

[25] R.W. Mahley, S.C. Rall Jr, APOlipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. Annual Rev, *Genomics Hum Genet* 1 (2000), 507-537.

[26] Y.K. Paik, D.J. Chang, C.A. Reardon, G.E. Davies, R.W. Mahley, J.M. Taylor, Nucleotide sequence and structure of the human APOlipoprotein E gene, *Proc Natl Acad Sci* 82 (1985), 3445-3449.

[27] G. Utermann, A. Steinmetz, W. Weber, Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of One- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis, *Hum Genet* 60 (1982), 344-351.

Table 1. Turner syndrome patients karyotype distribution.

Karyotype	Number of studied patients
45,X	53
45,X/46,X,i(X)(q10)	2
46,X,i(X)(q10)	5
45,X/46,X,+mar	2
45,X/46,XX	4
45,X/47,XXX	1
45,X/46,XX/47,XXX	1
45,X/45,X,add(15)(p11)	1
45,X/46,X, idic (X) (p11)	1
45,X/46,XX, p+	1
45,X/46,X,r(X)	1
45,X/46,X,r(?)	1
45,X/46,X, dup(X)(q25-q21)	1
46,X, idic,X(q25)	1
46,X,der(X)(p11.2)	1
45,X/46,XY	1
45,X/46,XX addX(p22)	1
TOTAL	**78**

Table 2 – Clinical and laboratorial features of the 78 Turner Syndrome Patients evaluated.

	Media ± SD	**Median**
Age (years)	25,0±10,5	23,8
SBP (mm/Hg)	113,8±13,9	111,3
DBP (mm/Hg)	74,5±13,7	76,3
Total Colesterol (mg/dL)	169,4±30,3	169,5
HDL-C (mg/dL)	53,8±15,0	52,0
LDL-C (mg/dL)	97,4±22,3	94,0
Triglycerides (mg/dL)	81,7±39,6	72,0
Fasting blood glucose(mg/dL)	83,5±9,5	84,5

SBP e DBP: Systolic Blood Pressure and Diastolic Blood Pressure, respectively; HDL-C: high density lipoprotein; LDL-C: low density lipoprotein.

Table 3. Distribution of genotypes and allelic frequencies of polymorphisms A637G of *TAP1* gene, A121C of *ENPP1* gene and isoforms of *APOE* gene in patients with ST and in a control group.

		Turner syndrome patients (n = 78)	Controls (n = 372)	p	OR (95%IC)
TAP1					
Genotypes				0.4584	
	AA (%)	6 (7,7)	42 (11,0)		
	AG (%)	41 (52,6)	205 (55,0)		
	GG (%)	31 (39,7)	125 (34,0)		1,23 (0,86 – 1,77)
Alleles				0.2943	
	A (%)	53 (34,0)	289 (39,0)		
	G (%)	103 (66,0)	455 (61,0)		
ENPP1					
Genotypes				0.5169	
	AA (%)	33 (42,3)	168 (45,0)		
	AC (%)	38 (48,7)	158 (42,0)		
	CC (%)	7 (9,0)	46 (12,0)		0,99 (0,69 – 1,42)
Alleles				1.0	
	A (%)	104 (66,7)	494 (66,0)		
	C (%)	52 (33,3)	250 (34,0)		
APOE					
Genotypes					
	E3E3 (%)	54 (68,3)	229 (61,5)	0,864	
	E2E3 (%)	5 (6,3)	46 (12,4)		
	E3E4 (%)	19 (24,1)	84 (22,6)		
	E2E2 (%)	0	4 (1,1)		
	E4E4 (%)	0	5 (1,3)		
	E2E4 (%)	1 (1,3)	4 (1,1)		
Alleles				0,062	0,74 (0,47 – 1,47)
	E3 (%)	132 (83,5)	588 (79,0)		
	E2 (%)	6 (3,8)	58 (7,8)		
	E4 (%)	20 (12,7)	98 (13,2)		

Significant values p<0,05

Caption of Fig. 1

M – lenght fragment marker 50 bp,; Lane 1 AA genotype; lanes 2, 3 and 4, GG genotype and lane 5 AG genotype.

Caption of Fig. 2

M – lenght fragment marker 50 bp,; Lanes 1, 4, 5 e 6 AC genotype; lane 2 CC genotype and lanes 3 and 7, AA genotype.

Fig. 1. PCR amplification product corresponding to A637G polymorphism of *TAP1* gene, after digestion with XmiI for RFLP analysis.

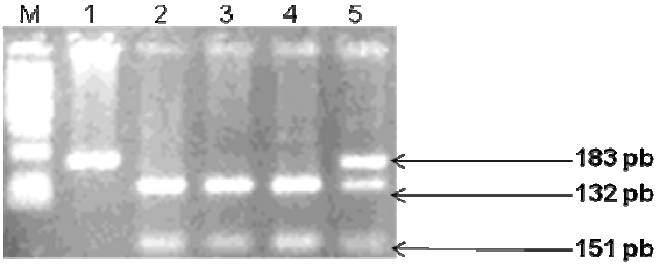
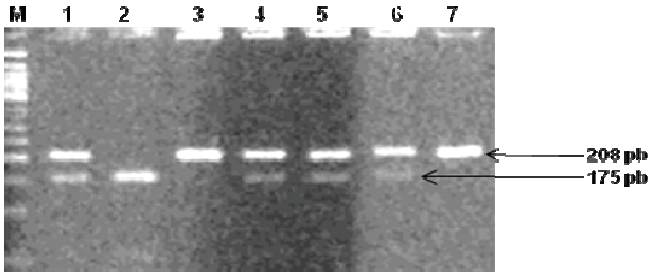


Fig. 2. PCR amplification product corresponding to A121C polymorphism of *ENPP1* gene, after digestion with AvaII for RFLP analysis.



9.7 Artigos publicados

Prevalence of the Polymorphism *MTHFR* A1298C and not *MTHFR* C677T Is Related to Chromosomal Aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome Patients

perspectives

Kelly Cristina de Oliveira
Bianca Bianco
Ieda T. N. Verreschi
Alexis Dourado Guedes
Bianca Borsato Galera
Marcial Francis Galera
Caio P. Barbosa
Monica Vannucci Nunes Lipay

Endocrinology Division – Department of Medicine (KCO, BB, ITNV, ADG, MVNL); Genetics Division - Department of Morphology and Genetics – Federal University of São Paulo – Unifesp (MVNL), São Paulo, SP, Brazil; Medical Genetics and Molecular Biology Unit of the General Hospital from University of Cuiabá (UNIC) (BBG, MFG), Cuiabá, MT, Brazil; Genetics Division of Medicine College from ABC (CPB), São Paulo, SP, Brazil.

copyright© ABE&M todos os direitos reservados

Received in 25/8/2008
Accepted in 20/9/2008

ABSTRACT

Background: Dysfunctions in the folate metabolism can result in DNA hypomethylation and abnormal chromosome segregation. Two common polymorphisms of this enzyme (C677T and A1298C) reduce its activity, but when associated with aneuploidy studies the results are conflicting. The objective of the present study is to analyze the *MTHFR* gene polymorphisms in women with Turner Syndrome and in a control group, correlating the findings to the chromosomal aneuploidy. **Methods**: The study comprised 140 patients with Turner Syndrome, of which 36 with chromosome mosaicism and 104 non-mosaics, and a control group of 209 fertile and healthy women without a history of any offspring with aneuploidy. Polymorphisms C677T and A1298C were studied by RFLP-PCR and the results were statistically analyzed. **Results**: The frequency of genotypes *MTHFR* 677CC, 677CT and 677TT in the patients with Turner Syndrome and chromosome mosaicism was, respectively, 58.3%, 38.9% and 2.8%. Among the patients with non-mosaic Turner Syndrome, 47.1% presented genotype 677CC, 45.2% genotype 677CT, and 7.7% genotype 677TT. Among the 209 individuals of the control group, genotypes 677CC, 677CT and 677TT were found at the following frequencies: 48.3%, 42.1% and 9.6%, respectively. As for polymorphism A1298C, the patients with Turner Syndrome and chromosome mosaicism presented genotypes 1298AA, 1298AC and 1298CC at the following frequencies: 58.3%, 27.8% and 13.9%, respectively. Among the non-mosaic Turner Syndrome patients, genotype 1298AA was found in 36.5%, genotype 1298AC in 39.4%, and genotype 1298CC in 22.1%. In the control group, genotypes 1298AA, 1298AC and 1298CC were present at the following frequencies: 52.6%, 40.7% and 6.7%, respectively. **Conclusion**: No correlation was observed between the *MTHFR* gene polymorphism 677 and chromosomal aneuploidy in the Turner Syndrome patients. However, the *MTHFR* gene polymorphism at position 1298, mainly genotype 1298CC that reduces the enzyme efficiency, was more frequent in the group of Turner Syndrome patients, suggesting its involvement in mechanisms related to chromosomal imbalances. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8:1374-1381)**

Keywords: Turner syndrome; *MTHFR* gene; Polymorphism; Aneuploidy; Chromosomal imbalance

RESUMO

A Prevalência do Polimorfismo A1298C e não do C677T do Gene MTHFR está Relacionada à Ocorrência de Aneuploidias Cromossômicas em Mulheres Brasileiras Portadoras da Síndrome de Turner.

Introdução: Disfunções no metabolismo dos folatos podem resultar em hipometilação do DNA e na segregação cromossômica anormal. Dois polimorfismos comuns no gene *MTHFR* (C677T e A1298C) reduzem a atividade da enzima e, quando associados a estudos de aneuploidias apresentam resultados conflitantes. O objetivo do presente estudo foi a análise dos polimorfismos do gene *MTHFR* em mulheres portadoras da síndrome de Turner

International Journal of Gynecological Pathology
28:197–202, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore
© 2009 International Society of Gynecological Pathologists

Original Article

SRY Gene Increases the Risk of Developing Gonadoblastoma and/or Nontumoral Gonadal Lesions in Turner Syndrome

Bianca Bianco, M.Sc., Mônica Lipay, Ph.D., Alexis Guedes, M.D., M.Sc., Kelly Oliveira, B.Sc., and Ieda T. N. Verreschi, M.D., Ph.D.

Summary: The presence of Y-chromosome material in patients with dysgenetic gonads increases the risk of gonadal tumors and/or nontumoral androgen-producing lesions. The patients' prognosis can vary, depending on their karyotype. The objective of this study was to investigate the presence of Y-chromosome mosaicism in Turner syndrome patients and its association with the development of gonadal tumors and/or nontumoral androgen-producing lesions. Eighty-seven Turner syndrome patients were studied. Genomic DNA was extracted from peripheral blood and genes *SRY* and *TSPY* and *DYZ3* repeat of the Y chromosome were amplified by polymerase chain reaction. To the Y-positive patients, prophylactic gonadectomy was offered. The data disclosed hidden Y-chromosome mosaicism in 16 (18.5%) of the patients. *SRY* sequence was detected in all of the 16 patients, and 4 (4.6%) of them presented *DYZ3* repeat region and *TSPY* gene. Eleven of the patients with Y-positive sequences agreed to undergo the prophylactic surgery. In 2 cases, bilateral gonadoblastoma was found and, in another case, the histopathologic study of the gonads revealed hilus cell hyperplasia. In a further case, there were hilus cell hyperplasia and a stromal luteoma. In conclusion, a systematic search for hidden Y-chromosome mosaicism, especially *SRY*, in Turner syndrome patients is justified by the possibility of preventing gonadal lesions. **Key Words:** Turner syndrome—Y-chromosome mosaicism—Gonadoblastoma—Nontumoral gonadal lesions—*SRY* gene.

The presence of Y-chromosome material in patients with dysgenetic gonads increases the risk of gonadal tumors, especially gonadoblastoma (1). The patients' prognosis can vary, depending on their karyotype. A major concern regards the high risk of these patients of developing gonadoblastoma or other tumors and virilization in puberty, if Y-specific chromosome sequences are present (2).

From the Division of Endocrinology, Department of Medicine (B.B., A.G., K.O., I.T.N.V.) ; and Division of Genetics, Department of Morphology and Genetics (M.L.), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.
Supported by FAPESP (2007/01241-0) and CAPES.
Address correspondence and reprint requests to Ieda T. N. Verreschi, MD, PhD, Laboratório de Esteróides, Rua Pedro de Toledo, 781, 13° andar, CEP: 04039-032, Vila Clementino, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: ieda.verreschi@unifesp.br.

Previous studies have found frequencies of hidden Y-chromosome material ranging between 0% and 60%. Several factors may have contributed to this difference, such as patient selection criteria, number of metaphases analyzed in the cytogenetic study, sample size, methodology, and the Y-chromosome sequence markers used (2–10). The most frequently used Y sequences are *SRY* (sex-determining region on the Y chromosome) (3–10) and *DYZ3* (3,4,7,9,10). Which Y-chromosome markers are relevant in this kind of study is still a controversial issue.

In general, the *SRY* gene sequences are used as reference, in view of their localization and their important role in the signaling cascade of sex-determining events (11). This gene is the most investigated one, and its detection is almost unanimously considered of major importance in studies on

DOI: 10.1097/PGP.0b013e318186a825

OCT4 gonadal gene expression related to the presence of Y-chromosome sequences in Turner syndrome

To show that in the dysgenetic gonads of 104 Turner syndrome patients no significant difference was found regarding the expression of the genes *DAX1*, *FOG2*, *GATA4*, *OCT4*, *SF1*, *SRY*, *TSPY*, *WT1*, and *STRA8* compared with controls, except for genes *OCT4*, *SRY*, and *TSPY* in both gonads of a patient whose chromosomal constitution was 45,X/45,X,add(15)(p11). The expression analysis of genes *OCT4*, *SRY*, and *TSPY* in the dysgenetic gonads of Turner syndrome patients may allow introducing modifications in the microenvironment that could contributed to a malignant transformation process. (Fertil Steril® 2010; ■:■–■. ©2010 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Turner syndrome, gonadal dysgenesis, *OCT4* gene, *SRY* gene, *TSPY* gene, Y-chromosome

The presence of Y-chromosome material in patients with dysgenetic gonads increases the risk of gonadal tumors, especially gonadoblastoma (1–3). In 1987, Page (4) hypothesized that there is a *locus*, termed *GBY* (gonadoblastoma on the Y chromosome), which predisposes the dysgenetic gonads to developing such in situ tumors. Studies have been suggested that the testis-specific protein Y encoded (*TSPY*) repeated gene is the putative region for this oncogenic *locus* (4–6), and could potentially be involved in other human cancers, including brain tumors, hepatocellular carcinoma, and melanoma (6). Hildenbrand et al. (7) studied a patient with TS and a 45,X/46,X,+mar karyotype who developed unilateral gonadoblastoma. Cytogenetic and molecular studies confirmed that the marker was derived from a Y chromosome. The authors investigated the gonadal material by immunohistochemistry for the expression of the *TSPY* gene, and the results revealed a high level of TSPY protein expression.

However, one of the Y sequences most frequently used in Turner syndrome (TS) patients screening is the *SRY* gene, because of its localization and its important role in the signaling cascade of sex determining events (3).

Furthermore, the *OCT4* (*POU5F1*) gene, located at 6p21.31, is expressed in pluripotent stem cells and germ cells of mice and humans (8). An extensive immunohistochemical screening for POU5F1 protein expression was performed in several types of germ cell tumors using microarrays that were only detected in gonadoblastoma, seminoma, dysgerminoma, and embryonic carcinoma cells (8, 9).

Thus, the aim of the present study was to screen 104 TS patients for Y-chromosome-specific sequences (*SRY* and *TSPY*) and their association with *SRY*, *TSPY*, *SF1*, *WT1*, *DAX1*, *OCT4*, *GATA4*, *FOG2*, and *STRA8* gene expression in gonadal neoplastic process.

One hundred four TS patients (age ranging from 8 months to 55 years) from the Endocrinology Outpatient Clinic of Federal University of Sao Paulo, Brazil, were studied in a prospective and unbiased approach based on diagnostic criteria that included clinical, hormonal, and cytogenetic analysis. A hormone profile consistent with hypergonadotropic hypogonadism or an unexplained short stature in females led to a cytogenetic evaluation. The patients with overt Y-chromosome material were excluded, to maintain sample homogeneity.

Small gonad fragments were collected from five fertile women from the Family Planning Outpatient Clinic from the Faculdade de Medicina do ABC. These women had no alteration in sex determination and differentiation, and had been submitted to laparoscopy to salpingotripsy as a permanent contraception method.

The study protocol was approved by the local research ethics committee, and all subjects and/or their parents gave informed consent for the study.

The karyotypes of TS patients were determined by standard analysis of peripheral blood lymphocytes, and the number of metaphases analyzed by G banding followed Hook's criteria (10) for

Bianca Bianco, Ph.D.[a,b]
Kelly C. Oliveira, M.Sc.[a]
Alexis D. Guedes, M.D., Ph.D.[a]
Caio P. Barbosa, M.D., Ph.D.[b]
Monica V. N. Lipay, Ph.D.[a]
Iedda T. N. Verreschi, M.D., Ph.D.[a]
[a] *Division of Endocrinology, Department of Medicine, Federal University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil*
[b] *Division of Gynecological Pathology and Human Reproduction, Department of Gynecology and Obstetrics, ABC School of Medicine, Santo André, Brazil*

Received October 23, 2009; revised February 10, 2010; accepted February 16, 2010.
B.B. has nothing to disclose. K.C.O. has nothing to disclose. A.D.G. has nothing to disclose. C.P.B. has nothing to disclose. M.V.N.L. has nothing to disclose. I.T.N.V. has nothing to disclose.
Supported by FAPESP (Grant No. 2007/01241-0).
Reprint requests: Monica Vannucci Nunes Lipay, M.D., Ph.D., Rua Pedro de Toledo, 781, 13° andar, Vila Clementino, Sao Paulo/SP, Brasil, CEP: 04039-032 (FAX: 55 11 5574-8502; E-mail: mvlipay@uol.com.br).

Da cromatina sexual ao PCR em tempo real: citogenética e expressão gênica no estudo da síndrome de Turner

From sex chromatin to real time PCR: cytogenetic and gene expression in the study of Turner syndrome

Bianca Bianco[1], Monica V. N. Lipay[1], Alexis D. Guedes[1], Kelly C. Oliveira[1], Ieda T. N. Verreschi[1]

[1] Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo, SP, Brasil

Em 1930, o pediatra alemão Otto Ullrich relatou o caso de uma menina de 8 anos de idade que apresentava palato em ogiva, ptose palpebral, orelhas de implantação baixa, linfedema, baixa estatura, ausência de desenvolvimento de mamas, ausência ou quantidade mínima de pelos pubianos e axilares, cúbito valgo e pescoço alado. No entanto, a primeira visão equivalente à síndrome foi feita por Morgagni em 1761 (1).

Em 1938, Henry Turner (2) publicou a descrição de pacientes do sexo feminino que se caracterizavam por apresentar os mesmos sinais descritos por Otto Ullrich (1930). Quatro anos depois, Varney e cols. (3) e Albright e Smith (4), independentemente, demonstraram em pacientes com sinais clínicos semelhantes aos daqueles descritos por Turner que, após a idade puberal, apresentavam um elevado nível de gonadotrofinas urinárias, estabelecendo que se tratava de uma anormalidade da função gonadal e não uma deficiência hipotalâmica ou hipofisária. Em 1944, Wilkins e Fleischmann (5) observaram, em análises histológicas, que as pacientes com os sinais descritos por Turner (2), Varney e cols. (3) e Albright e Smith (4) deveriam ter gônadas em fita e que todos esses autores estavam estudando a mesma síndrome: a síndrome de Turner (ST).

A primeira investigação cromossômica dessa síndrome foi realizada na Escola Paulista de Medicina, hoje Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, em 1954 por Décourt e cols. (6) que demonstraram que os sinais fenotípicos característicos da ST eram decorrentes da ausência da cromatina sexual. Em 1959, Ford e cols. (7) descreveram a anormalidade cromossômica que caracterizava a síndrome de Turner: monossomia do cromossomo sexual X, o cariótipo 45,X.

Dados de literatura referem que um segundo cromossomo sexual é necessário à sobrevivência do feto e, desse modo, virtualmente todo nascido vivo 45,X apresentaria mais de uma linhagem celular compondo seu cariótipo, constituindo assim um mosaico. Essa condição seria necessária a pelo menos alguns órgãos, durante determinado período da embriogênese. Essa hipótese se baseia em dois pontos principais: a frequência de mosaicismo do cromossomo sexual é muito superior em nascidos vivos com ST em relação à observada em abortos; estima-se que aproximadamente 99% dos embriões puramente 45,X morrem no útero. Todavia, a seleção natural nem sempre prevalece quando o mosaicismo está presente, apesar de o resultado fenotípico ser semelhante (8).

A detecção de mosaicismo é determinada, principalmente, por quatro fatores: o tipo e o número de tecidos analisados, o número de células estudadas, a sensibi-

Correspondência para:
Ieda T. N. Verreschi
Rua Pedro de Toledo, 781, 13º andar
04039-032 – São Paulo, SP, Brasil
ieda.verreschi@unifesp.br

Recebido em 8/Mar/2010
Aceito em 17/Mar/2010

J Bras Patol Med Lab • v. 44 • n. 5 • p. 337-342 • outubro 2008

Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de cortisol sérico em substituição à técnica de radioimunoensaio

Primeira submissão em 04/01/08
Última submissão em 16/10/08
Aceito para publicação em 20/10/08
Publicado em 20/10/08

High-performance liquid chromatography application for serum cortisol quantification as a substitute for radioimmunoassay

Eduardo Kinio Sugawara[1]; Luciane Maria Ribeiro Neto[2]; Kelly Cristina de Oliveira[3]; Ieda Therezinha do Nascimento Verreschi[4]

unitermos

HPLC

Radioimunoensaio

Cortisol

Acetonido de triancinolona

Esteróides

resumo

Introdução: A determinação de cortisol nos diferentes fluídos orgânicos tem sido aplicada como auxílio diagnóstico em distintas condições nosológicas em humanos, bem como empregada em estudos envolvendo pesquisa clínica. No intervalo de aplicação clínica, rotineiramente é determinado pela técnica de radioimunoensaio (RIE). Na determinação do cortisol urinário livre essa técnica vem sendo substituída pelo emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), principalmente no diagnóstico da síndrome de Cushing. Já para a determinação do cortisol sérico não se têm evidências do emprego da cromatografia líquida em substituição a outras técnicas analíticas. **Objetivos:** O desenvolvimento de metodologia analítica empregando HPLC no modo fase reversa (RP-HPLC) para a determinação de cortisol sérico em substituição ao RIE visando à redução da geração de resíduos radioativos. **Material e métodos:** O cortisol foi quantificado diretamente empregando-se RP-HPLC em amostras de soro previamente extraídas com éter utilizando-se acetonido de triancinolona como padrão interno (PI). Utilizou-se coluna analítica BDS-Hypesil-C18® (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel composta de água e acetonitrila (72:28; v/v) a 1 ml/min e detecção a 243 nm. **Resultados:** O cortisol e o PI apresentaram tempo de retenção de 3,4 e 7,1 min, respectivamente. O coeficiente de variação (CV%) obtido no estudo da precisão foi menor que 10%, e a exatidão apresentou um desvio inferior a 4%. **Discussão:** O método mostrou-se eficaz e eficiente, com sensibilidade e linearidade na faixa estudada de 2,5 a 60 µg/dl. **Conclusão:** O método proposto substitui o RIE no intervalo de sua aplicação clínica.

abstract

Background: The quantification of cortisol in different organic fluids has not only been applied to different human nosological conditions as a diagnostic aid but it has also been used in clinical research. In clinical application, cortisol is routinely measured by radioimmunoassay (RIA). In the determination of free urinary cortisol this technique has been replaced by the high-performance liquid chromatography mainly in the diagnosis of Cushing syndrome. As to serum cortisol determination, there is no evidence of the application of liquid chromatography as a substitute for other analytical techniques. Objective: The development of an analytical methodology using reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) to determine serum cortisol levels as a substitute for RIA in order to reduce radioactive waste. Material and methods: Cortisol was directly quantified by RP-HPLC in previously ether-extracted serum samples. Triamcinolone acetonide was used as internal standard (IS). The chromatographic separation was developed in a BDS-Hypersil-C18® column (125 x 4 mm, 5µm) using water-acetonitrile (72:28; v/v) as mobile phase at 1 ml/min and steroid peaks were measured at 243 nm. Results: Cortisol and IS presented retention time of 3.4 and 7.1 min, respectively. The precision was less than 10% and accuracy was less than 4%. Discussion: The method was effective and efficient, with good sensitivity and linearity in the concentration range of 2.5 to 60.0 µg/dl. Conclusion: The present methodology substitutes RIA at clinical application.

key words

HPLC

Radioimmunoassay

Cortisol

Triamcinolone acetonide

Steroids

1. Farmacêutico-bioquímico; mestrando em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia do Departamento de Medicina da Escola Paulista e Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP).
2. Farmacêutica-bioquímica; pesquisadora convidada do Programa de Pós-Graduação do Laboratório de Esteróides do Departamento de Medicina da EPM/UNIFESP.
3. Graduanda em Farmácia; técnica de laboratório do Laboratório de Esteróides da disciplina de Endocrinologia do Departamento de Medicina da EPM/UNIFESP.
4. Professora associada; chefe do Laboratório de Esteróides da disciplina de Endocrinologia do Departamento de Medicina da EPM/UNIFESP.
Apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (nº 478243/2004-9)