

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

**FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE) E
FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM MULHERES COM E SEM CÂNCER
DE MAMA**

GABRIELA HERRMANN CIBEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. EMILIO MORIGUCHI

CO-ORIENTADORA: PROF. DR^a. PATRICIA ASHTON PROLLA

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

**FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE) E
FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM MULHERES COM E SEM CÂNCER
DE MAMA**

GABRIELA HERRMANN CIBEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. EMILIO MORIGUCHI

CO-ORIENTADORA: PROF. DR^a. PATRICIA ASHTON PROLLA

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde: Cardiologia e Ciências
Cardiovasculares da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul para obtenção
do título de Mestre.*

PORTO ALEGRE

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Cibeira, Gabriela Herrmann

Frequência de polimorfismos da Apolipoproteína E e fatores de risco cardiovascular em mulheres com e sem câncer de mama/ Gabriela Herrmann Cibeira; orient. Emilio Moriguchi – Porto Alegre, 2011.

Dissertação. (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências da Saúde, Ciências Cardiovasculares e Cardiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Moriguchi, Emilio

O presente trabalho foi resultado de um estudo colaborativo entre os Laboratórios de Medicina Genômica e Identificação Genética (Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e a Coorte de Rastreamento Mamográfico Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA), projeto esse resultado de uma parceria entre a Associação Hospitalar Moinhos de Vento, o Instituto da Mama do Rio Grande do Sul e a Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, do qual participam 9.218 mulheres provenientes de 21 unidades básicas de saúde de Porto Alegre. O estudo foi orientado pelo Prof. Dr Emilio Moriguchi e pela Prof.^a. Dr^a. Patrícia Ashton-Prolla. A parte experimental foi realizada nos Laboratórios de Medicina Genômica e Identificação Genética e a parte clínica realizada junto à equipe do NMPOA. O presente trabalho foi realizado com fomento recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Edital MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saúde nº. 06/2005, processo 400949/2005-9; *Susan G Komen for the Cure (population specific grant number POP0403033)* e Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE/HCPA (projeto número 08-070).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr Emilio Moriguchi, pela credibilidade, confiança e, acima de tudo, exigência. Agradeço pela prontidão em sempre me auxiliar quando necessário. Gostaria de ratificar a sua competência, participação com discussões, correções, revisões e sugestões que fizeram com que eu conduzisse este trabalho da melhor forma.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Patricia Ashton Prolla, por todo o empenho, sabedoria e compreensão.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde por toda a assistência e compreensão ao longo do curso.

À Sirlei Reis por todo o apoio durante esse trabalho.

A minha mãe, Izabel Herrmann, que sempre foi a base de tudo. Obrigada pela sua força, entusiasmo e otimismo contagiante durante todo o mestrado.

Ao meu irmão, Gabriel Herrmann Cibeira, pela amizade, parceria e pelos momentos de descontração oferecidos durante este processo.

A minha inigualável tia, Stella Cibeira, por todo o carinho e acolhimento dado sempre durante toda a minha trajetória. Agradeço pelo incentivo, confiança e oportunidade.

Ao meu pai, Eurico Terra Cibeira, por todas as palavras de motivação e encorajamento ditas durante a realização deste projeto.

Às pacientes participantes dessa pesquisa pela disponibilidade.

Aos meus amigos e parentes que estiveram do meu lado, dando-me suporte e divertimento nas horas mais tensas.

A minha grande amiga Ilane Gehrs pela amizade e por todos os conselhos dados durante a minha trajetória.

Aos meus avós pela imensa paciência e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela colaboração e estímulo na realização desta pesquisa.

À toda a equipe do Núcleo Mama Porto Alegre pelas inúmeras palavras de incentivo e pela prontidão em sempre me ajudarem.

À amiga e colega Giovana Skonieski pela amizade, apoio, ensinamentos e viabilização desta pesquisa.

À Dra. Maira Caleffi pelo seu conhecimento e apoio.

Ao Dr Luiz Mattia pelo auxílio dado na realização desse trabalho.

À Izolda Ribeiro e à Bernardete Weber por confiarem no meu trabalho e me auxiliarem na logística e organização desta pesquisa.

Às nutricionistas Fabiane Bastos e Emilia Mostardeiro pelo profissionalismo e parceria.

À Ernestina Aguiar pela sua incansável disponibilidade, prestatividade, apoio

nas análises laboratoriais e confecção da dissertação.

À Juliana Giacomazzi pela amizade e auxílio nas análises na fase final desta dissertação.

À Carolina Isoppo, Betina Ettrich e Dra Marcia Graudenz pelo apoio e auxílio nas coletas de dados desta pesquisa.

À estatística Suzi Comey pela dedicação e comprometimento.

À Silvana Schneider pelo apoio nas análises estatísticas e disponibilidade em sempre me auxiliar.

À Universidade Luterana do Brasil, em especial à Ana Paula Magalhães Leboutte, por todo o apoio nas análises moleculares.

A Deus por ter sempre me iluminado e me feito acreditar que eu era capaz.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	13
2.2 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA	14
2.2a Idade	14
2.2b Etnia	14
2.2c História Familiar de Câncer de Mama	14
2.3 FATORES DE RISCO REPRODUTIVOS E HORMONAIS PARA CÂNCER DE MAMA	14
2.3a Menarca e Menopausa	14
2.3b Gestação e Aleitamento	15
2.3c Hormônios Exógenos	15
2.4 FATORES DE RISCO DE ESTILO DE VIDA PARA CÂNCER DE MAMA	15
2.4a Etilismo	15
2.4b Tabagismo	16
2.4c Sedentarismo	16
2.5 FATORES DE RISCO DIETÉTICOS E NUTRICIONAIS PARA CÂNCER DE MAMA	16
2.5a Obesidade	16
2.5b Dieta	17
2.6 RASTREAMENTO DE CÂNCER DE MAMA	18
2.7 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES	20
2.8 DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM MULHERES	21
2.9 FATORES DE RISCO PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM MULHERES	21

2.9a Hipertensão Arterial Sistêmica	21
2.9b Diabete Mellitus	22
2.9c Tabagismo	23
2.9d Dislipidemia	23
2.9e Sedentarismo	23
2.9f Obesidade Abdominal e Dieta	23
2.9g Menopausa	24
2.10 APOLIPOPROTEÍNA E	24
2.10a Estrutura e Função	24
2.10b Apolipoproteína E e Polimorfismos do seu Gene	26
2.10c Polimorfismo da Apolipoproteína E, Aspectos Dietéticos e Doenças Cardiovasculares	27
2.10d Polimorfismo da Apolipoproteína E e o Câncer de Mama	28
3. JUSTIFICATIVA PARA O PROJETO	30
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo Geral	31
4.2 Objetivos Específicos	31
5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA E DOS ANEXOS	32
6. MANUSCRITO EM PORTUGUÊS	46
Resumo	48
Introdução	49
Materiais e Métodos	50
Resultados	52
Discussão	53
Referências	57
Tabelas	60
7. MANUSCRITO EM INGLÊS	65
Abstract	67

Introduction	68
Materials and Methods	69
Results	71
Discussion	72
References	75
Tables	78
8. ANEXOS	
Anexo I - Protocolos das Análises Moleculares	83
Anexo II - Figuras de Clivagem pela enzima de restrição <i>HhaI</i>	87
Anexo III - Carta de Aprovação do Projeto no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clinicas de Porto Alegre	88
Anexo IV - Carta de Aprovação do Projeto no Instituto de Educação de Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento	89
Anexo V - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	90
Anexo VI - Ficha de Levantamento de Dados do Núcleo Mama Porto Alegre	94
Anexo VII - Ficha de Anamnese do Núcleo Mama Porto Alegre	95
Anexo VIII - Questionário de padrão alimentar, consumo de álcool e de estilo de vida	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	-	Contraceptivo oral
apoE	-	Apolipoproteína E
APOE	-	Gene da Apolipoproteína E
CA	-	Circunferência Abdominal
CM	-	Câncer de mama
DAC	-	Doença Arterial Coronariana
DCNT	-	Doença Crônico Não Transmissível
DCV	-	Doenças cardiovasculares
DM	-	Diabete Mellitus
DP	-	Desvio Padrão
E2	-	E2/E2, E2/E3, E2/E4
E3	-	E3/E3
E4	-	E3/E4, E4/E4
HAS	-	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	-	Lipoproteína de alta densidade
<i>HHA1</i>	-	Enzima de Restrição
IC	-	Intervalo de Confiança
IDL	-	Lipoproteína de densidade intermediária
II	-	Intervalo Interquartil
IMC	-	Índice de massa corporal
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
LDL	-	Lipoproteína de baixa densidade
NMPOA	-	Núcleo Mama Porto Alegre
OR	-	<i>Odds ratio</i>
PCR	-	Reação de polimerização em cadeia
PSF	-	Programa da Saúde da Família
RR	-	Risco Relativo
RS	-	Estado do Rio Grande do Sul

- SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia
- TRH - Terapia de reposição hormonal
- TG - Triglicerídios
- VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é uma doença geneticamente heterogênea de alta incidência entre as mulheres. A Apolipoproteína E (apoE) é um marcador molecular bastante conhecido que modifica o risco de diversas doenças, incluindo as doenças cardiovasculares (DCV). O polimorfismo dessa lipoproteína pode modular o risco para câncer de mama, por meio da combinação de fatores biológicos e de estilo de vida, como dieta e obesidade. Esses fatores afetam tanto o risco individual para a neoplasia como podem influenciar a severidade do fenótipo, uma vez que o indivíduo tenha sido diagnosticado e/ou tratado para CM (Hartman *et al.* 2002; Niemi *et al.* 2000).

O estrógeno interage concomitantemente com os fatores da hiperinsulinemia na estimulação do crescimento do câncer de mama. Os níveis de estrógeno livre também aumentam em mulheres obesas, especialmente entre aquelas com obesidade abdominal e resistência à insulina (Stoll *et al.* 1999). Sendo assim, uma redução nos níveis de estrógeno e de insulina poderia não só modular, como também diminuir o risco de crescimento de tumores (Stoll *et al.* 1999; Miller *et al.* 2003). Além disso, a regulação do metabolismo lipídico por meio da modificação de fatores de estilo de vida, incluindo o exercício, também é uma ferramenta efetiva na prevenção para o CM (Li *et al.* 2003).

Devido ao fato de o rastreamento, a detecção e o diagnóstico precoce do CM serem fatores centrais para a sobrevivência de pacientes com a doença, a compreensão do papel da apoE no risco desta patologia poderia auxiliar os pesquisadores a identificar aqueles indivíduos que podem ter chances aumentadas de desenvolver CM e outros tipos de neoplasia (Butler *et al.* 2001; Hartman *et al.* 2002; Newman *et al.* 2003). Estratégias de prevenção do câncer devem ser enfatizadas e focadas nos fatores de risco modificáveis, mesmo que o papel da genotipagem da apoE no risco para o CM ainda seja ambíguo, na medida em que nem a presença nem a ausência do alelo e4 oferece um diagnóstico certo da suscetibilidade à doença mamária (Butler *et al.* 2001; Niemi *et al.* 2000). Dado que os resultados ainda são conflitantes e diversas pesquisas estão em andamento, devem ser conduzidos novos estudos que visem identificar o quanto a presença ou ausência do alelo e4 confere aumento de risco para a neoplasia mamária.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Cada vez mais, novos polimorfismos genéticos têm sido associados com a suscetibilidade a diversas doenças. A apoE, identificada no início da década de 1970, é uma proteína integrante das lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons, além dos produtos de degradação lipolítica, como remanescentes de quilomícrons e lipoproteína de densidade intermediária (IDL). Essa apolipoproteína tem sido extensivamente estudada principalmente por sua função no metabolismo dos lipídios e pelo seu envolvimento no transporte de colesterol em vários tecidos (Ashavaid *et al.* 2003). Evidências mostram que o polimorfismo da *APOE* parece modificar o risco para uma variedade de doenças, entre elas, as DCV (Daugherty *et al.* 2002) e o CM (Moore *et al.* 2000).

Entre as mulheres, o CM é considerado o tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo, sendo também a principal causa de morte por neoplasia (Parkin *et al.* 2005). Além disso, conforme dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2008), as DCV são a principal causa de morbimortalidade na população feminina em vários países, especialmente entre mulheres com idade superior a 50 anos, entre as quais o risco de morrer por DCV é seis vezes maior do que por CM (*American Cancer Society*, 2008).

2.1. Epidemiologia do Câncer de Mama

O CM é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama (*American Cancer Society*, 2008). Nos Estados Unidos, a neoplasia permanece como o câncer mais comumente diagnosticado, depois do câncer de pele (*American Cancer Society*, 2008). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o aumento da incidência pode ser atribuído, principalmente, ao atraso no diagnóstico e implementação de terapêutica adequada (Brasil, 2009).

Em 2010, o número de casos novos de CM esperados para a população feminina brasileira em 2010 era de 49.240 com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (Brasil, 2009). As maiores taxas de incidência e mortalidade por CM no país são observadas nos estados considerados economicamente mais desenvolvidos, em especial nas regiões Sul e Sudeste. Na Região Sudeste, o CM é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (64/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (30/100.000) (Brasil, 2009).

O estado do Rio Grande do Sul (RS), por motivos ainda desconhecidos, tem taxas de incidência e mortalidade da doença que figuram entre as maiores do país (81,57 casos da doença a cada 100 mil mulheres). Porto Alegre, capital do estado, apresenta índices alarmantes de incidência da neoplasia mamária. Foram previstos, para o ano de 2010, 127,71 casos a cada 100.000 mulheres, enquanto que a estimativa nacional foi de 49 novos casos a cada 100.000 mulheres (Brasil, 2009).

2.2. Fatores de Risco para Câncer de Mama

Estudos recentes demonstram que a urbanização da sociedade e as condições sociais e econômicas são fatores de risco para o CM (Fan *et al.* 2009; Torio *et al.* 2009). Além desses, existem outros fatores que favorecem o desenvolvimento da doença, conforme descritos abaixo:

2.2a. Idade

Aproximadamente 7% de todos os cânceres de mama são diagnosticados em mulheres com menos de 40 anos e menos de 4% em mulheres com idade inferior a 35 anos (Ries *et al.* 2002). A incidência de CM aumenta com a idade, podendo alcançar mais de 10 casos a cada 100.000 mulheres com faixa etária entre os 20 e 30 anos e mais de 200 casos a cada 100.000 mulheres com idade superior a 60 anos (Ries *et al.* 2002). Embora o CM não seja comum em mulheres jovens, é o câncer mais frequente entre aquelas com idade inferior a 40 anos, sendo responsável por entre 30 e 40% de toda a incidência de câncer feminino (Bottom *et al.* 2006; Marret *et al.* 2002). A doença é raramente encontrada em mulheres com menos de 25 anos e a média de idade ao diagnóstico é de 64. Porém, a correlação entre a idade e aumento da doença não é linear, pois tem sido observado um aumento da incidência de CM em mulheres jovens e uma diminuição durante e logo após a menopausa (*American Cancer Society*, 2008).

2.2b. Etnia

A incidência e mortalidade por CM variam consideravelmente entre diferentes grupos étnicos e raciais (Ghafoor *et al.* 2004). Essas taxas são maiores entre os caucasianos e afro-americanos, intermediárias entre hispânicos e ameríndios, e mais baixas entre os asiáticos (*American Cancer Society*, 2008). No Brasil, a miscigenação da população provavelmente influencie na incidência da doença (Hallal *et al.* 2001). Estudos sugerem que mulheres judias, especialmente aquelas com história familiar de primeiro grau de CM, apresentam quase quatro vezes mais chance de desenvolver a doença (Egan *et al.* 1996).

2.2c. História Familiar de Câncer de Mama

Mulheres com familiares de primeiro grau afetadas por CM apresentam, aproximadamente, o dobro do risco de desenvolver a doença, em comparação àquelas sem história familiar. Se houver dois ou mais familiares afetados, esse risco aumenta ainda mais. No entanto, em torno de 85% das mulheres com familiares de primeiro grau com CM não desenvolvem a doença, e mais de 85% das mulheres com CM não possuem história familiar (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 2001).

2.3. Fatores de Risco Reprodutivos e Hormonais

2.3a. Menarca e menopausa

A idade da menarca e da menopausa estão relacionadas com a chance de a mulher desenvolver o CM. Tanto a menarca precoce como a menopausa tardia aumentam o risco em duas vezes para CM, provavelmente devido à exposição prolongada do parênquima mamário aos efeitos fisiológicos de estrogênio (Pike *et al.* 1981). A menarca precoce e a menopausa tardia levam a um aumento no número total de ciclos menstruais durante a vida e correspondem entre 30 a 50% do aumento no

risco de CM. Mulheres que tiveram a menarca antes dos 11 anos de idade possuem um risco cerca de 20% maior de desenvolver CM ao longo da vida, em comparação com aquelas com mais de 14 anos (Pike *et al.* 1981). Entretanto, a menarca tardia e a menopausa precoce levam a uma redução no risco de CM da mesma magnitude. (Vogel *et al.* 2000)

2.3b. Gestação e Aleitamento

A incidência de CM entre mulheres com a primeira gestação antes dos 20 anos é bastante reduzida. Por outro lado, mulheres com nascimento do primeiro filho após os 30 anos de idade apresentam um risco duas vezes maior que aquelas cujo nascimento do primeiro filho ocorreu antes dos 18 anos de idade. Mulheres nulíparas apresentam risco igual àquelas com nascimento do primeiro filho entre os 25-29 anos de idade (Harris *et al.* 1996; Offit *et al.* 1996). Longos períodos de lactação reduzem o risco para CM. Uma metanálise evidenciou que a cada gestação e a cada ano de amamentação, o risco relativo para CM diminui em 7% e 4,3%, respectivamente. Além disso, o tempo de amamentação é importante, sendo que a redução do risco é proporcional ao aumento do tempo de amamentação (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001*).

2.3c. Hormônios Exógenos

Dois principais tipos de componentes hormonais exógenos têm sido avaliados em relação ao CM: contraceptivo oral (ACO) e terapia de reposição hormonal (TRH). Observa-se um pequeno aumento no RR associado com o ACO, especialmente, entre usuárias recentes e recorrentes. Estudos epidemiológicos que relacionaram o uso de ACO com o CM resultaram em conclusões similares (Brinton *et al.* 1996; *Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2001*). O uso frequente de ACO apresenta um pequeno aumento no RR para CM (RR= 1.24), mas esse risco desaparece após 10 anos de cessação no uso. Mulheres que iniciaram o uso de ACO antes dos 20 anos de idade apresentam um risco ainda maior de desenvolver CM (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001*).

O uso da TRH está associado a um modesto aumento de risco para CM. Mulheres que fizeram uso de TRH por 5 anos ou mais (RR = 1.35), apresentaram maior risco no desenvolvimento de CM após a menopausa. A cessação do uso de TRH em 5 anos ou mais, parece não aumentar significativamente o risco para CM (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001*).

2.4. Fatores de Risco de Estilo de Vida

2.4a. Etilismo

Diversos estudos epidemiológicos evidenciaram associação positiva entre o consumo de álcool e o risco para CM, tanto em mulheres pré quanto pós-menopáusicas (Singletary *et al.* 2001). Uma metanálise, envolvendo 38 estudos, avaliou essa relação e mostrou um risco relativo (RR) de 1.1 [Intervalo de Confiança (IC) de 95%: 1.1-1.2] para câncer de mama em mulheres que bebiam uma dose diária de álcool, 1.2 (IC 95%: 1.1-1.3) para aquelas que consumiam duas doses diárias, e 1.4 (IC 95%: 1.2-1.6) entre as que usavam três ou mais doses diárias (Longnecker *et al.* 1994). Outra metanálise, envolvendo 53 estudos (58.515 pacientes com CM),

evidenciou aumento de risco em 7.1% (IC 95%: 5.5-8.7) para cada aumento de 10g na ingestão diária de álcool (Hamajima *et al.* 2002).

Embora o mecanismo pelo qual o álcool pode causar CM não tenha sido completamente elucidado, existem algumas hipóteses que justificam essa relação. O álcool pode atuar indiretamente por meio do seu primeiro metabólito, o acetaldeído, um conhecido carcinógeno e mutagênico, e/ou pode ser um tumor promotor, levando a um aumento na ativação pró carcinogênica (Poschl *et al.* 2004). Outro mecanismo de particular interesse para o CM é o aumento significativo de níveis de estrógeno em mulheres pré e pós-menopáusicas, associado com o consumo de álcool (Coutelle *et al.* 2004; Ginsburg *et al.* 1995). Além disso, o álcool aumenta a exposição a andrógenos endógenos (Singletary *et al.* 2001).

2.4b. Tabagismo

Não foi demonstrada associação entre fumantes ativos e risco para CM (Collaborative Group on Hormonal Factors, 2001; Terry *et al.* 2002). Diversos estudos relataram um modesto aumento na incidência de CM associado à exposição passiva ao fumo (Hirayama 1984; Jee *et al.* 1999; Johnson *et al.* 2000; Kropp *et al.* 2002). Adicionalmente, uma metanálise baseada em 11 estudos encontrou um RR de 1.41 (IC 95%: 1.14-1.85) para fumantes passivos (Khuder *et al.* 2000). Outros estudos, porém, não encontraram associação (Nishino *et al.* 2001; Nordlund *et al.* 1997; Wartenberg *et al.* 2000).

2.4c. Sedentarismo

Diversos estudos epidemiológicos têm avaliado a relação entre a prática de atividade física com o risco de câncer. A maior parte deles mostra efeitos protetores, apesar de os resultados ainda serem contraditórios. Revisões publicadas em 2002 reforçaram o papel da atividade física na prevenção do CM (Berglund *et al.* 2002; Vainio *et al.* 2002;). Uma revisão sistemática, publicada em 2007 (Monninkhof *et al.* 2007), mostrou uma redução no risco relativo (< 0,8) associado com atividades de lazer em 5 de 14 estudos de coorte (Breslow *et al.* 2001; Cerhan *et al.* 1998; Patel *et al.* 2003; Wyshak *et al.* 2000), embora 8 não tenham evidenciado qualquer associação (Dirx *et al.* 2001; Colditz *et al.* 2003; Lee *et al.* 2001; Luoto *et al.* 2000; Moradi *et al.* 2002; Rockhill *et al.* 1999; Tehard *et al.* 2006).

2.5. Fatores de Risco Dietéticos e Nutricionais para o câncer de mama

2.5a. Obesidade

Comparado com outros fatores de risco para CM, como mutações no BRCA1 (RR = 2,00) ou diagnóstico de carcinoma *in situ* (RR = ~16), o risco para obesidade é menor (RR = 1,1 - 2,5) (Carpenter *et al.* 2003). Entretanto, há evidências sugerindo que mulheres obesas e com história familiar da doença apresentam maior risco de desenvolverem a neoplasia, quando comparadas à mulheres magras com história de câncer na família (Carpenter *et al.* 2003). O mecanismo fisiológico pelo qual esses dois fatores de risco interagem para promover a tumorigênese ainda não é entendido. No entanto, essa evidência indica que mulheres com história familiar de CM poderiam reduzir o risco de desenvolverem a doença se mantivessem o peso corporal dentro da normalidade (Lorincz *et al.* 2006).

A obesidade tem sido associada com o aumento no risco de CM, principalmente, em mulheres pós-menopáusicas (Vogel *et al.* 2000; Weitzen *et al.* 2006). Os achados mostraram que mulheres com sobrepeso ou obesidade apresentaram 30 a 50% mais risco de desenvolver CM após a menopausa, quando comparadas à mulheres com peso normal. Sugere-se que, para cada 5kg de peso adquirido, desde o menor peso na vida adulta, o risco de desenvolver CM aumente em 8.0%. (Lahman *et al.* 2005; Trentham-Dietz *et al.* 2000).

Segundo Huang *et al.* (1997), a associação entre adiposidade e CM na menopausa poderia ser modificada pelo uso de hormônios. Nesse estudo, os autores observaram uma associação entre IMC elevado e risco de desenvolver (RR 1,59; IC 95% 1,09-2,32) e morrer (RR 2,17; IC 95% 1,23-3,82) por CM no estrato de mulheres que nunca fizeram reposição hormonal. Entre as mulheres que faziam reposição hormonal não foi observada associação entre obesidade e CM. Outro grande estudo iniciado em 1992 avaliou as medidas de adiposidade, altura, peso, circunferência da cintura, circunferência do quadril e história de peso pregressa de 64.500 mulheres com idades entre 50 e 79 anos. A análise de dados demonstrou que mulheres com $IMC \geq 31,1 \text{ kg/m}^2$ apresentaram 2,5 vezes maior risco de desenvolverem a doença quando comparadas àquelas que apresentavam $IMC \leq 22,6 \text{ kg/m}^2$ (*Women's Health Initiative Study Group*, 1998).

O efeito adverso da obesidade no prognóstico do CM tem sido mediado pelos elevados níveis de estrógeno circulante devido à grande atividade da aromatase no tecido adiposo (Loi *et al.* 2005). O estrógeno é conhecido por ser essencial para o desenvolvimento normal da mama e crescimento ductal. Além disso, desempenha um papel central no desenvolvimento e progressão do CM. A exposição ao estrógeno e/ou aumento na expressão de seu receptor nas células epiteliais mamárias aumenta o risco da neoplasia mamária. A evidência mais convincente para determinar o papel do estrógeno na obesidade é que os níveis circulantes dessa substância estão forte e linearmente relacionados à adiposidade em mulheres pós-menopáusicas, embora essa relação não seja observada em mulheres pré-menopáusicas (Rose *et al.* 2004). Mulheres obesas pós-menopáusicas têm elevada produção de estrógenos e seus tumores mamários são frequentemente positivos para receptores de estrógeno (Rose *et al.* 2004). Nessas mulheres, o tecido adiposo da mama, abdômen, coxas e nádegas são os principais sítios da biossíntese de estrógeno com os níveis de aromatase aumentando com a idade e o IMC (Grodin *et al.* 1973). De fato, os níveis locais de estrógeno nos tumores mamários são 10 vezes maiores que os níveis séricos de mulheres na pós menopausa. Isso ocorre devido às interações entre tumor e adipócito que estimulam a elevada produção de aromatase (Bulun *et al.* 1994).

2.5b. Dieta

Associações entre nutrientes, componentes alimentares específicos da dieta e o CM têm sido vastamente estudadas (Willet *et al.* 2005; *World Cancer Research Fund*, 1997), ainda que os resultados sejam inconsistentes (*World Cancer Research Fund*, 1997). A alta ingestão de gordura e de carboidratos refinados pode aumentar o risco de CM (*World Cancer Research Fund*, 1997), porém nem todos os estudos mostram tal associação (Willet *et al.* 2005).

A ingestão de diferentes tipos de gordura como ácidos graxos saturados, insaturados, poliinsaturados e *trans* tem sido relacionada ao CM (Cibeira *et al.* 2006; Jakovljevic *et al.* 2002). Embora fortes associações positivas entre a elevada ingestão

do nutriente e o risco de CM tenham sido obtidas em estudos com animais (Prentice *et al.* 2006, Rogers *et al.* 1997), estudos de caso controle indicam apenas uma fraca associação (Howe *et al.* 1990) e estudos prospectivos de coorte têm mostrado pouca ou nenhuma associação (Kim *et al.* 2006; Knekt *et al.* 1990, Velie *et al.* 2000). Além disso, o consumo de carne tem sido associado ao aumento no risco para CM (Zheng *et al.* 1998), provavelmente devido a produção de aminas aromáticas heterocíclicas e outros componentes nocivos produzidos durante o processo de preparação da carne.

Estudos mostram que dietas com baixo teor de gordura reduzem em 9% o risco de CM invasivo (Prentice *et al.* 2006). O ácido linoléico (altamente consumido nos países ocidentais) tem sido considerado como a base na indução e nas metástases de tumores (Bartsch *et al.* 1999), sendo que a relação ômega 6 (ω -6): ômega 3 (ω -3) parece ser fundamental, já que os ácidos graxos ω -3 (ácido linolênico) são inibidores competitivos dos efeitos dos ácidos graxos ω -6.

Por outro lado, a ingestão de frutas e vegetais, fontes ricas em antioxidantes naturais, tem sido associada com a redução no risco de CM em diversos estudos (Ambrosone *et al.* 2004; Lee *et al.* 1999; Van Duyn *et al.* 2000; *World Cancer Research Fund*, 1997).

2.6. Rastreamento do Câncer de Mama

No Brasil, o CM tem o seu quadro agravado pelo fato de o diagnóstico ser feito, na maioria das vezes, em fase tardia. Aproximadamente a metade dos casos da doença é diagnosticada nos estágios III e IV (Schwartzmann *et al.* 2001; Thulerl *et al.* 2005). Medidas de detecção precoce do CM, como programas de rastreamento mamográfico que disponham de acompanhamento genético e nutricional, consistem em instrumentos de modificação da história natural e de controle da mortalidade do CM (Fletcher *et al.* 1993; Moody-Ayers *et al.* 2000). Nos países onde a política de rastreamento mamográfico foi adotada, como no Reino Unido, Holanda e Suécia, observou-se uma redução na mortalidade pela doença em mais de 20% (Jonsson *et al.* 2000; Fracheboud *et al.* 2001). No Brasil, o rastreamento mamográfico em mulheres de 50 a 69 anos é a estratégia recomendada para controle do CM. As recomendações do Ministério da Saúde para detecção precoce e diagnóstico da neoplasia mamária são baseadas no Documento de Consenso para Controle do Câncer de Mama, de 2004 que considera como principais estratégias de rastreamento um exame mamográfico, pelo menos a cada dois anos, para mulheres de 50 a 69 anos, e o exame clínico anual das mamas para mulheres de 40 a 49 anos.

Em 2004, em Porto Alegre, foi iniciado um Programa de Rastreamento Mamográfico populacional – Coorte Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). Nas áreas da cidade incluídas nesse projeto, não há serviço referência em mamografia. Mulheres com sintomas de CM pertencentes a esses locais, deveriam se dirigir aos serviços centrais nos quais eram oferecidos atendimentos com especialista, mamografias, ecografias e tratamento, com um longo tempo de espera entre cada etapa do processo de tratamento. Um estudo conduzido em 2003 confirmou a falta de um programa estruturado de rastreamento no país, mostrando que 49,7% das mulheres com idade superior a 50 anos nunca haviam sido submetidas a uma mamografia e que, entre aquelas que fizeram o exame, 18% o realizou há mais de 2 anos (Lima Costa *et al.* 2007). Sendo assim, os dois principais objetivos do projeto NMPOA são (1) testar a efetividade de um programa de rastreamento mamográfico estruturado de forma centralizada e de um programa de detecção precoce baseado na busca ativa de

mulheres, promoção do cuidado humanizado e multidisciplinar para uma população de baixa renda e (2) verificar o perfil dos fatores de risco para CM em uma amostra estudada, avaliando a frequência e a possível contribuição de fatores de risco já estabelecidos.

O programa atende mulheres provenientes de 21 Unidades Básicas de Saúde e Estratégias de Saúde da Família de Porto Alegre com idade entre 15-69 anos. O NMPOA oferece exame clínico e mamográfico anual gratuito à mulheres na faixa etária de 40-69 anos, acompanhamento genético, nutricional e psicológico, bem como a total cobertura médica às mulheres com sintomas de doença mamária (Caleffi *et al.* 2005; Caleffi *et al.* 2007).

Em sete anos deste estudo, foram detectados 54 casos de CM, em um total de 9.218 mulheres cadastradas. Isto representa uma prevalência de 585 casos a cada 100.000 mulheres, demonstrando o alto índice da doença nesta população (Caleffi *et al.* 2010). Dos 14 casos de CM encontrados entre mulheres com idade entre 40 e 69 anos sem sintomas de doença mamária, 9 deles estavam em estágio iniciais (estágios 0 e 1). Neste mesmo grupo, foi observado que metade das mulheres nunca havia realizado exame de mamografia e que aproximadamente 10% haviam realizado o último exame de mamografia há mais de três anos.

A população de mulheres cadastradas nesse projeto reside, predominantemente, em uma zona de Porto Alegre caracterizada por hábitos rurais e baixo poder aquisitivo. Em análises previamente realizadas nessa amostra, verificou-se que, das 9.218 mulheres cadastradas no projeto NMPOA, 5.549 (60,21%) apresentavam IMC acima de 25kg/m², indicando elevada prevalência de mulheres com excesso de peso.

Um estudo caso-controle realizado com mulheres pertencentes ao NMPOA avaliou 216 mulheres, sendo 48 com CM e 168 sem a doença. O objetivo do estudo foi avaliar a associação entre a ingestão de diferentes tipos de carnes com o CM. Foram aferidos peso, altura e circunferência abdominal (CA), além de informações socioeconômicas. Foi aplicado um questionário de frequência alimentar previamente validado para determinar consumo de carnes, segundo ingestão semanal em gramas. As variáveis foram categorizadas em 8 grupos: carne de gado frita (preparada por método de fritura de imersão), carne de gado não frita (grelhada ou assada), carne processada (presunto e asselados, salsicha e linguiça), carne moída frita (hambúrguer e almôndegas), peixe frito, peixe não frito, frango frito e frango não frito. O estudo mostrou que a mediana de consumo de carne frita entre os casos [0; intervalo interquartil (IIQ) = 0–55] foi maior que a dos controles (0; IIQ 0–27,5, $p < 0,01$). Também houve maior consumo de carne moída frita nos casos (mediana = 5,6; IIQ 0–22,2), em comparação com controles (mediana = 0; IIQ 0–11,3, $p = 0,01$). Não foram observadas associações significativas entre os outros grupos de alimentos e câncer. Os dados obtidos nesse estudo são bastante relevantes, na medida em que Porto Alegre é uma das capitais brasileiras com maior incidência de CM e o Rio Grande do Sul um dos estados com maior consumo per capita de carne no Brasil (Caleffi *et al.* 2009).

Outro estudo transversal conduzido no NMPOA verificou a associação entre fatores sócios econômicos, excesso de peso e medidas antropométricas. O estudo incluiu 334 mulheres com média de idade de 52,1 anos [Desvio Padrão (DP) = 8,6 anos]. Verificou-se que 75,7% (n=253) das investigadas apresentaram menos de 8 anos de estudo. Foi observado que 58,1% (n=194) tinham renda entre 1 e 3 salários

mínimos e 23,1% (n=77) apresentaram renda inferior a um salário mínimo. Em relação às medidas antropométricas, o IMC médio obtido foi de 28,8kg/m² (DP=6,4 kg/m²). A prevalência de obesidade abdominal se mostrou maior nos grupos de baixa escolaridade, com OR de 2,109 (IC 95%:1,069 – 3,865). Associando-se a renda com o IMC, obteve-se uma fraca correlação significativa (r= - 0,115; p=0,035), indicando que quanto maior a renda, menor o IMC (Cibeira *et al.* 2009a).

Com o objetivo de avaliar o consumo de bebida alcoólica em uma amostra de mulheres pertencentes a coorte NMPOA, foi conduzido um estudo transversal do qual participaram 317 mulheres com idades entre 36 e 79 anos (52,3 ± 8,4). Dessas, 197 eram pós-menopáusicas e 120 eram pré-menopáusicas. Não foram obtidas associações significativas entre o IMC e o consumo de álcool, porém 53,2% das mulheres que bebiam apresentaram sobrepeso. Para a idade em que começaram a beber, a média obtida foi de, aproximadamente, 22 anos (DP=7,36 anos), sendo a idade mínima de 10 anos. Verificou-se menor consumo da substância entre mulheres pós-menopáusicas (p<0,05). Não foi observada associação positiva entre renda e consumo de álcool, porém as participantes bebedoras apresentaram média de anos de estudo mais elevada (p<0,05) que a média de anos de estudo das ex bebedoras e das que nunca beberam (Cibeira *et al.* 2009b).

Outras análises realizadas na mesma amostra demonstraram que 78,7% das mulheres com CM possuíam circunferência abdominal acima do recomendado e que o IMC mostrou-se como fator de risco leve para a doença mamária (OR=1,196 e IC95% [1,04; 1,38]). Não foram observadas associações entre a CA (p=0,681), LDL (p=0,106), colesterol total (p=0,144), triglicerídios (p=0,927), diabetes mellitus (p=0,532), hipertensão arterial (p=0,232) e o CM (Cibeira *et al.* 2011).

2.7. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares têm papel indiscutível na morbidade e mortalidade, tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde, as DCV são responsáveis por 30% do total de mortes no mundo. É estimado que esse grupo de doenças seja a primeira causa de morte em todos os países em desenvolvimento, até 2010 (*World Health Organization*, 2002). A cardiopatia isquêmica e o acidente vascular cerebral (AVC) são as principais causas de morte (Levy *et al.* 1998; Murray *et al.* 1999;) e, ao que tudo indica, esses índices se manterão até o ano de 2020.

Nos Estados Unidos e no Brasil, as DCV permanecem como sendo a principal causa de morbi mortalidade entre as mulheres, especialmente entre aquelas com idade superior a 50 anos. Entre essas o risco de morrer por DCV é seis vezes maior que por CM. No Brasil, as DCV também ocupam o primeiro lugar dentre as causas de mortalidade desde a década de 60, tanto para homens quanto para mulheres. De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia e da Associação Brasileira do Climatério, o infarto e o AVC são as principais causas de morte em mulheres brasileiras com mais de 50 anos. Apesar do risco de CM ser a principal preocupação das mulheres, sabe-se que a maior incidência de morte no sexo feminino se refere às DCV, um índice de 53% quando comparado aos 4% do CM (Fernandes *et al.* 2008).

No estado do RS, a taxa de mortalidade por DCV tem aumentado. No ano de 2006, foram a óbito 11.037 (34, 33%) mulheres com idade acima de 40 anos por doenças circulatórias e, no ano de 2007, 11.656 (34,75%) (Rio Grande do Sul, 2008). Entre as doenças do aparelho circulatório, 3.905 mulheres foram a óbito por doença

cerebrovascular, 3.480 por doença isquêmica do coração, 2.432 por infarto agudo do miocárdio, 2.207 por outras doenças cardíacas, 929 por doença hipertensiva, 88 por aterosclerose, 49 por febre reumática aguda e doença reumática crônica do coração e 372 por doenças restantes do coração (Rio Grande do Sul, 2007).

2.8. Doenças Cardiovasculares em Mulheres

A partir dos anos 60, com a entrada das mulheres no mercado de trabalho, e, conseqüentemente, maior exposição ao fumo e maus hábitos alimentares, a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares rapidamente se elevou entre o sexo feminino (Castanho *et al.* 2001). A morte causada por doenças cardíacas é maior em homens (39%) do que em mulheres entre 45 e 64 anos. Depois dos 65 anos, porém, a taxa de mortalidade por doenças cardíacas em mulheres ultrapassa a dos homens em 22% (*National Center for Health Statistics*, 1997). Apesar de a incidência da Doença Arterial Coronariana (DAC) aumentar com o envelhecimento, suas manifestações clínicas aparecem em média cerca de 10 a 15 anos mais tarde entre as mulheres, fato que, possivelmente, é explicado pela proteção estrogênica (Fernandes *et al.* 2008).

A DAC ocorre duas a três vezes mais frequente em mulheres pós-menopáusicas do que entre as pré-menopáusicas. Na faixa etária de 45 e 64 anos, uma em cada nove mulheres tem alguma forma de DCV, enquanto que esta relação passa para uma em cada três, após 65 anos de idade. O Estudo de *Framingham* (Kannel *et al.* 1979) comparou a incidência de DCV em mulheres na pré e pós-menopáusicas em quatro faixas etárias e demonstrou que quanto mais jovem a mulher, maior o risco de DCV se a mulher estiver no climatério. Esse risco diminui em faixas etárias mais avançadas, mostrando o maior impacto da menopausa na jovem.

2.9. Fatores de Risco para as Doenças Cardiovasculares em Mulheres

Atualmente, sugere-se que mais de 80% dos casos de morte por DCV estejam associados a fatores de risco já conhecidos. Os considerados mais importantes são aqueles que apresentam alta prevalência em muitas populações, aqueles que têm impacto independente e significativo no risco para doenças isquêmicas e AVC e os que são modificáveis ou passíveis de controle.

Abaixo, são descritos alguns desses fatores de risco que merecem especial atenção na prevenção de DAC nas mulheres:

2.9a. Hipertensão Arterial Sistêmica

Dentre os fatores de risco modificáveis, a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é considerada o mais importante para as doenças isquêmicas e para o AVC (*American Dietetic Association*, 2003). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a HAS está entre os três principais fatores de risco que contribuem para as doenças cardiovasculares nos países americanos (*World Health Organization*, 2002). No Brasil, a prevalência de HAS na população adulta das áreas urbanas varia entre 20 e 30% (Fuchs *et al.* 1994; Passos *et al.* 2006).

O manejo da HAS é um meio de controlar o risco cardiovascular. O controle da HAS diminuiu o AVC em cerca de 40% e a doença isquêmica do coração em 15% (Collins *et al.* 1990). Pesquisas têm mostrado que o diagnóstico de pressão alta e o controle adequado da pressão arterial são componentes essenciais de qualquer programa de redução de risco. A severidade da hipertensão (tanto sistólica como diastólica) resulta no aumento no risco de infarto (Mancia *et al.* 2007). O benefício

primário do controle da pressão arterial tem sido estabelecido por reduzir o risco de doenças cerebrovasculares assim como proteger os rins de deterioração, evitando falências renais.

A HAS é um dos principais fatores de risco para a doença coronária em ambos os sexos. Nos relatos dos *Tecumseh Community Health Study* (Higgins *et al.* 1987), *Charleston Heart Study* e *Chicago Heart Study* (Stamler *et al.* 1993), a HAS mostrou-se como preditor independente da doença e mortalidade coronária. No *Nurses' Health Study* (Stampfer *et al.* 1987), as mulheres hipertensas apresentaram quatro vezes maior risco de infarto do miocárdio e sete vezes maior risco de morte coronária, quando comparadas às normotensas. Esses dados foram obtidos após terem sido feitos os ajustes para a presença de hipercolesterolemia, tabagismo, diabetes, menopausa e uso de estrógenos. Ainda, no estudo de *Framingham*, a HAS foi um preditor importante de risco coronário nas mulheres entre 50 e 59 anos, mas moderado nas mulheres entre 60 e 69 anos. Entretanto, nas mulheres com mais de 70 anos, nenhum fator de risco relacionou-se à ocorrência de doença coronária.

2.9b. Diabete Mellitus

Na sociedade moderna, é cada vez mais prevalente a coexistência de Diabete Mellitus (DM) e HAS. Mais de 60% das pessoas que têm DM tipo 2 apresentam HAS, independente da idade ou da presença de obesidade (*American Dietetic Association*, 2003). O DM tipo 2 está associado com pelo menos o dobro de risco de morte, principalmente de DCV (*World Health Organization*, 2002).

O DM é um poderoso preditor de doença coronária e, nas mulheres, assume um significado especial, já que a doença aumenta em três vezes o risco cardíaco (Brezinka *et al.* 1994). Os relatos de *Framingham* mostraram que a mortalidade coronária em mulheres diabéticas foi maior que a de homens diabéticos (Kannel *et al.* 1979). Além disso, mostrou que o risco de reinfarto em mulheres diabéticas foi o dobro do risco em homens diabéticos (Abbott *et al.* 1988) e que as mulheres diabéticas desenvolveram insuficiência cardíaca quatro vezes mais que as mulheres não diabéticas (Abbott *et al.* 1988). No *Evans County Study* (Heyden *et al.* 1980) e *Rancho Bernardo Study* (Barrett-Connor *et al.* 1987), a mortalidade cardíaca em mulheres diabéticas foi significativamente maior que a dos homens diabéticos. No *Nurse's Health Study* (Manson *et al.* 1991), com seguimento de oito anos, e no estudo de *Gothenburg* (Lapidus *et al.* 1985), com seguimento de doze anos, ambos realizados apenas com mulheres, a presença do DM associou-se com um significativo aumento no risco para o infarto do miocárdio e morte coronária.

Apesar das controvérsias existentes quanto à contribuição individual de cada fator de risco, existe unanimidade em se afirmar que a associação de tabagismo, HAS, dislipidemia e DM culmina na ocorrência da doença coronária na mulher. Para Mansur *et al.* (1996) essa associação foi relevante quando diagnosticada a doença coronária nas mulheres pré-menopáusicas. Alguns estudos populacionais realizados na Inglaterra, Escócia, Suécia, Estados Unidos e Alemanha têm associado o baixo nível social e econômico com a ocorrência de doença coronária em homens e mulheres (Brezinka *et al.* 1994).

2.9c. Tabagismo

Outro importante fator de risco modificável é o tabagismo. Estima-se que cerca de 1/3 da população mundial adulta seja fumante (*World Health Organization*, 2011). O cigarro duplica o risco de DAC, sendo que 30% delas são atribuídas ao número de cigarros fumados. O hábito de fumar tem se relacionado à ocorrência de infarto do miocárdio e morte súbita em mulheres jovens. O risco cardíaco aumenta substancialmente se o tabagismo estiver associado à HAS, hipercolesterolemia ou DM (Brezinka *et al.* 1994). Os estudos que compararam a incidência de tabagismo em mulheres com infarto do miocárdio com aquelas sem doença coronária, demonstraram um aumento significativo do risco coronário nas fumantes, principalmente entre aquelas que fumavam mais de 25 cigarros por dia (Brezinka *et al.* 1994).

Mesmo em vários relatos que consideraram a importância dos outros fatores de risco (HAS, DM, dislipidemia, idade avançada), o tabagismo permaneceu associado ao risco aumentado de infarto do miocárdio (Brezinka *et al.* 1994). Em estudos prospectivos, como o de *Tecumseh* (Higgins *et al.* 1987), *Rancho Bernardo* (Barrett-Connor *et al.* 1987) e *Framingham* (Eaker *et al.* 1987), o tabagismo em mulheres associou-se ao aumento de mortes de origem coronária.

2.9d. Dislipidemia

Diversos estudos têm evidenciado associações positivas entre as dislipidemias e a ocorrência da doença coronária na mulher. A importância da HDL na proteção feminina contra a doença ficou bem estabelecida nos estudos de *Framingham* (Kannel *et al.* 1979), *Lipid Research Clinics* (Busch *et al.* 1987) e *Donolo-Tel-Aviv* (Livshits *et al.* 1989). Nesses estudos, o valor da HDL mostrou-se o maior preditor de risco em mulheres, superando outros fatores, incluindo o colesterol total. Por outro lado, o valor isolado de LDL não tem, na mulher, o mesmo significado como preditor de risco que se encontrou no homem (Moreno *et al.* 1993). A hipertrigliceridemia, na mulher, tem papel mais importante que no homem, como preditor de risco coronário (Moreno *et al.* 1993).

2.9e. Sedentarismo

Pesquisas mostram que o exercício físico pode ajudar na prevenção da obesidade (Cioclac *et al.* 2004), DM (Cioclac *et al.* 2004), dislipidemias (Cioclac *et al.* 2004), doenças cardíacas (Asikainen *et al.* 2002) e HAS (Monteiro *et al.* 2004). Além disso, a atividade física habitual, que engloba todos os movimentos realizados no cotidiano, também pode ter papel importante na prevenção de DCV e redução dos sintomas da doença já instalada (Thompson *et al.* 2003). Estima-se que o sedentarismo, ainda que de forma dependente de outros fatores, seja responsável por 22% das doenças isquêmicas do coração (*World Health Organization*, 2002).

No Rio Grande do Sul, a proporção de mulheres sedentárias entre 20 e 29 anos é de 38% e chega a 57% em mulheres acima dos 70 anos (Hallal *et al.* 2003).

2.9f. Obesidade abdominal e dieta

A Sociedade Brasileira de Cardiologia enfatiza a nítida correlação entre a obesidade e o risco de DCV (Santos *et al.* 2002), principal causa de morte hospitalar entre as mulheres brasileiras (Brasil, 2010). Na região metropolitana de São Paulo, em 2006, as DCV foram responsáveis por 22,1% das mortes em mulheres de 40 a 49 anos, 25,1% em mulheres de 50 a 59 anos e 26,9% em mulheres de 60 a 69 anos.

Nesse mesmo ano, 12,2% das internações de mulheres de 40 a 69 anos no Sistema Único de Saúde foram atribuídas a essas causas (Brasil, 2010).

A concentração excessiva de gordura na região abdominal relaciona-se com diversas disfunções metabólicas e está associada com o maior risco de morbidade e mortalidade decorrentes da doença aterosclerótica e de suas consequências, como a DAC (Silva *et al.* 2006; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). Entre as mulheres, o acúmulo de gordura na região do tronco e abdômen (padrão androide) tem aumentado consideravelmente. Esse aumento ocorre, principalmente, devido às mudanças relacionadas aos hábitos alimentares ocorrido nas últimas décadas, o que favoreceu a exposição mais intensa aos fatores de risco cardiovasculares. Como consequência disso, pesquisas conduzidas recentemente têm destacado o aumento da obesidade abdominal na população feminina brasileira (Martins *et al.* 2003; Olinto *et al.* 2006).

2.9g. Menopausa

A menopausa, fase que coincide com a última menstruação da mulher na qual ocorre a diminuição dos hormônios sexuais produzidos pelos ovários, é um período em que há uma maior suscetibilidade da mulher à DCV (Sowers *et al.* 1995). Estudos demonstraram que mulheres pós-menopáusicas com mais de 55 anos apresentaram elevado risco para DCV, principalmente devido às disfunções do endotélio vascular (Sowers *et al.* 1995). A DCV na mulher pós-menopáusicas, muitas vezes, envolve alterações na pressão arterial e em sua regulação. Os efeitos decorrentes do climatério na pressão arterial sofrem influências de diversos fatores, tais como envelhecimento, IMC, classe social e tabagismo (Manhem *et al.* 1994).

2.10. Apolipoproteína E

2.10a. Estrutura e Função

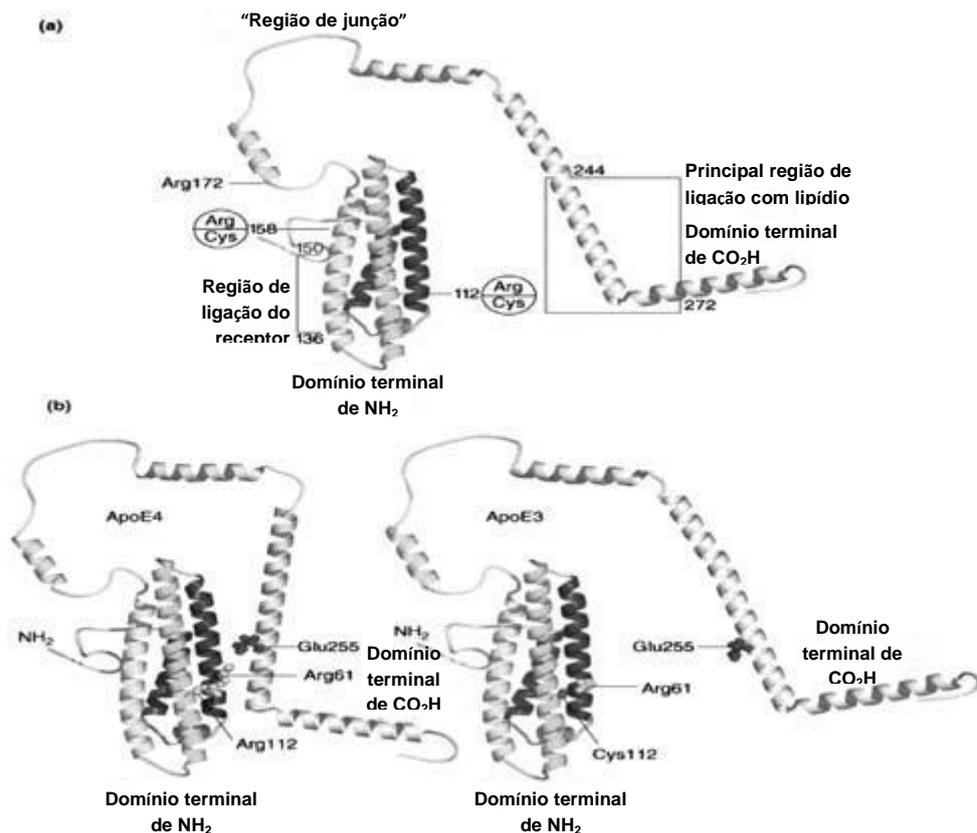
A apoE, identificada no início da década de 70, é uma proteína formada por 299 aminoácidos, sintetizada e secretada, primariamente, pelos hepatócitos (Rall *et al.* 1982). A apoE compõe a HDL, VLDL, quilomícrons e IDL. Essa proteína assume uma típica apo forma com dois domínios estruturais: o domínio amino (representado pela letra “a” na figura 1) e o domínio carboxil (representado pela letra “b”) (Hatters *et al.* 2006).

O terminal amino é composto por regiões ricas em sítios de lisina e arginina que são receptores de ligação, contidos entre os aminoácidos 136 e 150 (Innerarity *et al.* 1983). Esse domínio é formado por quatro feixes de hélices que contêm a região de receptor de LDL da proteína entre os aminoácidos 136-150 na hélice 4. O aminoácido 172, localizado na “região de junção”, é conhecido por ser essencial para a ligação com o receptor. O terminal carboxil é constituído por resíduos 225-299 e contém os principais determinantes de ligantes de lipídios que ancoram a apoE à lipoproteína (Wetterau *et al.* 1988). Esses domínios são separados por uma região protease-sensível (Wetterau *et al.* 1988), não havendo interações entre os domínios (Dong & Weisgraber *et al.* 1996). A estrutura do domínio terminal de carboxila é desconhecida, no entanto, evidências sugerem que seu formato seja helicoidal (Nolte *et al.* 1992). Além disso, o genótipo da apoE impacta na orientação tridimensional das regiões da apolipoproteína e nas interações amino-terminal e carboxila-terminal, que afetam a

ligação ao receptor e a distribuição da apoE. O terminal carboxil é que contém a região de ligação da lipoproteína.

A figura 1 demonstra o impacto da substituição do Cys por Arg na posição 112 na proteína. Essa substituição facilita a interação entre a Arg na posição 61 e a Glu na posição 255, favorecendo o maior contato entre os domínios terminais de amino e carboxil.

Figura 1. Elementos Estruturais da Apolipoproteína E



Hatters *et al.* 2006

Apesar do papel que a apoE desempenha no metabolismo lipídico e na aterosclerogênese estar bem estabelecido, essa proteína parece estar envolvida em diversos processos patofisiológicos que não estão diretamente relacionados com o transporte lipídico. Além disso, a apoE parece contribuir para o processo carcinogênico, uma vez que atua na proliferação de vários tipos de células tumorais e efetiva na modulação da angiogênese e de metástase (Vogel *et al.* 1994). Alguns estudos já demonstraram associação entre a *APOE* e algumas doenças, como o Alzheimer (McCarron *et al.* 1999) e alguns tipos de câncer, como por exemplo o de cólon (Slattery *et al.* 2005), ovário (Chen *et al.* 2005), próstata (Lehrer *et al.* 1998) e mama (Moysich *et al.* 1999).

2.10b. Apolipoproteína E e o polimorfismo do seu gene no metabolismo de lipoproteínas

A apoE é conhecida por desempenhar um papel multi funcional no metabolismo de lipoproteínas. Essa apolipoproteína age como cofator na síntese de VLDL, na hidrólise de remanescentes de VLDL para produzir LDL e como ligante de alta afinidade aos receptores de remoção celular, mediados por lipoproteínas remanescentes. O papel mais importante da apoE no metabolismo de lipoproteínas é a alta afinidade de ligação com receptores de LDL.

A apoE é sintetizada principalmente no fígado e, em menor quantidade, em outros tecidos como as glândulas adrenais, testículos, ovários (Blue *et al.* 1983; Polacek *et al.* 1992), pulmões (Dawson *et al.* 1989), rins (Wallis *et al.* 1983) e tecido adiposo (Zechner *et al.* 1991). Estima-se que do total de apoE produzida, entre 20 e 40%, seja sintetizada em tecidos extra hepáticos, como o cérebro e os macrófagos (Basu *et al.* 1982; Kayden *et al.* 1985).

Três alelos comuns (epsilon 2, epsilon 3 e epsilon 4) do gene da *APOE* codificam as três principais isoformas dessa proteína (E2, E3 e E4). O conjunto desses alelos forma seis fenótipos 3/3, 4/3, 2/3, 4/4, 4/2 e 2/2 (Davignon *et al.* 1988), resultado de diferentes substituições do aminoácido na posição 112 e 158. Essas substituições modificam a afinidade de ligação da apoE aos seus receptores e têm um grande impacto sobre os níveis de colesterol total e LDL sérico (Mahley *et al.* 2000). Em populações brancas adultas, a frequência estimada dos alelos e2, e3 e e4 é de, respectivamente, 8%, 78% e 14% (Wilson *et al.* 1991).

O alelo e2 está associado com concentrações mais baixas de colesterol e o e4 com concentrações mais elevadas (Siest *et al.* 1995). O mecanismo pelo qual o polimorfismo da *APOE* leva a diferença nos níveis de LDL plasmática não está claro. Sugere-se que, em indivíduos E2/E2, as partículas de VLDL sejam menores que em indivíduos E4/E4 (Bioletto *et al.* 1998), resultando em menores níveis de LDL e, conseqüentemente, menor conversão de VLDL para partículas de LDL. Outra explicação para essa relação, sugerida por Weintraub *et al.* (1987), é baseada nas diferenças de afinidade no receptor de LDL entre as variantes da *APOE*. A apoE3 e E4 têm a mesma afinidade para esse receptor, enquanto que a E2 mostra menor atividade de ligação. Assim, todas as lipoproteínas que contem o alelo e2 são mais lentamente removidas do plasma e induzem uma maior regulação do receptor da LDL e, conseqüentemente, uma baixa concentração do colesterol plasmático total. Por outro lado, as partículas de lipoproteína e4 são removidas mais rapidamente do plasma, induzindo a uma menor regulação do receptor de LDL, resultando em uma maior concentração de colesterol total circulante. Ainda, indivíduos portadores do alelo e2 têm menor absorção intestinal de colesterol e maior síntese de ácido biliar do que indivíduos portadores do alelo e3 ou e4 (Gylling *et al.* 1995; Kesaniemi *et al.* 1987; Miettinen *et al.* 1992).

Os alelos e2 e e3 têm sido mostrados por exercerem efeitos protetores em termos de risco de doença (Reardon *et al.* 2002). O alelo e4 tem sido mostrado por se ligar em igual ou melhor afinidade do que o e3, enquanto que o e2 se liga com apenas 2% de afinidade do e3 em certas condições (Reardon *et al.* 2002). Indivíduos com o

alelo e2 têm retardada depuração (*clearance*) de quilomícrons remanescentes devido a menor afinidade de ligação do receptor, o que resulta em uma super regulação do receptor de LDL e da neosíntese de colesterol (Reardon *et al.* 2002). A baixa regulação ocorre quando a absorção de colesterol é mediada pelo receptor de LDL e pela neosíntese de colesterol (Reardon *et al.* 2002). A *clearance* acelerada de quilomícrons remanescentes leva à baixa regulação de receptores hepáticos de LDL (Reardon *et al.* 2002) e podem estar subjacentes a forte associação entre os níveis de colesterol sérico total e de LDL. Por exemplo, indivíduos que possuem o alelo e4, tanto em homozigose quanto em heterozigose, absorvem e entregam ao fígado maior quantidade de colesterol intestinal, causando o efeito hipercolesterolêmico bem conhecido do alelo e4, com o alto risco de aterosclerose (Davignon *et al.* 1998).

O alelo e4 tem sido associado com o aumentado risco de doenças coronárias (Wang *et al.* 2003) e doença de Alzheimer (Kuusisto *et al.* 1994). Por outro lado, a frequência do alelo e4 é menor em pacientes com tumores proximais do cólon do que entre indivíduos saudáveis (Kervinen *et al.* 1996). Estudos demonstraram que o colesterol sérico elevado em indivíduos E4 (E3/E4 e E4/E4) poderia explicar a maior probabilidade de eventos coronários nesse subgrupo. Na maior parte das pesquisas, independentemente da idade e do estado de saúde da população avaliada, o alelo e4 tem sido associado com concentrações mais altas de LDL, em relação aos indivíduos com alelo e2. Entretanto, em relação aos indivíduos com homozigose para o alelo e3, existem somente diferenças moderadas e, frequentemente, não significativas (Davignon *et al.* 1988).

A variação fenotípica leva ao metabolismo diferencial de diferentes alelos (Mahley *et al.* 2000). O alelo e2 está presente, primariamente, na HDL, enquanto que o alelo e4 está presente igualmente na VLDL e HDL. Para todas as lipoproteínas, o alelo e4 é catabolizado três vezes mais rápido que o alelo e2, principalmente em indivíduos E2/E4, sugerindo que esses alelos podem ter rotas metabólicas distintas (Reardon *et al.* 2002).

2.10c. Polimorfismo da Apolipoproteína E, Aspectos Dietéticos e Doenças Cardiovasculares

O impacto dos polimorfismos no risco de doenças crônicas como as cardiovasculares e a habilidade de os fatores dietéticos manipularem as associações genótipo-fenótipo está sendo cada vez mais reconhecido. Song *et al.* (2004) avaliaram o risco médio de doenças cardiovasculares e verificaram um aumento entre 40 e 50% do risco em portadores de e4 (OR = 1.42), em relação aos indivíduos com genótipos E3/E3. O aumento de 40% – 50% do risco de doenças cardiovasculares em portadores de e4 (Song *et al.* 2004) tem sido tradicionalmente atribuído aos níveis moderadamente altos de colesterol circulante. Além disso, o genótipo *APOE* foi mostrado por afetar a capacidade de resposta ao conteúdo de gordura total e de ácidos graxos da dieta. É possível que a manipulação do conteúdo de gordura na dieta possa servir como meio de reduzir o risco de DCV associada com a presença do alelo e4. O estudo, porém, não mostrou diferença aparente tanto para os indivíduos portadores de e2 quanto de e3 (OR = 0,98).

Embora o mecanismo para justificar a relação entre o e4 e o risco de DCV não tenha sido totalmente elucidado, a associação tem sido atribuída às maiores concentrações de LDL, decorrentes da isoforma E4, que têm uma maior afinidade por seu receptor de membrana.

A variação alélica dentro do gene *APOE* tem sido mostrada por contribuir em 7% para a variabilidade interindividual na LDL e no colesterol total, com vários estudos demonstrando associações entre o alelo e4 e o aumento na LDL, e do alelo e2 com a diminuição dos níveis de LDL (Xhignesse *et al.* 1991). Além dos efeitos no metabolismo lipídico, o papel que a apoE desempenha no risco de doenças cardiovasculares tem sido foco de muitos estudos genéticos epidemiológicos (Horejsi *et al.* 2000; Ilveskoski *et al.* 2006).

Diversos estudos têm mostrado interações significativas entre as três isoformas da apoE e a resposta ao conteúdo total de gordura da dieta, composição de ácido graxo, colesterol total, consumo de óleo de peixe e ingestão alcoólica (Minihane *et al.*, 2000; Sarkkinen *et al.* 1998; Tso *et al.* 1998;). Masson *et al.* (2003) examinaram o locus da apoE e alterações no conteúdo de gordura da dieta. Significativamente, diferentes respostas ao colesterol total e à LDL foram observadas de acordo com o genótipo da *APOE*. Pesquisas conduzidas por Couture *et al.* (2003) e Moreno *et al.* (2004) sugeriram que a variabilidade na resposta às dietas ricas em carboidratos também podem ser determinadas pelo genótipo da *APOE*, embora a resposta à dietas com alto conteúdo de ácido graxo monoinsaturado tenha sido relacionada à circunferência abdominal.

2.10d. Polimorfismo da Apolipoproteína E e o Câncer de Mama

A relevância do gene da *APOE* para o câncer de mama é muito importante, pois a apoE faz parte de um amplo paradigma que tem como papel de destaque as interações gene-ambiente como fator de risco para a neoplasia mamária (Niemi *et al.* 2000; Zunarelli *et al.* 2000). No entanto, o papel que a apoE desempenha no risco para câncer ainda permanece contraditório. A maior parte dos estudos destaca que a apoE é essencial para o reparo celular (Mahley *et al.* 2000), na medida em que essa lipoproteína tem a capacidade de estimular ou inibir antígenos como os linfócitos T (Mahley *et al.* 2000). Dessa forma, a apoE destaca-se pelo seu importante papel como um marcador no risco para câncer de mama (Butler *et al.* 2001; Niemi *et al.* 2000), porém os resultados são ainda prematuros e controversos.

Niemi *et al.* (2000), avaliaram o impacto do fenótipo da apoE no colesterol e no CM, porém não encontraram associações positivas. Zunarelli *et al.* (2000) avaliaram a relação entre o gene da *APOE* com a taxa de proliferação celular do tumor, em pacientes com CM. Não foram observadas associações significativas entre a ocorrência do alelo e2 e do alelo e4 no tumor. Também não foram obtidas associações positivas entre a taxa de proliferação celular e a presença de CM.

Por outro lado, Leher *et al.* (1998) mostraram que a frequência de homozigose de alelo e4 foi associada com câncer de próstata precoce. Moysich *et al.* (1999) mostrou que mulheres americanas caucasianas que possuíam uma ou duas cópias do alelo e4 e que apresentavam elevadas concentrações de triglicerídios tiveram quatro vezes mais risco de desenvolver CM comparado com mulheres com baixas

concentrações de triglicerídios. Entretanto, não foram encontradas associações com o risco de câncer de mama em mulheres caucasianas (Moysich *et al.* 2000) ou inglesas (Zunarelli *et al.* 2000) tanto com o alelo e2 quanto com o e4, em comparação às portadoras de e3.

A literatura que examina especificamente a relação entre o gene da *APOE* e o risco de câncer permanece limitada e os resultados são conflitantes. Assim, alguns pesquisadores têm mostrado que a apoE modifica o risco de diversas doenças multifatoriais (Zunarelli *et al.* 2000), como por exemplo, o CM (Niemi *et al.* 2000) e as doenças cardiovasculares, por meio da combinação de fatores de risco biológicos e de estilo de vida, incluindo dieta e obesidade.

Alguns estudos têm demonstrado que o risco aumentado de CM está associado com níveis elevados de triglicerídios (Agurs-Collins *et al.* 1998; Goodwin *et al.* 1997; Kumar *et al.* 1991) e diversos mecanismos biológicos para essa associação têm sido estudados. Níveis elevados de triglicerídios têm sido associados com a redução nos níveis de hormônios sexuais ligados às globulinas, resultando em altos níveis de estradiol livre e subseqüentemente aumento no risco de CM (Takatani *et al.* 1991). Alternativamente, a hipertrigliceridemia poderia estar relacionada ao risco de câncer de mama, por causa da sua associação com a resistência à insulina (Bruning *et al.* 1992; Steiner *et al.*, 1994). A resistência a insulina também está relacionada com o aumento nos níveis de esteróides sexuais e com a redução dos níveis de hormônios sexuais ligados à globulinas, assim como com níveis elevados de fator de crescimento I que podem atuar sinergicamente com o estrógeno na promoção do CM (Steiner *et al.*, 1994).

3. JUSTIFICATIVA PARA O TRABALHO

Sendo o CM a neoplasia mais comumente diagnosticada em mulheres (*American Cancer Society, 2007*) e as doenças coronarianas aquelas que causam a maior parte das mortes por doenças cardiovasculares entre as mulheres (*American Heart Association, 2006*), pretendemos contribuir para o entendimento da relação entre os polimorfismos genéticos da *APOE*, fatores de risco para doenças cardiovasculares e o CM. Infelizmente, existem poucas pesquisas realizadas com mulheres brasileiras, o que dificulta o entendimento desse fenômeno e o esclarecimento dessa associação. Enquanto a maior parte dos estudos tem examinado a importância da apoE como um marcador molecular em uma variedade de doenças (*Davignon et al. 1998; Reardon et al. 200*), poucos investigam seu papel como um marcador para a suscetibilidade ao câncer (*Hartman et al. 2002*). Pouquíssimas pesquisas exploram a relevância da apoE no risco de câncer de mama (*Butler et al. 2001; Niemi et al. 2000*) e nenhum, até então, avaliou a relevância da apoE como marcador do risco de câncer de mama em mulheres gaúchas.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Comparar as frequências gênicas e genotípicas de polimorfismos no gene da *APOE* e os fatores de risco cardiovascular em uma amostra de mulheres brasileiras com e sem CM.

4.2. Específicos

4.2.1 determinar as frequências gênicas e genotípicas do gene da *APOE*;

4.2.2 verificar se há associação entre os polimorfismos do gene da *APOE* e o CM;

4.2.3 verificar se há associação entre o consumo de gordura, hábitos alimentares, estilo de vida e os polimorfismos da *apoE*.

5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA E DOS ANEXOS

Abbott RD, Donahue RP, Kannel WB, Wilson PW. The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs. women. The Framingham Study. *JAMA*. 1988; 260: 3.456-60.

Agurs-Collins T, Kim KS, Dunston GM, et al. Plasma lipid alterations in African-American women with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1998;124:186-190.

Ambrosone CB, McCann SE, Freudenheim JL, Marshall JR, Zhang Y, Shields PG. Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr*. 2004;134:1134–8.

American Dietetic Association. Treatment on Hypertension Adults with Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26(1): S80 – S82.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2008*. Atlanta: American Cancer Society; 2008.

Ashavaid TF, Todur SP, Nair KG. Apolipoprotein E polymorphism and coronary heart disease. *J Assoc Physicians India*. 2003; 51:784-788.

Asikainen TM, Miilunpalo S, Oja P, Rine M, Passanen M, Vuori I. Walking trials in postmenopausal women: effect of one vs two daily bouts on aerobic fitness. *Scand J Med Sci Sports*. 2002;12:99-105.

Barrett-Connor E, Khaw KT, Wingard D. A ten-year prospective study of coronary heart disease mortality in Rancho Bernardo women. In Eaker E, Packard B, Wenger NK, Clarkson TB, Tyroler HA: *Coronary heart disease in women*. New York. Haymarket Doyma. 1987 p.117-21.

Bartsch H, Nair J, Owen, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*. 1999; 20(12):2209-2218.

Basu SK, Ho YK, Brown MS, Bilheimer DW, Anderson R, Goldstein JL. *J Biol Chem* 1982; 257, 9788-9795.

Berglund G. Anthropometry, physical activity and cancer of the breast and colon. *IARC Sci Publ*. 2002;156:237-41.

Bioletto S, Fontana P, Darioli R, James RW. Apolipoprotein E polymorphism and the distribution profile of very low density lipoproteins; an influence of the E4 allele on large (Sf > 60) particles. *Atherosclerosis*. 1998;138:207-215.

Blue ML, Williams DL, Zucker S, Khan SA & Blum CB (1983) Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80, 283–287.

Bottom, O'Leary, Sheaffer, Phillips, Shu, et al. Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, Including SEER Incidence and Survival: 1975–2000. 2006. National Cancer Institute, NIH Pub. No. 06–5767. Bethesda, MD 2006. National Cancer Institute.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

Breslow RA, Ballard-Barbash R, Munoz K, Graubard BI. Long-term recreational physical activity and breast cancer in the National Health and Nutrition Examination Survey I epidemiologic follow-up study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:805-8.

Brezinka V, Padmos I. Coronary heart disease risk factors in women. *Eur Heart J* 1994; 15: 1.571-84.

Brinton LA. Hormones and risk of cancers of the breast and ovary. *Cancer Causes and Control.* 1996; 7(6):569-571.

Bulun SE, Mahendroo MS & Simpson ER. Aromatase gene expression in adipose tissue: relationship to breast cancer. *J Steroid Bioch Mol Biol.* 1994; 49: 319-326.

Butler WJ, Ryan P, Roberts-Thomson IC: Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16:631–635.

Bruning PF, Bonfrer JMG, Van Noord PAH, et al. Insulin resistance and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 1992;52: 511±516.

[Caleffi M](#), Ashton-Prolla P, Weber B, et al. Breast cancer screening in 10.000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort. 2005. 23;16:1020. *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings.* 2005; 23(16S) :1020.

Caleffi M, Bedin AJ, Zignani JM, et al. Prevalence of breast cancer risk factors in two different cohorts in relation to health care access and preventive programs in southern Brazil. *Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings.* 2007; 25(18S):1538.

Caleffi M, Ribeiro RA, Bedin AJ Jr, Viegas-Butzke JM, Baldisserotto FD, Skonieski GP, Giacomazzi J, Camey SA, Ashton-Prolla P. Adherence to a breast cancer screening program and its predictors in underserved women in southern Brazil. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Oct;19(10):2673-9.

Caleffi M, Herrmann G, Ashton-Prolla P, Giacomazzi J, Isoppo C, Ettrich B, Aguiar E, Graudenz M, Ribeiro R, Moriguchi E. Consumo de carnes e risco para câncer de mama em mulheres gaúchas: Projeto Núcleo Mama Porto Alegre. Trabalho apresenta no XVIII Congresso Brasileiro de Cancerologia na sessão de Tema Livre, 2009.

Carpenter CL, Ross RK, Paganini-Hill A, Bernstein L. Effect of family history, obesity and exercise on breast cancer risk among postmenopausal women. *International J Cancer*. 2003; 106(1):96-102.

Castanho VS, Oliveira LS, Pinheiro HP, Oliveira HCF, Faria EC. Sex Differences in Risk Factors for Coronary Heart Disease. A study in a Brazilian population. *BMC Public Health*, vol 1, n 3, 2001.

Cerhan JR. Physical activity, physical function and the risk of breast cancer in a prospective study among elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998;53:M251 – 6.

Chen YC, Pohl G, Wang T, Morin PJ, Risberg B, Kristensen GB, Yu A, Davidson B, Shih IM. Apolipoprotein E Is Required for Cell Proliferation and Survival in Ovarian Cancer *Cancer Res* 2005; 65: (1). January 1, 2005

Cibeira GH; Guaragna R. Lipídio: Fator de risco e prevenção de câncer de mama. *Rev Nutr* 2006; 19(1): 65-75.

Cibeira, GH; Manfroi, G. ; Hackenback L ; Muller, C. ; Skonieski G ; Lubianca, L. ; Weber, B. ; Caleffi, M. . Relação entre Variáveis Sócio-Econômicas e Circunferência Abdominal: Um Estudo Transversal com Mulheres Gaúchas. 2009a. (Apresentação de Trabalho/Congresso formato pôster). Bahia, Salvador. Evento: 13^o Congresso Brasileiro sobre Obesidade e Síndrome Metabólica. ABESO.

Cibeira GH (2), Müller C, Manfroi G, Hackenhaar L, Skonieski G, Weber B, Caleffi M. Consumo de bebida alcoólica em mulheres em rastreamento para câncer de mama: Projeto Núcleo Mama Porto Alegre. 2009b. São Paulo, SP. Evento: GANEPÃO.

Cibeira GH; Schneider S; Giacomazzi J; Prolla PA; Caleffi M; Moriguchi E. Associação entre o índice de Massa Corporal, perfil lipídico, resistência a insulina e câncer de mama. 2011. São Paulo, SP. Evento: GANEPÃO.

Colditz GA, Feskanich D, Chen WY, Hunter DJ, Willett WC. Physical activity and risk of breast cancer in premenopausal women. *Br J Cancer* 2003;89: 847 – 51.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358;9291:1389-1399.

Collins R, Pepo R, MacMahon S, et al. Blood Pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, short-term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990; 335: 827-38.

Coutelle C, Hohn B, Benesova M, Oneta CM, Quattrochi P, Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Schneeweiss A, Bastert G, Seitz HK. Risk factors in alcohol associated to breast cancer: alcohol dehydrogenase polymorphism and estrogens, *Int. J. Oncol.* 2004; 25: 1127- 1132.

Couture, P., Archer, W.R., Lamarche, B., Landry, N., Deriaz, O., Corneau, L., Bergeron, J. & Bergeron, N. Influences of apolipoprotein E polymorphism on the

response of plasma lipids to the ad libitum consumption of a high-carbohydrate diet compared with a highmonounsaturated fatty acid diet. *Metabolism* 2003; 52, 1454 - 1459.

Daugherty A. Atherosclerosis: Cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:453–455.

Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.

Dawson PA, Lukaszewski LM, Eils PF, Malbon CC & Williams DL. Quantification and regulation of apolipoprotein E expression in rat Kupffer cells. *Journal of Lipid Research.* 1989; 30:403–413.

Dirx MJ, Voorrips LE, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Baseline recreational physical activity, history of sports participation, and postmenopausal breast carcinoma risk in the Netherlands Cohort Study. *Cancer* 2001;92:1638 – 49.

Dong LM & Weisgraber KH. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry.* 1996: 271; 19053–19057.

Eaker ED, Castelli WP. Coronary heart disease and its risk factors among women in the Framingham Study. In Eaker ED, Packard B, Wenger NK, Clarkson TB, Tyroler HA: *Coronary heart disease in women.* New York. Haymarket Doyma. 1987; p.122-30.

Egan KM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Rosner BA, Colditz GA. Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 17; 88(14):988-93.

Fan L, Zheng Y, Yu KD, Liu GY, Wu J, Lu JS, et al. Breast cancer in a transitional society over 18 years: trends and present status in Shanghai, China. *Breast Cancer Res Treat.* In press 2009.

Fernandes CE et al. I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(1 supl.1):1-23.

Fletcher SW, Black W, Harris R, et al. Report of the International Workshop on Screening for Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 1993; 85(20):1644-1656.

Fracheboud J, de Koning HJ, Boer R, et al. Nationwide breast cancer screening programme fully implemented in The Netherlands. *Breast.* 2001; 10(1):6-11.

Fuchs FD, Moreira LB, Moraes RS, Bredemeier M, Cardozo SC. Prevalência de hipertensão arterial sistêmica e fatores associados na região urbana de Porto Alegre. Estudo de base populacional. *Populational-based study.* *Arq Bras Cardiol.* 1994;63(6):473-9.

- Ghafoor A, Jemal A, Ward E, et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2004; 54(3):181.
- Ginsburg ES, Walsh BW, Gao X, Gleason RE, Feltmate C, Barbieri RL. The effect of acute ethanol ingestion on estrogen levels in postmenopausal women using transdermal estradiol, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 1995; 2:26-29.
- Goodwin PJ, Boyd NF, Hanna W, et al. Elevated levels of plasma triglycerides are associated with histologically defined premenopausal breast cancer risk. *Nutr Cancer* 1997;27:284-292.
- Grodin JM, Siiteri PK, MacDonald PC. Source of estrogen production in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1973; 36: 207-214.
- Gylling H, Kontula K, Miettinen TA. Cholesterol absorption and metabolism and LDL kinetics in healthy men with different apoprotein E phenotypes and apoprotein B Xba I and LDL receptor Pvu II genotypes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1995; 15:208–213.
- Hallal C, Gotlieb SLD, Latorre MRDO. Evolução da mortalidade por neoplasias malignas no Rio Grande do Sul, 1979-1995. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2001; 4:169-177.
- Hallal PC, Victora CG, Wells JCK, Lima RC. Physical Inactivity: Prevalence and associated variables in brazilian adults. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:1894-900.
- Hamajima N et al. Collaborative Group on Hormonal Factors. Alcohol, tobacco and breast cancer—collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British Journal of Cancer*. 2002; 87:1234–1245.
- Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. *Diseases of the Breast*. Lippincott-Raven. p. 162, 1996.
- Hartman RE, Laurer H, Longhi L, et al. Apolipoprotein E4 influences amyloid deposition but not cell loss after traumatic brain injury in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002;22:10083–10087.
- Hatters DM, Peters-Libeu CA & Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006; 31: 445–454.
- Heyden S, Heiss G, Bartel AG, Hames CG. Sex differences in coronary mortality among diabetics in Evans County, Georgia. *J Chronic Dis* 1980; 33: 265-73.
- Higgins M, Keller JB, Ostrander LD. Risk factors for coronary heart disease in women; Tecumseh Community Health Study, 1959 to 1980. In Eaker ED, Packard B, Wenger NK, Clarkson TB, Tyroler HA: *Coronary heart disease in women*. New York. Haymarket Doyma . 1987, p. 83-9.

Hirayama T. Cancer mortality in nonsmoking women with smoking husbands on a large-scale cohort study in Japan. *Preventive Medicine*. 1984; 13:680–690.

Horejsi B, Spacil J, Ceska R, et al. The independent correlation of the impact of lipoprotein levels and apolipoprotein E polymorphism on carotid artery intima thickness. *Int Angiol*. 2000; 19:331–6.

Howe GR, Hirohata T, Hislop TG, et al. Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:561–9.

Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Dual Effects on Weight and Weight Gain on Breast Cancer Risk. *JAMA* 1997; 278(17):1407-11.

Ilveskoski E, Loimaala A, Mercuri MF, et al. Apolipoprotein E polymorphism and carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *International Journal of Cardiology*. 2006; 94: 209-12.

Innerarity TL, Friedlander EJ, Rall SC Jr, Weisgraber KH & Mahley RW. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Binding of apolipoprotein E fragments. *Journal of Biological Chemistry*. 1983; 258: 12341–12347.

Jakovljevic J, Touiland MS, Bondy ML, et al. Dietary intake of selected fatty acids cholesterol and carotenoids and estrogen receptor status in premenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2002; 75(1):5-14.

Jee SH, Ohrr H, Kim IS. Effects of husbands' smoking on the incidence of lung cancer in Korean women. *International Journal of Cancer*. 1999; 28:824–828.

Johnson KC, Hu J, Mao Y. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Passive and active smoking and breast cancer risk in Canada: 1994–97. *Cancer Causes Control*. 2000; 11:211–221.

Jonsson H, Tornberg S, Nystrom L, et al. Service screening with mammography in Sweden--evaluation of effects of screening on breast cancer mortality in age group 40-49 years. *Acta Oncology*. 2000; 39(5):617-623.

Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 1979; 241: 2.035-8.

Kayden HJ, Maschio F & Traber MG (1985) The secretion of apolipoprotein E by human monocyte-derived macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 239, 388–395.

Kervinen K, Soedervik H, Maekela J, et al. Is the development of adenoma and carcinoma in proximal colon related to apolipoprotein E genotype? *Gastroenterology* 1996;110: 1785±1790.

Kesaniemi YA, Ehnholm C & Miettinen TA (1987) Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. *Journal of Clinical Investigation* 80, 578–581.

Khuder SA, Simon VJ Jr. Is there an association between passive smoking and breast cancer? *European Journal of Epidemiology*. 2000; 16(12):1117-1121.

Kim EH, Willett WC, Colditz GA, et al. Dietary fat and risk of postmenopausal breast cancer in a 20-year follow-up. *Am J Epidemiol* 2006; 164:990 –7.

Knekt P, Albanes D, Seppanen R, et al. Dietary fat and risk of breast cancer. *Am J Clin Nutr* 1990;52:903– 8.

Kropp S, Chang-Claude J. Active and passive smoking and risk of breast cancer by age 50 years among German women. *American Journal of Epidemiology*. 2002; 156:616–626.

Kumar K, Sachdanandam P, Arivazhagan R. Studies on the changes in plasma lipids and lipoproteins in patients with benign and malignant breast cancer. *Biochemistry* 1991; 23:581±589.

Kuusisto J, Koivisto K, Kervinen K, et al. Association of apolipoprotein phenotypes with late onset Alzheimer's disease: Population based study. *BMJ* 1994;309:636±638.

Lapidus L, Bengtsson C, Blohme G, Lindqvist O, Nystrom E. Blood glucose, glucose tolerance and manifest diabetes in relation to cardiovascular disease and death in women. A 12 year follow-up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Acta Med Scand* 1985; 218: 455-62.

Lehrer S: Possible relationship of the apolipoprotein E (Apo E) e4 allele to prostate cancer. *Br J Cancer* 78: 1398, 1998.

Lee IM, Rexrode KM, Cook NR, Hennekens CH, Burin JE. Physical activity and breast cancer risk: the Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 2001;12:137 – 45.

Lee I. M., Antioxidant vitamins in the prevention of cancer, *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 111: 10-15, 1999.

Levy D, Wilson PWF. Atherosclerotic cardiovascular disease – an epidemiologic perspective. In: Topol EJ, editores. *Textbook of Cardiovascular Medicine*. 2^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raver;1998:13-29.

Li CI, Malone KE, Daling JR: Differences in breast cancer stage, treatment, and survival by race and ethnicity. *Arch Intern Med* 2003;163:49–56.

Lima-Costa MF, Matos DL: [Prevalence and factors associated with mammograms in the 50–69-year age group: a study based on the Brazilian National Household Sample Survey (PNAD-2003)]. *Cad Saude Publica* 2007, 23(7):1665-1673.

Livshits G, Weisbort J, Meshulam N, Brunner D. Multivariate analysis of the 20-year follow-up of the Donolo-Tel-Aviv Prospective Coronary Artery Disease Study and the usefulness of high density lipoprotein cholesterol percentage. *Am J Cardiol* 1989; 63: 676-81.

Loi S, Milne RL, Friedlander ML, McCredie MRE, Giles GG, Hopper JL, Phillips KA. Obesity and outcomes in premenopausal and postmenopausal breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(7): 1686-91.

Longnecker MP. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control*. 1994; 5:73–82.

Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer *Endocrine-Related Cancer* (2006) 13 279-292

Luoto R, Latikka P, Pukkala E, Hakulinen T, Vihko V. The effect of physical activity on breast cancer risk: a cohort study of 30,548 women. *Eur J Epidemiol* 2000;16:973 – 80.

Mahley RW, Rall SC Jr: Apolipoprotein E: Far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507–537.

Manhem K. Cardiovascular Risk in Postmenopausal Women: what is known and what is unknown. In Safar M, Stimper M, Zanchetti A. *Hypertension in Postmenopausal Women*. 1994, pp 3-13.

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G. ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens* 2007;25: 1751-62.

Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B et al. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1.141-7.

Mansur AP, Ramires JAF, Gonçalves EPS, Avakian SD, Caramelli B, Martins JRM et al. Risk factors, angiographic findings and menopausal status in women with chronic stable coronary heart disease. *Cardiovascular Risk Factors* 1996; 6: 284-8.

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 IS, Marinho SP. O potencial diagnóstico dos indicadores da obesidade centralizada. *Rev Saúde Publ.* 2003; 37 (6): 760-7.

Masson, L.F., McNeill, G. & Avenell, A. (2003) Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1098–1111.

McCarron MO, DeLong D, Alberts MJ. APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease: a meta-analysis. *Neurology* 1999; 53: 1308-1311.

Miettinen TA, Gylling H, Vanhanen H & Ollus A (1992) Cholesterol absorption, elimination, and synthesis related to LDL kinetics during varying fat intake in men with different apoprotein E phenotypes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 12, 1044–1052.

Miller K: Estrogen and DNA damage: The silent source of breast cancer? *J Natl CancerInst* 2003;95:100–102.

Minihane, A.M., Khan, S., Leigh-Firbank, E.C., Talmud, P., Wright, J.W., Murphy, M.C., Griffin, B.A. & Williams. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1990–1997.

Monninkhof EM, Elias SG, Vlems FA, et al. Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology* 2007;8:137 – 57.

Monteiro MF, Sobral Filho, DC. Exercício e o controle da pressão arterial. *Rev Bras Med Esporte* 2004;10:6:513-6.

Moody-Ayers SY, Wells CK, Feinstein AR. “Benign” tumors and “early detection” in mammography-screened patients of a natural cohort with breast cancer. *Archives of Internal Medicine.* 2000; 16(8):1109-1115.

Moore DB, Folsom AR, Mink PJ, Hong CP, Anderson KE, Kushi LH. Physical activity and incidence of postmenopausal breast cancer. *Epidemiology* 2000;11:292-6.

Moradi T, Adami HO, Ekblom A, et al. Physical activity and risk for breast cancer a prospective cohort study among Swedish twins. *Int J Cancer* 2002;100:76 – 81.

Moreno GT, Manson JE. Cholesterol and coronary heart disease in women: an overview of primary and secondary prevention. *Cor Art Dis* 1993; 4: 580-7.

Moreno, J.A., Perez-Jimenez, F., Marin, C., Gomez, P., Perez-Martinez, P., Moreno, R., Bellido, C., Fuentes, F. & Lopez-Miranda, J. The effect of dietary fat on LDL size is influenced by apolipoprotein E genotype in healthy subjects. *J. Nutr.* 2004; 134: 2517–2522.

Moysich KB, Freudenheim JL, Baker JA, Ambrosone CB, Bowman ED, Schisterman EF, Vena JE, Shields PG. ApoE4 gene linked to breast cancer. *BMJ.* 1999; 319: 662.

Murray CJL, Lopez A, et al. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge, MA, Harvard School of Public Health on behalf of the World Health Organization and the World Bank, 1999 (Global Burden of Disease and Injury Series, Vol. I).

National Center for Health Statistics. Statistical Abstracts for United States. Washington (DC): US Bureau of the Census 1997, 1997, 83 pg. 117^a ed. Acessível pelo site <http://www.census.gov/prod/www/statistical-abstract-us.html>.

Newman LA, Theriault R, Clendinnin N, Jones D, Pierce L: Treatment choices and response rates in African-American women with breast carcinoma. *Cancer.* 2003; 97(1):246–252.

Niemi M, Kervinen K, Kiviniemi H, et al. Apolipoprotein E phenotype, cholesterol and breast and prostate cancer. *J Epidemiol Community Health.* 2000; 54:978–979.

Nishino Y, Tsubono Y, Tsuji I, et al. Passive smoking at home and cancer risk: a population-based prospective study in Japanese nonsmoking women. *Cancer Causes Control*. 2001; 12:797–802.

Nolte RT & Atkinson D. Conformational analysis of apolipoprotein A-I and E-3 based on primary sequence and circular dichroism. *Biophysical Journal*. 1992; 63: 1221–1239.

Nordlund LA, Carstensen JM., Pershagen G. Cancer incidence in female smokers: a 26-year follow-up. *International Journal of Cancer Research*. 1997; 73:625–628.

Offit K, Gilewski T, McGuire P, et al. Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *Lancet*. 1996; 347:1643-1645.

Olinto MTA, Nacul LC, Dias-da-Costa JS, Gigante DP, Menezes AMB, Macedo S. Níveis de intervenção para obesidade abdominal: prevalência e fatores associados. *Cad Saúde Pública*. 2006; 22 (6): 1207-15.

Parkin MD, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.

Passos VMA, Assis TD, Barreto SM. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiol Serv Saude*. 2006;15(1):35-45.

Patel AV, Callel EE, Bernstein L, Wu AH, Thun MJ. Recreational physical activity and risk of postmenopausal breast cancer in a large cohort of US women. *Cancer Causes Control* 2003;14:519 – 29.

Pike MC, Henderson BE, Casagrande JT, et al. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women. *British Journal of Cancer*. 1981; 43:72-76.

Polacek D, Beckmann MW & Schreiber JR (1992) Rat ovarian apolipoprotein E: localization and gonadotropic control of messenger RNA. *Biology of Reproduction* 46, 65–72.

Poschl G., Seitz H. K., Alcohol and cancer, *Alcohol Alcohol*, 39: 155-165, 2004

Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, et al. Low-fat dietary pattern and risk of invasive breast cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 2006;295:629–42.

Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982;257:4171-4178.

Reardon CA: Differential metabolism of apolipoprotein E isoproteins. *J Lab Clin Med* 2002; 140:301–302.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al. SEER cancer statistics review, 1973-1999, Bethesda (MD): National Cancer Institute. 2002.

Rio Grande Do Sul, Secretaria De Saúde. Núcleo De Informação Em Saúde. Estatística de Saúde: Mortalidade 2006. Porto Alegre, 2007.

Rio Grande Do Sul, Secretaria De Saúde. Núcleo De Informação Em Saúde Estatística de Saúde: Mortalidade 2007. Porto Alegre, 2008.

Rockhill B, Willett WC, Hunter DJ, Manson JE, Hankinson SE, Colditz GA. A prospective study of recreational physical activity and breast cancer risk. *Arch Intern Med* 1999;159:2290 – 6.

Rogers AE. Diet and breast cancer: studies in laboratory animals. *Journal of Nutrition*. 1997; 127(5):933s-935s.

Rose DP, Komninou D & Stephenson GD. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obesity Reviews* 2004; 5: 153-165.

Ross R. K., Paganini-Hill A., Wan P. C., Pike M. C., Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92: 328-332, 2000.

Sarkkinen, E., Korhonen, M., Erkkila, A., Ebeling, T. & Uusitupa, M. (1998) Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid response to the separate modification of dietary fat and dietary cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1215–1222.

Sociedade Brasileira De Cardiologia. I Diretriz Brasileira sobre prevenção de doenças cardiovasculares em mulheres climatéricas e influência da terapia de reposição hormonal (TRH). 2008. Disponível em http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2008/diretriz_DCV_mulheres.pdf. Acesso em 7 nov 2010

Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma KN, Potter JD, Levin TR, Samowitz W, Wolff R. Associations between apoE genotype and colon and rectal cancer. *Carcinogenesis* vol.26 no.8 pp.1422--1429, 2005

Santos RD, Timerman S, Sposito AC, coordenadores. Diretrizes para cardiologistas sobre excesso de peso e doença cardiovascular dos Departamentos de Aterosclerose, Cardiologia Clínica e FUNCOR da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 78 (Supl.1): 1-13

Schwartzmann G. Breast cancer in South America: challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. *Journal of Clinical Oncology.* 2001; 9(18 Suppl):118S-124S.

Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995;41:1068-1086.

Singletary K. W., Gapstur S. M., Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms, *JAMA*, 286: 2143-2151, 2001.

Silva JLT, Barbosa DS, Oliveira JA, Guedes DP. Distribuição centrípeta da gordura corporal, sobrepeso e aptidão cardiorrespiratória: associação com sensibilidade insulínica e alterações metabólicas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50 (6): 1034-40.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 88 (supl): S2-19.

Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2004; 141:137-47.

Sowers MR, La Pietra M. Menopause: Its epidemiology and Potential Association with Chronic Diseases. *Epidemiol Rev.* 17, 1995 pp 287-302.

Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, Other Factors and 12-Yr Cardiovascular Mortality for Man Screened in Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16 (2), 1993, pp 434-42.

Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Coronary heart disease risk factors in women: the Nurses'Health Study Experience. In eaker ED, Packard B, Wenger NK Clarkson TB, Tyroler HA.: *Coronary heart disease in women.* New York. Haymarket Doyma. 1987. p. 112-6.

Steiner G. Hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia. *J Int Med* 1994;736:23-26.

Stoll BA: Premalignant breast lesions: Role for biological markers in predicting progression to cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:693-697.

Takatani O, Okumoto T, Kosano H. Genesis of breast cancer in Japanese: A possible relationship between sexhormone binding globulin (SHBG) and serum lipid components. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18:527-529.

Tehard B, Friedenreich CM, Oppert JM, Clavel-Chapelon F. Effect of physical activity on women at increased risk of breast cancer: results from the E3N cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:57-64.

Terry PD, Rohan TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002; 11:953-971.

Thompson PD, Buchner D, Piña IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 2003;107:3109-16.

Thuler LCS, Mendonça GA. Initial staging of breast and cervical cancer in Brazilian women. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia.* 2005; 27(11):656-660.

Torio CM, Klassen AC, Curriero FC, Caballero B, Helzlsouer K. The modifying effect of social class on the relationship between body mass index and breast cancer incidence. *Am J Public Health.* In press 2009.

- Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Egan KM, et al. Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes and Control*. 2000; 11(6):533-542.
- Tso, T.K., Park, S., Tsai, Y.H., Williams, G. & Snook, J.T. (1998) Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum lipoprotein response to saturated fatty acids. *Lipids* 33, 139–148.
- Vainio H, Kaaks R, Bianchini F. Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev* 2002;11 Suppl 2:S94 – 100.
- Van Duyn M. A., Pivonka E., Overview of the Health Benefits of Fruit and Vegetable Consumption for the Dietetics Professional: Selected Literature, *J. Am. Diet Assoc.*, 100: 1511-1521, 2000
- Van Landeghem AA, Poortman J, Nabuurs M & Thijssen JH. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Research* 1985; 45: 2900-2906.
- Velie E, Kulldorff M, Schairer C, Block G, Albanes D, Schatzkin A. Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer in postmenopausal women: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:833–9.
- Vogel T, Guo NH, Guy R, et al. Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation. *J Cell Biochem* 1994;54:299–308.
- Vogel, VG. Breast Cancer Prevention: A Review of Current Evidence. *Cancer J Clin* 2000; 50: 156 – 170.
- Wallis SC, Rogne S, Gill L, Markham A, Edge M, Woods D, Williamson R & Humphries S. The isolation of cDNA clones for human apolipoprotein E and the detection of apoE RNA in hepatic and extra-hepatic tissues. *The EMBO Journal*. 1983; 2:2369–2373.
- Wang CH, Zhou X. Meta-analysis for relationship between ApoE gene polymorphism and coronary heart disease. *Chin J Prev Med (Chin)*. 2003; 37: 368-370.
- Wartenberg D, Calle EE, Thun MJ, et al. Passive smoking exposure and female breast cancer mortality. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92(20):1666-1673.
- Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987;80:1571-1577.
- Weitzen R, Tichler T, Kaufman B, et al. Body weight, nutritional factors and physical activity--their influence on prognosis after breast cancer diagnosis. *Harefuah*. 2006; 145(11): 820-825.
- Wetterau JR, Aggerbeck LP, Rall SC Jr & Weisgraber KH. Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. I. Evidence for two structural domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1988; 263: 6240–6248.

Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptorbinding domain of human apolipoprotein E. *Science*. 1991; 252: 1817–1822.

Women's Health Initiative Study Group. Design of the Women's Health Initiative clinical trial and observational study. *Control Clin Trials* 1998; 19:61-109.

World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research (1997) Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC.

World Health Organization. Noncommunicable Diseases and Mental Health. Integrated management of cardiovascular risk: eport of a WHO meeting, Geneva 9-12, July 2002. Geneva: World Health Organization; 2002.

WHO REPORT on the global TOBA CCO ep idemic, 2011. Warning about the dangers of tobacco. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240687813_eng.pdf. Acesso em 29/08/2011.

World Health Organization. The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva, 2002. Disponível em http://www.who.int/entity/whr/2002/en/whr02_en.pdf. Acesso em 10/11/2010.

Wyshak G, Frisch RE. Breast cancer among former college athletes compared to non-athletes: a 15-year follow-up. *Br J Cancer* 2000;82:726 – 30.

Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Sing CF, et al. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:1100–10.

Zechner R, Moser R, Newman TC, Fried SK, Breslow JL. Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266: 10583–10588.

Zheng W., Gustafson D. R., Sinha R., Cerhan J. R., Moore D., Hong C. P., Anderson K. E., Kushi L. H., Sellers T. A., Folsom A. R., Well-done meat intake and the risk of breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst*. 1998, 90: 1724- 1729.

Zunarelli E, Nicoll JA, Trentini GP: Apolipoprotein E polymorphism and central nervous system tumors: Correlation with cell proliferation indices and clinical outcome. *Clin Neuropathol*. 2000; 19:1–6.

6. ARTIGO EM PORTUGUÊS

FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA APOLIPOPROTEÍNA E E FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM MULHERES COM E SEM CÂNCER DE MAMA

Gabriela Herrmann Cibeira – Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Ernestina Aguiar – Programa de pós-graduação em Ciências Médicas da UFRGS

Juliana Giacomazzi – Programa de pós-graduação em Ciências Médicas da UFRGS

Silvana Schneider – Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Suzi Camey – Programa de pós-graduação em epidemiologia da UFRGS

Maira Caleffi – Hospital Moinhos de Vento

Patricia Ashton-Prolla – Departamento de Genética da UFRGS e Laboratório de Medicina Genômica do HCPA

Emilio Moriguchi – Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da UFRGS

Título Abreviado: Apolipoprotein E e Breast Cancer

Palavras Chave: apolipoproteína E, cancer de mama, genótipos

Endereço para Correspondência:

Gabriela Herrmann Cibeira

Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Bairro Santana

Porto Alegre/RS/Brazil – Cep: 90035-006

Fone: (51) 2101 8844

Email: gabriela.herrmann@hmv.org.br

RESUMO

Introdução: A Apolipoproteína E (apoE) desempenha um papel importante no metabolismo de lipídios por mediar a ligação entre seu receptor com o receptor das partículas de lipoproteína de baixa densidade. A isoforma apoE4 tem sido associada com o aumento no risco de doenças coronárias e câncer de mama. O objetivo do presente estudo foi avaliar as frequências alélicas e genóticas de polimorfismos da apoE e sua relação com os fatores de risco cardiovascular em mulheres com e sem câncer de mama. **Materiais e Métodos:** Trata-se de um estudo do tipo caso-controle. No grupo dos casos foram incluídas mulheres com diagnóstico de carcinoma mamário e no grupo controle mulheres sem a doença. A amostra final foi composta por 47 casos e 167 controles. As participantes responderam a um questionário de frequência alimentar e perguntas referentes a história obstétrica e de estilo de vida. Foram aferidos peso, altura, circunferência abdominal e pressão arterial. A análise dos genótipos foi realizada pelo método PCR-RFLP e foram realizadas dosagens séricas de glicose em jejum e perfil lipídico. **Resultados:** As características demográficas, antropométricas, ginecológicas, de história obstétrica e de estilo de vida dos casos de câncer e dos controles foram semelhantes. 80,8% das participantes tiveram pelo menos um alelo ϵ 3, 17,3% um ϵ 2 e 1,9% um ϵ 4. Não foram obtidas diferenças significativas entre os grupos, comparando-se os níveis séricos de lipoproteína entre casos e controles. O grupo dos casos referiu maior consumo de gordura ($p=0,020$), colesterol ($p=0,017$), proteína ($p=0,031$) e carboidratos ($p=0,043$). Não foram observadas diferenças no risco estimado para câncer de mama entre as mulheres com genótipo apoE4 (RR = 0.95; IC95% = 0.44 – 2.03), comparado com o genótipo apoE3 (categoria de referência). Verificou-se que o alelo ϵ 2 foi positivamente associado com a ausência de câncer de mama, embora o ϵ 4 tenha sido associado positivamente com pacientes com a doença ($p<0,001$). A presença concomitante dos alelos ϵ 2 e ϵ 4 foi positivamente associada com a ausência de câncer de mama e o homocigoto e4/e4 com a presença da doença ($p = 0,021$). **Conclusão:** Mulheres com o genótipo apoE4 e elevados níveis de triglicerídios parecem ter maior risco para câncer de mama do que aquelas com menores níveis. O genótipo da apoE não foi correlacionado com o risco de câncer de mama nas análises brutas, porém a ingestão calórica, consumo de gordura, colesterol, proteína e carboidrato foi significativamente maior no grupo dos casos. Esses resultados indicam que a interação entre o metabolismo de lipídios da dieta e o genótipo da apoE podem modificar a associação entre o consumo de gordura dietética, particularmente fontes de triglicerídios, e risco de câncer de mama.

INTRODUÇÃO

A Apolipoproteína E (apoE) é uma glicoproteína de 299 aminoácidos sintetizada na maior parte dos tecidos do corpo¹. A apoE desempenha um papel importante no metabolismo de lipídios por mediar a ligação entre seu receptor com o receptor das partículas de lipoproteína de baixa densidade². O gene estrutural da apoE (*APOE*) é polimórfico: existem 3 isoformas comuns, E2, E3 e E4 que são codificadas pelos alelos ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4, respectivamente, num único loco do cromossomo 19. Substituições de diferentes aminoácidos nas posições 112 e 158 modificam a afinidade de ligação da apoE ao seu receptor e tem impacto principalmente nos níveis séricos de colesterol total e LDL-colesterol (LDL-C)¹.

A proteína apoE2 se difere da apoE3 na posição de um único aminoácido, resultando em uma menor atividade de ligação entre o receptor da apoE e os receptores de LDL-C, contribuindo para uma depuração (*clearance*) reduzida de apoE na circulação³. A apoE4 se difere da apoE3 na substituição de um aminoácido diferente que resulta em sua maior afinidade pelo receptor da apoE e receptores de LDL-C, causando depuração mais rápida no conteúdo de lipoproteínas na circulação³. Em geral, comparados com indivíduos com alelo ϵ 3, os níveis total de LDL-C tendem a ser menores para aqueles com alelo ϵ 2 e maiores para aqueles com o alelo ϵ 4. Isso resulta na maior ou menor regulação na expressão dos receptores de LDL-C nos hepatócitos e, conseqüentemente, maior ou menor absorção pelo fígado do conteúdo de LDL-C e lipoproteínas que contêm apoE, respectivamente, para aqueles com alelo ϵ 2 e aqueles com o alelo ϵ 4. Essa situação é verdadeira para a dieta usual. Quando um indivíduo consome uma dieta rica em gordura, aqueles com alelo ϵ 2 têm menor capacidade de reduzir o teor de partículas remanescentes da circulação, resultando em uma dislipidemia específica, denominada Tipo III, na qual há um acúmulo de partículas remanescentes na circulação (alto teor de triglicerídios, além de colesterol).

A apoE4 tem sido associada com o aumento no risco de doenças coronárias⁴ e doença de Alzheimer⁵. O alelo ϵ 4 também tem sido associado com o carcinoma de mama: em um estudo conduzido por Moysich *et al.* (1999)⁶, mulheres com uma ou duas cópias do alelo ϵ 4 e elevados níveis séricos de triglicerídios apresentaram quatro vezes mais risco de desenvolver câncer de mama, quando comparadas com mulheres com baixos níveis de triglicerídios⁶.

A ingestão dietética de gordura tem sido amplamente relacionada ao risco de câncer de mama^{7,8}. Entretanto, os resultados permanecem controversos, pois nem todos os estudos mostram associações positivas⁹. Estudos com animais sugerem que apenas a ingestão dietética de gordura antes da primeira gestação afete o risco¹⁰. A maior parte dos estudos sobre a ingestão de colesterol e o risco de câncer de mama também não mostram associação no risco⁹. É possível que a falta de associação entre a ingestão de gordura e o câncer de mama verificada nesses estudos possa estar relacionada às diferenças interindividuais no consumo de gordura dentro da mesma população, erros de medida (vieses) inerentes aos questionários dietéticos e também à magnitude dessas diferenças que poderiam não ser suficientes para assegurar a detecção por meio de métodos epidemiológicos¹¹.

Os níveis séricos de lipoproteínas também têm sido investigados em relação à etiologia do câncer de mama como um potencial mediador no efeito da gordura da dieta no risco e como um fator de risco independente. As associações entre colesterol sérico ou plasmático, LDL-C e níveis de triglicerídios têm sido amplamente estudadas, mas os resultados dessas investigações são inconsistentes. Alguns estudos não relataram qualquer efeito adverso das lipoproteínas^{12,13,14}; outros mostraram maior risco associado à níveis elevados de colesterol total^{15,16} e triglicerídios^{17,18}; ou associações inversas com o colesterol total^{16,19} ou com níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL)^{20,21}.

Pelo fato de a apoE desempenhar um importante papel no metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídios e no transporte reverso do colesterol, a relação entre concentrações séricas de lipoproteínas e os genótipos da apoE tem sido foco de diversos estudos^{22,23}. Evidências mostraram concentrações mais altas de triglicerídios séricos em pacientes com um alelo $\epsilon 4$, em relação ao genótipo homozigoto E3E3²². Estudos realizados em ratos avaliaram o papel das isoformas $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ no catabolismo e metabolismo de HDL e mostraram que a presença da isoforma $\epsilon 4$ resulta em níveis plasmáticos de LDL-C um pouco elevados e um pequeno, porém significativo, decréscimo no nível de HDL, incluindo situações nas quais esses animais foram alimentados com dieta rica em gordura²³.

Uma vez que há evidências convincentes de que a apoE modifica a associação entre a ingestão dietética e os níveis sanguíneos de lipídios, o objetivo do presente estudo foi avaliar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos da apoE e sua relação com os fatores de risco cardiovascular em uma amostra de mulheres brasileiras com e sem câncer de mama.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento

O delineamento do estudo foi do tipo caso-controle e as participantes foram recrutadas a partir da coorte Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). A coorte foi iniciada em 2004 e compreende 9.218 mulheres cadastradas com idade superior aos 15 anos que serão acompanhadas clinicamente por meio do rastreamento mamográfico (aquelas com idade entre 40-69 anos) durante 10 anos²⁴. A coorte inclui mulheres provenientes de zonas em vulnerabilidade social na periferia da cidade de Porto Alegre, sul do Brasil.

Amostra e Recrutamento

Considerando a frequência média do alelo $\epsilon 4$ (5,4%), previamente descrita na amostra de mulheres taiwanesas sem risco para câncer de mama²⁵, um poder de 80%, intervalo de confiança de 95% e uma taxa de caso controle de 1:3, nós estimamos um tamanho de amostra ideal de 52 casos e 156 controles. O grupo dos casos incluiu mulheres com diagnóstico de carcinoma de mama invasor ou *in situ*, avaliado por análise patológica. Todas as pacientes com câncer de mama do NMPOA foram convidadas a participar e aquelas que aceitaram participar compuseram o grupo

dos “casos”. O grupo controle foi formado por mulheres sem diagnóstico prévio ou atual de câncer de mama. Essas pacientes foram selecionadas aleatoriamente de um subconjunto de mulheres da coorte sem a neoplasia mamária que fora recrutado consecutivamente no ano de 2007 para outro estudo²⁶. Utilizando esses critérios, a amostra final do presente estudo foi de 47 casos e 167 controles. Todas as participantes foram incluídas somente após a explicação dos objetivos do estudo e procedimentos e depois de assinarem o consentimento informado.

Coleta de dados

As entrevistas foram realizadas por pesquisadores treinados. Cada entrevista durou, em média, 45 minutos. A entrevista incluiu a aplicação de um questionário de frequência alimentar, previamente validado²⁷, composto por 98 itens. Para o cálculo nutricional, foi utilizado o *software Virtual Nutri*, versão 1.0²⁸. Foram avaliadas outras variáveis como idade, idade da menarca, idade da primeira gestação, período de aleitamento materno exclusivo (meses), número de filhos, *status* menopáusicos, uso de medicamentos e prática de atividade física.

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado pelo peso (kg) dividido pela altura ao quadrado (m²). Os pontos de corte de IMC adotados foram os preconizados pela Organização Mundial de Saúde²⁹: baixo peso (IMC < 18,5 kg/m²); eutrofia (IMC 18,5-24,99 kg/m²); sobrepeso (IMC 25-29,99 kg/m²) e obesidade (IMC ≥ 30,00 kg/m²). A circunferência abdominal (CA) foi obtida na menor curvatura localizada entre as costelas e a crista ilíaca com fita métrica flexível e inelástica sem comprimir os tecidos. A atividade física foi definida como qualquer exercício realizado por 20-30 min pelo menos três vezes na semana nos últimos 90 dias. Três medidas da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram tomadas no início da manhã, após 5 minutos de repouso inicial e no término da entrevista. O manguito foi colocado na posição adequada do braço direito e utilizou-se um esfigmomanômetro de mercúrio. A pressão arterial foi considerada como a média aritmética da primeira, segunda e terceira medida³⁰.

Mulheres sem câncer de mama tiveram seu risco para desenvolver a doença estimado pelo Modelo de Gail³¹. O risco estimado foi expresso como risco corrente (em 5 anos) e risco cumulativo (mais de 90 anos de idade) para o desenvolvimento de câncer de mama.

Análises Laboratoriais

O DNA genômico foi extraído de sangue periférico (5ml) coletados em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A análise dos genótipos do polimorfismo da *APOE* foi realizada pelo método PCR-RFLP, conforme descrito por Hixson *et al.* (1990)³². Resumidamente, o *amplicon* de 244pb obtido por PCR foi clivado com a enzima *HhaI* e resultou em fragmentos de diferentes tamanhos que foram visualizados pela eletroforese de gel de poliacrilamida: (a) fragmentos de 91 e 83 pares de base para o genótipo E2E2 (b) fragmentos de 91, 48 e 35 pares de base para o genótipo E3E3 (c) fragmentos de 72, 48 e 35 pares de base para o genótipo E4E4. Ao longo desse artigo, nós descrevemos coletivamente os genótipos E3E3 como apoE3, os genótipos E2E3 e E2E4 como apoE2 e os genótipos E3E4 e E4E4 como apoE4.

As análises bioquímicas foram realizadas a partir de sangue venoso obtido em jejum de 12 horas. As amostras foram coletadas em tubos sem anticoagulantes para a quantificação dos lipídios e glicose. Para as análises, foram considerados os seguintes valores dentro da normalidade: concentração plasmática de colesterol total \leq 200mg/dl, concentração plasmática de triglicerídios \leq 150mg/dl; concentração plasmática de HDL $>$ 50mg/dl; concentração plasmática de LDL-C \leq 160mg/dl³³. A LDL-C foi calculada pela fórmula de Friedewald³⁴: $LDL-C = TotalChol - (HDLChol - Trig/5)$. O diabetes foi definido pela glicemia de jejum \geq 126 mg/dL e/ou pelo uso atual de insulina ou drogas hipoglicêmicas³⁵.

Análise Estatística

Foi utilizado o programa SPSS, versão 18.0, para a análise de dados. Para avaliar as diferenças demográficas, antropométricas, de estilo de vida e gineco-obstétricas entre os dois grupos nós utilizamos o Teste-t de Student para as variáveis com distribuição normal, o Teste Não-paramétrico de Mann-Whitney para as variáveis sem distribuição normal e o Teste Qui-quadrado para as variáveis categóricas. A regressão logística foi utilizada para calcular a razão de chances (OR) e utilizou-se 95% como intervalo de confiança (IC). As variáveis idade, idade da menarca, idade da menopausa, número de filhos, educação não foram incluídas, pois os valores de p não foram $<$ 0.20, após a regressão logística.

Considerações Éticas

Todos os pesquisadores participantes do presente estudo foram treinados e cegados para os resultados das análises genéticas e bioquímicas, ao longo das entrevistas com os pacientes. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil em 2008 e pelo Instituto de Educação e Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, no mesmo ano. Todas as participantes assinaram o termo de consentimento antes de serem incluídas na pesquisa.

RESULTADOS

As características demográficas, antropométricas, ginecológicas, de história obstétrica e de estilo de vida dos casos de câncer e dos controles estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença entre os grupos quanto à média de idade e altura, mediana do IMC, circunferência abdominal, idade da menarca, *status* menopáusicos, pressão arterial sistólica e diastólica e número de filhos. A porcentagem de mulheres pós-menopáusicas nos dois grupos foi semelhante e não foram obtidas diferenças quanto à prevalência de diabetes entre os casos e controles. Não foram obtidas diferenças no uso de medicações, atividade física e pressão arterial entre os dois grupos. Houve diferença significativa no uso de estatinas entre os grupos. Entretanto, devido ao fato de somente duas participantes pertencentes ao grupo dos casos utilizarem a medicação, essa variável não foi utilizada na ponderação das nossas análises.

As mulheres com câncer de mama apresentaram idade mais precoce do nascimento do primeiro filho e tenderam a amamentar por mais tempo, porém essa diferença não foi significativa. Em relação ao risco estimado para desenvolvimento de câncer de mama no grupo controle, a mediana foi de 1% (0.7 – 1.4). No que se refere ao risco estimado de desenvolver a neoplasia ao longo da vida, a mediana obtida foi de 7,7% (6.1 – 10.0). A distribuição dos genótipos para esses polimorfismos em toda a amostra e nos casos *versus* controles seguiram o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Não houve diferença significativa das frequências genotípicas observadas em mulheres com e sem câncer de mama ($p > 0.05$).

A distribuição dos genótipos da *APOE* na amostra total e pelo *status* da doença é apresentada na Tabela 2. A maior parte das participantes (80,8%) tiveram pelo menos um alelo $\epsilon 3$, 17,3% um $\epsilon 2$ e 1,9% um $\epsilon 4$. Em geral, as participantes com o alelo $\epsilon 4$ tenderam a ter níveis séricos mais elevados de triglicerídios, colesterol total e HDL que as participantes homocigotas para $\epsilon 3$ e participantes com alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$, o que é explicado devido a maior afinidade do alelo $\epsilon 4$ pelos receptores de apoE e LDL-C. No grupo das mulheres com câncer de mama, aquelas com alelo $\epsilon 2$, apresentaram os maiores níveis de colesterol total e LDL-C e níveis altos de triglicerídios (exceto para um caso de homocigose para o alelo $\epsilon 4$, em exceção), o que pode ser relacionado com a maior ingestão de gordura pelo grupo caso (verificar na discussão, o comentário referente a Dislipidemia Tipo III)

Comparando-se os níveis séricos de lipoproteína entre casos e controles, não foram obtidas diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, houve diferença na ingestão dietética entre os casos e controles: o grupo dos casos referiu maior consumo de gordura ($p = 0,020$), colesterol ($p = 0,017$), proteína ($p = 0,031$) e carboidratos ($p = 0,043$), conforme é mostrado na Tabela 3.

Não foram observadas diferenças no risco estimado para câncer de mama entre as mulheres com genótipo apoE4 (RR = 0.95; IC95% = 0.44 – 2.03), comparado com o genótipo apoE3 (categoria de referência). Na análise da distribuição da alélica entre os dois grupos, verificou-se que o alelo $\epsilon 2$ foi positivamente associado com a ausência de câncer de mama, embora o $\epsilon 4$ tenha sido associado positivamente com pacientes com a doença ($p < 0,001$), conforme descrito na Tabela 4. Ainda, a presença concomitante dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ foi positivamente associada com a ausência de câncer de mama e o homocigoto $e4/e4$ com a presença da doença ($p = 0,021$).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que investigou a relação entre lipoproteínas séricas, genótipo da *APOE* e risco de câncer de mama em mulheres brasileiras. A relevância do gene da *APOE* para o câncer de mama em particular é importante, pois a apoE faz parte de um paradigma mais amplo, destacando o papel crucial das interações gene-ambiente como fatores de risco para uma variedade de doenças humanas¹. Em nosso estudo, os níveis séricos de colesterol total, HDL e LDL-C não foram associados com o risco e a estratificação pelo genótipo da *APOE* não afetaram substancialmente essas observações. Entretanto, nós observamos evidência de maior risco de câncer de mama em mulheres com níveis séricos elevados de triglicerídios, particularmente entre

mulheres com genótipo apoE4 (E3E4 e E4E4). Além disso, mulheres com câncer de mama referiram maior ingestão dietética de colesterol ($p=0,017$), lipídio ($p=0,020$), carboidrato ($p=0,043$) e proteína ($p=0,031$).

Estudos prévios têm relatado aumento do risco de câncer de mama em associação com níveis elevados de triglicerídios^{21,36}, e os mecanismos biológicos para esta associação têm sido amplamente discutidos. Níveis elevados de triglicerídios têm sido associados com níveis menores do hormônio sexual de ligação globulínica, resultando em níveis altos de estradiol livre e, conseqüentemente, maior risco de câncer de mama³⁷. Além disso, a hipertrigliceridemia pode estar relacionada ao risco de câncer de mama, devido a sua associação com a resistência à insulina^{38,39}. A resistência à insulina também está ligada ao aumento dos níveis de esteróides sexuais, em associação com a diminuição dos níveis das globulinas ligadoras de hormônios sexuais, assim como com elevados níveis bioativos de nível de fator de crescimento semelhante à insulina I que pode agir sinergicamente com o estrógeno na promoção do câncer de mama⁴⁰. Uma possível razão para isso é que o polimorfismo da *APOE* modifica a proteína tanto na sua estrutura quanto na sua função. A isoforma E2 gera uma proteína, cuja ligação com o receptor de LDL-C é defeituosa. Por outro lado, a isoforma E4 tem uma proteína cuja afinidade pelo receptor de LDL-C é quatro vezes mais alta, resultando em uma depuração mais rápida de lipoproteínas que contêm apoE na circulação, o que resulta na baixa regulação da expressão dos receptores de LDL nos hepatócitos como consequência da maior absorção de LDL-C e lipoproteínas que contêm apoE, levando a níveis plasmáticos mais altos nesses indivíduos⁴¹. Nossos achados corroboram essa associação. Em nosso estudo, nós demonstramos que elevados níveis de triglicerídios estão associados com o risco de câncer de mama em mulheres com o genótipo apoE4 que tem sido relacionado com níveis de triglicerídios em estudos prévios^{42,43}. Mulheres com o genótipo apoE4 tem maiores níveis de colesterol total, LDL-C e triglicerídios que aquelas com genótipo apoE3 e esse efeito foi observado nos dois grupos (Tabela 2). Dessa forma, nós sugerimos que o aumento no risco, fortemente observado entre mulheres com o genótipo apoE4, pode ser um efeito da depuração reduzida de lipoproteínas ricas em triglicerídios do plasma, resultando em concentrações continuamente elevadas, o que contribuiria para a redução dos níveis do hormônio sexual de ligação globulínica. Ainda, nós demonstramos que mulheres homozigotas para $\epsilon 4$ tiveram níveis mais elevados de triglicerídios e glicose em jejum. Outro achado interessante do nosso estudo é que no grupo de mulheres com câncer de mama, aquelas com alelo $\epsilon 2$, apresentaram os níveis mais altos de colesterol total e LDL-C e elevados níveis de triglicerídios (exceto para um caso de homozigose de $\epsilon 4$), o que pode ser relacionado com a maior ingestão de gordura nos casos do que nos controles. Isso é o que acontece na Dislipidemia Tipo III: entre indivíduos que consomem uma dieta rica em gordura, aqueles com o alelo $\epsilon 2$, terão menor capacidade de limpar o conteúdo de partículas de apoE remanescentes da circulação, resultando em um tipo especial de dislipidemia, a Tipo III, na qual há um acúmulo de partículas remanescentes na circulação (elevados níveis de triglicerídios, além de colesterol).

Estudos em ratos têm avaliado o papel das isoformas $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ no metabolismo e catabolismo de HDL, sugerindo que a presença da isoforma $\epsilon 4$ implica em uma pequena elevação dos níveis séricos de LDL-C e uma pequena, mas significativa,

redução dos níveis de HDL, mesmo entre animais alimentados com dietas ricas em gordura²³. Em nosso estudo, nós observamos menores níveis séricos de HDL na amostra total (48.5 +11.1) e especialmente entre aqueles indivíduos com genótipo E4. Entretanto, nós não observamos menores níveis de LDL-C em mulheres com genótipo E4E4, possivelmente devido ao pequeno tamanho da amostra nesse grupo. Esses achados podem ser associados com a maior velocidade no catabolismo das lipoproteínas em indivíduos com o alelo $\epsilon 4$, comparado com aquelas com o alelo $\epsilon 3$. Como consequência, o maior catabolismo de lipoproteínas remanescentes em indivíduos $\epsilon 4$ poderia levar ao déficit hepático de receptores de lipoproteínas, resultando no aumento da LDL circulante, um dos maiores contribuintes para o risco de aterosclerose. Nesse estudo, nós observamos também um maior consumo de gordura, colesterol, proteína e carboidrato em mulheres com câncer de mama, comparadas com aquelas sem a doença. É sabido que uma dieta rica em gordura pode induzir a resistência à insulina⁴⁴ e que a hiperinsulinemia crônica associada à disponibilidade aumentada de IGF-1 pode estimular o crescimento do tumor de mama. Entretanto, estudos epidemiológicos que avaliam a associação entre os níveis aumentados de IGF-1 com a incidência de câncer de mama ainda não obtiveram resultados conclusivos.

Algumas questões metodológicas devem ser consideradas na interpretação dos achados deste estudo. Como na maior parte dos estudos epidemiológicos, não se pode descartar os efeitos dos vieses em nossos resultados. Nossos achados foram baseados em uma amostra pequena e não necessariamente representativa de mulheres brasileiras. No entanto, mesmo considerando o pequeno número de indivíduos nos diferentes grupos, a distribuição das frequências alélicas e genotípicas da *APOE* foi similar àquelas observadas em outros estudos^{45,46}. Um problema inerente de estudos de caso-controle que utilizam amostras biológicas se relaciona com a possibilidade de que o processo da doença ou o tratamento pode ter afetado as medidas em indivíduos com câncer de mama do presente estudo. Há algumas especulações de que os níveis séricos de lipídios poderiam ser afetados pela cirurgia como parte da resposta metabólica e neuroendócrina ao procedimento⁴⁷, embora estudos posteriores tenham demonstrado que os níveis de triglicerídios foram quase idênticos em amostras de sangue obtidas antes e depois da cirurgia de mama⁴⁸. Há evidências de que os níveis séricos de lipídios possam ser afetados pela quimioterapia e tratamento com tamoxifeno^{36,49,50}. No entanto, os resultados do presente estudo parecem não terem sido afetados por essas alterações nos níveis séricos de lipoproteínas em relação ao tratamento do câncer, em função das seguintes observações: a grande maioria dos casos não havia sido submetida a tratamento adjuvante no momento da coleta para o estudo e os níveis de lipoproteínas das mulheres que receberam quimioterapia foram semelhantes aos níveis das mulheres sem tratamento. Entretanto, a possibilidade de que as diferenças observadas nos níveis séricos de triglicerídios entre casos e controles resultaram do processo de doença e não de um indicador de exposição permanece. Além disso, a variabilidade intraindividual nas concentrações séricas de triglicerídios tem sido relatada⁵¹. Embora seja improvável que essa variabilidade esteja relacionada com o *status* da doença, é possível que os valores de triglicerídios séricos aferidos em uma única coleta não reflitam o grau de estabilidade dos níveis de triglicerídios nesta população.

Em resumo, neste estudo de caso controle, mulheres com elevados níveis de triglicerídios parecem ter maior risco para câncer de mama do que aquelas com menores níveis. Esse efeito foi mais pronunciado entre mulheres com o genótipo apoE4. Embora o genótipo da apoE não tenha sido correlacionado com o risco de câncer de mama nas análises brutas, quando as análises foram estratificadas segundo a ingestão dietética, consumo de gordura, colesterol, proteína e carboidrato, nós observamos uma ingestão significativamente maior desses micronutrientes entre mulheres com câncer de mama. Esses resultados indicam que a interação entre o metabolismo de lipídios da dieta e o genótipo da apoE podem modificar a associação entre o consumo de gordura dietética, particularmente fontes de triglicerídios, e risco de câncer de mama.

REFERÊNCIAS

1. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988; 240(4852):622-30.
2. Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor related protein, LPR, is an apolipoprotein E binding protein. *Nature*. 1989; 341:162-164.
3. Breslow JL. Genetic basis of lipoprotein disorders. *J Clin Invest*. 1989 August; 84(2): 373-380.
4. Davignon J, Gregg RE, Sing CF, *et al*. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1988; 8:1-21.
5. Kuusisto J, Koivisto K, Kervinen K, *et al*. Association of apolipoprotein phenotypes with late onset Alzheimer's disease: Population based study. *BMJ*. 1994; 309:636-638.
6. Moysich KB, Freudenheim JL, Baker JA, Ambrosone CB, Bowman ED, Schisterman EF, Vena JE, Shields PG: Apo E4 gene linked to breast cancer. *Brit Med*. 1999; 319: 662.
7. Cibeira GH; Guaragna, RM. Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. *Rev Nutr Cam*. 2006; 19(1): 65-75.
8. Buck K, Vrieling A, Flesch-Janys D, Chang-Claude J. Dietary patterns and the risk of postmenopausal breast cancer in a German case-control study. *Cancer Causes Control*. 2010 Nov 26.
9. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR, *et al*. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer pooled analysis. *N Engl J Med*. 1996; 8;334(6):356-61.
10. Ip C. Controversial issues of dietary fat and experimental mammary carcinogenesis. *Prev Med*. 1993; 22(5):728-37.
11. Bingham SA, Gill C, Welch A, *et al*. Comparison of dietary assessment methods in nutritional epidemiology: Weighted records v. 24 h recalls, food frequency questionnaires and estimated-diet records. *Br J Nutr*. 1994; 72(4):619-643.
12. Hiatt RA, Friedman GD, Bawol RD, Ury HK. Breast cancer and serum cholesterol. *J Natl Cancer Inst*. 1982; 68(6):885-9.
13. Morris DL, Borhani NO, Fitzsimons E, Hardy RJ, Hawkins CM, Kraus JF, Labarthe DR, Mastbaum L, Payne GH. Serum cholesterol and cancer in the Hypertension Detection and Follow-up Program. *Cancer*. 1983; 52(9):1754-9.
14. Tornberg SA, Holm LE, Carstensen JM. Breast cancer risk in relation to serum cholesterol, serum beta-lipoprotein, height, weight, and blood pressure. *Acta Oncol*. 1988; 27(1):31-7.
15. Gerber M, Cavallo F, Marubini E, *et al*. Liposoluble vitamins and lipid parameters in breast cancer. A joint study in northern Italy and southern France. *Int J Cancer*. 1988; 42(4):489-494.
16. Vatten LJ, Foss OP. Total serum cholesterol and triglycerides and risk of breast cancer: A prospective study of 24 329 Norwegian women. *Cancer Res*. 1990; 50(8):2341-6.
17. Potischman N, McCulloch CE, Byers T, Houghton L, Nemoto T, Graham S, Campbell TC. Associations between breast cancer, plasma triglycerides, and cholesterol. *Nutr Cancer*. 1991; 15(3-4):205-15.

18. Agurs-Collins T, Kim KS, Dunston GM, Adams-Campbell LL.. Plasma lipid alterations in African-American women with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998; 124(3):186-190.
19. Sharma V, Sharma A. Serum cholesterol levels in carcinoma of the breast. *Indian J Med Res.* 1991; 94(6):193-6.
20. Hoyer AP, Engholm G. Serum lipids and breast cancer risk: A cohort study of 5 207 Danish women. *Cancer Causes Control.* 1992; 3(5):403-480.
21. Kokoglu E, Karaarslan I, Karaarslan HM, Baloglu H. Alterations of serum lipids and lipoproteins in breast cancer. *Cancer Lett.* 1994; 82(2):175-8.
22. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J. Lipid Res. V.* 1992; 33(4):447-454.
23. Puglielli, L.; Tanzi, R.E.; Kovacs, D.M. - Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 2003; 6: 345-51.
24. Caleffi M, Ribeiro RA, Duarte Filho DL, Ashton-Prolla P, Bedin AJ Jr, *et al.* A model to optimize public health care and downstage breast cancer in limited-resource populations in southern Brazil Porto Alegre. *Breast Health Intervention Cohort. Public Health.* 2009; 9(13):83-91.
25. Chang SJ, Hou MF, Tsai SM, Kao JT, Wu SH, Hou LA, Tsai LY, *et al.* Association between the apolipoprotein E genotypes and breast cancer patients in Taiwanese. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2006; 98(1):109-13.
26. Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 2008; 261(1):21-5.
27. Salvo V, Gimeno SGA. Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência de consumo de alimento. *Rev Saúde Pública.* 2002; 36(4):505-12
28. Philippi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. *Virtual Nutri [programa de computador]. Versão 1.0 for Windows.* São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Departamento de Nutrição; 1996.
29. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii,1-253.
30. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, *et al.* 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: 2560-2572.
31. Veronesi U, Luini A; Costa A, *et al.* *Mastologia oncológica*, p.242, 2002.
32. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31(3): 545-548.
33. ____IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 88, Suplemento I, Abril 2007.*
34. Friedewald WT, Levey RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499-502.

35. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, *et al.* Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003; 26:3160-3167.
36. Potischman N, Byers T, Houghton L, Root M, Nemoto T, Campbell TC. . Effects of breast cancer treatment on plasma nutrient levels: Implications for epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992; 7:555-9.
37. Takatani O, Okumoto T, Kosano H. Genesis of breast cancer in Japanese: A possible relationship between sex hormone binding globulin (SHBG) and serum lipid components. *Breast Cancer Res Treat.* 1991;18(suppl 1):527-529.
38. Bruning PF, Bonfrer JMG, Van Noord PAH, Hart AA, de Jong-Bakker M, Nooijen WJ. Insulin resistance and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 1992; 52(4):511-516.
39. Steiner G. Hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia. *J Int Med.* 1994; 736(suppl):23-26.
40. Stoll BA. Essential fatty acids, insulin resistance, and breast cancer risk. *Nutr Cancer.* 1998; 31(1):72-77.
41. Curtiss LK. ApoE in atherosclerosis: a protein with multiple hats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(8):1852-3. No abstract available
42. Dart A, Sherrard B, Simpson H. Influence of apoE phenotype on postprandial triglyceride and glucose responses in subjects with and without coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 1997; 130(1-2):161-170.
43. Bergeron N, Havel RJ. Prolonged postprandial response of lipids and apolipoproteins in triglyceride-rich lipoproteins of individuals expressing on apolipoprotein epsilon 4 allele. *J Clin Invest.* 1996; 97(1):65-72.
44. Pischon T, Nothlings U, Boeing H: Obesity and cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 67(2), 128–145 (2008).
45. Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein in African- American and white young adults. *Am J Epidemiol.* 1998; 148(9):859-868.
46. Moysich KB, Freudenheim JL, Baker JA, Ambrosone CB, Bowman ED, Schisterman EF, Vena JE, Shields PG. Apolipoprotein E genetic polymorphism, serum lipoproteins, and breast cancer risk. *Mol Carcinog.* 2000; 27(1):2-9.
47. McNamara JJ, Molot M, Dunn R, Burran EL, Stremple JF. Lipid metabolism after trauma. Role in the pathogenesis of fat embolism. *J Thoracic Cardiovasc Surg.* 1972; 63(6):968-972.
48. Goodwin PJ, Boyd NF, Hanna W, Hartwick W, Murray D, Qizilbash A, Redwood S, Hood N, DelGiudice ME, Sidlofsky S, McCready D, Wilkinson R, Mahoney L, Connelly P, Page DL. Elevated levels of plasma triglycerides are associated with histologically defined premenopausal breast cancer risk. *Nutr Cancer.* 1997; 27:284-292.
49. Chang NW, Chen FN, Wu CT, Lin CF, Chen DR. Apolipoprotein ε4 allele influences the response of plasma triglyceride levels to tamoxifen in breast cancer patients. *Clin Chim Acta.* 2009; 401(1-2):144–7.
50. Thangaraju M, Kumar K, Gandhirajan, Sachdanandam P. Effect of tamoxifen on plasma lipids in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer.* 1994; 73(3):659-663.
51. Wasenius A, Stugaard M, Otterstad JE, Froyshov D. Diurnal and monthly intra-individual variability of the concentration of lipids, lipoproteins and apoproteins. *Scand J Clin Lab Inv.* 1990;50(6):635-642.

TABELAS

Tabela 1. Características da amostra

	Casos n=47		Controles n=167		P- valor
	n (%)	Med. (IIQ or SD)	n (%)	Med. (IIQ or SD)	
Idade (Anos) [#]		57.6 (10.6)		56.1 (8.1)	0.295
Peso (kg) *		66.7 (13.5)		68.5 (20.1)	0.559
Altura (m) [#]		1.56 (0.06)		1.55 (0.06)	0.175
IMC (kg/m ²) *		28.2 (5.9)		28.9 (7.2)	0.206
Circunferência Abdominal (cm) *		93.0 (17.0)		94.0 (17.0)	0.850
Idade da Menarca (anos) *		13.0 (3.0)		13.0 (2.0)	0.584
Idade da Primeira Gestação (anos) *		20.0 (5.0)		22.0 (8.0)	0.365
Aleitamento Exclusivo (meses) *		15.0 (45.0)		12.0 (32.0)	0.526
Número de Crianças ¥					
1 –3	32 (68.1)		117 (70.1)		
≥ 4	13 (27.7)		39 (23.4)		0.730
Status Menopáusico ¥					
Sim	31 (67.4)		102 (61.1)		0.434
Glicose em Jejum ¥		98.0 (17.0)		99.0 (19.0)	0.579
Pressão Arterial Sistólica (mm/Hg)	130.0 (20.0)		130.0 (20.0)		0.776
Pressão Arterial Diastólica (mm/Hg)	80.0 (10.0)		80.0 (10.0)		0.538
Uso de Antihipertensivo ¥					
Sim	23 (48.9)		83 (50.0)		0.898
Uso de Hipoglicemiante ¥					
Sim	5 (10.6)		16 (9.6)		0.839
Uso de Antidislipidêmico ¥					
Sim	2 (4.3)		23 (13.9)		0.071

Uso de Terapia Hormonal ¥			
Sim	5 (11.1)	33 (19.8)	0.179
Uso de Contraceptivo ¥			
Sim	34 (73.9)	133 (79.6)	0.403
Atividade Física ¥			
Sim	14 (29.8)	57 (34.1)	0.576

Média e desvio padrão (DP), Teste-t; * Mediana e Intervalo Interquartil (IIQ), Teste não-paramétrico de Mann-Whitney; ¥ n (%); Teste Qui-quadrado.

Tabela 2. Distribuição das médias das lipoproteínas séricas segundo o genótipo da APOE entre os casos e controles

Resultado	N (%)	Colesterol total sérico (mg/dL)	HDL sérica (mg/dL)	LDL sérica (mg/dL)*	Triglicerídeo sérico (mg/dL)
		Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
AMOSTRA TOTAL (n=212)					
2/3	20 (9.4)	210.3 (47.9)	56.0 (21.1)	121.7 (44.9)	162.7 (103.3)
2/4	17 (8.1)	185.0 (32.7)	53.6 (11.2)	100.7 (31.3)	153.2 (83.1)
3/3	119 (56.1)	201.3 (45.8)	51.4 (14.6)	117.5 (42.7)	165.8 (84.0)
3/4	52 (24.5)	216.9 (52.4)	50.1 (13.8)	131.2 (49.9)	177.9 (116.5)
4/4	4 (1.9)	187.2 (22.1)	48.5 (11.1)	90.2 (56.3)	242.7 (123.9)
CASOS (n=47)					
2/3	4 (8.5)	253.5 (72.5)	51.0 (14.1)	166.3 (56.4)	181.0 (159.3)
3/3	28 (59.6)	189.9 (55.2)	48.4 (12.1)	109.7 (51.4)	159.1 (61.8)
3/4	12 (25.5)	194.7 (50.3)	50.2 (15.2)	116.3 (45.4)	141.6 (86.9)
4/4	3 (6.4)	195.3 (18.4)	43.7 (6.6)	114.2 (35.9)	187.3 (67.9)
CONTROLES (n=165)					
2/3	16 (9.7)	199.5 (35.2)	57.2 (22.7)	110.6 (35.4)	158.1 (91.3)
2/4	17 (10.3)	185.0 (32.6)	53.6 (11.1)	100.7 (31.3)	153.2 (83.1)
3/3	91 (55.2)	204.8 (42.3)	52.3 (15.2)	119.9 (39.7)	167.8 (89.9)
3/4	40 (24.2)	223.6 (51.8)	50.1 (13.6)	135.7 (50.9)	188.8 (122.8)
4/4	1 (0.6)	163	63	18,2	409.0

* Baseado na Equação de Friedewald's: $LDL-C = Colest_{tot} - HDL_{colest} - (TRIG/5)$; DP: Desvio Padrão

Tabela 3. Lipoproteínas séricas e ingestão dietética de gordura e colesterol entre casos e controles.

Variável	Casos (n= 47) Mediana (IIQ)*	Controles (n=165) Mediana (IIQ)*	P-valor [‡]
Ingestão de Lipídios (g/dia)	66.1 (33.6)	56.8 (21.7)	0,020
Ingestão de Colesterol (mg/dia)	254.6 (127.9)	214.5 (124.4)	0.017
Proteínas (g/dia)	97.7 (38.7)	89.4 (35.9)	0.031
Carboidratos (g/dia)	314.2 (128.9)	289.6 (127.1)	0.043
Colesterol total sérico(mg/dL)	193.0 (52)	209.0 (59)	0.070
HDL sérica (mg/dL)	47.0 (15)	50.0 (15)	0.166
LDL sérica (mg/dL)	108.0(58)	121.2 (54.3)	0,154
Triglicerídio sérico (mg/dL)	151.0 (95)	150.0 (116)	0,656

*Mediana e Intervalo Interquartil (IIQ); [‡] Teste Não-Paramétrico de Mann-Whitney

Tabela 4. Distribuição alélica entre casos e controles

	Alelo			P-valor*
	ε2 n (%)	ε3 n (%)	ε4 n (%)	
Casos	8 (8.5)	80 (85.1)	6 (6.4)	
Controles	66 (19.8)	266 (79.6)	2 (0.6)	
Total	74 (17.3)	346 (80.8)	8 (1.9)	<0.001

* Teste exato de Fischer entre alelos e caso-controles.

7. ARTIGO EM INGLÊS

FREQUENCY OF THE APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISMS AND CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN WOMEN WITH AND WITHOUT BREAST CANCER

Gabriela Herrmann Cibeira – Post-graduate Program in Cardiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Ernestina Aguiar – Post-graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Juliana Giacomazzi – Post-graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Silvana Schneider – Genomic Medicine Laboratory (HCPA).

Suzi Camey – Post-graduate Program in Epidemiology, – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Maira Caleffi – Moinhos de Vento Hospital – Porto Alegre, RS, Brazil.

Patricia Ashton-Prolla – Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and Genomic Medicine Laboratory (HCPA).

Emilio Moriguchi – Post-graduate Program in Cardiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abbreviated Title: Apolipoprotein E and Breast Cancer

Key Words: apolipoprotein E, breast cancer, genotypes

Address for Correspondence:

Gabriela Herrmann Cibeira

Adress: Rua Ramiro Barcelos, 2350 –Santana

Porto Alegre/RS/Brazil – Zip Code: 90035-006

Telephone: (51) 2101 8844

Email: gabriela.herrmann@hmv.org.br

ABSTRACT

Introduction: ApoE plays an important role in lipid metabolism by mediating the binding of lipoprotein particles to the low density lipoprotein and apoE receptors. The apoE4 has been associated with increased risk for coronary heart disease and breast cancer. The aim of this study was to assess allelic and genotypic frequencies of apolipoprotein E polymorphisms and their relationship to cardiovascular risk factors in women with and without breast cancer. **Materials and Methods:** The study was designed as case-control. In case group it was included women with breast cancer diagnosed and in the control group it was included women without disease. The final sample consisted of 47 cases and 167 controls. The participants answered a food frequency questionnaire and questions related to obstetric history and lifestyle. We measured weight, height, waist circumference and blood pressure. Serum fasting glucose and lipid profile were performed. Analysis of genotypes were performed by PCR-RFLP. **Results:** Demographic, anthropometric, gynecological, obstetric history and lifestyle characteristics between cases and controls were similar. Most participants (80.8%) had at least one $\epsilon 3$ allele, 17.3% had one $\epsilon 2$ and 1.9% had one $\epsilon 4$ allele. No significant differences were found between the groups, comparing serum lipoprotein levels. The case group reported higher consumption of fat ($p = 0.020$), cholesterol ($p = 0.017$), protein ($p = 0.031$) and carbohydrates ($p = 0.043$). There was no difference in estimated risk for breast cancer between women with the apoE4 genotype (RR = 0.95, 95% CI = 0:44 to 2:03) as compared to those with the apoE3 genotype (reference category). The presence of the $\epsilon 2$ allele was positively associated with the absence of breast cancer, whereas the $\epsilon 4$ was associated positively with patients with the disease ($p < 0.001$). The concomitant presence of $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ alleles was positively associated with the absence of breast cancer and homozygous $\epsilon 4/\epsilon 4$ with the presence of the disease ($p = 0.021$). **Conclusion:** women with elevated triglyceride levels were found to be at greater risk of breast cancer than those with lower levels. This effect was more pronounced among women with the apoE4 genotype. Although apoE genotype did not correlate with risk of breast cancer in the crude analysis, it was observed a significantly higher dietary intake, consumption of fat, cholesterol, protein and carbohydrate among breast cancer affected women. These results indicate that the interaction between metabolism of dietary lipids and apoE genotype can modify the association between consumption of dietary fat, particularly sources of triglycerides, and breast cancer risk.

INTRODUCTION

Apolipoprotein E (apoE) is a 299-amino acid glycoprotein that is synthesized by most tissues throughout the body¹. ApoE plays an important role in lipid metabolism by mediating the binding of lipoprotein particles to the low density lipoprotein and apoE receptors². The structural gene for apoE (*APOE*) is polymorphic: there are three common isoforms, E2, E3, and E4, encoded by the $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$ *APOE* alleles, respectively, at a single locus on the long arm of chromosome 19. Substitutions of different amino acids at positions 112 and 158 modify the binding affinity of APOE to its receptor and have a major impact on total and LDL-cholesterol (LDL-C) levels in the serum¹.

The apoE2 protein differs from the wild-type protein, apoE3, by a single amino acid change resulting in a lower receptor binding activity for apoE-receptor and LDL-receptors resulting in a reduced clearance of apoE containing lipoproteins from the circulation³. The apoE4 variant differs from apoE3 in that a different amino acid substitution results in its higher affinity for the apoE-receptor and LDL-receptors resulting in a faster apoE containing lipoproteins clearance from the circulation³. In general, compared with individuals with the $\epsilon 3$ allele, levels of total and LDL-C tend to be lower for those with the $\epsilon 2$ allele and higher for those with the $\epsilon 4$ allele, that results from up- or down-regulation of the LDL-receptors expression in the hepatocytes as a consequence of lower or higher uptake of LDL-C and apoE containing lipoproteins by the liver, respectively, for those with the $\epsilon 2$ allele and those with the $\epsilon 4$ allele. This situation is true for the usual diet. When a subject is challenged with a high fat diet, those with the $\epsilon 2$ allele, will have lower capacity of clearing the apoE containing remnant particles from the circulation, resulting in a special presentation of dyslipidemia, called Type III, with the accumulation of remnant particles in the circulation (high in triglycerides besides cholesterol).

The apoE4 has been associated with increased risk for coronary heart disease⁴, and Alzheimer's disease⁵. The $\epsilon 4$ allele has also been related to breast carcinoma: in a study by Moysich *et al.* (1999)⁶, women with one or two copies of the $\epsilon 4$ allele and high blood triglycerides levels presented a fourfold risk of developing breast carcinoma when compared to women with low triglyceride levels.

Dietary fat intake has long been hypothesized to be associated with breast cancer risk^{7,8}. However, the results remain controversial, because not all studies show a positive risk association⁹. Evidence from animal studies suggests that only increased fat intake before the first pregnancy affects risk¹⁰. Most studies of cholesterol intake and risk of breast cancer have also not shown a risk association⁹. It has been suggested that the failure to identify an association of fat intake with breast cancer in these studies may be related to interindividual differences in fat consumption within populations, measurement errors (biases) inherent to dietary questionnaires, and also to the magnitude of these differences, which would not be sufficient to ensure detection through epidemiologic methods¹¹.

Blood levels of lipoproteins have also been investigated in relation to breast cancer etiology as a potential mediating effect of dietary fat on risk and as an independent risk factor. The associations between blood total cholesterol, high density

lipoprotein (HDL) cholesterol, LDL-C, and triglycerides levels have been widely studied, but results from these investigations are inconsistent. Some studies reported no adverse effect of lipoproteins^{12,13,14}; others reported excess risk associated with elevated total cholesterol levels^{15,16} and triglycerides^{17,18} or inverse associations with total cholesterol^{16,19} or HDL cholesterol levels^{20,21}.

Because apoE plays an important role in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and reverse cholesterol transport, the relationship between serum lipoproteins and *apoE* genotypes has been the focus of several studies^{22,23}. Current evidence shows higher serum triglyceride concentrations in patients with one $\epsilon 4$ allele, compared to those with a homozygous E3E3 genotype²². Studies in rats have evaluated the role of $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ isoforms in the catabolism and metabolism of HDL and showed that presence of the $\epsilon 4$ isoform results in elevated LDL-C levels in plasma and a small but significant decrease in HDL levels, including situations in which these animals were fed a diet rich in fats²³.

Since there is compelling evidence that apoE modifies the association between dietary intake and blood levels of lipids, the aim of this study was to assess allelic and genotypic frequencies of apolipoprotein E polymorphisms and their relationship to cardiovascular risk factors in a sample of Brazilian women with and without breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

The study was designed as case-control and participants were recruited from the Núcleo Mama Porto Alegre Project (NMPOA) cohort. The cohort was initiated in 2004 and comprises 9.218 women which were enrolled at ages > 15 years and who will be followed clinically and by mammographic screening (those between ages 40-69 years) for 10 years²⁴. The cohort includes women from socially vulnerable areas in the periphery of the city of Porto Alegre, Southern Brazil.

Sample and Recruitment

Considering the average frequency of the $\epsilon 4$ allele (5.4%) previously described in a sample of Taiwanese women without breast cancer risk²⁵ and a power of 80%, confidence intervals at 95% and a case-to-control ratio of 1:3, we estimated an ideal sample size of 52 cases and 156 controls. The case group included women with pathologically-proven *in situ* or invasive breast carcinoma. All patients women with breast cancer from NMPOA were invited to participate and those willing to participate joined the group "cases". The control group consisted of women with no current or prior breast cancer diagnosis and these patients were randomly selected from a subset of women without breast cancer from the cohort which were consecutively recruited in the year 2007 for another study²⁶. Using these criteria, the final study sample that was obtained from the cohort participants was of 47 cases and 167 controls. All patients were included only after the explanation of the study goals and procedures and after signature of informed consent.

Data collection

The interviews were conducted by trained investigators. Each interview lasted, on average, 45 minutes. The interview included application of a previously validated food frequency questionnaire of 98 items²⁷. Nutritional calculations were performed using the Virtual Nutri software, version 1.0²⁸. Additional variables that were assessed included age, age at menarche, age at first pregnancy, period of exclusive breastfeeding (months), number of children, menopausal status, medications used and physical activity.

Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height squared (m^2). The BMI cutoff points adopted were those recommended by the World Health Organization²⁹: underweight (BMI < 18.5 kg/m^2), normal weight (BMI 18.5 to 24.99 kg/m^2), overweight (BMI 25 to 29.99 kg/m^2) and obesity (BMI > 30.00 kg/m^2). The abdominal circumference (AC) was measured midway between the lower rib and iliac crest with a measuring tape. Physical activity was defined as any exercise for 20-30 min at least three times a week, during leisure time in the previous 90 days. Three measurements of systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure were taken on the right arm with an appropriately sized cuff using a mercury sphygmomanometer. BP measurements were taken early in the morning, after a 5-min initial rest and subsequently at 2-min intervals between each measurement, and after 30 or more minutes of the last caffeine intake or cigarette smoked. Blood pressure was considered as the arithmetic mean of the second and third measurements³⁰.

Women without breast cancer had their risk for the disease estimated by the Gail Model, and the estimated risk was expressed as current (in 5 years) and cumulative risk (up to 90 years of age) of developing breast cancer³¹.

Laboratory Analyses

Genomic DNA was extracted from peripheral blood (5 ml) collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). *APOE* genotyping was performed by PCR-RFLP as described by Hixson *et al* (1990)³². Briefly, the 244pb amplicon obtained by PCR was enzyme restricted using *HhaI* and resulted in fragments of different sizes which were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis as follows: (a) fragments of 91 and 83 bp for genotype E2E2, (b) fragments of 91, 48 and 35 bp for genotype E3E3 (c) fragments of 72, 48 and 35 bp for genotype E4E4. Throughout the manuscript we describe collectively the genotypes E3E3 as apoE3, the genotypes E2E3 and E2E4 as apoE2 and the genotypes E3E4 and E4E4 as apoE4.

Biochemical analyses were performed on venous blood obtained after 12 hours recommended overnight fasting. Samples were collected in tubes without anticoagulants for the quantification of lipids and glucose. For result analyses, the following normal values were considered: plasma total cholesterol \leq 200 mg/dL, plasma triglycerides \leq 150mg/dL; plasma HDL > 50mg/dL; plasma LDL-C \leq 160mg/dL³³. LDL-C was calculated by Friedewald's formula³⁴: $LDL-C = TotalChol - (HDLChol - Trig/5)$. Diabetes was defined by fasting glucose levels \geq 126 mg/dL and/or through referring current use of oral hypoglycemic drugs or insulin³⁵.

Statistical Analyses

SPSS version 18.0 was used for data analyses. To evaluate the differences in demographic, anthropometric, lifestyle, gynecological, and obstetrical characteristics between the two groups we used Student t test for normally distributed variables, Mann-Whitney test for non-parametric variables without a normal distribution and chi-square test for categorical variables. Logistic regression was used to calculate the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for the *apoE* polymorphism. ORs were adjusted by the dietary consumption of protein, fats, carbohydrate and cholesterol. The variables age, age at menarche, age at menopause and number of children were not included, because p-values were not < 0.20 after logistic regression analyses.

Ethical considerations.

All the participating investigators were trained and blinded for the results of genetic and biochemical analyses during patient interviews. The study was approved by the ethics committees of participating institutions (Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Hospital Moinhos de Vento). Written informed consent was obtained from all subjects enrolled.

RESULTS

Demographic, anthropometric, gynecological, obstetric history and lifestyle characteristics of breast cancer cases and controls are presented in Table 1. There was no difference between groups regarding mean age and height, BMI median, waist circumference, age at menarche, menopausal status, fasting glucose, systolic and diastolic blood pressure and number of children. The percentage of menopausal women in both groups was similar and no differences were obtained regarding the prevalence of diabetes between cases and controls. No difference was obtained in the use of medications, physical activity practice and blood pressure between the two groups. There was a significant difference in use of statins between groups. However, because only two subjects were using the medication in the case group, this variable was not used in the analysis.

Women with breast cancer had an earlier age at birth of the first child and tended to breastfeed longer, but this difference was not significant. In relation to estimated risk for developing breast cancer in the control group, the median current estimated risk was 1% (0.7 - 1.4) and the median lifetime estimated risk was 7.7% (6.1 - 10.0). The distribution of *apoE* genotypes in the overall sample and in cases vs. controls followed the Hardy-Weinberg equilibrium. No significant differences in genotype frequencies were observed in women with and without breast cancer ($p>0.05$).

The distribution of *apoE* genotypes in the total sample and by disease status is shown in Table 2. Most participants (80.8%) had at least one $\epsilon 3$ allele, 17.3% had one $\epsilon 2$ and 1.9% had one $\epsilon 4$ allele. In general, participants with the $\epsilon 4$ allele tended to have higher serum triglycerides, total cholesterol LDL-C levels and higher HDL cholesterol levels than participants homozygous for $\epsilon 3$ and participants with the $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ alleles, what is expected because of the higher affinity of $\epsilon 4$ allele for the *apoE*- and LDL-receptors. In the Breast Cancer Case Group, those with the $\epsilon 2$ allele, presented the highest levels of total cholesterol and LDL-C and high levels of triglycerides (except for one case of

homozygous for $\epsilon 4$ allele, an exception) what can be related to the higher fat intake in the cases than controls (see in the discussion, the Dyslipidemia Type III comment).

Comparing blood lipoprotein levels among cases and controls there were no significant differences between groups. However, there was a difference between dietary intake among cases and controls: the case group reported higher consumption of fats ($p = 0.020$), cholesterol ($p = 0.017$), protein ($p = 0.031$) and carbohydrates ($p = 0.043$), as shown in Table 3.

There was no difference in estimated risk for breast cancer between women with the apoE4 genotype (RR = 0.95, 95% CI = 0:44 to 2:03) as compared to those with the apoE3 genotype (reference category). The analysis of allelic distribution between the two groups, showed that the presence of the $\epsilon 2$ allele was positively associated with the absence of breast cancer, whereas the $\epsilon 4$ was associated positively with patients with the disease ($p < 0.001$), as described previously (Table 4). Moreover, the concomitant presence of $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ alleles was positively associated with the absence of breast cancer and homozygous e4/e4 with the presence of the disease ($p = 0.021$), suggesting a dominant negative effect of the e2 allele over the e4 allele.

DISCUSSION

This is the first study to investigate the relationship between serum lipoproteins, *apoE* genotype and breast cancer risk in Brazilian women. The relevance of the *APOE* gene to this particular disease is important since APO E is part of a broader paradigm highlighting the crucial role of gene-environment interactions as risk factors for a variety of human diseases¹. Total cholesterol, HDL and LDL-C blood levels were not associated with risk in this series and the stratification by *apoE* genotype did not substantially affect these observations. However, we observed evidence for greater breast cancer risk in women with elevated triglyceride levels, particularly among women with the apoE4 (E3E4 and E4E4) genotype. In addition, women diagnosed with breast cancer in this series reported higher intakes of dietary cholesterol ($p = 0.017$), fat ($p = 0.020$), carbohydrate ($p=0.043$) and protein ($p=0.031$).

Previous studies have reported increased risk of breast cancer in association with elevated triglyceride levels^{20,21,37}, and biologic mechanisms for this association have been postulated. Increased triglyceride levels have been shown to be associated with decreased levels of sex hormone binding globulin, resulting in elevated levels of free estradiol and subsequently increased risk of breast cancer³⁷. Furthermore, hypertriglyceridemia could be related to risk of breast cancer, because of its association with insulin resistance^{38,39}. Insulin resistance is also linked to increased sex steroids levels in association with decreased sex hormone binding globulin levels, as well as with increasing bioactive levels of insulin-like growth factor I, which may act synergistically with estrogen in promoting breast cancer⁴⁰. A possible reason for this is that the ApoE polymorphism modifies the protein both in its structure and its function. The E2 isoform generates a protein whose binding to the LDL-C receptor is defective. In the other hand, the E4 isoform has a protein whose affinity for the LDL-C receptor is four times higher than by LDL-C itself, resulting in a faster apoE containing lipoproteins clearance from the circulation that results in down-regulation of the LDL-receptors

expression in the hepatocytes as a consequence of higher uptake of LDL-C and apoE containing lipoproteins by the liver, leading to higher plasma lipid levels in those individuals⁴¹. Our findings corroborate this association. In our study, we demonstrate that elevated triglyceride levels are associated with breast cancer risk among women with the *apoE4* genotype which has been shown to be related to triglyceride levels in previous studies^{42,43}. Women with the *apoE4* genotype had higher levels of total cholesterol, LDL-C and triglycerides than those with *apoE3* genotype, and this effect was pronounced in both groups (Table 2). Thus, we suggest that the observed strong risk elevation among women with the *apoE4* genotype may be an effect of reduced triglyceride-rich lipoproteins clearance from plasma, resulting in continuous elevated concentrations, which could result in decreased sex hormone binding globulin levels. Moreover, we demonstrate that women with $\epsilon 4$ homozygotes had higher levels of triglycerides and fasting glucose. Another interesting finding of our study is that in the Breast Cancer Case Group, those with the $\epsilon 2$ allele, presented the highest levels of total cholesterol and LDL-C and high levels of triglycerides (except for one case of homozygous for $\epsilon 4$ allele, an exception) what can be related to the higher fat intake in the cases than controls, what happens in the Type III Dyslipidemia: when a subject is challenged with a high fat diet, those with the $\epsilon 2$ allele, will have lower capacity of clearing the apoE containing remnant particles from the circulation, resulting in a special presentation of dyslipidemia, called Type III, with the accumulation of remnant particles in the circulation (high in triglycerides besides cholesterol).

Studies in rats have attempted to establish the role of $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ isoforms in metabolism and catabolism of HDL, suggesting that the presence of the $\epsilon 4$ isoform implies in slightly elevated plasma LDL-C levels and a small but significant decrease in HDL, even among animals fed a fat-rich diet²³. In our study, we observed lower serum levels of HDL in the total sample (48.5 +11.1) and especially in those individuals with the E4 genotype. However, we did not observe lower LDL-C levels in women of with the E4E4 genotype, possibly due to small sample size in this group. These findings could be associated with a higher speed in the catabolism of lipoproteins in individuals with the $\epsilon 4$ allele compared to those with the $\epsilon 3$ allele. As a consequence, higher catabolism of remnant lipoproteins in $\epsilon 4$ individuals could lead to a deficit of hepatic lipoproteins receptors, resulting in an increase of circulating LDL-C, one of the largest contributors to risk of atherosclerosis. In this study, we observed also a higher consumption of fats, cholesterol, protein and carbohydrate in women with breast cancer compared to those without cancer. It is known that a high fat diet can induce insulin resistance⁴⁴ and that the resulting chronic hyperinsulinemia and increased availability of IGF-1 may stimulate breast tumor growth. However, epidemiological studies on the association of heightened levels of IGF-1 with breast cancer incidence have come down on both sides of this issue.

Some methodological issues should be considered in interpreting these findings. As in most epidemiological studies, we cannot rule out the potential effects of biases on our results. Our findings were based on a small sample which is not necessarily representative of Brazilian women. However, even considering the small number of individuals in different groups, the distribution of apolipoprotein E allelic frequency was similar to that observed in other studies^{45,46}. An inherent problem in case-control studies utilizing biological specimen relates to the possibility that the

disease process or treatment may have affected the measurements in cancer-affected individuals. There has been some speculation around the hypothesis that blood lipid levels could be affected by surgery as part of the metabolic and neuroendocrine response to the procedure⁴⁶, although posterior studies demonstrate that triglyceride levels were almost identical in blood samples obtained before and after breast cancer surgery⁴⁷. There is evidence that blood lipid levels can be affected by chemotherapy and tamoxifen treatment^{36,49,50}. However, the results of the present study seem not to have been affected by these changes in serum lipoproteins in relation to cancer treatment, because of the following observations: the vast majority of cases had not undergone adjuvant treatment at the time of blood draw and lipoprotein levels of those who have received chemotherapy were similar to the levels of women without such treatment. However, the possibility remains that the observed differences in the blood triglyceride levels for the cases and controls resulted from the disease process and are not an indicator of exposure. Furthermore, substantial intraindividual variability in serum triglyceride concentrations has been reported⁵¹. Although it is unlikely that this variability is related to disease status, it is possible that the triglyceride blood values for only one point of time do not reflect the degree of stability of triglyceride levels in this population.

In summary, in this case control study, women with elevated triglyceride levels were found to be at greater risk of breast cancer than those with lower levels. This effect was more pronounced among women with the apoE4 genotype. Although apoE genotype did not correlate with risk of breast cancer in the crude analysis, when the analysis was stratified by dietary intake, consumption of fat, cholesterol, protein and carbohydrate, we observed a significantly higher intake of these micronutrients among breast cancer-affected women. These results indicate that the interaction between metabolism of dietary lipids and apoE genotype can modify the association between consumption of dietary fat, particularly sources of triglycerides, and breast cancer risk.

REFERENCES

1. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988; 240(4852):622-30.
2. Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor related protein, LRP, is an apolipoprotein E binding protein. *Nature*. 1989; 341:162-164.
3. Breslow JL. Genetic basis of lipoprotein disorders. *J Clin Invest*. 1989 August; 84(2): 373-380.
4. Davignon J, Gregg RE, Sing CF, *et al*. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1988; 8:1-21.
5. Kuusisto J, Koivisto K, Kervinen K, *et al*. Association of apolipoprotein phenotypes with late onset Alzheimer's disease: Population based study. *BMJ*. 1994; 309:636-638.
6. Moysich KB, Freudenheim JL, Baker JA, Ambrosone CB, Bowman ED, Schisterman EF, Vena JE, Shields PG: Apo E4 gene linked to breast cancer. *Brit Med*. 1999; 319: 662.
7. Cibeira GH; Guaragna, RM. Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. *Rev Nutr Cam*. 2006; 19(1): 65-75.
8. Buck K, Vrieling A, Flesch-Janys D, Chang-Claude J. Dietary patterns and the risk of postmenopausal breast cancer in a German case-control study. *Cancer Causes Control*. 2010 Nov 26.
9. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR, *et al*. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer pooled analysis. *N Engl J Med*. 1996; 8;334(6):356-61.
10. Ip C. Controversial issues of dietary fat and experimental mammary carcinogenesis. *Prev Med*. 1993; 22(5):728-37.
11. Bingham SA, Gill C, Welch A, *et al*. Comparison of dietary assessment methods in nutritional epidemiology: Weighted records v. 24 h recalls, food frequency questionnaires and estimated-diet records. *Br J Nutr*. 1994; 72(4):619-643.
12. Hiatt RA, Friedman GD, Bawol RD, Ury HK. Breast cancer and serum cholesterol. *J Natl Cancer Inst*. 1982; 68(6):885-9.
13. Morris DL, Borhani NO, Fitzsimons E, Hardy RJ, Hawkins CM, Kraus JF, Labarthe DR, Mastbaum L, Payne GH. Serum cholesterol and cancer in the Hypertension Detection and Follow-up Program. *Cancer*. 1983; 52(9):1754-9.
14. Tornberg SA, Holm LE, Carstensen JM. Breast cancer risk in relation to serum cholesterol, serum beta-lipoprotein, height, weight, and blood pressure. *Acta Oncol*. 1988; 27(1):31-7.
15. Gerber M, Cavallo F, Marubini E, *et al*. Liposoluble vitamins and lipid parameters in breast cancer. A joint study in northern Italy and southern France. *Int J Cancer*. 1988; 42(4):489-494.
16. Vatten LJ, Foss OP. Total serum cholesterol and triglycerides and risk of breast cancer: A prospective study of 24 329 Norwegian women. *Cancer Res*. 1990; 50(8):2341-6.
17. Potischman N, McCulloch CE, Byers T, Houghton L, Nemoto T, Graham S, Campbell TC. Associations between breast cancer, plasma triglycerides, and cholesterol. *Nutr Cancer*. 1991; 15(3-4):205-15.

18. Agurs-Collins T, Kim KS, Dunston GM, Adams-Campbell LL.. Plasma lipid alterations in African-American women with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998; 124(3):186-190.
19. Sharma V, Sharma A. Serum cholesterol levels in carcinoma of the breast. *Indian J Med Res.* 1991; 94(6):193-6.
20. Hoyer AP, Engholm G. Serum lipids and breast cancer risk: A cohort study of 5 207 Danish women. *Cancer Causes Control.* 1992; 3(5):403-480.
21. Kokoglu E, Karaarslan I, Karaarslan HM, Baloglu H. Alterations of serum lipids and lipoproteins in breast cancer. *Cancer Lett.* 1994; 82(2):175-8.
22. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J. Lipid Res. V.* 1992; 33(4):447-454.
23. Puglielli, L.; Tanzi, R.E.; Kovacs, D.M. - Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 2003; 6: 345-51.
24. Caleffi M, Ribeiro RA, Duarte Filho DL, Ashton-Prolla P, Bedin AJ Jr, *et al.* A model to optimize public health care and downstage breast cancer in limited-resource populations in southern Brazil Porto Alegre. *Breast Health Intervention Cohort. Public Health.* 2009; 9(13):83-91.
25. Chang SJ, Hou MF, Tsai SM, Kao JT, Wu SH, Hou LA, Tsai LY, *et al.* Association between the apolipoprotein E genotypes and breast cancer patients in Taiwanese. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2006; 98(1):109-13.
26. Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 2008; 261(1):21-5.
27. Salvo V, Gimeno SGA. Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência de consumo de alimento. *Rev Saúde Pública.* 2002; 36(4):505-12
28. Philippi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. Virtual Nutri [programa de computador]. Versão 1.0 for Windows. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Departamento de Nutrição; 1996.
29. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii,1-253.
30. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, *et al.* 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: 2560-2572.
31. Veronesi U, Luini A; Costa A, *et al.* *Mastologia oncológica*, p.242, 2002.
32. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31(3): 545-548.
33. ____ IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 88, Suplemento I, Abril 2007.*
34. Friedewald WT, Levey RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499-502.

35. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, *et al.* Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003; 26:3160-3167.
36. Potischman N, Byers T, Houghton L, Root M, Nemoto T, Campbell TC. . Effects of breast cancer treatment on plasma nutrient levels: Implications for epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992; 7:555-9.
37. Takatani O, Okumoto T, Kosano H. Genesis of breast cancer in Japanese: A possible relationship between sex hormone binding globulin (SHBG) and serum lipid components. *Breast Cancer Res Treat.* 1991;18(suppl 1):527-529.
38. Bruning PF, Bonfrer JMG, Van Noord PAH, Hart AA, de Jong-Bakker M, Nooijen WJ. Insulin resistance and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 1992; 52(4):511-516.
39. Steiner G. Hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia. *J Int Med.* 1994; 736(suppl):23-26.
40. Stoll BA. Essential fatty acids, insulin resistance, and breast cancer risk. *Nutr Cancer.* 1998; 31(1):72-77.
41. Curtiss LK. ApoE in atherosclerosis: a protein with multiple hats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(8):1852-3. No abstract available
42. Dart A, Sherrard B, Simpson H. Influence of apoE phenotype on postprandial triglyceride and glucose responses in subjects with and without coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 1997; 130(1-2):161-170.
43. Bergeron N, Havel RJ. Prolonged postprandial response of lipids and apolipoproteins in triglyceride-rich lipoproteins of individuals expressing on apolipoprotein epsilon 4 allele. *J Clin Invest.* 1996; 97(1):65-72.
44. Pischon T, Nothlings U, Boeing H: Obesity and cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 67(2), 128–145 (2008).
45. Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein in African- American and white young adults. *Am J Epidemiol.* 1998; 148(9):859-868.
46. Moysich KB, Freudenheim JL, Baker JA, Ambrosone CB, Bowman ED, Schisterman EF, Vena JE, Shields PG. Apolipoprotein E genetic polymorphism, serum lipoproteins, and breast cancer risk. *Mol Carcinog.* 2000; 27(1):2-9.
47. McNamara JJ, Molot M, Dunn R, Burran EL, Stremple JF. Lipid metabolism after trauma. Role in the pathogenesis of fat embolism. *J Thoracic Cardiovasc Surg.* 1972; 63(6):968-972.
48. Goodwin PJ, Boyd NF, Hanna W, Hartwick W, Murray D, Qizilbash A, Redwood S, Hood N, DelGiudice ME, Sidlofsky S, McCready D, Wilkinson R, Mahoney L, Connelly P, Page DL. Elevated levels of plasma triglycerides are associated with histologically defined premenopausal breast cancer risk. *Nutr Cancer.* 1997; 27:284-292.
49. Chang NW, Chen FN, Wu CT, Lin CF, Chen DR. Apolipoprotein ε4 allele influences the response of plasma triglyceride levels to tamoxifen in breast cancer patients. *Clin Chim Acta.* 2009; 401(1-2):144–7.
50. Thangaraju M, Kumar K, Gandhirajan, Sachdanandam P. Effect of tamoxifen on plasma lipids in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer.* 1994; 73(3):659-663.
51. Wasenius A, Stugaard M, Otterstad JE, Froyshov D. Diurnal and monthly intra-individual variability of the concentration of lipids, lipoproteins and apoproteins. *Scand J Clin Lab Inv.* 1990;50(6):635-642.

TABLES

Table 1. Clinical and Demographic Characteristics of Cases and Controls

	Cases n=47		Controls n=167		P-value
	n (%)	Med. (IIQ or SD)	n (%)	Med. (IIQ or SD)	
Age (Years) [#]		57.6 (10.6)		56.1 (8.1)	0.295
Weight (kg) *		66.7 (13.5)		68.5 (20.1)	0.559
Height (m) [#]		1.56 (0.06)		1.55 (0.06)	0.175
BMI (kg/m ²) *		28.2 (5.9)		28.9 (7.2)	0.206
Abdominal Circumference (cm) *		93.0 (17.0)		94.0 (17.0)	0.850
Age at Menarche (years) *		13.0 (3.0)		13.0 (2.0)	0.584
Age at the First Pregnancy (years) *		20.0 (5.0)		22.0 (8.0)	0.365
Exclusive Breastfeeding (months) *		15.0 (45.0)		12.0 (32.0)	0.526
Number of Children ¥					
1 –3	32 (68.1)		117 (70.1)		
≥ 4	13 (27.7)		39 (23.4)		0.730
Menopausal Status ¥					
Yes	31 (67.4)		102 (61.1)		0.434
Fasting Glucose ¥		98.0 (17.0)		99.0 (19.0)	0.579
Systolic Blood Pressure (mm/Hg)	130.0 (20.0)		130.0 (20.0)		0.776
Diastolic Blood Pressure (mm/Hg)	80.0 (10.0)		80.0 (10.0)		0.538
Use of Anti hipertensive medication ¥					
Yes	23 (48.9)		83 (50.0)		0.898
Use of Hypoglycemic medication ¥					
Yes	5 (10.6)		16 (9.6)		0.839
Use of Antidyslipidemic medication ¥					
Yes	2 (4.3)		23 (13.9)		0.071

Hormone Therapy Use	¥			
Yes		5 (11.1)	33 (19.8)	0.179
Contraceptive Use	¥			
Yes		34 (73.9)	133 (79.6)	0.403
Physical Activity	¥			
Yes		14 (29.8)	57 (34.1)	0.576

Average and Standard Deviation (SD), T-test; * Median and Interquartile Range (IIQ), Mann-Whitney Non-parametric Test; ¥ n (%); Chi-Square Test.

Table 2. Mean Serum Lipoproteins by apoE Genotype in Breast Cancer Patients and Community Controls

Genotype	n (%)	Total serum cholesterol (mg/dL)	Serum HDL (mg/dL)	Serum LDL-C* (mg/dL)	Serum triglyceride (mg/dL)	Fasting Glucose (mg/dL)
		Average (SD)	Average (SD)	Average (SD)	Average (SD)	Average (SD)
Total Sample (n=212)						
E2E3	20 (9.4)	210.3 (47.9)	56.0 (21.1)	121.7 (44.9)	162.7 (103.3)	107.9 (34.4)
E2E4	17 (8.1)	185.0 (32.7)	53.6 (11.2)	100.7 (31.3)	153.2 (83.1)	101.8 (23.9)
E3E3	119 (56.1)	201.3 (45.8)	51.4 (14.6)	117.5 (42.7)	165.8 (84.0)	110.4 (33.2)
E3E4	52 (24.5)	216.9 (52.4)	50.1 (13.8)	131.2 (49.9)	177.9 (116.5)	103.3 (33.4)
E4E4	4 (1.9)	187.2 (22.1)	48.5 (11.1)	159.2 (56.3)	242.7 (123.9)	107.7 (21.1)
Cases (n=47)						
E2E3	4 (8.5)	253.5 (72.5)	51.0 (14.1)	166.3 (56.4)	181.0 (159.3)	90.5 (6.1)
E3E3	28 (59.6)	189.9 (55.2)	48.4 (12.1)	109.7 (51.4)	159.1 (61.8)	111.3 (39.6)
E3E4	12 (25.5)	194.7 (50.3)	50.2 (15.2)	116.3 (45.4)	141.6 (86.9)	108.6 (63.4)
E4E4	3 (6.4)	195.3 (18.4)	43.7 (6.6)	114.2 (35.9)	187.3 (67.9)	114.3 (20.2)
Controls (n=165)						
E2E3	16 (9.7)	199.5 (35.2)	57.2 (22.7)	110.6 (35.4)	158.1 (91.3)	112.2 (37.3)
E2E4	17 (10.3)	185.0 (32.6)	53.6 (11.1)	100.7 (31.3)	153.2 (83.1)	101.8 (23.9)
E3E3	91 (55.2)	204.8 (42.3)	52.3 (15.2)	119.9 (39.7)	167.8 (89.9)	110.1 (31.2)
E3E4	40 (24.2)	223.6 (51.8)	50.1 (13.6)	135.7 (50.9)	188.8 (122.8)	101.6 (17.1)
E4E4	1 (0.6)	163	63	181.8	409.0	88.0

* Based on Friedewald's Equation: $LDL-C = \text{Coolest}_{\text{tot}} - HDL_{\text{cholest}} - (TRIG/5)$; SD: standard deviation

Table 3. Serum Lipoproteins and Dietary Intake among Breast Cancer Cases and Community Controls

	Cases (n= 47)	Controls (n=165)	P-value ‡
	Median (IIQ)*	Median (IIQ*)	
Dietary Fat Intake (g/day)	66.1 (33.6)	56.8 (21.7)	0.020
Dietary Cholesterol Intake (mg/day)	254.6 (127.9)	214.5 (124.4)	0.017
Dietary Protein Intake (g/day)	97.7 (38.7)	89.4 (35.9)	0.031
Dietary Carbohydrate Intake (g/day)	314.2 (128.9)	289.6 (127.1)	0.043
Serum Total Cholesterol(mg/dL)	193.0 (52.0)	209.0 (59.0)	0.070
Serum HDL (mg/dL)	47.0 (15.0)	50.0 (15.0)	0.166
Serum LDL-C (mg/dL)	108.0 (58.0)	121.2 (54.3)	0.154
Serum triglycerid (mg/dL)	151.0 (95.0)	150.0 (116.0)	0.656

*Median and Interquartile Range (IIQ); ‡ Mann-Whitney Non-parametric Test

Table 4. Allelic *apoE* distribution in cases and controls

	Allele			P-value*
	$\epsilon 2$ n (%)	$\epsilon 3$ n (%)	$\epsilon 4$ n (%)	
Cases	8 (8.5)	80 (85.1)	6 (6.4)	
Controls	66 (19.8)	266 (79.6)	2 (0.6)	
Total	74 (17.3)	346 (80.8)	8 (1.9)	<0.001

*Fischer's exact test between alleles and case-controls.

ANEXO I

PROTOCOLOS DAS ANÁLISES MOLECULARES

Protocolo de extração do DNA

Extração de DNA pelo Método de Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, EUA)

Solução de Lise de Hemácias (RBC)

5 mM Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)

1 mM EDTA pH 8,0

Solução de Lise Celular (CLS)

10 mM Tampão Tris pH 7,5

1 mM EDTA pH 8,0

1% SDS

Solução de Precipitação de Proteína

7,5 M Acetato de amônio (NH_4Ac)

Outros Agentes Utilizados

Isopropanol 100%

Etanol 70%

Tampão TE 1X

RBC

0,5 ml $MgCl_2$ 1 M

0,2 ml EDTA 0,5 M

100 ml água destilada

CLS

1 ml Tris 1 M

0,2 ml EDTA 0,5 M

10 ml SDS 10%

100 ml H₂O destilada

Etapa 1 – Lise Celular

- a) Adicionar 3 ml de sangue total a um tubo *falcon* de 15 ml contendo 9 ml da solução de lise RBC. Inverter o tubo e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Inverter pelo menos uma vez mais durante a incubação;
- b) Centrifugar por 10 minutos a 3400 RPM (2000g). Remover o sobrenadante, deixando um pellet visível de células brancas e 100-200 ul de líquido residual;
- c) Vortexar o tubo vigorosamente para ressuspender as células brancas no supernadante residual, o que facilita em muito a lise na etapa seguinte;
- d) Adicionar 3 ml da solução de lise celular ao tubo contendo as células ressuspendidas e misturar com pipeta de transferência diversas vezes até a solução ficar homogênea. Após misturar, nenhum resíduo celular (ou aglomerado de células) deve ser visível. Se houverem resíduos, incubar a 37°C até a solução ficar homogênea. A amostra é estável se armazenada nessa solução a temperatura ambiente por 18 meses.

Etapa 2 – Precipitação da Proteína

- a) Resfriar a amostra até a temperatura ambiente;
- b) Adicionar 1 ml da solução de precipitação de proteína ao lisado celular;
- c) Vortexar vigorosamente por 20 segundos para misturar a solução uniformemente com o lisado celular;
- d) Centrifugar a 3400 RPM por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um pellet marrom escuro e compacto;

Etapa 3 – Precipitação do DNA

- a) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo falcon de 15 ml contendo 3 ml de Isopropanol 100%;
- b) Inverter o tubo lentamente cerca de 50 vezes até que apareçam os “novelos” de DNA;
- c) Centrifugar a 3400 RPM por 3 minutos, o DNA será visível como um pellet branco pequeno;
- d) Retirar o sobrenadante e drenar o tubo em papel absorvente. Adicionar 3 ml de etanol 70%. Inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA;
- e) Centrifugar a 3400 RPM por 1 minuto. Retirar o sobrenadante cuidadosamente. O pellet poderá estar solto, por isso é preciso inverter o tubo lenta e cuidadosamente para não perdê-lo;
- f) Drenar o tubo em papel absorvente e deixar a amostra “secar” a temperatura ambiente por 15 minutos;

Etapa 4 – Hidratação do DNA

- a) Adicionar 200-250 μ l de tampão TE 1X que resulta em uma concentração aproximada de 400 μ g/ μ l. Deixar o DNA hidratar neste tampão a temperatura ambiente por 12-24 horas ou alternativamente, incubar o DNA a 65° C por 1 hora;
- b) Armazenar o DNA a 2-8°C.

Protocolo de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) do Polimorfismo da Apolipoproteína E

Componentes

Componente	Concentração	Concentração	Volume por reação (μ l)
	Estoque	final	
Água	Qsp	qsp	15,0
Tampão	10X	1X	2.0
MgCl ₂	50 mM	1.6 mM	1.0
DNTP	2 mM	0.04 mM	2.0
Primer Forward	20 μ mol	0.4 μ mol	1.5
Primer Reverse	20 μ mol	0.4 μ mol	1.5
Taq platinum	5 unidades/ μ l	1 unidade	1.0
DNA	20 ng/ μ l	100 ng/ μ l	1.0
Total	---	---	25

Programa para o PCR no Termociclador *Eppendorf Mastercycler*:

- a) 94°C 3 minutos
- b) 94°C 30 segundos
- c) 60°C 1 minuto
- d) 72°C 30 segundos do passo b até passo d – 35 ciclos
- e) 72°C 5 minutos

Protocolo de confecção do gel de agarose a 2%

Componentes:

2 g agarose

7 µl brometo de etídio (1 µg/ml)

100 ml tampão TBE 1X

Protocolo de Clivagem do polimorfismo da *Apolipoproteína E*

Componentes:

Água 12,3 µl

Buffer 2 µl

BSA 0,2 µl

Enzima *HhaI* 0,5 µl

Protocolo de Diluição da Solução mãe Acrilamida (30%)

Componentes:

29g de acrilamida

1gr de Bis – acrilamida

Água para 100ml

Protocolo de Gel de Poliacrilamida (8%)

Componentes:

2,5ml TBE 10X

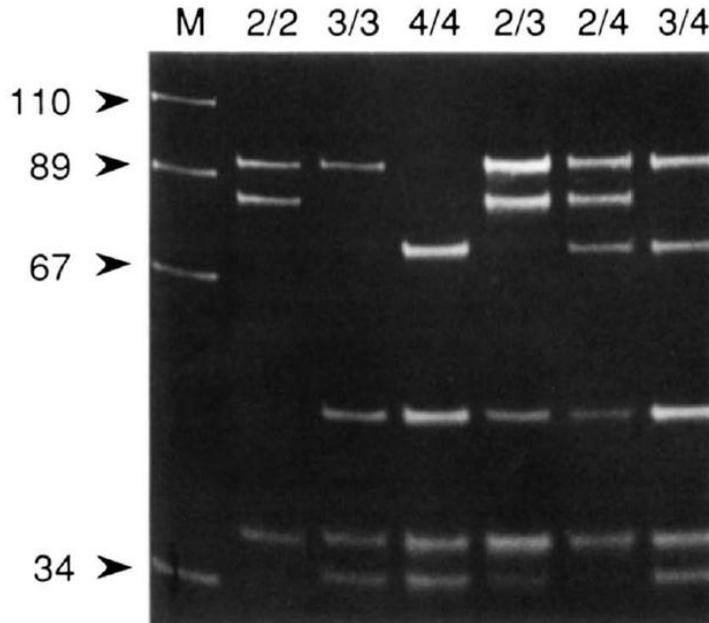
6,67ml Acrilamida 30%

1,75ml de Glicerol

14ml de Água

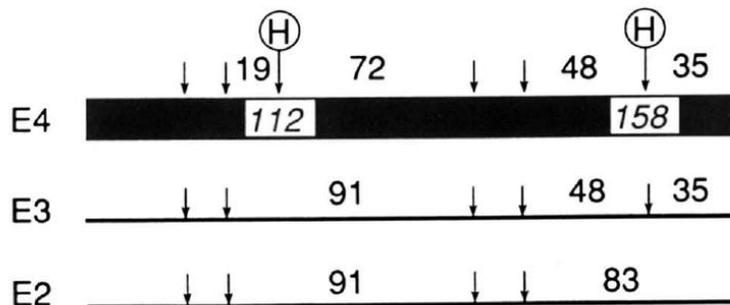
ANEXO II

Figura. 2. Clivagem com *HhaI* e separação por eletroforese de fragmentos de *HhaI* após a amplificação de DNA de indivíduos com as isoformas conhecidas de *APOE*.



A figura acima mostra um gel de poliacrilamida depois da eletroforese de fragmentos de *HhaI* de um homocigoto E2/E2 (2/2), homocigoto E3/E3 (3/3), homocigoto E4/E4 (4/4), heterocigoto E2/E3 (2/3), heterocigoto E2/E4 (2/4) e heterocigoto E3/E4 (3/4). Os tamanhos das bases de DNA são mostrados no lado esquerdo do gel.-.

Figura. 3. Clivagem com enzima de restrição *HhaI*



A figura mostra um mapa de clivagem por *HhaI* dado por seqüências amplificadas, no qual as setas para baixo mostram os sítios. O E4 é mostrado na linha preenchida, contendo os códons 112 e 158, o E3 e o E2 são mostrados abaixo do E4. As distâncias (em pares de bases) entre os sítios polimórficos de *HhaI* (H circulado) que distinguem as isoformas são mostrados para cada mapa de clivagem.

ANEXO III

CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 08-070

Versão do Projeto: 18/04/2008

Versão do TCLE: 18/04/2008

Pesquisadores:

EMILIO HIDEYUKI MORIGUCHI
PATRICIA ASHTON PROLLA
MAIRA CALEFFI
JULIANA GIACOMAZZI
BERNADETE WEBER
GABRIELA HERRMANN CIBEIRA

Título: FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DA APOLIPROTEÍNA E (APOE) E FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EM MULHERES COM E SEM CÂNCER DE MAMA.

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular Nº 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 05 de maio de 2008.

Profª Nadirte Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

ANEXO IV

CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO INSTITUTO DE EDUCAÇÃO DE PESQUISA DO HOSPITAL MOINHOS DE VENTO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E COMISSÃO CIENTÍFICA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão Científica do Instituto de Educação e Pesquisa Hospital Moinhos de Vento, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/CNS/MS como Comitê de Ética em Pesquisa da Associação Hospitalar Moinhos de Vento - HMV, analisaram o projeto:

Projeto CEP/IEP-AHMV: 2008/86

Título: CARACTERIZAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE DA APOPROTEÍNA E (APOE) E FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

Pesquisador Responsável: PATRICIA ASHTON PROLLA

Este projeto de pesquisa foi **APROVADO**, seguindo as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa poderá ser iniciado e toda e qualquer alteração no projeto deverá ser comunicada ao CEP/IEPHMV.

Porto Alegre, 24 de Março de 2009.


Sérgio Amantêa
Coordenador do CEP-IEPHMV

ANEXO V

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização da associação entre polimorfismos do gene da apolipoproteína E (ApoE) e fatores de risco cardiovascular

Justificativa e objetivos da pesquisa:

Este é um estudo de pesquisa que será feito com mulheres pertencentes ao Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA) que tem como objetivo verificar a associação entre os polimorfismos do gene da ApoE e os fatores de risco e morbidades cardiovasculares em mulheres com e sem câncer de mama. Pretendemos facilitar o entendimento dessa relação, já que existem poucas pesquisas realizadas com a população brasileira. Coletaremos o seu sangue somente uma vez e o analisaremos em laboratório especializado. Determinaremos a incidência do polimorfismo de uma proteína presente no sangue (a ApoE) e suas possíveis associações com doenças cardiovasculares e câncer de mama. Analisaremos também a taxa de alguns outros componentes do seu sangue, como colesterol, glicose, triglicerídeos e creatinina, entre outros. Ao longo do estudo, novas informações poderão surgir e a análise de novos polimorfismos associados ao risco para doenças cardiovasculares poderá ser realizada com o seu material já coletado.

Procedimentos e Riscos ou desconfortos potenciais:

Informações sobre fatores de risco e estilo de vida serão obtidas através de questionário específico aplicado uma única vez no momento da coleta do material. O questionário é composto por 103 perguntas que serão respondidas uma única vez. O tempo médio para você respondê-lo é de, aproximadamente, 30 minutos. Para estudar as características genéticas será coletada uma pequena amostra de seu sangue (10 ml) em dois frascos uma única vez. As amostras serão analisadas no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão analisadas por equipe especialmente treinada para este fim, o que diminui as chances de complicações. Os dados genéticos humanos coletados em nossa pesquisa só poderão ser utilizados para outros projetos se for obtido o consentimento prévio do indivíduo doador ou seu representante legal e mediante a elaboração de novo protocolo de pesquisa, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, se for o caso, da Comissão Nacional de ética em Pesquisa (CONEP). Caso isso venha a acontecer, você será contatado para conceder ou não autorização para uso do material em futuros projetos. O material somente será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e pela CONEP (quando for o caso).

Benefícios esperados

Nós ainda não sabemos qual a relação exata entre estes "polimorfismos genéticos", as doenças cardiovasculares e o câncer de mama em mulheres do Rio Grande do Sul, e este estudo está sendo conduzido justamente para tentar verificar tal associação. Este trabalho poderá ou não beneficiar sua família futuramente. Esse benefício provavelmente não será direto para a sua pessoa, pois é um estudo inicial cujos resultados deverão ser confirmados

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
05/05/2008
mx 08070

GPPG - Recebido

18 ABR. 2008

Por: ba g Nº 08070

1

posteriormente em uma análise em muitas mulheres adicionais, por um número maior de anos. Entendemos que estudos genéticos adicionais poderão auxiliar no esclarecimento dos fatores de risco cardiovasculares bem como na prevenção de doenças relacionadas. Caso alguma informação derivada deste estudo for importante para você e sua família todo o esforço será realizado para informá-los.

Você tem o direito de recusar-se a participar deste projeto e sua recusa não afetará de nenhuma maneira o seu cuidado (ou de seus familiares) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre ou no NMPOA.

Pesquisadores responsáveis: Gabriela Herrmann Cibeira, Dr Emilio Moriguchi e Dr^a
Patricia Ashton-Prolla - Telefone: 3315 8641

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
05.105.1208
MC 08070

2

Nome e assinatura do participante

Local e data

Pesquisadores responsáveis: Gabriela Herrmann Cibeira, Dr Emilio Moriguchi e Dr^a
Patricia Ashton-Prolla
Telefone: 33 15 8641

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
05.05.2008
nr 08070

4

ANEXO VI

FICHA DE LEVANTAMENTO DE DADOS DO NÚCLEO MAMA PORTO ALEGRE

NÚCLEO MAMA PORTO ALEGRE						
FICHA DE LEVANTAMENTO DE DADOS						
Nome:		DN:		Idade:		
Endereço:		No:		Compl.:		
Bairro:		Fone:				
Escolaridade:		UBS:		Data da Consulta:		
1. Algum de seus parentes de 1o grau teve câncer? (pais, irmãos ou filhos)						
				sim	não	não sei
Se positivo informe: Familiar:		Tipo:		Idade:		
Se positivo informe: Familiar:		Tipo:		Idade:		
RISCO TIPO I - HISTÓRIA FAMILIAR						
				sim	não	não sei
2. Algum de seus parentes de 1o grau tem ou teve câncer de mama e/ou ovário?						
3. Alguém na sua família tem ou teve câncer nas duas mamas?						
4. Algum homem da sua família teve câncer de mama?						
5. Alguma mulher na sua família teve câncer de mama E ovário (a mesma pessoa)?						
6. Alguma mulher na sua família teve câncer de mama antes dos 50 anos?						
7. Na sua família, há 2 ou mais pessoas com câncer de mama e/ou ovário ?						
8. Na sua família, há 2 ou mais pessoas com câncer de mama e/ou intestino ?						
RISCO TIPO II - AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA						
9. Peso (kg):						
10. Altura (m):						
11. IMC (peso/altura ²):						
RISCO TIPO III - FUMO						
				sim	não	
12. Tem hábito de fumar?						
13. Quantos cigarros/dia:						
RISCO TIPO IV - USO DE BEBIDA ALCOÓLICA						
				sim	não	
14. Tem hábito de ingerir bebida alcoólica?						
15. Quantas medidas por dia?						
1 medida = vinho: 2 copos cerveja: 1 garrafa ou 2 latas destilados: 2 doses						
RISCO TIPO V - ANTECEDENTES						
				sim	não	não sei
16. Você já teve câncer de mama ou ovário?						
17. Você já fez biópsia de mama?						
18. Houve alteração na sua biópsia?						
19. No de biópsias realizadas:						
EXAME CLÍNICO						
Normal						
Alterado		Nódulo	Derr. papilar	Alt. Pele	Gânglios	Outro. Qual?
ENCAMINHAMENTOS						
RISCO I	SIM	1 resposta positiva ==> NMPOA				
RISCO II	SIM	IMC > 25				
RISCO III	SIM	Se fumar				
RISCO IV	SIM	7 ou mais medidas/semana				
RISCO V	SIM	1 resposta positiva ==> NMPOA				
EXAME CLÍNICO	ALTERADO	alterado ==> NMPOA				
OBSERVAÇÕES FINAIS						
a) Acompanhamento Anual (sem fatores de risco de 15 a 39 anos ou >70 anos)						
b) Rastreamento mamográfico anual (40-69 anos)						
c) Sintomático						
Data do Encaminhamento:						
Profissional:						
Registro:						

ANEXO VII

FICHA DE ANAMNESE DO NÚCLEO MAMA PORTO ALEGRE

Identificação:	
Registro: _____	
Endereço: _____	
Nome: _____	
Nome da Mãe: _____	
Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ Raça () branca () negra () asiática	
<input type="checkbox"/> Consulta de Rotina Data da 1ª consulta: ____/____/____	
História Atual	
Queixa Principal	Observações
<input type="checkbox"/> Nenhuma	
<input type="checkbox"/> Dor mamária	
<input type="checkbox"/> Nódulo	
<input type="checkbox"/> Derrame papilar	
<input type="checkbox"/> Alteração de imagem	
<input type="checkbox"/> Alteração de pele	
<input type="checkbox"/> Abscesso mamário	
<input type="checkbox"/> Outro	
<input type="checkbox"/> Câncer mamário	
Cirurgia: _____	
T__N__M__ E: _____ Data: ____/____/____	
Anatomopatológico: _____	
Exames Apresentados	
<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	
História Gineco Obstétrica	
Menstruação	
Menarca: ____ anos	
Gestações	

Nascimento do 1º filho: _____ anos
 Nº gestações: ____ Parto Normal ____ Cesárea ____ Abortos ____ Mola ____
 Última gestação: _____ anos
 Amamentação _____ meses

Cirurgias
Histerectomia Idade: _____ anos Ooforectomia Uni Bi Idade: _____ anos

Menopausa
 Idade: _____ Natural Cirúrgica

Reposição Hormonal
Em uso N° de meses _____
 Qual? _____ Estrógeno Contínuo Sequencial Progesterona Contínuo Sequencial

Contraceção/ Método

Outras doenças

Mama
 Já fez biopsia mama
 () sim
 () não
 () não sei
 Quantas vezes? _____ -Realiza autoexame da mama, _____.

Endométrio

Ovário

Colo do Útero

Sexualmente Transmissíveis

HIV
HPV (Verrugas)
Outros _____

Revisão de sistemas

Doenças:

Cirurgia Prévia:

Alergias:

História Familiar

Alguns de seus parentes de 1º grau tem ou teve câncer? (pai, mãe, irmã, filho ou filha).
 Se a resposta for sim Indique: Familiar _____ Tipo: _____ Idade de início: _____

Alguns de seus parentes de 1º grau tem ou teve câncer de mama ou ovário? () sim () não () não sei

Alguém na sua família tem ou teve câncer nas duas mamas? () sim () não () não sei

Algum homem da sua família teve câncer de mama? () sim () não () não sei

Alguma mulher em sua família teve câncer de mama e ovário () sim () não () não sei

Alguma mulher em sua família teve câncer de mama antes dos 50? () sim () não () não sei

Na sua família, há duas (ou mais) pessoas com câncer de mama e/ou câncer de ovário? () sim () não () não sei

Na sua família, há duas (ou mais) pessoas com câncer de mama e/ou intestino? () sim () não () não sei

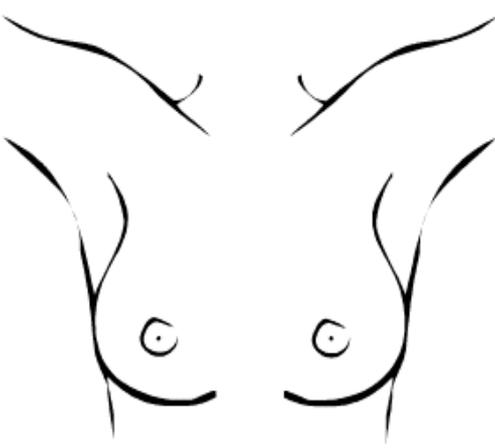
Encaminhar ao geneticista se ao menos uma das respostas for “sim”

Perfil Psicossocial

Situação	Início	Término	Observações
<input type="checkbox"/> Uso de álcool			01 medida = 02 copos de vinho 01 medida= 01 garrafa de cerveja ou 02 latas 01 medida = 02 doses de destilado - fator de risco se o individuo utilizar 07 ou mais medidas por semana
<input type="checkbox"/> Uso de fumo			Quantos /dia: tipo:
<input type="checkbox"/> Uso de drogas			
<input type="checkbox"/> Obesidade			Altura: Peso: IMC: peso/altura x altura
<input type="checkbox"/> Depressão			
<input type="checkbox"/> Outros			

Situação familiar

Exame da Mama

	LEGENDA	<i>QII-Quadrante Interno Inferior</i> <i>QIS-Quadrante Interno Superior</i> <i>QEI-Quadrante Externo Inferior</i> <i>QES-Quadrante Externo Superior</i> <i>MAM - Mamilo</i> <i>ME - Mama Esquerda</i> <i>MD- Mama Direita</i>	Tipo 	Lesão <i>Nódulo</i> <i>Nodularidade</i> <i>Retração</i> <i>Pele alterada</i>
		Região	Tipo	Dimensões

CONDUTA PROPOSTA:

ENCAMINHAMENTO:

EVOLUÇÃO:

ANEXO VIII

QUESTIONÁRIO DE PADRÃO ALIMENTAR, CONSUMO DE ÁLCOOL E DE INFORMAÇÕES REFERENTES AO ESTILO DE VIDA

Data: _____ *Horário de Início:* _____ *Horário de Término:* _____

Nome do entrevistado: _____

Data nascimento: _____ Idade: _____ Posto de Saúde: _____

Endereço residencial: _____

Bairro: _____ CEP: _____

Fone (com): _____ Fone (res): _____

Peso: _____ *Altura:* _____ *IMC:* _____

CC: _____ *CQ:* _____ *GEB:* _____

A) DADOS PESSOAIS	
1. Cor: (0) branco (1) negro (2) amarelo (3) mulato (4) outro	_____
2. Estado Civil: (0) solteiro (1) casado/amigado (2) viúvo (3) divorciado/separado	_____
3. Você realiza atividade profissional? (0) não (1) sim Qual? _____ Horário: _____	_____
4. Tem carteira assinada? (0) não (1) sim	_____
5. Qual a última série e grau que você concluiu? _____ (9) não sabe	_____
6. Quantas pessoas moram na sua casa? _____	_____
7. Qual o seu peso habitual? _____ (999) não sabe	_____
8. A Sra. fuma? (0) não (1) sim	_____
9. Há quanto tempo o Sra. fuma? _____ (999) não se aplica	_____
10. A Sra. já fumou? (0) não (1) sim (9) não se aplica	_____
11. Por quanto tempo fumou? _____ meses (999) não se aplica	_____
12. Há quanto tempo parou de fumar? _____ meses (999) não se aplica	_____
13. Quantas horas em média costuma dormir? _____	_____
14. Quantos filhos a Sra Tem? _____	_____
15. Por quanto tempo a Sra. Amamentou? _____ meses	_____

B) ANTECEDENTES DE DOENÇAS	
16. A Sra. tem diabetes? (0) não (1) sim (9) não sabe	_____
17. A Sra. tem pressão alta? (0) não (1) sim (9) não sabe	_____
18. A Sra. tem algum tipo de dislipidemia? (0) não (1)sim (9) não sabe	_____
19. A Sra se submeteu a algum tipo de cirurgia? (0) não (1) sim Qual?_____	_____
20. Seus pais têm pressão alta? (0) não, nem pai, nem a mãe (1) ambos têm (2) apenas o pai tem (3) apenas a mãe tem	_____
21. Seus pais já tiveram Infarto? (0) não (1) ambos já tiveram (2) o pai teve (3) a mãe teve	_____
22. Seus pais têm câncer? (0) não (1) o pai tem (2) a mãe tem Qual?_____	_____
23. Seus pais tiveram câncer? (0) não (1) ambos já tiveram (2) a mãe já teve (3) o pai já teve	_____
24. Seus pais têm diabetes? (0) não (1) o pai tem (2) a mãe tem (3) ambos têm Tipo:_____	_____

C) CONDIÇÕES DE SAÚDE	
25. Costuma apresentar enjoo ou vômito? (0) não (1) pós-prandial (2) pré-prandial (3) misto (4) outros -----	_____
26. Você apresenta algum problema gastrointestinal? (0) não (1) pirose (2) distensão (3) flatulência (5) hemorroidas (6) gastrite (7) mais de um dos anteriores (8) outros Quais?_____	_____
27. Como é seu ritmo intestinal? (0) diário (1) alternado (2) > 2 dias (3) > 4 dias	_____
28. Qual a consistência de suas fezes? (0) duras e ressecadas (1) consistência normal (2) pastosa (3) líquida	_____
29. Costuma utilizar algum laxante? (0) não (1) sim Qual?_____	_____
30. Costuma tomar algum diurético? (0) não (1)sim Qual?_____	_____

31. Pratica alguma atividade física? (0) não (1) sim	_____
32. Qual atividade física pratica: _____ (99) não se aplica	_____
33. Quantas vezes por semana pratica atividade física? Quanto tempo de atividade? _____ (9) não se aplica	_____
D) NUTRIÇÃO	
34. Mudou seu hábito alimentar no último mês? (0) não (1) sim (9) não sabe	_____
35. Como você classifica sua mastigação? (0) lenta (1) adequada (2) rápida (3) muito rápida (9) não sabe	_____
36. Costuma beliscar de dia? (0) não (1) sempre (2) às vezes	_____
37. Costuma beliscar à noite? (0) não (1) sempre (2) às vezes	_____
38. Aos finais de semana você tem alteração do consumo alimentar? (0) não (1) na quantidade (2) na qualidade (3) ambas, quantidade e qualidade	_____
39. A que você atribui as alterações alimentares nos fins de semana? (0) à disponibilidade de tempo (1) ambiente/estar em família ou com amigos (2) ambos (3) outros O que? _____ (9) não sabe/não se aplica	_____
40. Quantas refeições costuma fazer por dia? ()	_____
41. Que adoçante você utiliza nas bebidas? (0) açúcar refinado (1) açúcar mascavo (2) mel (3) adoçante artificial (4) nenhum	_____
42. Que tipo de adoçante artificial você costuma utilizar? (0) não se aplica (1) sacarina/ciclato (2) aspartame (3) frutose (4) sucralose (5) stévia (6) mais de um tipo Quais? () () () () (9999) não sabe	_____
43. Que tipo de gordura você costuma usar no preparo das refeições? (0) Óleo de soja/milho (1) azeite (2) outro óleo (3) bacon/banha (4) manteiga (5) margarina (6) mais de um tipo Quais? () () () () (9999) não sabe	_____
44. Quanto costuma ser o gasto mensal de óleo em sua casa? _____ (99) não sabe	_____

45. Quando você come carne bovina/suína, costuma comer a gordura visível? (0) sempre (1) algumas vezes (2) nunca/raramente (3) não come carne	_____
46. Quando come frango ou peru, costuma comer a pele? (0) sempre (1) algumas vezes (2) nunca/raramente (3) não come frango	_____
47. Como costuma comer as carnes assadas ou fritas: (0) mal passada (1) ao ponto (2) bem passada (3) torrada (4) variadamente (9) não se aplica	_____

GRUPOS DE ALIMENTOS	Com que frequência você costuma comer?		Qual tamanho de sua porção em relação à porção média?	
	QUANTAS VEZES VOCE COME:	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Alimentos e preparações	Número de vezes: 1 2,3 etc. (N = nunca ou raramente comeu no último ano)	D = por dia S = por semana M = por mês	Porção média de referência	P = menor que a porção média M = igual à porção média (M) G = maior que a porção (M) EG = muito maior que a porção (M)
<i>ALIMENTO OU PREPARAÇÃO</i>	QUANTAS VEZES VOCE COME N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12		UNIDADE D S M	PORÇÃO MÉDIA (M) PORÇÃO P M G EG
Sopas (legumes, canja, cremes etc.).			###	1 Concha média cheia (135ml) ###
<i>MASSAS</i>	QUANTAS VEZES VOCE COME N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12		UNIDADE D S M	PORÇÃO MÉDIA (M) PORÇÃO P M G EG
Miojo				1 prato raso (200g)
Macarrão, ravioli, capeleti, nhoque.				1 prato raso (200g) ou 2 escumadeiras Médias cheias
Pastel de feira (vários sabores)				1 unidade
Pizza				2 fatias (200g)
Torta, esfiha, empada, enroladinho.				1 unidade Média (70g) ou 1 fatia

			pequena													
PRATOS VARIADOS E LANCHES	QUANTAS VEZES VOCE COME												UNIDADE D S M	PORÇÃO MÉDIA (M)	PORÇÃO P M G EG	
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				12
Cachorro quente () simples () especial															1 unidade	
Hambúrguer															1 unidade	
Torrada, sanduíche natural															1 unidade	
Salgadinho de pacote, torresmo															1 pacote (120g) ou 1 xícara de chá	
Coxinha, croquete, rissole, quibe, bolinha de queijo e de bacalhau															3 unidades pequenas ou 1 média (85g)	
Banana à milanesa, banana frita															2 un.pequenas (100g)	
Farofa, polenta															2 colheres de sopa rasa (20g)	
<i>CARNES</i>	QUANTAS VEZES VOCE COME												UNIDADE D S M	PORÇÃO MÉDIA (M)	PORÇÃO P M G EG	
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				12
Strogonoff de frango e de carne															1 Concha média rasa ou 5 colheres de sopa (120g)	
Almôndega, carne cozida, de panela, ensopada, moída, picadinho															4 colheres de sopa ou 2 un. médias (100g)	
Bife ,bife rolê, espeto de carne															1 un. grande (155g)	
Bife à milanesa, parmegiana															1,5 un. grande (150g)	
Carne assada, churrasco, carne seca															1 fatia média (100g)	
<i>CARNES</i>	QUANTAS VEZES VOCE COME												UNIDADE D S M	PORÇÃO MÉDIA (M)	PORÇÃO P M G EG	
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				12
Carne de porco (bisteca, costela, lombo)															5 un. pequenas (75g)	
Filé fgo assado ou grelhado, peru espeto de fgo															2 un. médias (220g)	
Frango ensopado, desfiado,															2 coxas médias ou 1	

cozido			peito pequeno (160g)	
Nuggets, frango empanado, frango frito			8 unidades ou 1 filé grande (160g)	
Linguiça, salsicha, hambúrguer			3 gomos, 4 salsichas ou 1,5 hambúrguer (150g)	
PEIXES	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA	PORÇÃO
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	D S M	(M)	P M G EG
Peixe frito, peixe dorê			2 unidades (80g)	
Peixe ensopado, peixe cozido			1 filé grande ou 1 posta peq. (160g)	
ARROZ, TUBÉRCULOS E LEGUMES	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA	PORÇÃO
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	D S M	(M)	P M G EG
Feijão, ervilha, lentilha			1 concha média cheia (140g)	
Arroz, arroz c/ legume, à grega			6 colheres de sopa cheia ou 1 escumadeira (150g)	
Batata, batata doce, mandioca ou mandioquinha cozida, salada de batata			2 un. pequenas ou 3 colheres de sopa (150g)	
Batata frita, batata doce frita, mandioca frita, palha ou rufles			1 porção pequena (100g)	
Purê de batata ou mandioca			1 colher de sopa (45g)	
Maionese de Legumes			1,5 colheres sopa (40g)	
OVOS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA	PORÇÃO
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	D S M	(M)	P M G EG
Ovo cozido/mexido			1 unidade (50gr)	
Omelete/frito			1,5 unidade (75gr)	
LEITE, DERIVADOS, FRIOS E CEREAIS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA	PORÇÃO
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	D S M	(M)	P M G EG
Café ()Solúvel ()Infusão			1 copo pequeno (50ml)	

Vitamina de frutas (leite + fruta)			2 copos de requeijão (500ml)	
Vitamina de leite – leite + cereais/suplem. () integral () desnatado			2 copos de requeijão (500ml)	
Leite tipo: () integral () desnatado			1 xícara (200ml)	
Achocolatado (leite+achoco)			1 copo requeijão (250ml)	
<i>Queijo Fresco/ricota/minas</i>			1,5 fatia grande (60g)	
Queijo ralado			2 colheres de sobremesa (14g)	
Queijo Edam, cheddar, gorgonzola			1 colher de sopa (30g)	
Queijo Mussarela			3 fatias médias (60g)	
LEITE, DERIVADOS, FRIOS E CEREAIS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA	PORÇÃO
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	D S M	(M)	P M G EG
Requeijão tipo: () normal () light			1 colher de sopa (30g)	
logurte Natural tipo: () integral () desnatado			1 un. média (200g)	
logurte com frutas tipo: () integral () desnatado			1 un. média (200g)	
Margarina tipo: () normal () light			1 colher de sopa (20g)	
Manteiga			1 colher de sopa (20g)	
Maionese tipo: () caseira () industrializada () light			1 colher de sopa (20g)	
Mortadela, presunto, salame			3 fatias médias(60g)	

All Bran/cereais			2 colheres de sopa (70g)	
VEGETAIS	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA	PORÇÃO
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	D S M	(M)	P M G EG
Abobrinha			1 colher gde rasa (35g)	
Alface, escarola, agrião			2 folhas médias (20g)	
Milho			2,5 c sopa cheia (64g)	
Tomate			2 fatias médias (30g)	
Suflê			1 pedaço médio (80g)	
<i>FRUTAS E SUCOS</i>	QUANTAS VEZES VOCE COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA	PORÇÃO
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	D S M	(M)	P M G EG
Abacate			1 unidade pequena (390g)	
Abacaxi, melão			1 fatia pequena (50g)	
Banana nanica ou prata			1 un. grande (100g)	
Laranja, tangerina			1 unidade média (180g)	
Maçã, pera			1 un. média (130g)	
Mamão, papaia			1 fatia pequena (100g)	
Nectarina			2 unidades (200g)	
Salada de frutas			1,5 copo de requeijão (320g)	
Suco de fruta artificial			1 copo de requeijão (250ml)	
Suco de frutas em geral			1 copo de requeijão(250ml)	
Suco de laranja natural			1 copo de requeijão(250ml)	
Uva/limão/morango/pêssego			1 cacho pequeno, 1 xícara ou 3 unidades grandes (180g)	

DIVERSOS	QUANTAS VEZES VOCE COME												UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	PORÇÃO P M G EG			
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				12	D	S
Patê																	2 colheres de sopa (40g)	
Azeitona																	10 un. (30g)	
Pipoca																	1 saco grande (25g) ou 1 tigela média	
Amendoim																	2 punhados (60g)	
Tempero para salada: () óleo () azeite																	1 colher de sobremesa (5g)	
PÃES, BOLOS E BISCOITOS	QUANTAS VEZES VOCE COME												UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	PORÇÃO P M G EG			
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				D	S	M
Biscoito amanteigado, doce, recheado, wafer, maria, maisena																	½ pacote ou 14 un. (60g)	
Bolacha salgada, torrada																	6 un. (40g)	
Bolinho, sonho, churros																	5 bolinhos ou 1 sonho pequeno 75g	
Bolo, tortas doces, pavê, rocambole, bombas																	1,5 fatia média (80g)	
Pão caseiro, francês, de forma																	1 unidade, ou 2 fatias (50g)	
Pão de queijo																	2 un. média ou 1 grande(45g)	
Pão de centeio/integral																	1 unidade, ou 2 fatias (50g)	
BEBIDAS DIVERSAS	QUANTAS VEZES VOCE COME												UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	PORÇÃO P M G EG			
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				D	S	M
Cerveja																	1 lata (350ml)	
Refrigerante () normal () diet																	2 copos (500ml)	
Vinho/licor																	1 copo pequeno ou 3 cálices (165ml)	
Pinga/uísque/ conhaque																	1 e ½ dose (80ml)	
DOCES E SOBREMESAS	QUANTAS VEZES VOCE COME												UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	PORÇÃO P M G EG			
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				D	S	M

	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	D S M	(M)	P M G EG
Açúcar ou mel (café ou chá)			1 colher de sopa cheia ou 3 colheres chá (24g)	
Arroz doce, pudim, flan			2 colheres grandes rasa ou 1 pote (100g)	
Bombom/chocolate, trufa			2 barras pequenas ou 3 bombons (70g)	
Gelatina			1 pote 150g	
Goiabada, marmelada			3 pedaços médios (170g)	
Doce de leite			1 colher de sopa cheia (40g)	
Sorvete massa, sundae			1,5 bola média ou 3 colheres sopa (120g)	
Bala, drops, chiclete			5 un. (25g)	

48. Com que frequência costuma	Nunca/raramente	Algumas vezes	Sempre
Acrescentar mais sal na hora de comer, à mesa	0	1	2
Comer salada crua	0	1	2
Comer chantilly em sobremesas	0	1	2
Comer alimentos fritos	0	1	2
Comer preparações à milanesa ou dorê	0	1	2
Comer enlatados	0	1	2
Comer embutidos	0	1	2
Comer sanduíches	0	1	2