

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre UEPG e a UNICENTRO)

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GENÉTICO DA APOLIPOPROTEÍNA-B
E FATORES DE RISCO CARDÍACO EM PACIENTES DA
REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS - PR

LUCIA HOFFMANN

PONTA GROSSA
2012

LUCIA HOFFMANN

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GENÉTICO DA APOLIPOPROTEÍNA-B
E FATORES DE RISCO CARDÍACO EM PACIENTES DA
REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS - PR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello
Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari

PONTA GROSSA
2012

Catálogo na Fonte
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

- H711a Hoffmann, Lucia
Associação entre o polimorfismo genético da apolipoproteína-B e fatores de risco cardíaco em pacientes da região dos Campos Gerais-PR / Lucia Hoffmann. Ponta Grossa, 2012.
96 f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.
Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello.
Coorientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari.
1. Variações genéticas. 2. ApoB. 3. *MspI*. 4. Nível lipídico. 5. Fatores de risco. 6. Doenças cardiovasculares. I. Matiello, Mara Cristina de. II. Vicari, Viviane Nogaroto. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro – Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 575.1



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 17/2012

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **LUCIA HOFFMANN**.

Aos quatorze dias do mês de dezembro de dois mil e doze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Drª Mara Cristina de Almeida Matiello, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **LUCIA HOFFMANN**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Drª Mara Cristina de Almeida Matiello (Orientadora UEPG), Profa Drª Viviane Nogaroto Vicari (Co-orientadora UEPG) Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG) e Drª Sônia Alvim Veiga Pileggi (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Associação entre o Polimorfismo Genético da Apolipoproteína-B e Fatores de Risco Cardíaco em Pacientes da Região dos Campos Gerais – PR**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 14 de dezembro de dois mil e doze.

Profª Drª Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Profª Drª Sônia Alvim Veiga Pileggi

“Feliz é aquele que sabe ao certo o que procura,
porque quem não sabe o que procura,
não vê o que encontra.”

Claude Bernard

Dedico este trabalho aos meus filhos,
Madiorie, Sayonara e Temístocles Hoffmann Mendes,
e ao Tiago A. Silva
pelo amor e apoio incondicional,
fundamentais para que eu chegasse até aqui.
Não há palavras e ações
que possa retribuir tudo o que fizeram por mim.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem o qual nada sou. Ele é a minha força, é quem me dá sabedoria, é graças a Ele que cheguei até aqui. Obrigada Senhor, por tudo o que tens me feito viver, por todas as conquistas, por me permitir ter pessoas sempre ao meu lado, pelo cuidado em todos os meus passos, pelo ânimo nos momentos difíceis e pela força quando achava que seria impossível. Hoje eu sei ... Para Ti, nada é impossível.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pela oportunidade em ingressar no mestrado.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva e à todos professores da área pelo aprendizado durante as disciplinas cursadas.

À orientadora Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello e co-orientadora Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari pela acolhida e por abrir as portas para o desenvolvimento deste trabalho científico.

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, pelo apoio oferecido.

Aos membros da banca de avaliação no exame de qualificação, Prof. Dr. Marcos Pileggi e Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari e a Profa. Dra. Sonia Alvim Veiga Pileggi, pelas sugestões na melhoria desta dissertação.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, pela prontidão ao serem solicitados.

Ao técnico Miguel Airton Carvalho do laboratório de Citogenética e Evolução - UEPG, pelo auxílio técnico e pela amizade.

Aos colegas de laboratório, pelo companheirismo e pelo convívio agradável durante esta caminhada.

À minha família que esteve ao meu lado em todo e qualquer momento, e sempre orando por mim, a quem tenho grande estima.

Aos meus pais *in memoriam*, pelo amor, carinho e confiança, os quais me deram muito mais que uma vida, me ensinaram a ir atrás dos meus sonhos e de minhas conquistas.

Aos meus filhos, pelo eterno amparo concedido, razão de eu ter chegado até aqui.

Agradeço em especial a Madiorie, a filha da qual sem pronunciar palavras em

seu silêncio fala com Sabedoria Divina transmitindo imensa compreensão com inteligência inexplicável. Por esse silêncio profundo pelo qual me ensinou a gritar com alegria na trilha da vida. Dedico estas palavras a quem me conduziu por todos estes anos.

Aos amigos e a todas as pessoas que passaram pela minha vida, que contribuíram com o meu crescimento e que fizeram a diferença.

À todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A apolipoproteína B (apoB) é a principal proteína da lipoproteína de baixa densidade (LDL) que está envolvida no transporte e metabolismo do colesterol. Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no gene da apoB humana têm sido associados ao risco para doenças cardiovasculares, como a Doença Arterial Coronariana (DAC), as dislipidemias e a aterosclerose. Estas doenças são caracterizadas como multifatoriais, causadas pela interação entre fatores ambientais e genéticos. Estudos de investigação dos componentes genéticos causadores destas doenças têm focado principalmente em polimorfismos nos genes que codificam proteínas estruturais e enzimas relacionadas ao perfil lipídico. Este trabalho teve como objetivo investigar a associação do polimorfismo *MspI* no gene da apoB com os fatores de risco cardiovascular em um grupo de pacientes caso-controle na população da Região dos Campos Gerais (Paraná, Brasil), além de determinar as frequências alélicas e genótípicas deste polimorfismo, e associar os dados genéticos obtidos com as variáveis relacionadas aos riscos cardíacos através da análise de correlação. Foram avaliados 66 pacientes, dos quais 55 compuseram o grupo com risco cardiovascular, e os 11 demais formaram o grupo sem risco – controle. A idade média dos pacientes foi de $60 \pm 10,0$ anos no grupo com risco e $53 \pm 14,0$ anos no grupo controle. O polimorfismo *MspI* (exon 26) no gene da apoB foi caracterizado por PCR-RFLP, sendo os fragmentos de DNA, após a restrição, identificados por eletroforese em gel de agarose. O alelo normal foi denominado M_1 e o alelo mutado M_2 . As frequências genótípicas encontradas para o polimorfismo *MspI* foram 0,82, 0,09 e 0,09 para o grupo controle; e 0,76, 0,24 e 0,00 para o grupo de pacientes com risco, respectivamente para os genótipos M_1M_1 , M_1M_2 e M_2M_2 . O homozigoto M_1M_1 foi predominante na distribuição genotípica para ambos os grupos. Não houve diferença significativa entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo *MspI* no gene da apoB ($\chi^2 = 5,90$; $P > 0,05$; Teste de Contingência), quando comparados os 2 grupos em estudo. Assim, a distribuição do polimorfismo estudado na população da região dos Campos Gerais (PR) se mostrou no equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes com risco cardíaco, mantendo o polimorfismo estável, sendo estes resultados também relatados para as populações chinesa e coreana. Na análise de correlação de Pearson entre as variáveis de risco (idade, diabetes mellitus, LDL alto, triglicerídios alto, HDL baixo, hipotireoidismo, peso, índice de massa corporal), observou-se que a maioria das variáveis analisadas se correlacionaram para os genótipos M_1M_1 e M_1M_2 . Já para a população total estudada ($n = 66$), a associação do polimorfismo gênico da apoB não apresentou correlação com as variáveis de risco cardíaco. Enfim, esta pesquisa apresentou dados para o entendimento da associação do polimorfismo do gene da apoB com o distúrbio de metabolismo lipídico no desenvolvimento de fatores de risco para doenças cardiovasculares na população dos Campos Gerais (PR).

Palavras-chave: Variações genéticas. ApoB. *MspI*. Nível lipídico. Fatores de risco. Doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Apolipoprotein B (apoB) is the principal protein from low density lipoprotein (LDL) involved in cholesterol metabolism and transport. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human apoB gene have been associated with cardiovascular disease risk, such as Coronary Artery Disease (CAD), dyslipidemia and atherosclerosis. These multifactorial diseases are generated by interaction between environmental and genetic factors. Previous works investigated the genetic causative components of these diseases and focused mainly on polymorphisms that occur in genes encoding structural proteins and enzymes related to lipid profile. The present study aimed to investigate the *MspI* polymorphism in the apoB gene association with cardiovascular risk factors in a case-control patients group from the Campos Gerais region (Paraná, Brazil) population, moreover to determine this polymorphism allele and genotype frequencies, and also to associate the obtained genetic data with cardiac risk related variables by using correlation analysis. We evaluated 66 patients, from which 55 patients formed the cardiovascular risk group, and 11 others composed the group without risk – control. The patients mean age was 60 ± 10.0 years in the group with risk and 53 ± 14.0 years in the control group. The *MspI* polymorphism (exon 26) on apoB gene was characterized by PCR-RFLP and, after restriction, DNA fragments were identified by electrophoresis using agarose gel. The normal allele was named M_1 and the mutated allele was called M_2 . The obtained values for *MspI* polymorphism genotypic frequencies were 0.82, 0.09, 0.09 for the control group, and 0.76, 0.24, 0.00 for the CAD risk group, respectively for genotypes M_1M_1 , M_1M_2 , M_2M_2 . It was showed that the M_1M_1 homozygous was dominant in the genotype distribution for both groups. There was no significant difference between the allele and genotype frequencies for *MspI* polymorphism in the apoB gene ($\chi^2 = 5.90$, $P > 0.05$; Contingency Test) when comparing the two groups. Therefore, the distribution of the studied polymorphism in the Campos Gerais region population presented to be in Hardy-Weinberg equilibrium both for the control group and for the CAD risk patients group, keeping stable the polymorphism, what was already previously reported for Chinese and Korean populations. The Pearson correlation analysis performed between the risk variables (age, diabetes mellitus, high LDL, high triglycerides, low HDL, hypothyroidism, weight, body mass index) showed correlation between the most of the variables for M_1M_1 and M_1M_2 genotypes. But for the total population ($n = 66$), the association of the apoB gene polymorphism was not correlated with cardiac risk variables. In the end, this research presented data for understanding the association of apoB gene polymorphism with lipid metabolism disorder in the development of risk factors for cardiovascular disease in the population of Campos Gerais (PR).

Keywords: Genetic variations. ApoB. *MspI*. Lipid levels. Risk factors. Cardiovascular diseases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Evolução das placas de ateroma.....	26
FIGURA 2 -	Esquema de lipoproteína de alta densidade (HDL) e de lipoproteína baixa densidade (LDL).....	28
FIGURA 3 -	Localização cromossômica dos genes das apolipoproteínas humanas envolvidas no metabolismo dos lipídios.....	33
FIGURA 4 -	Representação da apolipoproteína B-100 na lipoproteína de baixa densidade (LDL).....	40
FIGURA 5 -	Representação esquemática do mapa do gene <i>APOB</i>	42

CAPÍTULO I

FIGURA 1 -	Eletroforese dos produtos de PCR-RFLP (481 pb) do exon 26 do gene ApoB com a enzima <i>MspI</i>	57
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Valores de referência para análise das dislipidemias.....	18
TABELA 2 -	Dislipidemia primária: classificação etiológica.....	23
TABELA 3 -	Principais apolipoproteínas.....	32
TABELA 4 -	Frequência dos alelos do polimorfismo <i>MspI</i> do gene da apoB em diferentes populações.....	44

CAPÍTULO I

TABELA 1 -	Caracterização da amostra em estudo.....	56
TABELA 2 -	Distribuição de frequência (%) dos genótipos para o polimorfismo CGG→CAG no gene da apolipoproteína B, nos grupos analisados.....	57
TABELA 3 -	Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo CGG→CAG no gene da ApoB no grupos estudados.....	58
TABELA 4 -	Análise de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas, idade, diabetes mellitus (DM), LDL alto (LDLA), triglicerídios alto (TGA), HDL baixo (HDLB), hipotireoidismo (HIPOT), peso e índice de massa corporal (IMC) entre pacientes de genótipo 1 (M_1M_1).....	59
TABELA 5 -	Análise de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas, idade, diabetes mellitus (DM), LDL alto (LDLA), triglicerídios alto (TGA), HDL baixo (HDLB), hipotireoidismo (HIPOT), peso e índice de massa corporal (IMC) entre pacientes de genótipo 2 (M_1M_2).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	conjunto de proteína transportadora de ligação dependente de trifosfato adenosina do tipo 1
APOA	apolipoproteína A
APOB100	apolipoproteína B100
APOC	apolipoproteína C
APOD	apolipoproteína D
APOE	apolipoproteína E
APOH	apolipoproteína H
ATP	trifosfato de adenosina
AVC	acidente vascular cerebral
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronariana
DFB	defeito familiar da apoB100
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
ϵ	epsilon (alelo)
HAR	hipercolesterolemia autossômica recessiva
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol da HDL
HF	hipercolesterolemia familiar
HFC	hiperlipedemia familiar combinada
HL	lipase hepática
HLP	hiperlipoproteinemia
HTG	hipertrigliceridemia
I/D	inserção/deleção
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IM	infarto do miocárdio
IMC	índice de massa corporal
LCAT	lecitina colesterol aciltransferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade

LDL-C	colesterol da LDL
LDL-PPD	pico diâmetro da partícula LDL
Lp(a)	lipoproteína (a)
LPL	lipoproteína lipase
PCR	reação em cadeia pela polimerase
Qm	quilomícrons
RLDL	receptor da LDL
RLP	receptor de lipoproteína lipase
SNP	polimorfismo de único nucleotídeo (single nucleotide polymorphism)
SR-BI	receptor scavenger de classe B tipo I
TG	triglicerídios
TRC	transporte reverso do colesterol
USF1	fator de transcrição Upstream 1
VLDL	lipoproteína de muita baixa densidade
VLDL-C	colesterol da VLDL

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.2 DISLIPIDEMIAS	17
1.3 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA (DAC)	23
1.4 ATEROSCLEROSE	25
1.5 LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS	27
1.5.1 Lipoproteínas	27
1.5.2 Apolipoproteínas	31
1.5.3 ApoB	37
1.5.4 Variação genética da apoB-100 e a interação com risco cardíaco.	40
1.5.5 Polimorfismos da apoB	41
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	46
2.1 OBJETIVO GERAL	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	47
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA	47
3.3 GENOTIPAGEM QUANTO AO POLIMORFISMO GENÉTICO DA APO B-100	48
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
4 RESULTADOS	50
CAPÍTULO I	51
Resumo	52
Introdução	53
Material e Métodos	54
Resultados	56
1 Caracterização das amostras	56
2 Análises moleculares	57
3 Análise de correlação	58
Discussão	60
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	90
ANEXO 1 - Termo de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da UEPG	90
ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	91
ANEXO 3 - Ilustrações do perfil de bandas da eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras da amplificação do PCR	92
ANEXO 4 - Sequência de base do gene da apolipoproteína B	93
ANEXO 5 - Dados da Análise de Correlação do Genótipo 1 (M_1M_1), do Genótipo 2 (M_1M_2) e da População Geral	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo risco é usado para definir a chance de uma pessoa sadia, exposta a determinados fatores ambientais ou hereditários, adquirir uma determinada doença. Os fatores associados ao aumento do risco de se desenvolver uma doença são chamados fatores de risco. O conceito fatores de risco em doenças cardíacas coronárias surgiu pela primeira vez em 1963, como título de um artigo médico (MORIGUCHI, 2002). Este conceito começou então a ser aplicado de forma mais generalizada, sendo também utilizado para caracterizar os fatores associados a outras manifestações de doenças relacionadas com cardiopatias (YOKOTA et al., 2012).

As principais cardiopatias compreendem doença arterial coronariana (DAC), aterosclerose e dislipidemias. A DAC uma doença multifatorial que resulta na obstrução das artérias coronárias (ALLENDER et al, 2008; LIBBY, 2008). A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica caracterizada pela formação de ateromas no interior dos vasos sanguíneos (FILHO et al., 2003; MAGYAR et al., 2003; LUSIS; MAR; PAJUKANTA, 2004). Já as dislipidemias são distúrbios de altos níveis de colesterol, triglicerídios e lipoproteínas circulantes no sangue (NAVARRO; CONEGERO, 2002; SILVA, 2005; RADER; HOBBS, 2008).

De acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007, relata que durante os últimos trinta anos presencia declínio razoável da mortalidade por causas de doenças cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil. Conforme as projeções da Organização Mundial de Saúde, esta tendência de elevação na doença cardiovascular tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade elevadas nestes países. Além disso, as previsões atuais estimam que no ano 2020 as doenças cardiovasculares tornar-se-ão a principal causa global do total de doenças (LIBBY, 2008). Além dos fatores genéticos concorrem também às

mudanças socioeconômicas e culturais que vêm ocorrendo na sociedade, as doenças cardiovasculares vêm aumentando consideravelmente, representando atualmente um dos mais importantes problemas de saúde pública (ISHITANI et al., 2006)

Algumas doenças cardiovasculares dependem das alterações do metabolismo lipídico. Os distúrbios no metabolismo lipídico e as anormalidades nas lipoproteínas plasmáticas classificam-se entre os fatores de risco mais bem compreendidos e solidamente estabelecidos para aterosclerose. De maneira que, as doenças mencionadas abaixo, contribuem também para o aparecimento da aterosclerose, como (LIBBY, 2008; MOTTA, 2009):

- Dislipidemias (Hiperlipoproteinemia – HLP, Hiperlipidemia familiar combinada – HFC, Hipertrigliceridemia – HTG, Hipercolesterolemia familiar – HF, Defeito familiar da apoB100 – DFB, entre outras);
- Doença Arterial Coronariana – DAC.

O estudo dos fatores de risco cardíaco surgiu de uma fusão de resultados experimentais, que envolvem duas categorias: genéticos e ambientais. Os estudos observacionais realizados em todo o mundo sustentam o conceito de “fatores de risco” para as doenças cardiovasculares (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003; LIBBY, 2008; MOTTA, 2009), os quais podem ser citados: genética, tabagismo, hipertensão arterial, Diabetes mellitus, colesterol HDL baixo, colesterol LDL elevado, triglicerídeo elevado, histórico familiar de Doença Arterial Coronariana, obesidade, sedentarismo, alcoolismo, dieta aterogênica, estresse, idade, sexo masculino, estado pós-menopausa, hipotireoidismo.

As variações genéticas nos componentes da resposta inflamatória aterosclerótica têm sido implicadas como fatores de risco cardíaco, agindo conjuntamente com fatores de risco proinflamatórios convencionais (LIBBY, 2008; BEVAN, 2008).

A apolipoproteína B (apoB), é a principal proteína constituinte da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, atua como ligante dos receptores LDL, correlacionada com o risco cardíaco. Diversos polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs) do gene *APOB* têm sido estudado geneticamente e têm fornecido evidências que alguns alelos podem ser componente associado à variação das concentrações dos níveis lipídicos plasmáticos em diferentes populações com doenças cardiovasculares (PEACOCK et al., 1992).

1.2 DISLIPIDEMIAS

As dislipidemias são caracterizadas por alterações no perfil lipídico, associadas a manifestações clínicas diversas. São classificadas em primárias e secundárias (NAVARRO; CONEGERO, 2002; SILVA, 2005).

As dislipidemias primárias são de origem genética, como: hiperlipoproteinemia, hiperlipidemia familiar combinada, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia familiar, defeito familiar da apoB100 (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003; CAMPOS, 2005).

Por outro lado as dislipidemias secundárias são causadas por outras doenças ou uso de medicamentos: hipotireoidismo, Diabetes mellitus, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, obesidade, alcoolismo, doença hepática, uso de doses altas de diuréticos, betabloqueadores, corticosteróides. O tratamento dessas dislipidemias consiste em controlar a doença de base (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003; RADER; ROBBS, 2008).

As dislipidemias são distúrbios que estão relacionados com redução ou deficiência na remoção plasmática das lipoproteínas. Esses distúrbios podem se manifestar por concentrações elevadas no plasma de colesterol, triglicerídios e de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) (FODOR et al., 2000), também tem sido associado ao aumento das concentrações das lipoproteínas ricas em triglicerídios, como os quilomícrons (Qm) e lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL) e à diminuição da concentração do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (HOKANSON; AUSTIN, 1996; KNOPP, 2002).

O aumento da concentração de lipídios plasmáticos resulta frequentemente de falha na interação das lipoproteínas com seus receptores celulares ou na deficiência da hidrólise dos componentes lipídicos das lipoproteínas que retardam ou anulam a captação de colesterol pelas células (BROWN; GOLDSTEIN, 1986). Esses distúrbios metabólicos são influenciados por alterações em genes de receptores, de apolipoproteínas ou das enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas (GALTON, 1997).

Os valores de referência para o perfil lipídico das dislipidemias em adultos com idade superior a 20 anos encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1 - Valores de referência para análise das dislipidemias

Analitos	Valores de referência (mg/dL)	Categoria
Colesterol total	menor que 200	Ótimo
	200 – 239	Limítrofe
	240 ou maior	Elevado
LDL-C	menor que 100	Ótimo
	100 – 129	Desejável
	130 – 159	Limítrofe
	160 – 189	Alto
	190 ou maior	Muito alto
HDL-C	menor que 40	Baixo
	maior que 60	Alto
Triglicerídios	menor que 150	Ótimo
	150 – 200	Limítrofe
	200 – 499	Alto
	500 ou maior	Muito alto

Fonte: III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias (2001), WHO (2006), I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (2012).

Nas dislipidemias encontram-se:

a) Hiperlipoproteinemia (HLP)

Atualmente tornou-se evidente que os níveis plasmáticos ideais ou ótimos de colesterol são muito inferiores aos níveis normais da população geral, e que o risco de coronariopatia aumenta à medida que os níveis de colesterol se elevam acima dos valores ideais (III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias, 2001).

Esta forma está associada com enfermidade cardiovascular periférica e desenvolve aterosclerose prematura. Um alerta para a possível existência de HLP do tipo III é a presença de xantomas na superfície palmar ou depósitos tuberosos nos cotovelos e joelhos (MISRA et al., 1998). O diagnóstico definitivo necessita da análise genética de apolipoproteína. A HLP tipo III uma mutação rara que ocorre em 1:1000 pessoas. A base fisiopatológica desta enfermidade é o acúmulo de VLDL, e é

causada por uma apoE anormal (homozigótica), que não é normalmente reconhecida pelos receptores lipoprotéicos apoB/apoE. Este é um distúrbio genético, mas é ocasionalmente encontrado em associação com hipotireoidismo ou obesidade (ORDOVAS, et al., 1987; HAVEL; KANE, 1995; SMITH, 2000).

b) Hiperlipidemia familiar combinada (HFC)

A HFC é caracterizada por elevações dos níveis de VLDL, IDL e LDL. Exibe um padrão de transmissão vertical, semelhante a um modo de herança dominante. Entre os sobreviventes de infarto do miocárdio prematuro (menos de 60 anos de idade), a HFC é o distúrbio lipídico mais comum familiar, com uma frequência entre 10% para 20% nas populações estudadas (ALLAYEE et al., 2002).

O defeito primário na HFC envolve uma produção aumentada de VLDL (THOMPSON, 1990). Estudo em populações associado à HFC com ligação a família multigênica sugerem que certos alelos do gene deste grupo (APOAI-CIII-AIV-AV) contribuem para níveis altos de triglicerídios (TALMUD et al., 2002), e este grupo multigênico é também associado com HFC (DALLINGA-THIE et al., 1996; CAMPOS, 2005). Heterozigose para mutações nulas de LPL também podem contribuir para certas formas de HFC. Várias informações sobre o genoma para a HFC têm sido disponíveis e sugerem que outro gene (apoA II) localizado no cromossomo 1q21.2 tem papel importante para HFC (PAJUKANTA et al., 1998). Pajukanta e colaboradores (2004) mostraram a associação entre o gene USF1 e a HFC, sendo este um forte candidato, pois é um fator de transcrição e está relacionado com o controle de vários genes do metabolismo da glicose e lipídico.

c) Hipertrigliceridemia (HTG)

É caracterizada por aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídios, resultante da elevação aumentada de quilomícrons e VLDL circulante. A HTG é um fator de risco importante no desenvolvimento de aterosclerose e de DAC e está sendo com um fator de risco independente (STAMPFER et al., 1996; JEPPESEN et al., 1998; AUSTIN, 1999).

A correlação entre a HTG e as causas de arterosclerose e suas sequelas ainda não foi elucidada. Entretanto, existem alguns tipos de HTG extrema que

podem causar pancreatite potencialmente fatal, e a terapia para diminuir os níveis de triglicerídios nestes pacientes é benéfica. De acordo com a orientação do NCEP – *National Cholesterol Education Program* (Expert Panel, 2001), a qual define os níveis de triglicerídios do plasma considera o valor <200 mg/dL como normais; 200 a 400 mg/dL como limítrofes altos; 400 a 1000 mg/dL como altos; e >1000 mg/gL como muito altos. Pessoas com mutações no receptor da apoB e apoE acumulam alterações elevadas na concentração de lipídios plasmáticos. Na maioria das análises univariadas de dados populacionais, os triglicerídios se correlacionam com o risco cardíaco. Entretanto esta correlação pode ser explicada por fatores frequentemente associados a níveis elevados de triglicerídios, baixos níveis de HDL, obesidade, diabetes e formas aterogênicas de LDL. Os pacientes com triglicerídios acima de 1000 mg/dL geralmente têm excesso de Qm e necessitam diminuir estes níveis para 600 mg/dL ou menos a fim de evitar pancreatite (HEGELE et al., 1986; LEWIN, 2001; GOODMAN; GILMAN, 2003; HEGELE et al., 2009).

d) Hipercolesterolemia familiar (HF)

A HF é causada por mutações do gene do RLDL, as quais afetam a função do receptor e prejudicam o catabolismo das LDL (HOBBS; GOLDSTEIN; BROWN, 1992; GOLDSTEIN; BROWN, 2001).

Alguns pesquisadores acreditam que as partículas de IDL são pró-aterogênicas. Nos pacientes com nível elevado de IDL, é proeminente o aumento da aterosclerose. Pequenos aumentos em IDL também ocorrem na hipercolesterolemia familiar. Não há dúvida quanto à aterogenicidade da LDL. A LDL penetra prontamente na artéria. Os pacientes com hipercolesterolemia familiar, que têm níveis predominantemente elevados de LDL, têm um aumento de coronariopatia prematura. Uma subespécie de LDL, conhecida como LDL pequena e densa, é aterogênica e acompanha níveis altos de triglicerídios e baixos de HDL. Mesmo que os mecanismos pelos quais a IDL é pró-aterogênica não estejam totalmente compreendidos, muitas evidências sugerem que a modificação oxidativa dentro da artéria é uma etapa importante, senão obrigatória, na aterogênese (WITZTUM, 1994; ABIFADEL et al., 2003; RADER; HOBBS, 2008).

A hipercolesterolemia pode ser também causada por alterações no gene da apoB, que afetam a capacidade de ligação das LDL com RLDL (HANSEN, 1998).

Essas mutações são a causa da doença autossômica dominante denominada de defeito familiar da apoB100 (DFB) (BORÉN et al., 2001; GAFFNEY et al., 2002). Os pacientes com DFB apresentam perfil lipídico similar da HF heterozigótica (MISEREZ; KELLER, 1995; HANSEN, 1998; TAI et al., 2001).

Foi observada uma forma recessiva de hipercolesterolemia denominada hipercolesterolemia autossômica recessiva (HAR) que tem a mesma gravidade que HF homozigótica. A mutação causante da HAR está em um gene que codifica uma proteína adaptadora do RLDL (GOLDSTEIN; BROWN, 2001).

A hipercolesterolemia também pode resultar de alterações frequentes em vários genes. Estudos identificaram mais de 1000 mutações gênicas diferentes, todas conduzindo a HF (GUARDAMAGNA et al., 2009). Além das mutações encontradas no gene RLDL, tem observado que os polimorfismos genético do RLDL e da apoB estão associadas com as variações inter-individuais das concentrações plasmáticas de lipídios, principalmente colesterol total e LDL-C, e com a suscetibilidade de desenvolvimento de DAC em diferentes populações caucasóides da Europa, dos Estados Unidos e do Japão. Os grupos populacionais da Europa Central possuem frequência (1:209) da mutação R3500Q do gene da apoB entre pacientes hipercolesterolêmico. (GAJRA et al., 1994; CHOONG; SETHI; KOAY, 1998; PONGRAPEEPORN et al., 2000).

Este distúrbio é caracterizado por hipercolesterolemia devido os níveis elevados de LDL-C com nível plasmático normal de triglicerídios, na ausência de causas secundárias de hipercolesterolemia. De maneira geral, os níveis plasmáticos de LDL-C não estão tão elevados quanto aqueles observados na HF e no DFB. Os estudos familiares são úteis para diferenciar a hipercolesterolemia poligênica dos distúrbios monogênicos; 50% dos parentes de primeiro grau de pacientes com HF e DFB apresentam hipercolesterolemia, enquanto 10% dos parentes de primeiro grau de pacientes com hipercolesterolemia têm hipercolesterolemia poligênica (RADER, HOBBS, 2008).

e) Defeito familiar da apoB100 (DFB)

O DFB é uma dislipidemia Mendeliana de herança autossômica dominante (com uma frequência de cerca de 1 em 500-1000 nas populações européias). Na

maioria dos casos, ocorre uma mutação na sequência de codificação de apoB100 que substitui o aminoácido arginina para glutamina na posição 3500. O DFB é causado por mutações no domínio de ligação do receptor LDL da apoB100. A doença por DFB é caracterizada moderada a grave por apresentar aumento do LDL, lipoides arcus, e prematura DAC (FISHER et al., 1999; FOUCHIER et al., 2004; RADER; HOBBS, 2008). Pacientes heterozigotos DFB apresentam níveis de colesterol de cerca de 300mg/dL, devido à deficiente remoção da LDL (LUSIS; IVANDIC; CASTELLANI, 2002).

Em consequência da mutação apoB100, embora os pacientes com DFB sejam clinicamente indistinguíveis dos pacientes de Hipercolesterolemia familiar (HF), estes apresentam níveis de colesterol inferior àqueles com HF, mesmo assim ainda são muito elevados (NABEL, 2003).

Classificação Etiológica das Dislipidemias

A grande maioria dos defeitos genéticos conhecidos envolve proteína, apolipoproteína, enzima lipolítica, receptor membranário, ou proteína reguladora. A compreensão da hipercolesterolemia familiar representou um importante avanço da investigação da etiologia das dislipidemias, apresentada na Tabela 2 (CAMPOS, 2005).

TABELA 2 – Dislipidemia primária: classificação etiológica

Deficiência metabólica	Gene	Diagnóstico	Transmissão	Prevalência	Fenótipo	Implicação clínica
Enzima	Lipoproteína lipase(LPL)	Deficiência em LPL	Autossômica recessiva	muito rara	I	pancreatite aguda
Receptor	LDL (E,B)	Hipercolesterolemia familiar heterozigótica homozigótica	Autossômica dominante	1:500 1:1 000 000	IIa	aterosclerose
Apolipoproteína	APOB100	Deficiência familiar de apoB100 heterozigótica homozigótica	Autossômica dominante	1:1 000 1:4 000 000	IIa	aterosclerose
Apolipoproteína	APOE	Dislipoproteinemia ou dislipidemia de remanescentes	Poligênica	1:10 000	III,IIb	aterosclerose
Apolipoproteína	APOCII	Deficiência em apoCII	Autossômica recessiva	muito rara	I	pancreatite aguda
Desconhecida		Hipercolesterolemia poligênica	Poligênica	1:250	IIa, IIb	aterosclerose
Desconhecida		Hiperlipidemia	Poligênica	1:200	IIb, IV	aterosclerose
Desconhecida		Hipertrigliceridemia familiar	Autossômica dominante	1:600	IV, V	Controverso fator de risco independente para a aterosclerose?

Fonte: CAMPOS, 2005.

1.3 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA (DAC)

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte por doença no Brasil e em vários países do mundo (WHO, 2006). Dentre as doenças cardiovasculares, a Doença Arterial Coronariana (DAC) destaca-se como a maior causadora de incapacidade e morte. É uma doença da idade adulta e de etiologia multifatorial (VOGEL; MOTULSKY, 1997; SERRUYS et al., 2009).

A associação positiva entre triglicerídios (TG) plasmáticos aumentados e DAC foi confirmada por análise de prospecção realizada por Hokanson e Austin (1996), indicando as concentrações de triglicerídios plasmáticos como fator de risco independente para DAC e não meramente consequência do efeito das baixas concentrações de HDL-C (HOKANSON; AUSTIN, 1996; LUSIS; MAR; PAJUKANTA, 2004).

Cada uma das partículas de lipoproteínas aterogênicas (LDL-C e VLDL) contém uma molécula de apoB e, por conseguinte, a concentração de apoB fornece

uma medida direta da quantidade dessas lipoproteínas circulantes (BARTER et al., 2006; HANKEY, 2006). Assim, já existem indícios consideráveis de que apoB seria um parâmetro mais exato para o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares do que qualquer um dos outros parâmetros de colesterol (WALLDIUS; JUNGNER, 2006). Relatos com base em resultados de quatro grandes estudos prospectivos sugerem que a apoB é superior ao colesterol total e ao LDL-C como marcador do risco de doenças vasculares (SNIDERMAN et al., 2003).

Dados têm sugerido que 88,4 mg/dL seria um nível normal de apoB. Esse valor é o nível encontrado em pessoas jovens e com valores baixos de LDL-C (GRUNDY, 2002; BALLANTYNE; RAICHLEN; CAIN, 2008).

A ocorrência de DAC varia amplamente no mundo e, geralmente, a maior frequência é encontrada em países ocidentais ou com estilo de vida ocidental. Estudos epidemiológicos prospectivos têm demonstrado que a incidência de DAC em pessoas com Diabetes mellitus (DM) é cerca de duas a três vezes maior do que a observada na população em geral (STAMLER et al., 1993). A prevalência de DM entre portadores de DAC aumentou significativamente nos últimos anos (TAKAISHI et al., 2004). O aumento do risco de eventos cardiovasculares em pessoas com DM2 pode ser relacionado, com anormalidades no metabolismo de lipídios, lipoproteínas e apolipoproteína B e receptores LDL (BERNARD et al., 2004).

A complexidade da DAC surge da diversidade de fenótipos clínicos e das múltiplas vias biológicas que contribuem para a formação da placa aterosclerótica, incluindo o metabolismo lipídico, inflamação, função endotelial, estresse oxidativo e trombose. Em adição aos fatores ambientais, variações inter-individuais na susceptibilidade à DAC podem estar relacionados à variabilidade nos genes que codificam proteínas que participam nessas e em outras vias biológicas (CHANNON; WATKINS, 2004).

Nas últimas décadas pode-se mapear uma doença monogênica e identificar o gene subjacente com famílias suficientes disponíveis. No entanto o sucesso, no mapeamento de genes com doenças complexas, tais como DAC, tem sido razoável. O lento processo de identificação de genes em características complexas é provavelmente causado por vários fatores, como locus e heterogeneidade dos alelos, epistasia, dificuldades em avaliar os complexos fenótipos, desconhecido modos de herança, fenocópias, penetrância reduzida, e uma alta frequência de alelos de doenças predisponentes (LUSIS; FOGELMAN; FONAROW, 2004).

Assim, a identificação de fatores genéticos que afetam o metabolismo lipídico é de significância para a correção das dislipidemias e DAC (VU-DAC et al., 2003).

Estudos prospectivos demonstraram a associação com hiperaciduremia e incidência de DAC, doença cardiovascular e morte. O ácido úrico também está associado com DM e intolerância à glicose, fatores de risco que conferem maior risco relativo para doença cardiovascular em mulheres (BARRET-CONNOR et al., 1991; WILSON; CUPPLES; KANNEL, 1991; SOWERS, 1998), assim como a síndrome metabólica, resistência à insulina, obesidade, hipertensão e dislipidemia (REAVEN, 1994; YOO et al., 2005).

1.4 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença progressiva de origem multifatorial que caracteriza um espessamento e endurecimento da camada interna das artérias devido ao recrutamento de monócitos e formação de macrófagos, à deposição de lipídios e elementos fibrosos, à proliferação de células vasculares lisas e à síntese de matriz extracelular, provocando a formação de placa aterosclerótica com consequente diminuição ou obstrução do fluxo sanguíneo (ROSS, 1993; LUSIS; FOGELMAN; FONAROW, 2004).

A aterosclerose pode afetar as artérias do coração, cérebro, rins, outros órgãos vitais, braços e pernas, sendo a principal causa de morte no Brasil e no mundo (III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose, 2001; PELLANDA et al., 2002).

Os ateromas normalmente têm uma cápsula fibrosa, consistindo de células musculares lisas e uma matriz extracelular que abriga um centro lipídico-necrótico rico. A placa de ateroma pode tornar-se cada vez mais complexa com calcificação, ulceração na superfície luminal, e hemorragia de pequenos vasos que crescem na lesão da parede média do vaso sanguíneo (Figura 1). Geralmente, a trombose é associada com ruptura ou erosão de uma vulnerável placa que tem uma cápsula fibrosa fina (CASTELLI, 1998; LUSIS; FOGELMAN; FONAROW, 2004; NUSSBAUM; McINNIS; WILLARD, 2008).

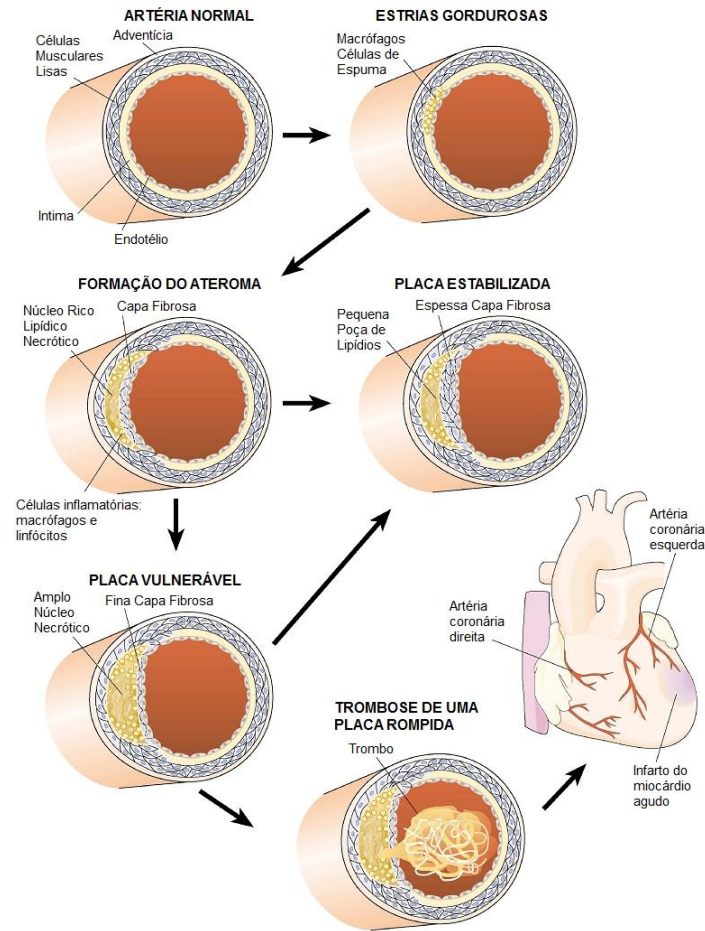


FIGURA 1 - Evolução das placas de ateroma.

Fonte: LUSIS; MAR; PAJUKANTA, 2004 adaptado.

Sugere-se que o desenvolvimento da placa aterosclerótica siga um padrão não linear contínuo, mas com evolução descontínua com períodos de inatividade intercalados por intervalos de evolução rápida. Este evento de formação aterogênica em geral leva-se décadas. Portanto, durante o processo ocorre um equilíbrio complexo entre entrada e saída de lipoproteínas e leucócitos, proliferação e morte celulares, produção e remodelagem da matriz extracelular, além da calcificação e a neovascularização, contribuem para a formação da lesão. Geralmente após um período prolongado de formação, a aterosclerose pode ser evidenciada clinicamente (SNIDERMAN et al., 2003; LIBBY, 2008) .

1.5 LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS

O colesterol, os triglicerídios e os fosfolipídios cumprem um papel importante no metabolismo. O colesterol atua como um componente estrutural essencial das membranas celulares, além de ser precursor de hormônios esteróides e outras substâncias orgânicas importante, como os ácidos biliares. O colesterol está presente sob duas formas, colesterol livre e ésteres de colesterol.

Os lipídios são moléculas insolúveis em água, porém solúveis em solventes apolares. Para seu transporte plasmático constituem-se em lipoproteínas que são macroagregados moleculares esféricos que apresentam núcleo contendo os lipídios hidrofóbicos e na superfície externa os lipídios hidrofílicos e as apolipoproteínas (FREDRICKSON; LEVY; LEES, 1967; SCHUMAKER; ADAMS, 1969; TRIA; SCANU, 1969; CISTERNA; MONTE, 1998; MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003).

Os lipídios estão presentes em todos os tecidos e apresentam grande importância em vários aspectos da vida como: funcionais das biomembranas, isolante que permite a condução nervosa e previne a perda de calor (MOTTA, 2009).

1.5.1 Lipoproteínas

As lipoproteínas são complexos macromoleculares sintetizados no fígado e no intestino delgado, que transportam o colesterol e os triglicerídeos através da corrente sanguínea e entre os tecidos (Figura 2). A estrutura e a composição são enzimaticamente reguladas e de forma geral, as lipoproteínas consistem uma parte central de lipídios hidrofóbicos (triglicerídios e ésteres de colesterol) rodeado por uma monocamada de lipídios anfipática (fosfolipídios e colesterol livre) e várias proteínas, apolipoproteínas interagindo com os líquidos corporais (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003).

As principais classes de lipoproteínas plasmáticas são: quilomícrons (Qm), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteína (a) (Lp(a)).

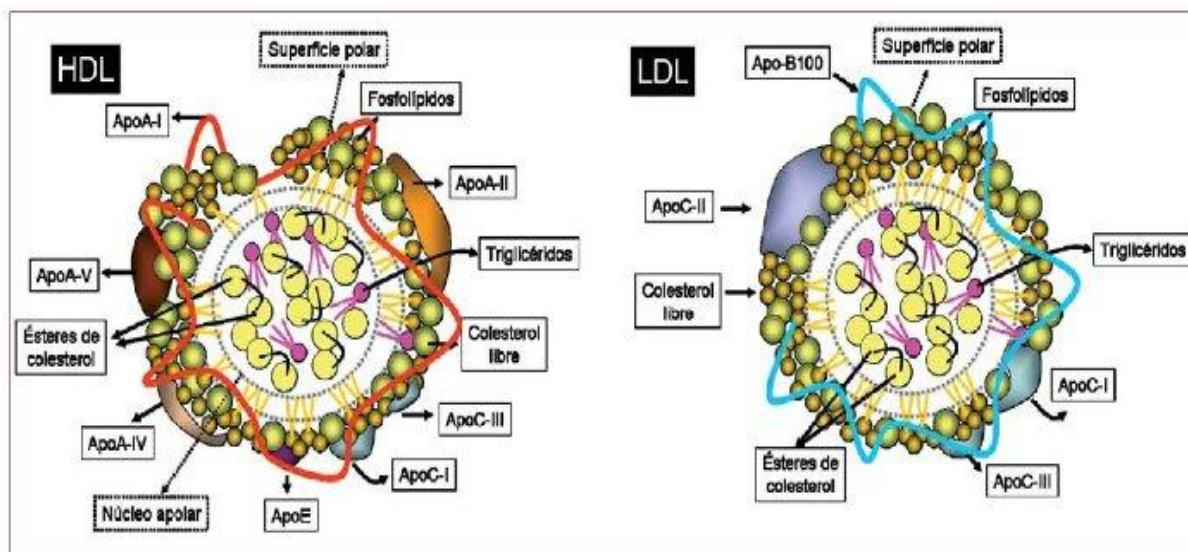


FIGURA 2 – Esquema de lipoproteína de alta densidade (HDL) e de lipoproteína de baixa densidade (LDL). A linha em azul representa apoB100 associada a LDL.

Fonte: FORTI; DIAMENT, 2006.

A camada superficial dos quilomícrons é constituída de apoB48, apoA I, apoA II e múltiplas cópias da apoE. Os enterócitos são responsáveis pela síntese dos Qm, secretados no sistema linfático e através do ducto torácico atingem a circulação sanguínea. Os quilomícrons captam apoC II, apoC III, e apoE de outras lipoproteínas circulantes e de colesterol de membranas celulares (CISTERNAS; MONTE, 1998).

O hepatócito sintetiza a VLDL. O núcleo da VLDL é constituído principalmente de triglicerídios e sua superfície apresenta as apolipoproteínas apoB100, apoC II, apoC III e apoE. Quando a VLDL adquire a apoC II, os triglicerídios do seu núcleo são hidrolisados pela lipoproteína lípase (LPL). As VLDL remanescentes têm vários destinos: removidas da circulação por receptores apoB/E ou por receptores VLDL e conversão à LDL através da hidrólise pela lípase hepática (HL) (KWITEROVICH JR et al., 1997; WALLDIUS; JUNGNER, 2006).

A IDL participa do metabolismo lipídico via endocitose mediada pelo receptor de LDL através de sua ligação à apoB/E, e parte das IDL é remodelada pela HL, formando LDL (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003). As LDL são, em sua maior parte, produzidas a partir das VLDL com função de transportar colesterol na forma de ésteres de colesterol. Sua concentração sérica guarda relação direta com o aumento do risco de aterogênese (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003). Alguns estudos indicam que a apoB pode ser um melhor indicador fator de risco que o colesterol LDL (WALLDIUS et al., 2001).

A HDL secretada pelo fígado e intestino, é responsável pelo transporte reverso de colesterol (TRC) no metabolismo lipídico (SCARTEZINI et al., 2003).

As apolipoproteínas que formam a HDL são apoA I e apoA II, embora outras, como apoA IV, apoA V, apoC I, apoC II, apoC III, apoD e apoE, possam estar presentes (LUND-KATZ et al., 2003).

É importante enfatizar que o TRC é realizado por um conjunto de partículas efetoras como apolipoproteínas, lipídios, proteínas de transferência, enzimas, entre outras, associadas ou não a HDL e suas subclasses, sendo esse um grande desafio para a lipidologia entender como a relação influxo/efluxo do colesterol pode ser modulada para prevenir risco cardíaco (VON ECKARDSTEIN; NOFER; ASSMANN, 2001).

Numerosos estudos clínicos e epidemiológicos têm relacionado fortemente a diminuição da concentração plasmática da lipoproteína HDL com o desenvolvimento de risco cardíaco (YOUNG; KARAS; KUVIN, 2004). Tais achados sugerem que o desequilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise pode conduzir à aterosclerose. Apesar de todas essas evidências, o papel da HDL na indução da supressão de moléculas de adesão para prevenir risco cardíaco é ainda uma questão importante para debate (LIMA; COUTO, 2006).

Apo(a) é uma glicoproteína, partícula denominada (Lp(a)) ligada apoB100 em uma LDL e quando oxidada pode promover a formação de células espumosas e a entrada de Lp(a) nas placas ateroscleróticas. Estudos sugerem a Lp(a) como fator de risco cardiovascular independente (JENNER et al., 2005; KAMSTRUP et al., 2009). A Lp(a) é sintetizada no fígado e fixada à apoB100 por uma ligação de dissulfeto. O principal local de depuração da Lp(a) é o fígado, porém sua via de captação não é conhecida (RADER; HOBBS, 2008). A Lp(a) foi descrita pela primeira vez por Berg em 1963.

Metabolismo das lipoproteínas

Os níveis séricos de lipídios são características multifatoriais, determinadas por um grande número de fatores genéticos e ambientais. Variações em um grande número de genes envolvidos na síntese de proteínas estruturais e relacionado ao metabolismo lipídico têm sido associadas às dislipidemias (ORDOVAS, 2006)

Lipídios da dieta sob forma de Qm, partículas com alto teor de triglicerídios que acondicionados com apoB48, C II e C III em sua superfície para formar os Qm.

Nos capilares, a presença da apoC II possibilita a hidrólise dos TG pela lipase, reação esta que libera os ácidos graxos e as apoC II e C III, resultando nos Qm remanescentes. Estes ainda possuem apoB48, além de estarem agora ligados à apoE. Os Qm remanescentes são absorvidos por hepatócitos, que possuem em sua superfície receptores para a apoB, receptores para apoE e RLP. No fígado, o colesterol pode ser usado na produção de membranas celulares, homônios esteróides ou lipoproteínas, ou pode ser secretado como colesterol livre (EVANS; KASTELEIN, 2002; RADER; HOBBS, 2008).

Outra rota metabólica envolve a síntese e secreção de colesterol e TG pelo fígado, tornando-os disponíveis para os tecidos periféricos. Estes lipídios são secretados sob forma de VLDL contendo apoB100.

Com a hidrólise pela lipoproteína lipase, ocorre a quebra de TG e VLDL é convertida em LDL que possui apoB100. Nesta conversão, são produzidos resíduos de VLDL que são absorvidos pelos hepatócitos via receptores LDL. Além do fígado, tecidos periféricos também possuem receptores para apoB e apoE com acesso de LDL mediado por estes receptores, regula a síntese endógena do colesterol e reprime a produção de receptores apoB e apoE e enzimas relacionadas, 30% a 40% dos VLDL remanescentes dão origem às LDL (KWITEROVICH JR et al., 1997; RADER; HOBBS, 2008).

Nas células periféricas o colesterol vai para o fígado e ao intestino pelo processo de TRC, que é facilitado pela HDL.

A apoA I recém secretada adquire fosfolipídio e colesterol não-esterificado (HDL) de seu local de síntese (intestino e fígado) através de efluxo promovido pela proteína de membrana, conjunto de proteína transportadora de ligação dependente de trifosfato adenosina do tipo 1 (ABCA1). Esse processo resulta na formação de HDL madura que recrutam o colesterol não-esterificado adicional pelas células periféricas. No interior da partícula de HDL, o colesterol é esterificado pela lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT) uma mesma enzima plasmática associada às HDL convertendo em HDL madura. Depois de liberados na corrente sanguínea, a HDL nascente coleta ésteres do colesterol e outras lipoproteínas associadas a apoE. As HDL trocam, a seguir, seu colesterol esterificado por TG contidos nas VLDL pela ação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP). Esta lipoproteína rica em colesterol volta para o fígado onde o colesterol é captado diretamente pelos hepatócitos através do receptor da classe BI (SR-BI), um receptor

de superfície celular que medeia à transferência seletiva de lipídios para as células (GREENSPAN; STREWLER, 2000).

Os hepatócitos podem oxidar o colesterol para fornecer energia ou precursores para a síntese de corpos cetônicos, e também em ácidos biliares por uma via envolvendo colesterol 7- α -hidroxilase e são capazes de excretar na bile ou no lúmen intestinal (NAKANDAKARE; QUINTÃO, 1998; GREENSPAN; STREWLER, 2000; LUSIS et al., 2004).

Sendo assim, qualquer gene que seja responsável pela produção de uma proteína envolvida nesta rota metabólica poderia ser um gene candidato na investigação de determinantes genéticos dos níveis lipídicos. O somatório de variações, com um pequeno defeito de cada um desses genes, poderia levar à modificação do perfil lipídico em um paciente, predispondo a um risco cardíaco (CASAS et al., 2006).

No metabolismo de lipídios pode se observar que as alterações genéticas são decorrentes de mutações na sequência de nucleotídeos do gene e podem produzir trocas de resíduos de aminoácidos na sequência da proteína ou interrupção da síntese gerando proteínas truncadas que estão envolvidas no correto balanço metabólico. As mutações também podem estar presentes em regiões regulatórias (promotores ou éxons) ou em regiões não codificadora (regiões intergênicas ou íntrons). Desta forma, a identificação de alterações em genes que codificam essas proteínas é de especial interesse para explicar a variação na distribuição da frequência alélica encontrada nos níveis lipídicos. Tais variações genéticas quando frequentemente encontrada na população estudada que apresentam frequência superior a 1% são definidas como polimorfismo (BEIGUELMAN, 1995; CONSTANZA et al., 2005).

1.5.2 Apolipoproteínas

As apolipoproteínas são proteínas existentes no sangue e têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas como: proporcionar estabilidade estrutural, solubilizar os lipídios altamente hidrofóbicos, servir como ligantes para receptores celulares ou agir como co-fatores para enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas e permitir a captação pelos tecidos. Defeitos na estrutura de uma apolipoproteína ou na sua síntese podem afetar o metabolismo dos

lipídios resultando em progressão para a DAC (GROENENDIJK et al., 2001a)

Embora existam vários fatores que contribuam para as concentrações plasmáticas de lipídios, as apolipoproteínas representam o principal componente na dinâmica do metabolismo lipídico. Foram identificadas as apolipoproteínas, classificadas de A a M (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003; SEDA; SEDOVÁ, 2003; RADER; HOBBS, 2008), conforme a Tabela 3.

TABELA 3 - Principais apolipoproteínas.

Apolipo proteína	Fonte principal	Associação com as lipoproteínas	Função
ApoA I	Intestino, fígado	HDL, quilomícrons	Proteína estrutural das HDL Cofator da LCAT (ativa a LCAT)
ApoA II	Fígado	HDL, quilomícrons	Proteína estrutural das HDL
ApoA IV	Intestino	HDL, quilomícrons	Desconhecida
ApoA V	Fígado	Quilomícrons	Promove lipólise dos triglicerídios mediada pela LPL
ApoB48	Intestino	Quilomícrons	Proteína estrutural dos quilomícrons
ApoB100	Fígado	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	Proteína estrutural das VLDL, IDL, LDL, Lp(a) Ligante para a ligação ao receptor de LDL
ApoC I	Fígado	Quilomícrons, VLDL, IDL	Ativador LCAT
ApoC II	Fígado	Quilomícrons	Co-fator da LPL
ApoC III	Fígado	Quilomícrons	Inibe a ligação das lipoproteínas aos receptores
ApoD	Baço, cérebro, testículos, supra-renais	HDL	Desconhecida
ApoE	Fígado, rins, supra-renais, monócitos, líquido cefaloraquidiano e baço	Remanescentes de quilomícrons, IDL, HDL	Ligante para ligação ao receptor de LDL
ApoF			Inibição da CETP
ApoH	Fígado	Quilomícrons, VLDL, LDL, HDL	B ₂ glicoproteína I
ApoJ	Fígado	HDL	Desconhecida
ApoL	Desconhecida	HDL	Desconhecida
ApoM	Fígado	HDL	Desconhecida

Fonte: Adaptado de MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003; RADER; HOBBS, 2008.

A Figura 3 mostra as principais regiões cromossômicas dos genes das apolipoproteínas nos cromossomos humanos, que possuem participação na função e nas alterações do metabolismo lipídico.

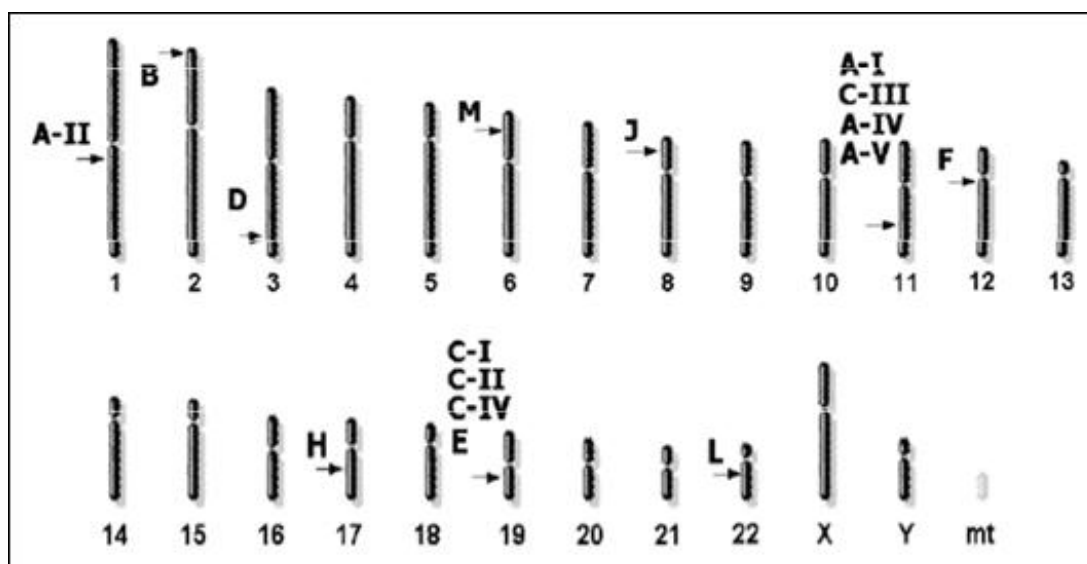


FIGURA 3 – Localização cromossômica dos genes das apolipoproteínas humanas envolvidas no metabolismo dos lipídios.

Fonte: SEDA; SEDOVÁ, 2003.

ApoA

ApoA possui quatro isoformas (A I, A II, A IV e A V), que fazem parte da constituição da HDL (BOUCHER et al., 2004).

A apolipoproteína A I é uma proteína encontrada nas HDL e sua síntese é hepática e em menor extensão no intestino delgado. A apoA I desempenha um papel na atividade antiaterogênica da HDL e é um cofator para LCAT. Alguns estudos epidemiológicos e clínicos revelaram associação entre as baixas concentrações plasmáticas de HDL-C e da apoA I e o aumento de infarto do miocárdio (SORCI-THOMAS; THOMAS, 2002; WALLDIUS; JUNGNER, 2007).

O gene *APOA* está localizado no cromossomo 11q23 no agrupamento gênico A I - C III - A IV - A V. O gene *APOA* I, é constituído por 3 introns e 4 exons que codificam uma proteína de 243 aminoácidos (KARATHANASIS et al., 1983).

Há identificações de aproximadamente 46 mutações no gene *APOA*, sendo que 33 estão com baixas concentrações plasmáticas de HDL-C ou com altas concentrações de triglicerídios, ou ainda com maior risco de DAC (SHOULDERS et al., 1996).

Outras mutações do gene *APOA I*, também associados com a HTG, são a apoA I-Giessen e a apoA I-Marburg (Pro¹⁴³→Arg), que causam redução da atividade da LCAT, mas não da concentração do HDL-C (GROENENDIJK et al., 2001b).

ApoA II é a segunda proteína mais abundante de HDL. O gene *APOA II* está localizado no cromossomo 1 na região próxima ao centrômero, com 4 exons. Além do seu papel estrutural, parece ativar HL, e também pode atuar na atividade da LCAT (LUSIS; FOGELMAN; FONAROW, 2004).

A função metabólica da apoA IV ainda não foi totalmente estabelecida. Este gene é constituído de 3 exons. Sugeriu-se que a apoA IV tem papel na absorção de lipídios. A síntese e secreção intestinal de apoA IV é aumentada durante a absorção de gorduras (BISGAIER et al., 1985).

A apoA V foi identificado como o quarto membro do conjunto de genes (*cluster*) das apolipoproteínas *APOA I*, *C III*, *A IV*, *A V*, no cromossomo 11, estando localizado aproximadamente 27kb distal do *APOA IV* e 37kb do *APOC III* (PENNACCHIO et al., 2001; OLIVIER et al., 2004).

A apoA V é uma proteína de 39kDa e 343 resíduos de aminoácidos (WEINBERG et al., 2003). A apoA V está presente no soro e circula em concentrações muito menores que outras lipoproteínas, como a apoA I (PENNACCHIO et al., 2001; VAN DER VLIET et al., 2001; O'BRIEN et al., 2005).

Dois mecanismos foram propostos para a ação da apoA V, desde a sua descoberta. A apoA V poderia inibir a produção hepática de VLDL (OLOFSSON, 2005), ou seria um ativador intravascular da hidrólise dos TG pela LPL (MERKEL et al., 2005).

A apoA V está associada com a regulação das concentrações plasmáticas de TG. Polimorfismos da apoA V têm sido associados com a HTG, um fator de risco independente para a DAC, e também frequente no DM2 (MERKEL; HEEREN, 2005).

ApoC

A apoC é sintetizada no fígado e secretada no plasma. A apoC I é um componente proteico das LDL de 6,6kDa. Os elevados níveis de ApoC I estão associados com hiperlipoproteinemia e aterosclerose (LUSIS et al., 1986).

ApoC II está presente nos quilomícrons, nas VLDL e nas HDL. A apoC II atua como cofator para ativação da LPL, aumentando o índice de hidrólise de TG dos Qm e VLDL (NILSSON-EHLE; GARFINKEL; SCHOTZ, 1980).

O gene *APOC II* está localizado no cromossomo 19q13 e faz parte do agrupamento gênico E, C I, C II, C IV. O gene *APOC II* é constituído por 4 exons que codificam uma proteína de 79 aminoácidos (SCOTT et al., 1985; LUSIS et al., 1986).

As mutações no gene *APOC II* estão associadas com hiperquilomicronemia e hipertrigliceridemia como a mutação C II de Paris, C II de Japão, C II de Hamburg, C II de Barcelona (SANTAMARINA-FOJO, 1998; JONG; HOFKER; HAVEKES, 1999).

A apoC III é uma proteína que participa da regulação do metabolismo de lipoproteínas ricas em TG e é um componente de quilomícrons e VLDL. O gene da *APOC III* está mapeado no cromossomo 11q23, constituído por 4 exons, próximo aos genes *APOA I* e *APOA IV*, e faz parte do agrupamento A I, C III, A IV. Vários estudos associaram a sua variabilidade genética com quadros de dislipidemia, especialmente HTG, hipercolesterolemia e risco aumentado de doenças cardiovasculares (ZENG et al., 1995; HOFFER et al., 1998; DALLONGEVILLE et al., 2000).

ApoC III é um componente dos quilomícrons e VLDL e está presente em pequena quantidade na HDL, LDL e IDL. O fígado é o principal local de síntese da apoC III, e em menor grau, o intestino (AALTO-SETÄLÄ et al., 1996). No plasma, a apoC III apresenta 3 isoformas (apoC3-0, apoC3-1, apoC3-2), que diferem entre si pelo número de ácidos siálicos ligados ao resíduo de treonina localizado na posição 74 da sequência da proteína. A apoC III inibe a atividade da LPL e da HL *in vitro* (PRICE et al., 1986; McCONATHY et al., 1992).

ApoD

O gene *APOD* foi mapeado no cromossomo 3q26.2 (YANG et al., 1994). A organização deste gene apresenta-se diferentemente do gene das outras apolipoproteínas, sugere que não é membro da família apolipoproteína multigênica. Sua função é desconhecida, no entanto a apoD é uma proteína encontrada com complexo LCAT (ALBERS et al., 1981; STEYRER; KOSTNER, 1988).

ApoE

A apoE é uma glicoproteína secretada por vários tipos de célula, principalmente no fígado e em menor proporção também é sintetizada pelo rim, supra renais, monócitos e está presente no líquido cefalorraquidiano. A apoE possui várias funções importantes como: imunoregulação, regeneração dos tecidos neurais,

ativação das enzimas lipolíticas (LPL e HL) (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003; RIDDELL et al., 2008).

O gene *APOE* foi isolado, caracterizado, e mapeado no cromossomo 19q13.2, produz um polipeptídeo composto de 299 aminoácidos, e tem no mesmo cromossomo os genes *APOC1*, *APOC2*, *APOC4* e receptor de LDL. O gene *APOE* possui 3,7kb é constituído por 3 íntrons e 4 éxons abrangendo 3.597 nucleotídeos que codificam uma proteína madura de 299 aminoácidos (SCOTT et al., 1985; HOFFMANN et al., 2002).

As mutações de ponto no éxon 4 originam três alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) com frequência polimórfica e codificam para três diferentes formas da proteína. A combinação desses alelos dá origem a seis genótipos de apoE, ($\epsilon 2\epsilon 2$, $\epsilon 2\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 4$, $\epsilon 4\epsilon 4$, $\epsilon 2\epsilon 4$). As isoformas de apoE têm diferentes afinidades por diferentes receptores celulares, proteoglicanos e lipoproteínas plasmáticas (ZANNIS, 1986; WERNETTE-HAMMOND et al., 1989; HOFFMANN et al., 2002).

O locus estrutural da apoE é polimórfico (UTERMANN; HESS; STEINMETZ, 1977; ZANNIS; BRESLOW, 1981). As três isoformas de apoE diferem entre si pelo aminoácido presente nas posições 112 e 158 da proteína (ZANNIS et al., 1982; MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003). A isoforma apoE2 apresenta cisteína na posições 112 e 158. A apoE3, isoforma mais comum, caracteriza-se por possuir um códon para cisteína na posição 112 e na posição 158 para argenina. A isoforma apoE4 contém argenina nas posições 112 e 158 (HIXSON; VERNIER, 1990). Como estas mutações envolvem adições ou perdas de sítios de restrição *HhaI*, as três formas são facilmente distinguíveis pela digestão com essa endonuclease de restrição. A sequência entre os resíduos 140 e 160 são primariamente responsáveis pela interação dos lipídios ligado à apoE com receptor LDL (MAHLEY et al. 1984). O resíduo 112 parece determinar a especificidade de ligação do lipídio à lipoproteína (MAHLEY; WEISGRABER; FARESE JR, 2003). Estudos relatam uma associação da apoE com a doença de Alzheimer e aterosclerose (HOFMAN et al., 1997).

Em comparação com o alelo $\epsilon 3$ (frequência da população ~60%), o alelo $\epsilon 4$ (frequência ~30%) aumenta níveis de colesterol plasmático, enquanto o alelo $\epsilon 2$ (frequência ~10%) diminui os níveis de colesterol plasmático (SING; DAVIGNON, 1985).

Segundo Mailly e colaboradores (1991), as variantes raras da apoE foram identificadas em E1, E5 e E7. A apoE1, que resulta da substituição Arg¹⁸⁰→Cys da

proteína, altera a conformação do domínio de ligação da apoE, diminuindo a ligação aos receptores celulares, e está associada com hiperlipidemia tipo IV (HUANG et al., 1998; HOFFMANN et al., 2001). A apoE5 foi descrita em duas famílias no Japão, cujas pessoas apresentaram HLP tipo II, e alguns parentes desenvolveram aterosclerose prematura (ORDOVAS, et al, 1987). A apoE7 está associada com a HLP tipo III e com o desenvolvimento de HTG, todas as mutações que causam HTG estão localizadas dentro do domínio C-terminal da apoE (HUANG et al., 1998; HOFFMANN et al., 2001). As interações intramoleculares deste domínio ainda não são bem conhecidas. Mais ensaios serão necessários para investigar os mecanismos pelos quais essas isoformas influenciam o metabolismo de triglicerídios (ORDOVAS, et al, 1987; DONG; WEISGRABER, 1996).

ApoH

Em estudos realizados por Bossé e colaboradores (2005), o gene *APOH* está localizado no cromossomo 17q. ApoH é uma cadeia glicoproteica que existe no plasma tanto na forma livre e em combinação com partículas de lipoproteína, incluindo HDL, VLDL e quilomícrons. A verificação na sequência do gene *APOH* está associado com o pico do diâmetro da partícula LDL (LDL-PPD). Além disso, a associação entre o gene *APOH* e LDL-PPD tem um fundamento fisiológico. ApoH é também conhecida como β 2-glicoproteína I, é a cadeia polipeptídica de 326 aminoácidos sintetizado no fígado. Seu papel no metabolismo lipoproteico não é totalmente compreendido, mas foi mostrado para ativar lipoproteína lipase e triglicerídios.

1.5.3 ApoB

Apolipoproteína B é uma proteína anfipática (Figura 4). A sequência do gene da apoB é composto por 43Kb de comprimento, possui numerosos polimorfismos já descritos, e é uma das maiores cadeias polipeptídicas. ApoB é constituída por 4.536 aminoácidos, é considerada a maior das apolipoproteínas. O gene da apoB é expresso em grande quantidade no intestino e no fígado. Em humanos o gene *APOB* está localizado no braço curto da região 23 do cromossomo 2 (2p23.4) (LUDWIG et al., 1987). Já, em camundongos o gene *APOB* é encontrado no

cromossomo 12 (LUSIS et al., 1986). A clonagem e o sequenciamento do gene da apoB tornou possível o estudo de suas variações no DNA humano (KNOTT et al., 1986).

O gene *APOB* contém 28 introns e 29 exons e é claramente distinto de outros genes das apolipoproteínas (apoA I, A II, A IV, C I, C II, C III, E). A distribuição dos introns do gene *APOB* é assimétrica, com uma concentração de um terço do gene na região 5', contendo mais de 11 introns dentro dos primeiros 500 códons e 19 introns nos primeiros 1000 códons. Já os exons 26 e 29 são mais longos, com 7572 e 1906 pb respectivamente, e estão localizados na região próxima a 3'. Nenhuma homologia de sequência foi identificada entre apoB e as outras apolipoproteínas. Há evidências que o gene *APOB* é evolutivamente relacionado com os outros genes de apolipoproteínas, porém não apresenta mais os 3 introns e os 4 exons existentes na estrutura comum da maioria das apolipoproteínas (LUDWIG et al., 1987).

O metabolismo da lipoproteína contém dois tipos de apoB: apoB48 e apoB100, com peso molecular de aproximadamente 210kDa e 540kDa, respectivamente. Estudos sugerem que apoB48 e apoB100 são produtos do mesmo gene (LUDWIG et al., 1987).

A apoB48, assim denominada por ser 48% tão grande quanto a apoB100, é uma importante estrutura protéica que reúne no intestino quilomícrons ricos em TG, e a síntese é portanto essencial para absorção intestinal da dieta de gorduras e vitaminas lipossolúveis. Dados disponíveis sugerem que apoB48 não tem um papel claro na função mediada pelo receptor do quilomícron remanescente. Os quilomícrons remanescentes são normalmente eliminados do plasma, sendo a concentração da apoB48 muito baixa, apenas alguns microgramas por mililitros (YOUNG; KARAS; KUVIN, 2004).

A apoB100 é constituinte protéico da LDL, a persistência de níveis elevados de colesterol no plasma de LDL e de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, VLDL, ILDL têm sido bem documentadas como fatores de risco para doença arterial coronariana (TYROLER, 1987; AUSTIN et al., 1988; WALLDIUS; JUNGNER, 2006; FORTI; DIAMENT, 2007). Alguns estudos apresentaram que quase 70% do colesterol circulante é transportado por partículas de LDL (KANE; HAVEL, 1995; HAVEL; KANE, 1995; MYANT, 1990; HENRY, 2008).

Os fatores ambientais (por exemplo: dieta e estilo de vida) e genéticos desempenham um papel importante na determinação do risco cardiovascular em

pacientes hiperlipidêmicos (LUSIS; IVANDIC; CASTELLANI, 2002). A elevação do nível de apoB100 além do normal no plasma humano é um fator de risco para desenvolver doenças como aterosclerose e outras cardiopatias (CASTILLO et al., 2002). No entanto, a concentração da apoB100 é aproximadamente de 88,4 mg/dL, considerada dentro dos valores da normalidade (O'BRIEN et al., 2005; PENNACCHIO et al., 2001; VAN DER VLIET et al., 2001).

Logo, a apoB100 apresenta um papel central no metabolismo das lipoproteínas e na manutenção da homeostase normal dos níveis de colesterol no plasma sanguíneo. ApoB é essencial tanto para a montagem e secreção dos quilomícrons do intestino delgado e de VLDL no fígado; assim como ligante para o receptor de LDL para mediar a captação de colesterol ao complexo celular periférico e ao fígado onde é internalizado e degradado (PEACOCK et al., 1992). A variação do gene *APOB* é suscetível de explicar algumas das diferenças inter-individuais nos níveis lipídicos plasmáticos associado à deficiência nesta proteína para contribuir com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares que tem sido relatada em estudos de populações (LUDWIG et al., 1987; YANG et al., 1989).

A capacidade da apoB100 de se ligar as lipoproteínas sugere ser devido as sequências de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 4). O domínio de ligação do receptor LDL da apoB100 é na porção carboxilo-terminal da ApoB, entre os aminoácidos 3000 e 3600 (MILINE et al., 1989). Esta região de apoB contém vários trechos curtos de aminoácidos carregados positivamente, um dos quais (aminoácidos 3359-3367) é homóloga à região de ligação ao receptor da apoE, e outro ligando ao receptor LDL. Carregados positivamente as sequências de aminoácidos da apoB100 são sugeridos a interagir com carga negativa as sequências de aminoácidos do domínio de ligação ao receptor de LDL celular (KNOTT et al., 1986; DUNNING et al., 1991).

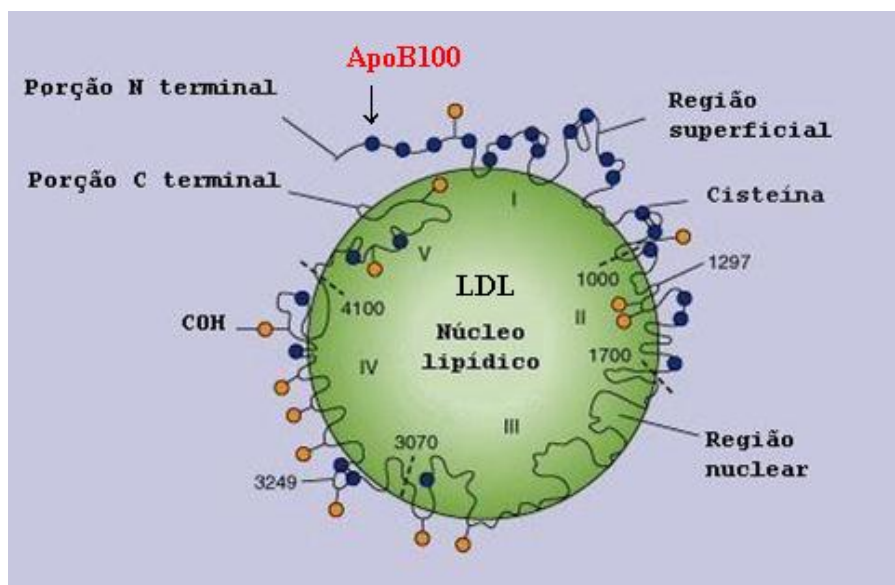


Figura 4 – Representação do papel da apolipoproteína B-100 na lipoproteína de baixa densidade (LDL).

FONTE: Adaptado de SEGREST et al., 2001.

A natureza anfipática da apoB faz com que as regiões hidrofóbicas estejam imersas no núcleo da LDL, e as hidrofílicas expostas na superfície da molécula (Figura 4) (SEGREST et al., 2001). Esta apolipoproteína possui cinco domínios estruturais, sendo o quarto domínio (aminoácidos 3070-4100) o responsável pela interação da apoB com os receptores da LDL e pela manutenção da integridade desta partícula (BROWN; GOLDSTEIN, 1979; YANG et al., 1986). Estes processos modulam a remoção de LDL do plasma e regulam a biossíntese do colesterol.

1.5.4 Variação genética da apoB-100 e a interação com risco cardíaco

A associação de RFLPs no gene *APOB* com níveis de lipoproteínas na doença arterial coronariana e na doença cerebrovascular tem sido documentada (YOUNG, 1990; LUDWIG et al., 1997; FORTI; DIAMENT, 2007; BENN, 2009).

As mutações pontuais dos supostos domínios de ligação dos receptores da apoB100 foram identificados. Três dessas mutações têm sido relacionadas com defeito na apoB100 em investigações genéticas e funcionais. A primeira substituição a ser descoberta, e, aparentemente, a mais frequente, é apoB100 (Arg³⁵⁰⁰→Gln) (SORIA et al., 1989). Outras duas substituições, apoB100 (Arg³⁵⁰⁰→Trp) e apoB100 (Arg³⁵³¹→Cys) ocorrem com menor frequência (GAFFNEY et al., 1995; FISHER et

al., 1999). Esta última foi identificada em duas famílias de origem e etnia diferente (PULLINGER et al., 1995), em quatro pacientes com DAC dos EUA, todos de origem caucasiana (LUDWIG et al., 1997), e dois pacientes franceses (RABÈS et al., 1997). Comparando a mutação apoB100 (Arg³⁵⁰⁰→Gln) com a mutação no códon 3531 está associado a um menor aumento no LDL (PULLINGER et al., 1995; WENHAM et al., 1997). De forma que a LDL associada a apoB100 (Arg³⁵³¹→Cys) apresentaram menor redução de ligação dos receptores LDL *in vitro* do que LDL dotado de apoB100 (Arg³⁵⁰⁰→Gln) (PULLINGER et al., 1995; FISHER et al., 1999).

Portanto, até a realização do ensaio, apoB100 (Arg³⁵⁰⁰→Trp) havia sido descrita em apenas uma família de origem européia (GAFFNEY et al., 1995), duas em chineses e Malayan coorte hipercolesterolêmica (CHOONG et al., 1997), em uma família de descendência asiática que vive na região de Glasgow (GAFFNEY et al., 1995), e também foi relatado em nove pessoas não aparentadas de Taiwan (TAI; PAN; LEE-CHEN, 1998). O receptor de ligação da apoB100 (Arg³⁵⁰⁰→Trp) é considerado semelhante ao de apoB100 (Arg³⁵⁰⁰→Gln) (GAFFNEY et al., 1995; FISHER et al., 1999).

As outras mutações (Gln³⁴⁰⁵→Glu), (Arg³⁴⁸⁰→Pro), (Asn³⁵¹⁶→Lys) e (Thr³⁴²¹→Gln) interferem na conformação do domínio de ligação da apoB com os receptores apoB/apoE, reduzindo a afinidade da LDL por esses receptores, elevando assim os níveis circulantes de LDL. Provocam uma forma de dislipidemia conhecida como defeito familiar da apoB (FISHER et al., 1999; FORTI et al., 2003).

1.5.5 Polimorfismos da apoB

Devido ao grande tamanho do gene *APOB* e ao grande número de variantes, a relação entre polimorfismos no gene da apoB e níveis de lipídios plasmáticos já foi descrita (PAJUKANTA et al., 1996; BENN, 2007). Além disso, níveis elevados de apoB possuem significativa relação com os receptores LDL, que constitui um marcador de risco de eventos ateroscleróticos como DAC e AVC (WALLDIUS; JUNGNER, 2006; WALLDIUS; JUNGNER, 2007; BENN, 2009).

A análise dos polimorfismos do gene da *APOB* também pode ser utilizada na identificação de marcadores genéticos de DAC e quatro regiões são alvo dessa análise: 1) região de microssatélite na região 5'; 2) deleção de nove pares de bases na região 5'; 3) sete sítios polimórficos para endonucleases de restrição (*Apa*LI,

HincII, *PvuII*, *AluI*, *XbaI*, *MspI* e *EcoRI*); 4) região hipervariável na região 3' (LUDWIG; McCARTHY, 1990).

Dentre os sítios polimórficos já descritos destacam-se: Inserção(I)/Deleção(D) (exon 1), *PvuII* (exon 4), *HincII* (exon 4), *AluI* (exon 14), *MspI* (exon 26) (SORIA et al., 1989; LEREN et al., 1998), *XbaI* (exon 26) (PRIESTLEY et al., 1985; DUMAN et al., 2005), *EcoRI* (exon 29) (MISRA et al., 2001; DUMAN et al., 2005), N4311S região hipervariável 3' (LAMIA et al., 2012); (CAVALLI et al., 2000; TAHRI-DAIZADEH, 2004; PANDEY et al., 2007), sendo os polimorfismos *EcoRI*, *XbaI* e *MspI* os mais estudados.

A mutação apoB100 ($\text{Arg}^{3500} \rightarrow \text{Gln}$) é observada com uma frequência aproximada de 1 em 500 ou 1 em 700 em populações de origem europeia (RAUH et al., 1992). Embora, a hipercolesterolemia primária que é uma desordem metabólica comum na população europeia, não há razões para a ligação molecular-defeituosa da apoB100 ainda não ter sido descoberta. Por isso, muitos investigadores basearam-se em métodos voltados especificamente para detectar a substituição $\text{Arg}^{3500} \rightarrow \text{Gln}$ para diagnosticar DFB (GAFFNEY et al., 1995).

O estudo com o polimorfismo *MspI*, região próxima a extremidade 3' (correspondente aos aminoácidos 2488-3611) no códon 3500 da proteína apoB, sugere que esta proteína resulta em alteração por substituição dos aminoácidos de argenina (CGG) para glutamina (CAG) no exon 26 (Figura 5). Estabelece que a mutação da apoB3500 resulta em menor afinidade de ligação aos receptores LDL e a consequente hipercolesterolemia (SORIA et al., 1989).

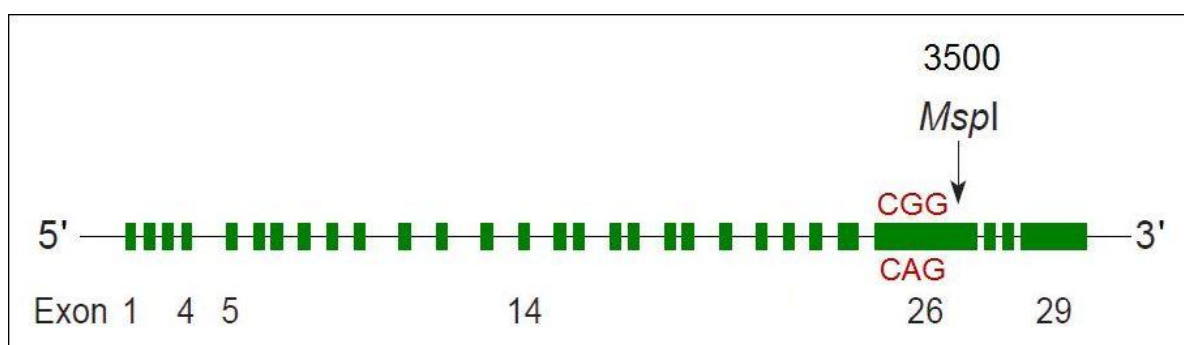


FIGURA 5 – Representação esquemática do mapa do gene *APOB*. O gene *APOB* contém 28 introns e 29 exons, e no exon 26 está localizado o polimorfismo *MspI* com a troca da arginina pela glutamina.

Fonte: Adaptado de CASTILLO et al., 2002.

A presença do sítio de clivagem para a *MspI* do polimorfismo revela o alelo M_1 na pessoa normal, e quando ocorre a mutação, resulta na troca CGG→CAG, a enzima *MspI* perde o sítio de restrição, originando o alelo M_2 . Essa variação determina três genótipos: M_1M_1 , M_1M_2 e M_2M_2 (SORIA et al., 1989). Porém, os heterozigotos M_1M_2 têm no nível plasmático 50% de apoB normal (LUSIS; FOGELMAN; FONAROW, 2004). As doenças cardiovasculares representam o mais complexo fenótipo de lipoproteínas no sangue, uma vez que é provável envolver outros fatores locais e sistêmicos. Isto é ilustrado pela gravidade altamente variável de aterosclerose entre pessoas com HF, os quais apresentam elevados níveis séricos de LDL. Por exemplo, Hobbs e colaboradores (1987) caracterizaram um alelo defeituoso do receptor de apoB/apoE em franceses canadenses. Um paciente homozigoto com HF no estudo viveu até a idade de 33 anos, enquanto outro com o mesmo defeito morreu de infarto do miocárdio, com 3 anos de idade.

A Tabela 4, resume as frequências dos alelos M_1 e M_2 determinadas em vários estudos com caucasianos e orientais. Relatam concentrações de apoB e lipídicas que têm sido relacionadas com a ocorrência de DAC, a presença de eventos recorrentes e com processos trombóticos (IZAR et al., 2003; WÄGNER et al., 2003). Benn e colaboradores (2005) sugerem que a apoB pode identificar fenótipos dislipêmicos de alto risco em pacientes com DM2 normotrigliceridêmicos. Mutações não polimórficas no gene da apoB podem causar Hipercolesterolemia Familiar, caracterizada por aumento das concentrações plasmáticas de LDL com deposição de colesterol nos tecidos e aterosclerose prematura (SOUTAR; NAOUMOVA; TRAUB, 2003; BENN et al., 2005; BENN, 2009). Estas variantes genéticas raras não podem explicar toda a variabilidade da apoB na população em geral. Como consequência, estudos encontraram uma grande variedade de frequências alélicas no gene da apoB em diferentes populações apresentando resultados inconsistentes, talvez devido à falta de análises estatísticas adequadas, linhas de seleção e diversidade populacional (IOANNIDIS et al., 2001; WHITFIELD et al., 2004).

TABELA 4 – Frequência dos alelos do polimorfismo *MspI* do gene da apoB em diferentes populações.

População	N	Definição de amostra	<i>MspI</i>		P	Referência
			M ₁ ou M ₊	M ₂ ou M ₋		
Caucasianos	233	Controle (122)	0,943	0,057	s	GENEST JR et al., 1990.
		DAC (111)	0,895	0,105		
Suecos	241	Controle (96)	-	0,113	ns	PEACOCK et al., 1992.
		IM (145)	-	0,100		
Iugoslavos	239	Controle (239)	-	0,110	s	GLISIC; SAVIC; ALAVANTIC, 1995.
Noruegueses	172	Controle (64)	0,890	0,110	ns	DELGHANDI et al., 1999.
		Casos (108)	0,850	0,150		
Chineses	301	Controle (153)	0,990	0,010	ns	PAN et al., 1995.
		DAC (148)	1,000	0,000		
Coreanos	451	Controle (216)	1,000	0,000	ns	HONG; SONG; KIM, 2001.
		DAC (235)	1,000	0,000		

N: número de amostras. ns: não significativo ($P > 0,05$). s: significativo ($P < 0,05$).

Assim, a predição de fatores de risco cardiovascular deve ser aprimorada pela combinação de fatores convencionais e outros marcadores de risco, como os polimorfismos genéticos, mesmo porque ainda não está bem claro se fatores genéticos e ambientais influenciam patologias como a DAC (BERNARD et al., 2004; AUSTIN et al., 2004). Entretanto, estudos mostram que apoB é um ótimo marcador de risco para doenças cardiovasculares (SNIDERMAN, 2005).

Em síntese, os polimorfismos genéticos da apoB têm sido indicados como marcadores genéticos da aterosclerose devido à associação com a concentração elevada dos lipídios e o risco elevado para doenças cardíacas. Essas associações foram demonstradas em várias populações do mundo, mas até o momento poucas investigações foram realizadas na população brasileira.

No entanto, nos últimos anos, a biologia molecular revolucionou vários campos de pesquisa, incluindo o das lipoproteínas, propiciando a descrição de vários distúrbios do metabolismo lipoproteico ao nível molecular e estabelecendo a significância fisiológica de várias dislipidemias, o que, seguramente, levará a um novo enfoque na busca de alternativas farmacológicas para a regulação dos níveis de lipídios, lipoproteínas e apolipoproteínas, que contribuirão para o controle do processo cardiovascular. Assim pode-se observar o envolvimento das lipoproteínas e apolipoproteínas no quadro com risco cardíaco.

Muitos polimorfismos presentes no gene *APOB* já foram utilizados como marcadores em estudos populacionais mundiais com o objetivo de correlacioná-los com os níveis lipídicos ou com risco de doenças cardiovasculares (RIOS et al., 2003; MASSON; McNEILL; AVENELL, 2003; SAKUMA; HIRATA; HIRATA, 2004), porém no Brasil este estudo ainda é escasso.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Tendo em vista a elevada taxa de morbidade e mortalidade resultante de problemas cardiovasculares, os quais estão relacionados a fatores ambientais e genéticos, e o papel da ApoB no perfil lipídico em casos de doença arterial coronariana, dislipidemias, aterosclerose, entre outras, além da ausência de estudos da incidência deste polimorfismo em uma população da Região dos Campos Gerais – PR, este estudo apresenta os seguintes objetivos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre o polimorfismo gênico da apolipoproteína B, por meio de estudo caso-controle, e fatores de risco cardiovasculares, em uma parcela da população na Região dos Campos Gerais, Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar os participantes do estudo quanto ao polimorfismo genético presente no gene ApoB, utilizando-se da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*);
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo CGG (arginina)→CAG (glutamina) do gene da apolipoproteína B e compará-las com as frequências descritas para outras populações;
- Associar os dados genéticos obtidos com características fenotípicas relacionadas aos riscos cardíacos, através da análise de correlação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Setor de Ciências da Saúde da UEPG sob o registro: 116/2011 (protocolo nº. 13664/11) (Anexo1), tendo sido mantido o sigilo dos dados relativos aos participantes durante todos os experimentos. Os pacientes concordaram em participar voluntariamente do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE (Anexo 2).

Foram obtidas 66 amostras de sangue periférico, o qual foi coletado em tubos de vácuo contendo o anticoagulante EDTAK₃ (Vacutainer, BD). Destas, 55 amostras provieram de pacientes com diagnóstico de doença com risco cardíaco (grupo de pacientes com risco) e 11 amostras de pacientes sem risco (grupo controle). A caracterização dos dois conjuntos: o grupo de pacientes com risco cardíaco e o grupo controle, foi em função dos valores de LDL alto ou baixo, de acordo com a referência da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006), III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias (2001), e I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (2012) (TABELA 1).

As amostras dos pacientes foram coletadas na Clínica Cray da Costa – Ponta Grossa/PR, especializada em tratamentos cardiorrespiratórios, sob a supervisão do médico responsável e participante da pesquisa Dr. Mário Augusto Cray da Costa, no período de 2011 a 2012. Após coletadas as amostras foram mantidas sob refrigeração (-20 °C) até seu processamento, o qual foi realizado no Laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA das amostras de sangue periférico foi realizada a partir de leucócitos utilizando-se kits comerciais (kit de extração Mini Spin-Biopur), segundo instruções do fabricante.

As amostras foram quantificadas através do espectrofotômetro modelo NanoVue - marca GE, fornecendo uma leitura da estimada concentração (ng/μL) do DNA de cada amostra. Além disso, as amostras foram submetidas à eletroforese em

gel de agarose a 1% por 1 hora a 70 V, para verificação da integridade do DNA obtido.

Ao DNA e ao marcador de peso molecular (Low Ranger 100 pb DNA Ladder – Norgen Biotek) foi adicionado o corante fluorescente para ácidos nucléicos Gel Red (Biotium) para visualização e fotodocumentação das amostras em fotodocumentador MF-ChemiBIS (DNR Bio-Imaging Systems Ltd).

3.3 GENOTIPAGEM QUANTO AO POLIMORFISMO GENÉTICO DA APOB-100

Os pacientes foram genotipados para a região polimórfica da ApoB utilizando-se a técnica de PCR-RFLP (reação da polimerase em cadeia - polimorfismos dos fragmentos de restrição), segundo Soria et al. (1989). As reações de amplificação por PCR foram realizadas utilizando-se os seguintes componentes: 40 ng de DNA molde; tampão de reação 1x; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 0,8 µM de *primer forward* (5' TCTCGGGAATATTCAGGAAGTATTG 3') e *reverse* (5' CTAAGGATCCTGCAATGTCAAGGT 3'); 1 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen); e H₂O q.s.p. 10 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (Eppendorf), programado da seguinte maneira: desnaturação inicial por 1 min a 95 °C; 35 ciclos repetidos, anelados: 1 min a 95 °C, 40 seg a 57 °C, 1 min a 72 °C; finalizando com uma extensão de 5 min a 72 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% por 30 min a 70 V para verificação da amplificação do fragmento de tamanho esperado de 481 pb (Anexo 3).

Os produtos de PCR amplificado foram então quantificados e submetidos à digestão enzimática utilizando-se a enzima de restrição *MspI* (New England Biolabs), a qual reconhece o sítio C[↓]CGG. Nas reações de clivagem, foram utilizados aproximadamente 800 ng de DNA, tampão de reação 1x (contendo 50 mM acetato de potássio, 20 mM Tris acetato, 10 mM acetato de Magnésio, 1mM DTT, pH 7,9) e 5 U de enzima. Os ensaios foram mantidos em banho seco (Loccus Biotecnologia) por 3 horas a 37 °C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 3,5% por 1 hora e 30 min a 70 V.

Pacientes considerados normais apresentaram o sítio de restrição para a enzima *MspI*, resultando na clivagem do fragmento de PCR e aparecimento de duas bandas (396 e 85 pb) (Anexo 4). Já os pacientes que apresentaram o polimorfismo

em ApoB não possuíam o sítio de restrição para a enzima *MspI*.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas da média e desvio padrão para a caracterização e comparação das amostras em relação aos parâmetros antropométricos (idade, peso, altura) foram realizadas por meio de recursos do software Microsoft Excel 2010.

O teste de contingência foi utilizado para comparar as frequências genotípicas e alélicas e entre os grupos, empregando o Programa GraphPad InStat versão 3.10, considerando $P < 0,05$ como estatisticamente significativo.

As análises de correlação de Pearson por genótipos entre as variáveis: idade, peso, IMC (índice de massa corporal), LDL, HDL, triglicerídios, diabetes mellitus, hipotireoidismo, foram realizadas no Programa SAS versão 8.1 (SAS Institute INC, 2000) (Anexo 5).

4 RESULTADOS

Os resultados foram organizados no capítulo I correspondente ao artigo científico:

CAPÍTULO I

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GENÉTICO DA APOLIPOPROTEÍNA-B E FATORES DE RISCO CARDÍACO EM PACIENTES DA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS – PR, BRASIL

Resumo

O gene da apolipoproteínaB que se apresenta como principal constituinte da LDL e possui relação com o metabolismo dos lipídios. O objetivo do presente trabalho foi investigar a associação entre o sítio polimórfico *MspI* no gene da apoB, situado no cromossomo 2, e os fatores de risco cardiovascular em um grupo de pacientes caso-controle na população da Região dos Campos Gerais (PR) Brasil, além de determinar as frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo, e associar os dados genéticos com as variáveis relacionadas aos riscos cardíacos através da análise de correlação. Foram avaliados 66 pacientes, sendo 55 separados como grupo de pacientes com risco cardiovascular e 11 pacientes considerados sem risco formando o grupo controle. A idade média dos pacientes foi de $60 \pm 10,0$ anos no grupo com risco e $53 \pm 14,0$ anos no grupo controle. O polimorfismo *MspI* (exon 26) do gene da apoB foi caracterizado por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), sendo os fragmentos de DNA, após a restrição, identificados por eletroforese em gel de agarose. O alelo normal foi denominado de M_1 e o alelo mutado de M_2 . As frequências genotípicas encontradas para o polimorfismo *MspI* foram 0,82, 0,09 e 0,09 para o grupo controle, e 0,76, 0,24 e 0,00 para o grupo de pacientes com risco, respectivamente para os genótipos M_1M_1 , M_1M_2 e M_2M_2 . Observou-se que o homozigoto M_1M_1 obteve predominância na distribuição genotípica para ambos os grupos. Não houve diferença significativa entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *MspI* do gene da apoB ($\chi^2 = 5,90$; $P > 0,05$; Teste de Contingência) quando comparados os 2 grupos em estudo. Assim, a distribuição do polimorfismo estudado, tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes com risco cardíaco, mostrou-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg, mantendo o polimorfismo estável, da mesma forma que outros estudos já relataram para as populações chinesa e coreana. Na análise de correlação de Pearson entre as variáveis de risco (idade, diabetes mellitus, LDL alto, triglicerídios alto, HDL baixo, hipotireoidismo, peso, índice de massa corporal), observou-se que a maioria das variáveis analisadas se correlacionaram para os genótipos M_1M_1 e M_1M_2 . Já para a população total estudada ($n = 66$), a associação do polimorfismo gênico da apoB não apresentou correlação com as variáveis de risco cardíaco. Por fim, este trabalho apresentou dados para o entendimento da associação do polimorfismo do gene da apoB com o distúrbio de metabolismo lipídico no desenvolvimento de fatores de risco para doenças cardiovasculares (dislipidemias, DAC, aterosclerose) na população dos Campos Gerais (PR).

Palavras-chave: Variações genéticas. ApoB. *MspI*. Nível lipídico. Fatores de risco. Doenças cardiovasculares.

Introdução

As lipoproteínas desempenham um papel central no desenvolvimento de doença cardiovascular e aterosclerótica em seres humanos. As concentrações plasmáticas de lipoproteínas e o seu destino metabólico são modulados por apolipoproteínas sobre a superfície dessas partículas ricas em lipídios. Há hipótese levantada que a variação genética em apolipoproteínas é um grande determinante da variação inter-individual na susceptibilidade para doença arterial coronariana (DAC) (UTERMANN; HESS; STEINMETZ, 1977; LAMIA et al., 2012). A apoB é uma proteína-chave na modulação do metabolismo e altamente aterogênica contendo lipoproteínas, sendo um bom modelo para testar hipóteses (LIU; ATKINSON, 2011).

ApoB é uma proteína com peso molecular de aproximadamente 540 kDa, possui duas formas distintas (apoB48 e apoB100) codificadas por um único gene, que está localizado no braço curto do cromossomo 2 na região 23, o qual possui 43 Kb com 28 introns e 29 exons (LUDWIG et al., 1987).

Em humanos o locus gênico da apoB é polimórfico. Vários estudos têm sugerido a relação entre polimorfismos no gene a apoB e níveis de lipídios plasmáticos (PAJUKANTA et al., 1996; LUDWIG et al., 1997; BENN et al., 2007). Assim, alterações genéticas e estruturais da apoB têm sido associadas com a ligação defeituosa com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), conduzindo à hipercolesterolemia, sendo esta um fator de risco importante para aterosclerose (CAVALLI et al., 2000; TAHRI-DAIZADEH et al., 2004). Além disso, nível elevado de apoB é significativo para relação dos receptores apoB/apoE, que constitui um marcador de risco de eventos cardiovasculares (WALLDIUS; JUNGNER, 2006; WALLDIUS; JUNGNER, 2007).

O gene *APOB* é expresso em grande quantidade no intestino e no fígado, e possui numerosos polimorfismos já descritos, destacando-se: Inserção(I)/Deleção(D) (exon 1), *PvuII* (exon 4), *HincII* (exon 4), *AluI* (exon 14), *XbaI* (exon 26), *MspI* (exon 26), *EcoRI* (exon 29) e região hipervariável 3' (HVR) (LEREN et al., 1998; TAHRI-DAIZADEH et al., 2004; BERNARD et al., 2004; PANDEY et al., 2007).

A apo B100 é constituinte protéico da LDL no exon 26 do códon 3500 desta proteína. Estudos relatam que a mutação da apoB3500 resulta em menor afinidade de ligação aos receptores LDL e a consequente hipercolesterolemia (SORIA et al., 1989).

A presença do sítio de clivagem para a *MspI* do polimorfismo revela o alelo M_1 no paciente normal, e quando ocorre a mutação, resulta na troca CGG→CAG, a enzima *MspI* perde o sítio de restrição, originando o alelo M_2 . Essa variação determina três genótipos: M_1M_1 , M_1M_2 e M_2M_2 (SORIA et al., 1989).

O sítio de ligação da apoB com o receptor da lipoproteína LDL localiza-se entre os resíduos de aminoácido 3130-3630 (KNOTT et al., 1986; YANG et al., 1986). Nesta região gênica estão os sítios polimórficos para a enzima *MspI*. Myant e colaboradores (1989) sugeriram associação entre doença arterial coronariana (DAC) e esses marcadores tomados em conjunto de algumas populações.

Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a associação do polimorfismo gênico *MspI* (CGG→CAG) da apolipoproteína B, por meio de estudo caso-controle, com fatores de risco cardiovasculares na população dos Campos Gerais (PR), além de determinar as frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo, e associar os dados genéticos obtidos com as variáveis relacionadas aos riscos cardíacos por meio da análise de correlação.

Material e Métodos

Obtenção das amostras

Foram obtidas 66 amostras de sangue periférico, o qual foi coletado em tubos de vácuo contendo o anticoagulante EDTAK₃ (Vacutainer, BD). Destas, 55 amostras provieram de pacientes com risco cardiovascular com LDL alto (grupo de pacientes com risco) e 11 amostras de pacientes sem risco com LDL baixo (grupo controle).

Extração do DNA e genotipagem do polimorfismo genético da ApoB

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos através do kit de extração Mini SPIN – BioPur, segundo instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas através do espectrofotômetro NanoVue GE Healthcare e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% por 1 hora, 70 V, para verificação de sua integridade.

Os pacientes foram genotipados para a região polimórfica de ApoB utilizando-se a técnica de PCR-RFLP, segundo Soria et al. (1989). As reações de amplificação por PCR foram realizadas utilizando-se os seguintes componentes: 40 ng de DNA

molde; tampão de reação 1x; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 0,8 µM de *primer forward* (5' TCTCGGGAATATTCAGGAAGTATTG 3') e *reverse* (5' CTAAGGATCCTGCAATGTCAAGGT 3'); 1 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen); e H₂O q.s.p. 10 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (Eppendorf), programado da seguinte maneira: desnaturação inicial por 1 min a 95 °C; 35 ciclos repetidos, anelados: 1 min a 95 °C, 40 seg a 57 °C, 1 min a 72 °C; finalizando com uma extensão de 5 min a 72 °C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% por 30 min a 70 V para verificação da amplificação do fragmento de tamanho esperado de 481 pb.

Os produtos de PCR amplificado foram então quantificados e submetidos à digestão enzimática utilizando-se a enzima de restrição *MspI* (New England Biolabs), a qual reconhece o sítio C[↓]CGG. Nas reações de clivagem, foram utilizados aproximadamente 800 ng de DNA, tampão de reação 1x (contendo 50 mM acetato de potássio, 20 mM Tris acetato, 10 mM acetato de Magnésio, 1 mM DTT, pH 7,9) e 5 U de enzima. Os ensaios foram mantidos em banho seco (Loccus Biotecnologia) por 3 horas a 37 °C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 3,5% por 1 hora e 30 min a 70 V.

Pacientes considerados normais apresentaram o sítio de restrição para a enzima *MspI*, resultando na clivagem do fragmento de PCR e aparecimento de duas bandas (396 e 85 pb). Já os pacientes que apresentaram o polimorfismo em apoB não possuíam o sítio de restrição para a enzima *MspI*.

Para a visualização tanto do DNA quanto do produto de PCR e clivagem foi adicionado corante fluorescente Gel Red (Biotium) 1:1000. Em cada gel foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb (Norgen) como padrão. O produto clivado foi capturado e fotodocumentado com câmera MF-ChemiBIS (DNR Bio-Imaging Systems Ltd)

Estatística

As análises estatísticas da média e desvio padrão para a caracterização e comparação das amostras em relação aos parâmetros antropométricos foram realizadas por meio de recursos do software Microsoft Excel 2010.

O teste de contingência (Qui-quadrado) foi utilizado para comparar as frequências genotípicas e alélicas e entre os grupos, empregando o Programa

GraphPad InStat versão 3.10, considerando $P < 0,05$ como estatisticamente significativo.

As análises de correlação linear de Pearson por genótipos entre as variáveis: idade, peso, IMC - índice de massa corporal, LDL, HDL, triglicerídios, diabetes mellitus, hipotireoidismo, foram realizadas no Programa SAS versão 8.1 (SAS Institute, 2000).

Resultados

1 Caracterização das amostras

Os resultados de média e desvio padrão para os dados antropométricos (idade, peso, altura e IMC) para os grupos em estudo estão apresentados na Tabela 1. Os 66 pacientes foram divididos em controle e pacientes com risco em função da caracterização dos valores de LDL alto ou baixo.

TABELA 1 - Caracterização de amostra em estudo.

Parâmetros	Grupo controle (n = 11)	Grupo de pacientes com risco cardiovascular (n = 55)
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Idade (anos)	53,0 $\pm$ 14,0	60,0 $\pm$ 10,0
Peso (kg)	80,7 $\pm$ 10,0	79,0 $\pm$ 15,0
Altura (m)	1,64 $\pm$ 0,1	1,65 $\pm$ 0,1
IMC (kg/m ²)	29,7 $\pm$ 3,9	29,0 $\pm$ 4,9

DP: Desvio padrão

IMC: Índice de massa corporal

2 Análises moleculares

Os pacientes foram genotipados em normais, contendo o alelo normal CGG, denominado M_1 , e o alelo mutado CAG como M_2 na porção 3500 para o aminoácido. Foram observados pacientes homozigotos para o alelo M_1 , heterozigotos e homozigotos para o alelo mutante (Figura 1). A distribuição de frequência dos genótipos está descrita na Tabela 2. As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises estão representadas na Tabela 3.

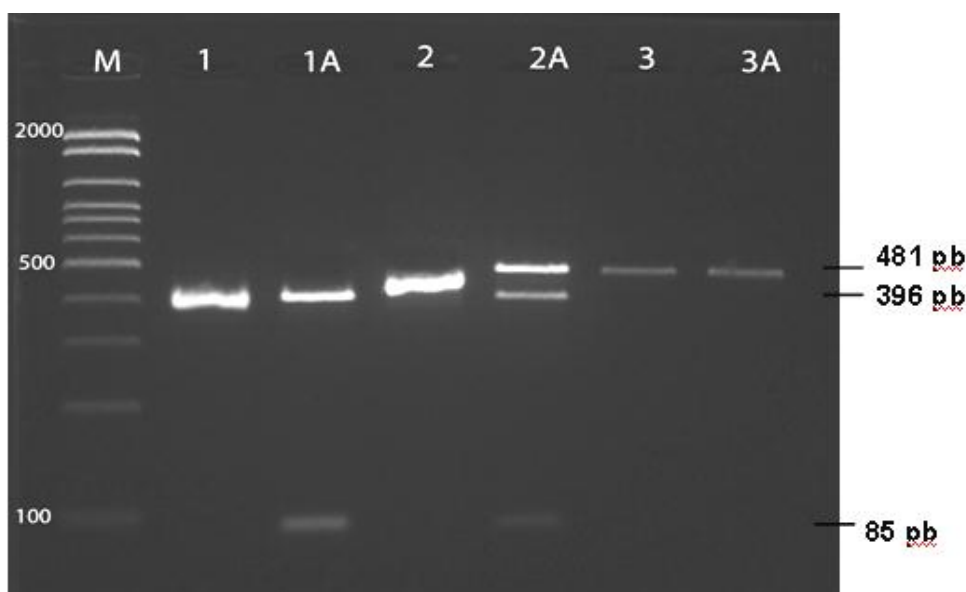


FIGURA 1 - Eletroforese dos produtos de PCR-RFLP (481 pb) do exon 26 do gene ApoB com a enzima *MspI*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 3,5%, corado com Gel Red 1%, mostrando o produto de amplificação do gene da apoB em três pacientes (1, 2 e 3), e o produto de clivagem deste fragmento com a enzima *MspI* para os respectivos pacientes (1A e 2A), e a não clivagem para o paciente homozigoto (3A). M = marcador de peso molecular de 100 pb.

TABELA 2 - Distribuição de número (n) e frequência (%) dos genótipos para o polimorfismo CGG→CAG no gene da apolipoproteína B, nos grupos analisados.

Genótipos	Grupo controle (n = 11)	Grupo de pacientes com risco (n = 55)
	n (%)	n (%)
M_1M_1	9 (81,8)	42 (76,4)
M_1M_2	1 (9,1)	13 (23,6)
M_2M_2	1 (9,1)	0 (0)

Análise molecular da distribuição de frequência (%) genotípica e alélica para o polimorfismo CGG→CAG no gene da apolipoproteína B, dos grupos analisados na população dos Campos Gerais, PR.

TABELA 3 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo CGG→CAG no gene da ApoB nos grupos estudados.

	Genótipos			Alelos	
	M ₁ M ₁ (n)	M ₁ M ₂ (n)	M ₂ M ₂ (n)	M ₁	M ₂
Grupo controle	0,82 (9)	0,09 (1)	0,09 (1)	0,865	0,135
Grupo de pacientes com risco	0,76 (42)	0,24 (13)	0 (0)	0,880	0,120
	$\chi^2 = 5,90$ $P = 0,051$				

As frequências genotípicas e alélicas entre os grupos controle e pacientes com risco cardíaco não foram significantes estatisticamente. Para o teste de contingência a distribuição do polimorfismo do estudo na população da região dos Campos Gerais, se mostrou no equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes com risco cardiovascular ($P > 0,05$).

3 Análise de correlação

As análises de correlação linear de Pearson entre as variáveis idade, diabetes mellitus, LDL, triglicerídios, HDL, hipotireoidismo, peso e IMC entre os pacientes com os genótipos estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5. O genótipo 3 (M₂M₂) foi observado em apenas um paciente e desta forma não foi possível fazer a análise de correlação entre as variáveis para esse genótipo.

TABELA 4 - Análise de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas, idade, diabetes mellitus (DM), LDL alto (LDLA), triglicerídios alto (TGA), HDL baixo (HDLB), hipotireoidismo (HIPOT), peso e índice de massa corporal (IMC) entre pacientes de genótipo **1** (M_1M_1).

	DM	LDLA	TGA	HDLB	HIPOT	PESO	IMC
Idade	-0,18	-0,34 *	0,08	-0,01	0,02	-0,36 **	-0,21
DM	-	0,02	0,07	0,13	0,06	-0,05	-0,24
LDLA		-	0,11	-0,03	-0,11	0,05	0,08
TGA			-	0,28 *	-0,02	-0,39 **	-0,27
HDLB				-	0,13	-0,02	-0,04
HIPOT					-	0,04	0,07
Peso						-	0,71 **

* = significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$). ** = significativo a 1% de probabilidade ($P < 0,01$).

TABELA 5 - Análise de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas, idade, diabetes mellitus (DM), LDL alto (LDLA), triglicerídios alto (TGA), HDL baixo (HDLB), hipotireoidismo (HIPOT), peso e índice de massa corporal (IMC) entre pacientes de genótipo **2** (M_1M_2).

	DM	LDLA	TGA	HDLB	HIPOT	PESO	IMC
Idade	-0,08	0,43	0,05	-0,06	-0,38	-0,55 *	-0,56*
DM	-	-0,27	0,71 **	0,14	0,0	-0,41	-0,46
LDLA		-	-0,27	-0,27	-0,67 **	-0,01	0,01
TGA			-	0,14	0,0	-0,52 *	-0,48
HDLB				-	0,0	-0,02	-0,19
HIPOT					-	-0,26	-0,07
Peso						-	0,9 *

* = significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$). ** = significativo a 1% de probabilidade ($P < 0,01$).

Discussão

A identificação de fatores de risco que predisõem a desenvolver doenças cardiovasculares continua sendo um importante desafio em nossa sociedade. As alterações séricas dos lipídios, das lipoproteínas e das apolipoproteínas têm sido implicadas no desenvolvimento progressivo da aterosclerose e constituem os principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares (LOTUFO, 1998; AUSTIN, 1999).

Vários estudos têm demonstrado a influência de variações genéticas sobre as concentrações plasmáticas de triglicerídios e LDL, sobre os mecanismos pelos quais essas alterações afetam as concentrações dos lipídios sanguíneos, muito embora ainda não totalmente esclarecidos (FORTI et al., 2003).

A dificuldade da padronização nos procedimentos diagnósticos para as doenças cardiovasculares reflete a ausência de marcadores de diagnóstico definitivos ou um padrão ouro, para estas patologias. O diagnóstico precoce e o acompanhamento adequado dos pacientes continuam sendo as principais ferramentas para prevenir complicações (REECE; LEGUIZAMÓN; WIZNITZER, 2009).

A elevação do nível de apoB100 além do normal no plasma se mostrou ser um fator de risco para desenvolver doenças como aterosclerose e outras cardiopatias (CASTILLO et al., 2002).

Inúmeros ensaios reportados na literatura têm projetado a apoB num cenário clínico de prevenção, por ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CASTILLO et al., 2002; SNIDERMAN et al., 2003; WALLDIUS; JUNGNER, 2006). Adicionalmente a DAC segundo Stamler e colaboradores (1993) decorre de hábitos de vida com estilo ocidental, o que torna pertinente para nossa realidade, a inclusão do exame de apoB a nível plasmático como um adjuvante de exames rotineiros como LDL, HDL, TG e colesterol total. Ainda, se o paradigma atual de saúde pública detém seus pilares na medicina preventiva, o rastreamento e inserção da apoB em protocolos preventivos, poderá ser um indicativo significativo na prevenção de doenças crônicas como o DM2 que segundo Bernard (2004) está relacionado com disfunções metabólicas de lipídios, lipoproteínas e apoB.

Os produtos do gene analisados neste estudo, podem ter associação com os

níveis lipídicos plasmáticos, embora alguns sejam discordantes de vários trabalhos publicados (CHIODINI et al., 2003).

Comparação dos grupos estudados com a idade, peso e altura

Em relação à idade dos voluntários, componentes das amostras obtidas, foi constada uma média superior de idade no grupo com risco cardiovascular em relação ao grupo controle (Tabela 1), sendo um fator inerente aos pacientes atendidos na clínica particular, especializada no acompanhamento de doenças cardiovasculares. A faixa etária marcadamente superior apresentada pelos pacientes do grupo com risco em relação ao controle (média 60,0 *versus* 53,0 anos) reflete que o risco cardíaco aumenta com a idade. Estudos revelam que as doenças cardiovasculares são comuns após os 55 anos de idade aproximadamente (MYANT et al., 1989; LUSIS; MAR; PAJUKANTA, 2004; LUSIS; FOGELMAN; FONAROW, 2004), que está em concordância com nossos dados.

Os valores do peso e da altura apresentaram-se próximos em ambos os grupos e parâmetros (Tabela 1). Como o índice de massa corporal (IMC) é uma medida internacional usada para calcular o peso ideal, foram obtidos os IMC do grupo de pacientes em risco e do controle. O IMC dos grupos em estudo mostraram valores semelhantes de IMC 29,7 kg/m² para o controle e IMC 29,0 kg/m² para o grupo de pacientes com risco cardiovascular (Tabela 1). O excesso de peso é registrado no índice de massa corpórea – IMC > 25 kg/m², e o acúmulo de gordura na região abdominal, que está associado a um maior risco de doença aterosclerótica. Aproximadamente 32% da população brasileira apresenta sobrepeso, e 8% dessa população apresenta obesidade (IMC > 30 kg/m²) (III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias, 2001; IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2007).

Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo genético da apoB nos grupos estudados e em outras populações

A Tabela 2 apresenta a distribuição de número e frequência percentual dos genótipos observados para proporções no sítio polimórfico *MspI* (CGG→CAG) do gene da apoB nos grupos deste estudo. Foi encontrada uma frequência dos

genótipos no grupo controle ($n = 11$) de 81,8% para o homozigoto M_1M_1 , 9,1% para o heterozigoto M_1M_2 e 9,1% para o homozigoto M_2M_2 . Para o grupo de pacientes com risco cardíaco ($n = 55$) a distribuição de frequência genotípica encontrada foi de 76,4% para o genótipo M_1M_1 , 23,6% para o M_1M_2 , e nula para M_2M_2 . Assim, revela-se que o homozigoto M_1M_1 é predominante na distribuição genotípica para ambos os grupos. Contudo, no grupo de pacientes com risco houve um aumento no heterozigoto M_1M_2 . As frequências genotípicas e alélicas entre os grupos controle e pacientes com risco cardíaco não foram significantes estatisticamente, conforme indica a Tabela 3, por exemplo a frequência do alelo M_1 representou 0,865 para grupo controle *versus* 0,880 para grupo de paciente com risco, e a frequência do alelo M_2 foi 0,135 para controle *versus* 0,120 para grupo com risco. Estes dados condizem com a pesquisa chinesa publicada por Pan et al. (1995), na qual a distribuição de frequência genotípica do polimorfismo *MspI* para o gene apoB mostrou predominância para o homozigoto ($M+M+ = M_1M_1$), indicando 100% para o grupo com DAC e 99% para o grupo controle, com frequências genotípicas e alélicas também não significantes estatisticamente, esta mesma constatação ocorreu com os caucasianos relatado por Delghandi e colaboradores (1999).

A distribuição do polimorfismo estudado na população da região dos Campos Gerais, Paraná, Brasil, se mostrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes com risco cardiovascular ($\chi^2 = 5,90$; $P > 0,05$) (Tabela 3). Da mesma maneira, foi relatado na população chinesa e coreana que a distribuição polimórfica *MspI* do gene da apoB também se apresentou no equilíbrio de Hardy-Weinberg para os grupos controle e DAC (PAN et al., 1995; HONG; SONG; KIM, 2001). Desta forma, a população em estudo mostrou-se homogênea pelo fato de não estar apresentando ação de nenhum fator evolutivo sobre a mesma, capaz de provocar alteração das frequências alélicas, mantendo o polimorfismo estável, com frequência alélica superior a 1%. Contudo, o esperado era encontrar desequilíbrio nesta população, por se tratar de uma amostra selecionada de pacientes com diagnóstico clínico com risco cardiovascular.

Estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg em uma população mendeliana significa ausência de alguns fatores evolutivos atuando sobre a população, com frequências alélicas permanecendo constantes de geração a geração, e proporções genotípicas atinjindo um equilíbrio estável, com um número grande de indivíduos, acasalamento aleatório, sem seleção, sem mutação, e sem migração entre as

populações (FUTUYMA, 1998; RIDLEY, 2004). Por outro lado, as forças que provocam desvios nas frequências de Hardy-Weinberg incluem: mutação, seleção natural, deriva genética, acasalamento seletivo, migração entre as populações, população limitada, população não estar em panmixia (RICKLEFS, 2003; RIDLEY, 2004; GRIFFITHS et al., 2008).

Diferente da fenilcetonúria (PKU) e da anemia falciforme que são classificadas como monogênicas ou doenças hereditárias mendelianas, a doença cardiovascular é uma doença multifatorial ou poligênica que pode diferir em cada população (GRIFFITHS et al., 2008). Por exemplo, a prevalência de doença arterial coronariana varia muito entre diferentes populações, e as frequências dos polimorfismos do gene da apoB pode variar entre os grupos étnicos (HONG; SONG; KIM, 2001).

Estudos de associação entre o polimorfismo da apoB e níveis lipídicos têm relatado resultados contraditórios entre as populações. Esta associação se apresenta principalmente em populações caucasianas – iugoslava (GLISIC; SAVIC; ALAVANTIC, 1995), inglesa (PEACOCK et al., 1992), finlandesa (TIKKANEN; HELIÖ, 1992), canadense (POULIOT et al., 1994; VOHL et al., 1996), norueguesa (DELGHANDI et al., 1999) e dinamarquesa (TYBJAERG-HANSEN et al., 1991). Porém esta associação geralmente não se apresenta em populações asiáticas (RENGES et al., 1991; RENGES et al., 1992; SAHA et al., 1992; PAN et al., 1995; CHOONG; SETHI; KOAY, 1999; HONG; SONG; KIM, 2001).

Entretanto, os trabalhos citados geralmente são realizados com populações de origem homogênea. Por exemplo, os coreanos apresentam taxa muito baixa de casamento inter-populações, mantendo uma população homogênea por um longo período de tempo (HONG; SONG; KIM, 2001).

Por outro lado a população brasileira é muito heterogênea, resultado de séculos de relações étnicas entre os colonizadores europeus, os escravos africanos e ameríndios nativos. A consequência disso é a categorização imprecisa da origem étnica ocorrendo uma miscigenação. O censo brasileiro sugere auto-classificação em cinco categorias: branco, negro, pardo, indígena ou amarelo (oriental); negros e pardos constituem 45% de toda a população e cerca de 99% da população não caucasiana. Apesar disso, em um estudo nacional por amostragem domiciliar, apenas 5,4% dos brasileiros declaram a sua cor como negra. No Brasil o conceito étnico encontra-se mais relacionado à cor da pele e aos traços faciais do que à

ancestralidade (HERINGER, 2002; SALZANO; HURTADO, 2004; RAMALHO; MAGNA; GIRALDI, 2006).

Uma vez que os pacientes dos grupos em estudo neste trabalho pertencem à população do Sul do Brasil (região dos Campos Gerais - PR), esperava-se encontrar associação entre o polimorfismo *MspI* do gene da apoB e o risco cardiovascular promovido por alterações lipídicas, pois estudos realizados com outras populações caucasianas previamente citados mostram essa associação. Entretanto, os resultados do presente trabalho divergiram desta expectativa, talvez pelo fato de se utilizar um número pequeno de amostras nas análises. Porém em um trabalho análogo de uma população brasileira foi encontrada esta associação envolvendo outro marcador 3'HVR (CAVALLI et al., 2000). Segundo Hong, Song e Kim (2001), os polimorfismos do gene apoB são bem mais frequentes em caucasianos do que em orientais.

Análise de correlação dos genótipos do gene da apoB

Foi realizada a análise de correlação de Pearson entre oito variáveis associadas ao risco de doenças cardíacas (idade, DM, LDLA, TGA, HDLB, HIPOT, peso, IMC), para os genótipos **1** (M_1M_1) e **2** (M_1M_2) do gene da apoB dos grupos estudados.

De acordo com Figueiredo Filho e Silva Júnior (2009), o coeficiente de correlação Pearson (r) é uma medida da associação linear entre duas variáveis, e seu valor varia de -1 a 1. O sinal de r indica se a direção do relacionamento é positiva (variáveis diretamente proporcionais) ou negativa (variáveis inversamente proporcionais), enquanto que seu valor absoluto representa a força da relação entre as variáveis. Uma correlação perfeita ($r = -1$ ou $r = 1$) indica que o valor de uma das variáveis pode ser determinado exatamente ao se saber o valor da outra. Já uma correlação de valor nulo indica a ausência de relação linear entre as variáveis. Dancey e Reidy (2006) classificam o coeficiente de correlação de Pearson em três níveis: $r = 0,1$ até $0,3$ (fraca correlação); $r = 0,4$ até $0,6$ (correlação moderada); $r = 0,7$ até $1,0$ (forte correlação).

A Tabela 4 mostra os valores de correlação para o genótipo **1** (M_1M_1). A forte correlação positiva do IMC com o peso ($r = 0,71$) apresentou-se significativa ($P < 0,01$). O peso foi significativamente ($P < 0,01$) correlacionado com a idade e com

TGA ($r = -0,36$ e $r = -0,39$, respectivamente), porém com direção negativa. O HDLB apresentou correlação significativa com TGA ($r = 0,28$). O LDLA se correlacionou significativamente ($P < 0,05$) de forma negativa com a idade ($r = -0,34$).

A Tabela 5 exibe as correlações para o genótipo 2 (M_1M_2). O DM se correlacionou com o TGA ($r = 0,71$) de forma significativa ($P < 0,01$), o que concorda com a já descrita elevação nas concentrações de triglicerídios em pessoas com diabetes (TAN et al., 2001). O HIPOT foi significativamente ($P < 0,01$) correlacionado com direção negativa com o LDLA ($r = -0,67$). O peso foi significativamente correlacionado ($P < 0,05$) de maneira negativa com a idade ($r = -0,55$) e com TGA ($r = -0,52$). O IMC se correlacionou significativamente ($P < 0,05$) com a idade com coeficiente negativo ($r = -0,56$), assim como foi observado na pesquisa de Haffner et al., (2002), conduzida quando obteve com pacientes diabéticos na correlação negativa de Pearson. Não foi obtida correlação entre HIPOT e as variáveis DM, TGA e HDLB em nossas análises.

A forte correlação positiva observada entre diabetes mellitus e a elevada taxa de triglicerídios no genótipo M_1M_2 pode estar vinculada ao desenvolvimento de doença cardiovascular, o que associa o diabetes mellitus a dislipidemias secundárias (American Diabetes Association, 2005). Os pacientes diabéticos, devido ao alto nível de colesterol circulante e outros lipídios, desenvolvem doença arterial coronariana (GUYTON; HALL, 1997). A obesidade também desempenha um papel no desenvolvimento de diabetes mellitus. Geralmente, os diabéticos morrem de doenças cardiovasculares e de suas complicações (TAN et al., 2001). A idade avançada e a alta frequência de obesidade do grupo de pacientes estudado são causas subjacentes da atual epidemia de diabetes mellitus tipo 2. Embora muitos pacientes diabéticos apresentem níveis de colesterol-LDL próximos da média, as partículas de LDL tendem a ser menores e mais densas, portanto mais aterogênicas, e os níveis de HDL baixo e de triglicerídios elevados (LIBBY, 2008).

A correlação negativa apresentada entre hipotireoidismo e LDL elevado no genótipo M_1M_2 sugere que o hipotireoidismo não se enquadra como fator de dislipidemia secundária ao desenvolvimento de aterosclerose no grupo em estudo. Entretanto, Guyton e Hall (1997) descrevem o desenvolvimento de doença cardiovascular em alguns pacientes hipotireoideos, uma vez que o hipotireoidismo causa um aumento da quantidade de colesterol-LDL no sangue devido à excreção diminuída do colesterol-LDL na bile pelo fígado.

Analisando os valores significativos estatisticamente da correlação entre as oito variáveis associadas ao risco de doenças cardíacas, para ambos os genótipos, observou-se uma predominância de valores negativos para o coeficiente de correlação.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. Ao Dr. Mario Augusto Cray da Costa, pelo fornecimento das amostras de sangue.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação de fatores de risco que levam ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares continua sendo um importante desafio em nossa sociedade. As alterações séricas dos lipídios, das lipoproteínas e das apolipoproteínas, em especial a apoB, implicam no desenvolvimento progressivo das dislipidemias, DAC e aterosclerose, além de acarretarem em um aumento na probabilidade de ocorrência de doenças cardiovasculares.

Os pacientes estudados pertencentes à população dos Campos Gerais (PR) apresentaram idade média de $60 \pm 10,0$ anos no grupo com risco cardiovascular e $53 \pm 14,0$ anos no grupo controle, demonstrando, em acordo com a literatura que o risco para doenças cardíacas tende a aumentar com a idade avançada.

Os valores médios encontrados para o IMC ($29,0 \pm 4,9$ kg/m² para grupo com risco cardíaco e $29,7 \pm 3,9$ kg/m² para o grupo controle) constituem um alerta para estes pacientes que se encontram com excesso de peso e a caminho de se tornarem obesos, o que pode ser consequência da disfunção do metabolismo lipídico, dos níveis de colesterol LDL e da concentração plasmática de apoB.

As frequências genotípicas e alélicas entre os grupos controle e pacientes com risco cardíaco não foram significantes estatisticamente ($P > 0,05$), o que indica que a distribuição do polimorfismo *MspI* no gene da apoB da amostra populacional estudada se encontra dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como foi encontrado nas populações chinesa e coreana.

Por não apresentar nenhum fator evolutivo atuando sobre si capaz de provocar alteração das frequências alélicas, a população estudada se mostrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mantendo o polimorfismo estável. Esperava-se porém um desvio do equilíbrio por se tratar de uma amostra selecionada com diagnóstico de quadro clínico cardíaco.

O genótipo M_1M_1 obteve predominância em relação aos genótipos M_1M_2 e M_2M_2 na distribuição genotípica para ambos os grupos (81,8% para controle e 76,4% para grupo com risco). No grupo de risco o genótipo M_1M_2 representou 23,6%, superior aos 9,1% encontrados para este genótipo no grupo controle, o que pode sugerir uma miscigenação da população. O genótipo mutado M_2M_2 foi encontrado em um único paciente no grupo controle.

A análise de correlação de Pearson entre as variáveis de risco (idade,

diabetes mellitus, LDL alto, triglicerídios alto, HDL baixo, hipotireoidismo, peso, índice de massa corporal) para os genótipos do gene da apoB dos grupos estudados mostrou alguns valores estatisticamente significativos ($P < 0,01$), destacando-se para o genótipo M_1M_2 uma forte correlação positiva ($r = 0,71$) entre diabetes mellitus e a elevada taxa de triglicerídios.

Entretanto, observou-se que os valores negativos do coeficiente de correlação se sobressaíram em relação aos valores positivos para os genótipos M_1M_1 e M_1M_2 . A análise de correlação realizada para os genótipos M_1M_1 e M_1M_2 mostrou correlação entre a maioria das variáveis de risco analisadas. Não foi possível realizar a análise de correlação entre as variáveis para o genótipo M_2M_2 , homozigoto para a mutação, observado em apenas um dos pacientes. Já para a população geral estudada ($n = 66$), o polimorfismo gênico da apoB estudado não apresentou correlação com as variáveis de risco cardíaco analisadas.

Visto que os participantes dos grupos em estudo neste trabalho pertencem à população dos Campos Gerais (PR), esperava-se encontrar associação entre o polimorfismo *MspI* do gene da apoB e o risco cardiovascular promovido por alterações lipídicas, assim como se observa em estudos realizados com outras populações caucasianas. Uma possível explicação para a divergência dos resultados talvez seja o número pequeno de amostras utilizado nas análises, além da utilização de um único sítio polimórfico.

Contudo, considera-se que este trabalho reúne informações pertinentes ao entendimento do polimorfismo do gene da apoB, e sua relação com o distúrbio de metabolismo lipídico no desenvolvimento de fatores de risco para doenças cardiovasculares na população dos Campos Gerais (PR).

Como trabalhos futuros, sugere-se testar em um número maior de pacientes, classificar a etnia original da população, bem como testar outras enzimas da apoB (*IID*, *EcoRI*, *XbaI*, *PvuII*, *HincII*, *AluI*), e outros marcadores gênicos (*APOE*, *APOC*, *APOA*, *Lp(a)*, *USF1*, entre outros) que possam ser auxiliares no entendimento clínico e genético da apoB, e assim favorecer a diretriz de diagnóstico preventivo e tratamento na medicina, a fim de viabilizar a detecção precoce de doenças cardiovasculares, entre outras atreladas ao gene da apoB em humanos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF) da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 99, n. 2, supl. 2, p. 1-28, 2012.

III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 77, supl. 3, p. 1-48, 2001.

IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 88, supl.1, p. 1-19, 2007.

ABIFADEL, M.; VARRET, M.; RABÈS, J. P.; ALLARD, D.; OUGUERRAM, K.; DEVILLERS, M.; CRUAUD, C.; BENJANNET, S.; WICKHAM, L.; ERLICH, D.; DERRÉ, A.; VILLÉGER, L.; FARNIER, M.; BEUCLER, I.; BRUCKERT, E.; CHAMBAZ, J.; CHANU, B.; LECERF, J. M.; LUC, G.; MOULIN, P.; WEISSENBAACH, J.; PRAT, A.; KREMPF, M.; JUNIEN, C.; SEIDAH, N. G.; BOILEAU, C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant ypercholesterolemia. **Nature Genetics**, v. 34, n. 2, p. 154-6, 2003.

ALBERS, J. J.; CHEUNG, M. C.; EWENS, S. L.; TOLLEFSON, J. H. Characterization and immunoassay of apolipoprotein D. **Atherosclerosis**, v. 39, n. 3, p. 395-409, 1981.

ALLAYEE, H.; KRASS, K. L.; PAJUKANTA, P.; CANTOR, R. M.; VAN DER KALLEN, C. J. H.; MAR, R.; ROTTER, J. I.; BRUIN, T. W. A.; PELTONEN, L.; LUSIS, A. J. Locus for Elevated Apolipoprotein B Levels on Chromosome 1p31 in Families With Familial Combined Hyperlipidemia. **Circulation Research**, v. 90, p. 926-931, 2002.

ALLENDER, S.; SCARBOROUGH, P.; PETO, V.; RAYNER, M.; LEAL, J.; LUENGO-FERNANDEZ R., GRAY, A. European cardiovascular disease statistics. **European Heart Network**, p. 1-112, 2008.

AALTO-SETÄLÄ, K.; WEINSTOCK, P. H.; BISGAIER, C. L.; WU, L.; SMITH, J. D.; BRESLOW, J. L. Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apoC-III transgenic mice. **Journal of Lipid Research**, v. 37, n. 8, p. 1802-1811, 1996.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.28, supl.1, p.S37-S42, 2005.

AUSTIN, M. A.; BRESLOW, J. L.; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; WILLETT, W. C.; KRAUSS, R. M. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. **Journal of the American Medical Association**, v. 260, n. 13, p. 1917-1921, 1988.

AUSTIN, M. A. Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v. 83, n. 9, p. 13-16, 1999.

AUSTIN, M. A.; HUTTER, C. M.; ZIMMERN, R. L.; HUMPHRIES, S. E. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. **American Journal of Epidemiology**, v. 160, n. 5, p. 421-429, 2004.

BALLANTYNE, C. M.; RAICHLEN, J. S.; CAIN, V. A. Statin therapy alters the relationship between apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol targets in high-risk patients: the MERCURY II (Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin) trial. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 8, p. 626-632, 2008.

BARRETT-CONNOR, E. L.; COHN, B. A.; WINGARD, D. L.; EDELSTEIN, S. L. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo study. **Journal of the American Medical Association**, v. 265, n. 5, p. 627-631, 1991. [Errata em JAMA 1991, v. 265, n. 24, p. 3249]

BARTER, P. J.; BALLANTYNE, C. M.; CARMENA, R.; CASTRO CABEZAS, M.; CHAPMAN, M. J.; COUTURE, P.; DE GRAAF, J.; DURRINGTON, P. N.; FAERGEMAN, O.; FROHLICH, J.; FURBERG, C. D.; GAGNE, C.; HAFFNER, S. M.; HUMPHRIES, S. E.; JUNGNER, I.; KRAUSS, R. M.; KWITEROVICH, P.; MARCOVINA, S.; PACKARD, C. J.; PEARSON, T. A.; REDDY, K. S.; ROSENSON, R.; SARRAFZADEGAN, N.; SNIDERMAN, A. D.; STALENHOEF, A. F.; STEIN, E.; TALMUD, P. J.; TONKIN, A. M.; WALLDIUS, G.; WILLIAMS, K. M. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, n. 3, p. 247-258, 2006.

BERG, K. A new serum type system in man - the LP system. **Acta pathologica, microbiologica et immunologica scandinavica**, v. 59, p. 369-382, 1963.

BEVAN, S.; DICHGANS, M.; WIECHMANN, H. E.; GSCHWENDTNER, A.; MEITINGER, T.; MARKUS, H. S. Genetic variation in members of the leukotriene biosynthesis pathway confer an increased risk of ischemic stroke: a replication study in two independent populations. **Stroke**, v. 39, n. 4, p. 1109-1114, 2008.

BEIGUELMAN, B. A lei de Hardy e Weiberg. In: **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. 3. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. cap.7. p. 179-202.

BENN, M.; NORDESTGAARD, B. G.; JENSEN, J. S.; GRANDE, P.; SILLESEN, H.; TYBJAERG-HANSEN, A. Polymorphism in APOB associated with increased low-density lipoprotein levels in both genders in the general population. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 10, p. 5797-5803, 2005.

BENN, M.; NORDESTGAARD, B. G.; JENSEN, J. S.; TYBJAERG-HANSEN, A. Polymorphisms in apolipoprotein B and risk of ischemic stroke. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 9, p. 3611-3617, 2007.

BENN, M. Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review. **Atherosclerosis**, v. 206, p. 17–30, 2009.

BERNARD, S.; CHARRIÈRE, S.; CHARCOSSET, M.; BERTHEZÈNE, F.; MOULIN, P.; SASSOLAS, A. Relation between Xba1 apolipoprotein B gene polymorphism and cardiovascular risk in a type 2 diabetic cohort. **Atherosclerosis**, v. 175, n. 1, p. 177-181, 2004.

BISGAIER, C. L.; SACHDEV, O.P.; MEGNA, L.; GLICKMAN, R. M. Distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma. **Journal of Lipid Research**, v. 26, p. 11-25, 1985.

BORÉN, J.; EKSTRÖM, U.; AGREN, B.; NILSSON-EHLE, P.; INNERARITY, T. L. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 12, p. 9214-9218, 2001.

BOSSÉ, Y.; FEITOSA, M. F.; DESPRÉS, J. P.; LAMARCHE, B.; RICE, T.; RAO, D. C.; BOUCHARD, C.; PÉRUSSE, L.; VOHL, M. C. Detection of a major gene effect for LDL peak particle diameter and association with apolipoprotein H gene haplotype. **Atherosclerosis**, v.182, n. 2, p. 231-239, 2005.

BOUCHER, J.; RAMSAMY, T. A.; BRASCHI, S.; SAHOO, D.; NEVILLE, T. A.; SPARKS, D. L. Apolipoprotein A-II regulates HDL stability and affects hepatic lipase association and activity. **Journal of lipid research**, v. 45, n. 5, p. 849-58, 2004.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 7, p. 3330-3337, 1979.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34-47, 1986.

CAMPOS, E. M. Da classificação dos fenótipos de Fredrickson – perfis das lipoproteínas – ao entendimento dos genótipos. **Acta Médica Portuguesa**, v. 18, p. 189-198, 2005.

CASAS, J. P.; COOPER, J.; MILLER, G. J.; HINGORANI, A. D.; HUMPHRIES, S. E. Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association studies. **Annals of Human Genetics**, v. 70, n. 2, p. 145-169, 2006.

CASTELLI, W. P. The new pathophysiology of coronary artery disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 82, n. 10B, p. 60T-65T, 1998.

CASTILLO, S.; TEJEDOR, D.; MOZAS, P.; REYES, G.; CIVEIRA, F.; ALONSO, R.; ROS E.; POCOVÍ, M.; MATA, P. The apolipoprotein B R3500Q gene mutation in Spanish subjects with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 165, n. 1, p. 127-135, 2002.

CAVALLI, S. A.; HIRATA, M. H.; SALAZAR, L. A.; DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S. D.; NAKANDAKARE, E. R.; BERTOLAMI, M. C.; HIRATA, R. D. Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact on serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. **Clinica Chimica Acta**, v. 302, n. 1-2, p. 189-203, 2000.

CHANNON, K.M.; WATKINS, H. Coronary artery disease genetics: bigger is better. **European Heart Journal**, v. 25, n. 11, p. 900-901, 2004.

CHEN, Z. C.; SHIN, S. J.; KUO, K. K.; LIN, K.; YU, M. L.; HSIAO, P. J.. Significant association of ABCG8 :D19H gene polymorphism with hypercholesterolemia and insulin resistance. **Journal of Human Genetics**, v. 53, n.8, p.757-763, 2008.

CHIODINI, B. D.; BARLERA, S.; FRANZOSI, M. G.; BECEIRO, V. L.; INTRONA, M.; TOGNONI, G. APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. **Atherosclerosis**, v. 167, n. 2, p. 355-366, 2003.

CHOONG, M. L.; KOAY, E. S. C.; KHOO, K. L.; KHAW, M. C.; SETHI, S. K. Denaturing gradient-gel electrophoresis screening of familial defective apolipoprotein B-100 in a mixed Asian cohort: two cases of arginine₃₅₀₀ → tryptophan mutation associated with a unique haplotype. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 916-923, 1997.

CHOONG, M. L.; SETHI, S. K.; KOAY, E. S. C. The StuI polymorphism on exon 8 of the low density lipoprotein (LDL) receptor gene: prevalence and impact on serum lipid levels in an Asian cohort. **Annals Academy of Medicine**, v. 27, n. 4, p. 503-506, 1998.

CHOONG, M. L.; SETHI, S. K.; KOAY, E. S. C. Effects of intragenic variability at 3 polymorphic sites of the apolipoprotein B gene on serum lipids and lipoproteins in a multiethnic Asian population. **Human Biology**, v. 71, n. 3, p. 381-397, 1999.

CISTERNAS, J. R.; MONTE, O. Hiperlipidemias. In: MONTE, O.; LONGUI, C.A.; CALLIARI, L. E. **Endocrinologia para o pediatra**. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 271-275.

CONSTANZA, M. C.; CAYANIS, E.; ROSS, B. M.; FLAHERTV, M. S.; ALVIN, G. B.; DAS, K.; MORABIA, A. Relative contributions of genes, environment, and interactions to blood lipid concentrations in a general adult population. **American Journal of Epidemiology**, v. 161, p. 714-724, 2005.

DALLINGA-THIE, G. M.; BU, X. D.; VAN LINDE-SIBENIUS TRIP, M.; ROTTER, J. I.; LUSIS, A. J.; DE BRUIN, T. W. Apolipoprotein A-I/CIII/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. **Journal of Lipid Research**, v. 37, n. 1, p. 136-147, 1996.

DALLONGEVILLE, J.; MEIRHAEGHE, A.; COTTEL, D.; FRUCHART, J. C.; AMOUYEL, P.; HELBECQUE, N. Gender related association between genetic variations of APOC-III gene and lipid and lipoprotein variables in northern France. **Atherosclerosis**, Shannon, v. 150, n. 1, p. 149-157, 2000.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed, 2006.

DELGHANDI, M.; THANGARAJAH, R.; NILSEN, M.; GRIMSGAARD, S.; BONAA, K. H.; TONSTAD, S.; JORGENSEN, L. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene (XbaI, EcoRI, and MspI RFLPs) in Norwegians at risk of atherosclerosis and healthy controls. **Acta Cardiologica**, v. 54, n. 4, p. 215-225, 1999.

DONG, L. M.; WEISGRABER, K. H. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19053-19057, 1996.

DUMAN, B. S.; TÜRKÖĞLU, C.; AKPINAR, B.; GÜDEN, M.; VERTII, A.; CÂGATAY, P.; GÜNAY5, D.; BÜYÜKDEVİRİM, A. S. Genetic variations of the ApolipoproteinB gene in Turkish patients with coronary artery disease. **Annals Human Biology**, v. 32, n.5, p. 620–629, 2005.

DUNNING, A. M.; HOULSTON, R.; FROSTEGARD, J.; REVILL, J.; NILSSON, J.; HAMSTEN, A.; TALMUD P.; HUMPHRIES S. Genetic evidence that the putative receptor binding domain of apolipoprotein B (residues 3130 to 3630) is not the only region of the protein involved in interaction with the low density lipoprotein receptor. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1096, n. 3, p. 231-237, 1991.

EVANS, V.; KASTELEIN, J. J. Lipoprotein lipase deficiency – rare or common? **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 16, n. 4, p. 283-287, 2002.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **The Journal of the American Medical Association**, v. 285, n.19, p. 2486-2497, 2001.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**. v. 18, n. 1, p. 115-146, 2009.

FILHO, A. C.; ARAÚJO, R. G.; GALVÃO, T. G.; CHAGAS, A. C. P. Inflamação e aterosclerose: integração de novas teorias e valorização dos novos marcadores. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 11, n. 3, p. 14-19, 2003.

FISHER, E.; SCHARNAGL, H.; HOFFMANN, M. M.; KUSTERER, K.; WITTMANN, D.; WIELAND, H.; GROSS, W.; MÄRZ, W. Mutations in the apolipoprotein (apo) B-100 receptor-binding region: detection of apo B-100 (Arg³⁵⁰⁰ → Trp) associated with two new haplotypes and evidence that apo B-100 (Glu³⁴⁰⁵ → Gln) diminishes receptor-mediated uptake of LDL. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 1026-1038, 1999.

FODOR, J. G.; FROHLICH, J. J.; GENEST JR, J. J. G.; McPHERSON, P. R. Recommendations for the management and treatment of dyslipidemia. Report of the working group on hypercholesterolemia and other dyslipidemias. **Canadian Medical Association Journal**, v. 162, n. 10, p. 1441-1447, 2000.

FORTI, N.; SALAZAR, L. A.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S. D.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Alterações Genéticas e Colesterolemia: Recentes Estudos Brasileiros. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n 5, p. 565-71, 2003.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. 672-679, 2006.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Apolipoproteínas B e A-I: fatores de risco cardiovascular? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 276-282, 2007.

FOUCHIER, S. W.; DEFESCHE, J. C.; KASTELEIN, J. J.; SIJBRANDS, E. J. Familial defective apolipoprotein B versus familial hypercholesterolemia: an assessment of risk. **Seminars in Vascular Medicine**, v. 4, n. 3, p. 259-64, 2004.

FREDRICKSON, D. S.; LEVY, R. I.; LEES, R. S. Fat transport in lipoproteins – an integrated approach to mechanisms and disorders. **The New England Journal of Medicine**, v. 276, p. 34-44, 1967.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1998. 631 p.

GAFFNEY, D.; REID, J. M.; CAMERON, I. M.; VASS, K.; CASLAKE, M. J.; SHEPHERD, J.; PACKARD, C. J. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 15, n. 8, p. 1025-1029, 1995.

GAFFNEY, D.; FORSTER, L.; CASLAKE, M. J.; BEDFORD, D.; STEWART, J. P.; STEWART, G.; WIERINGA, G.; DOMINICZAK, M.; MILLER, J. P.; PACKARD, C. J. Comparison of apolipoprotein B metabolism in familial defective apolipoprotein B and heterogeneous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 162, n. 1, p. 33-43, 2002.

GAJRA, B.; CANDLISH, J. K.; SAHA, N.; HENG, C. K.; SOEMANTRI, A. G.; TAY, J. S. Influence of polymorphisms for apolipoprotein B (ins/del, XbaI, EcoRI) and apolipoprotein E on serum lipids and apolipoproteins in a Javanese population. **Genetic Epidemiology**, v. 11, p. 19-27, 1994.

GALTON, D. J. Genetic determinants of atherosclerosis-related dyslipidemias and their clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 257, n. 2, p. 181-197, 1997.

GENEST JR, J. J.; ORDOVAS, J. M.; McNAMARA, J. R.; ROBBINS, A. M.; MEADE, T.; COHN, S. D.; SALEM, D. N.; WILSON, P. W.; MASHARANI, U.; FROSSARD, P. M.; SCHAEFER, E. J. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 82, n. 1-2, p. 7-17,

1990.

GLISIC, S.; SAVIC, I.; ALAVANTIC, D. Apolipoprotein B gene DNA polymorphisms (EcoRI and MspI) and serum lipid levels in the Serbian healthy population: interaction of rare alleles and smoking and cholesterol levels. **Genetic Epidemiology**, v. 12, n. 5, p. 499-508, 1995.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Molecular medicine. The cholesterol quartet. **Science**, Washington, v. 292, n. 5520, p. 1310-1312, 2001.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 646.

GREENSPAN, F. S.; STREWLER, G. J. Distúrbios do metabolismo das lipoproteínas. In: KANE, J. P.; MALLOY, M. J. **Endocrinologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 501-520.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 712 p.

GROENENDIJK, M.; CANTOR, R. M.; DE BRUIN, T. W. A.; DALLINGA-THIE, G. M. The apoA1-CIII-AIV gene cluster. **Atherosclerosis**, v. 157, p. 1-11, 2001a.

GROENENDIJK, M.; CANTOR, R. M.; DE BRUIN, T. W. A.; DALLINGA-THIE, G. M. New genetic variants in the apoA-I and apoC-III genes and familial combined hyperlipidemia. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 188-194, 2001b.

GRUNDY, S. M. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. **Circulation**, v. 106, n. 20, p. 2526-2529, 2002.

GUARDAMAGNA, O.; RESTAGNO, G.; ROLFO, E.; PEDERIVA, C.; MARTINI, S.; ABELLO, F.; BARACCO, V.; PISCIOTTA, L.; PINO, E.; CALANDRA, S.; BERTOLINI, S. The type of LDLR gene mutation predicts cardiovascular risk in children with familial hypercholesterolemia. **The Journal of Pediatrics**, v. 155 p. 199-2004, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap.3, p. 30-31, cap. 68, p. 781-790, cap. 69, p. 792.

HAFFNER, S. M.; GREENBERG, A. S.; WESTON, W. M.; CHEN, H.; WILLIAMS, K.; FREED, M. I. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. **Circulation**, v. 106, p. 679-684, 2002.

HANKEY, G. J. Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential? **Stroke**, v. 37, n. 8, p. 2181-2188, 2006.

HANSEN, P. S. Familial defective apolipoprotein B-100. **Danish Medical Bulletin**, v. 45, n. 4, p. 370-382, 1998.

HAVEL, R. J.; KANE, J. P.; Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 7. ed. McGraw-Hill, New York, 1995. p. 1841-1851.

HEGELE, R. A.; HUANG, L. S.; HERBERT, P. N.; BLUM, C. B.; BURING, J. E.; HENNEKENS, C. H.; BRESLOW, J. L. Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 24, p. 1509-1515, 1986.

HEGELE, R. A.; BAN, M. R.; HSUEH, N.; KENNEDY, B. A.; CAO, H.; ZOU, G. Y.; ANAND, S.; YUSUF, S.; HUFF, M. W.; WANG, J. A polygenic basis for four classical Fredrickson hyperlipoproteinemia phenotypes that are characterized by hypertriglyceridemia. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 21, p. 4189-4194, 2009.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais**. 20. ed. Brasil: Manole, 2008. pgs: 75, 259-284, 340-350.

HERINGER, R. Desigualdades raciais no Brasil: síntese de indicadores e desafios no campo das políticas públicas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 57-65, 2002.

HIXSON, J. E.; VERNIER, D. T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. **Journal of Lipid Research**, v. 31, n. 3, p. 545-548, 1990.

HOBBS, H. H.; BROWN, M. S.; RUSSELL, D. W.; DAVIGNON, J.; GOLDSTEIN, J. L. Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. **The new England journal of medicine**, p. 317, p. 734-737, 1987.

HOBBS, H. H.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. **Human Mutation**, v. 1, n. 6, p. 445-466, 1992.

HOFFER, M. J.; SIJBRANDS, E. J.; DE MAN, F. H.; HAVEKES, L. M.; SMELT, A. H.; FRANTS, R. R. Increased risk for endogenous hypertriglyceridaemia is associated with an apolipoprotein C3 haplotype specified by the SstI polymorphism. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 28, n. 10, p. 807-812, 1998.

HOFFMANN, M. M.; SCHARNAGL, H.; KÖSTER, W.; WINKLER, K.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. Apolipoprotein E1 Baden (Arg¹⁸⁰ → Cys). A new apolipoprotein E variant associated with hypertriglyceridemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 303, n. 1-2, p. 41-48, 2001.

HOFFMANN, M. M.; SCHARNAGL, H.; PANAGIOTOU, E.; BANGHARD, W.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. Diminished LDL receptor and high heparin binding of apolipoprotein E2 Sendai associated with lipoprotein glomerulopathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 3, p. 524-530, 2002.

HOFMAN, A.; OTT, A.; BRETELER, M. M.; BOTS, M. L.; SLOOTER, A. J.; VAN HARSKAMP, F.; VAN DUIJN, C. N.; VAN BROECKHOVEN, C.; GROBBEE, D. E. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. **Lancet**, v. 349, n. 9046, p. 151-154, 1997.

HONG, S. H.; SONG, J.; KIM, J. Q. The haplotype analyses using multiple markers of the apolipoprotein B gene in patients with coronary artery disease. **Journal of Korean Medical Science**. v. 16, n. 6, p. 719-724, 2001.

HOKANSON, J. E.; AUSTIN, M. A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. **Journal of Cardiovascular Risk**, v. 3, n. 2, p. 213-219, 1996.

HUANG, Y.; LIU, X. Q.; RALL JR, S. C.; TAYLOR, J. M.; VON ECKARDSTEIN A.; ASSMANN, G.; MAHLEY, R. W. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 41, p. 26388-26393, 1998.

HUBACEK, J. A.; BERGE, K. E.; COHEN, J. C.; HOBBS, H. H. Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. **Human Mutation**, 18, n. 4, p. 359-360, 2001.

ISHITANI, L. H.; FRANCO, G. C.; PERPÉTUO, I. H. O.; FRANÇA, E. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 4, p. 684-69, 2006.

IOANNIDIS, J. P. A.; NTZANI, E. E.; TRIKALINOS, T. A.; CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. G. Replication validity of genetic association studies. **Nature Genetics**, v. 29, p. 306-309, 2001.

IZAR, M. C.; FONSECA, F. A. H.; IHARA, S. S. M.; KASINSKI, N.; SANG, W. H.; LOPES, I. E. L.; PINTO, L. E. S. A.; RELVAS, W. G. M.; LOURENÇO, D.; TUFIK, S.; DE PAOLA, A. A. V.; CARVALHO, A. C. C. Risk factors, biochemical markers, and genetic polymorphisms in early coronary artery disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n. 4, p. 388-395, 2003.

JENNER, J. L.; SEMAN, L. J.; MILLAR, J. S.; LAMON-FAVA, S.; WELTY, F. K.; DOLNIKOWSKI, G. G.; MARCOVINA, S. M.; LICHTENSTEIN, A. H.; BARRETT, P. H.; DELUCA, C.; SCHAEFER, E. J. The metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein (a) in human beings. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 54, n. 3, p. 361-9, 2005.

JEPPESEN, J.; HEIN, H. O.; SUADICANI, P.; GYNTELBERG, F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen male study. **Circulation**, v. 97, p. 1029-1036, 1998.

JONG, M. C.; HOFKER, M. H.; HAVEKES, L. M. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. **Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 3, p. 472-484, 1999.

KAMSTRUP, P. R.; TYBJAERG-HANSEN, A.; STEFFENSEN, R.; NORDESTGAARD, B. G. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. **The journal of the american medical association**, v. 301, n. 22, p. 2331-9, 2009.

KANE, J. P.; HAVEL, R. J.; Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1995. v. 86, p. 1853.

KARATHANASIS, S. K.; McPHERSON, J.; ZANNIS, V. I.; BRESLOW, J. L. Linkage of human apolipoprotein A-I and C-III genes. **Nature**, v. 304, n. 5924, p. 371-373, 1983.

KNOPP, R. H. Risk factors for coronary artery disease in women. **American Journal of Cardiology**, New York, v. 89, n. 12, p. 28-34, 2002.

KNOTT, T. J.; PEASE, R. J.; POWELL, L. M.; WALLIS, S. C.; RALL JR, S. C.; INNERARITY, T. L.; BLACKHART, B.; TAYLOR, W. H.; MARCEL, Y.; MILINE, R.; JOHNSON, D.; FULLER, M.; LUSIS, A. J.; McCARTHY, B. J.; MAHLEY, R. W.; LEVY-WILSON, B.; SCOTT, J. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. **Nature**, v. 323, p. 734-738, 1986.

KWITEROVICH JR, P. O.; BARTON, B. A.; McMAHON, R. P.; OBARZANEK, E.; HUNSBERGER, S.; SIMONS-MORTON, D.; KIMM, S. Y.; FRIEDMAN, L. A.; LASSER, N.; ROBSON, A.; LAUER, R.; STEVENS, V.; VAN HORN, L.; GIDDING, S.; SNETSELAAR, L.; HARTMULLER, V. W.; GREENLICK, M.; FRANKLIN JR, F. Effects of diet and sexual maturation on low-density lipoprotein cholesterol during puberty: the Dietary Intervention Study in Children (DISC). **Circulation**, v. 96, n. 8, p. 2526-2533, 1997.

LAMIA, R.; ASMA, O.; SLIM, K.; JIHÉNE, R.; IMEN, B.; IBTIHEL, B. H.; KAOUTHER, K.; RADHIA, B.; NABILA, B. R.; NAOUFEL, N.; AHMED, B. A.; ESSIA, B.; ALI, B. Association of four apolipoprotein B polymorphisms with lipid profile and stenosis in Tunisian coronary patients. **Journal of Genetics**, v. 91, p. 75-79, 2012.

LEREN, T. P.; BAKKEN, K. S.; HOEL, V.; HJERMANN, I.; BERG, K. Screening for mutations of the apolipoprotein B gene causing hypocholesterolemia. **Human Genetics**, v. 102, n. 1, p. 44-49, 1998.

LEWIN, B. Trânsito de Proteínas. **GenesVII**. Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 25, p. 758-759, p. 955.

LIBBY, P. Patogenia, prevenção e tratamento da aterosclerose. In: HARRISON, T. R.; FAUCI, A.; BRAUNWALD, E. ; KASPER, D. ; HAUSER, S. L.; LONGO, D.; JAMENSON, J. L.; LOSCALZO, J. **Medicina interna**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2008. Seção 5, cap.235, p. 1501-1507.

LIMA, E.S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 169-178, 2006.

LIU, Y.; ATKINSON, D. Immuno-electron cryo-microscopy imaging reveals a looped topology of apoB at the surface of human LDL. **Journal of Lipid Research**, v. 52, p. 1111–1116, 2011.

LOTUFO, P. A. Mortalidade precoce por doenças do coração no Brasil. Comparação com outros países. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, n. 5, p. 321-325, 1998.

LUDWIG, E. H.; BLACKHART, B. D.; PIEROTTI, V. R.; CAIATI, L.; FORTIER, C.; KNOTT, T.; SCOTT, J.; MAHLEY, R. W.; LEVY-WILSON, B.; McCARTHY, B. J. DNA sequence of the human apolipoprotein B gene. **DNA (Mary Ann Liebert Inc)**, v. 6, n. 4, p. 363-372, 1987.

LUDWIG, E. H.; McCARTHY, B. J. Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apolipoprotein B100. **American Journal of Human Genetics**, v. 47, n.4, p. 712-720, 1990.

LUDWIG, E. H.; HOPKINS, P. N.; ALLEN, A.; WU, L. L.; WILLIAMS, R. R.; ANDERSON, J. L.; WARD, R. H.; LALOUEL, J. M.; INNERARITY, T. L. Association of genetic variations in apolipoprotein B with hypercholesterolemia, coronary artery disease, and receptor binding of low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 38, n. 7, p. 1361-1373, 1997.

LUND-KATZ, S.; LIU, L.; THUAHNAL, S. T.; PHILLIPS, M. C. High density lipoprotein structure. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 1044-1054, 2003.

LUSIS, A. J.; HEINZMANN, C.; SPARKES, R. S.; SCOTT, J.; KNOTT, T. J.; GELLER, R.; SPARKES, M. C.; MOHANDAS, T. Regional mapping of human chromosome 19: organization of genes for plasma lipid transport (APOC1, -C2 and -E and LDLR) and the genes C3, PEPD, and GPI. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 3929-3933, 1986.

LUSIS, A. J.; IVANDIC, B.; CASTELLANI, L. W. Lipoprotein and lipid metabolism. In: RIMOIN, D. L.; CONNER, J. M. ; PYERITZ, R. E. **Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics**. 4th, London, England: Churchill Livingstone, 2002. p. 2500–2537.

LUSIS, A. J.; FOGELMAN, A. M.; FONAROW, G. C. Genetic basis of atherosclerosis: part I. New genes and pathways. **Circulation**, v. 110, p. 1868-1873, 2004.

LUSIS, A. J.; MAR, R.; PAJUKANTA, P. Genetics of atherosclerosis. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 5, p. 189-218, 2004.

MAGYAR, M. T.; SZIKSZAI, Z.; BALLA, J.; VALIKOVICS, A.; KAPPELMAYER, J.; IMRE, S.; BALLA, G.; JENEY, V.; CSIBA, L.; BEREKZKI, D. Early-onset carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers. **Stroke**, v. 34, p. 58-63, 2003.

MAHLEY, R.W.; INNERARITY, T. L.; RALL JR, S. C.; WEISGRABER, K. H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. **Journal of Lipid Research**, v. 25, n. 12, p. 1277-1294, 1984.

MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, v. 240, n. 4852, p. 622-630, 1988.

MAHLEY, R. W.; WEISGRABER, K. H.; FARESE JUNIOR, R. V. Disorders of lipid metabolism. In: LARSEN, P. R.; KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K. S. **Williams Textbook of Endocrinology**. 10 ed., EUA: Saunders, 2003. p. 1642-1705.

MAILLY, F.; XU, C. F.; XHIGNESSE, M.; LUSSIER-CACAN, S.; TALMUD, P. J.; DAVIGNON, J.; HUMPHRIES, S. E.; NESTRUCK, A. C. Characterization of a new apolipoprotein E5 variant detected in two French-Canadian subjects. **Journal of Lipid Research**. v. 32, n. 4, p. 613-620, 1991.

MASSON, L. F.; McNEILL, G.; AVENELL, A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1098-1111, 2003.

McCONATHY, W. J.; GESQUIERE, J. C.; BASS, H.; TARTAR, A.; FRUCHART, J. C.; WANG, C. S. Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III. **Journal of Lipid Research**, v. 33, n. 7, p. 995-1003, 1992.

MERKEL, M.; LOEFFLER, B.; KLUGER, M.; FABIG, N.; GEPPERT, G.; PENNACCHIO, L. A.; LAATSCH, A.; HEEREN, J. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. **The Journal Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 21553-21560, 2005.

MERKEL, M.; HEEREN, J. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10 p. 2694-2696, 2005.

MILINE, R.; THÉOLIS JR, R.; MAURICE, R; PEASE, R. J.; WEECH, P. K.; RASSART, E.; FRUCHART, J. C.; SCOTT, J.; MARCEL, Y. L. The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 33, p. 19754-19760, 1989.

MISEREZ, A. R.; KELLER, U. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 15, p. 1719-1729, 1995.

MISRA, W.; HOFFMANN, M. M.; SCHARNAGL, H.; FISHER, E.; CHEN, M.; NAUCK, M.; FEUSSNER, G.; WIELAND, H. Apolipoprotein E2 (Arg¹³⁶ → Cys) mutation in the receptor binding domain of apoE is not associated with dominant type III hyperlipoproteinemia. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 3, p. 658-669, 1998.

MISRA, A.; NISHANTH, S.; PASHA, S. T.; PANDEY, R. M.; SETHI, P.; RAWAT, D. S. Relationship of Xba1 and EcoR1 polymorphisms of apolipoprotein-B gene to dyslipidemia and obesity in Asian Indians in North India. **Indian Heart Journal**, v. 53, n. 2, p. 177-183, 2001.

MORIGUCHI, E. H. Novos fatores de risco na prática clínica. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 5, p. 63-66, 2002.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e interações**. Lipídios, Lipoproteínas e apoproteínas. 5 ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009. 400p.

MYANT, N. B.; GALLAGHER, J.; BARBIR, M.; THOMPSON, G. R.; WILE, D.; HUMPHRIES, S. E. Restriction fragment length polymorphisms in the apo B gene in relation to coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 77, n. 2-3, p. 193-201, 1989.

MYANT, N. B. Cholesterol metabolism, LDL, and the LDL receptor. **Academic Press**, San Diego, 1990. p. 465.

NABEL, E. G. Genomic Medicine: Cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 1, p. 60-72, 2003.

NAKANDAKARE, E. R.; QUINTÃO, E. Alterações do Metabolismo Lipídico na Criança e no Adolescente. In: SETIAN, N. **Endocrinologia Pediátrica**. São Paulo: Sarvier, 1998. p. 245-254.

NAVARRO, S. C.; CONEGERO, C. I. Os fatores de risco da doença aterosclerótica. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 6, n. 3, p. 151-156, 2002.

NILSSON-EHLE, P.; GARFINKEL, A. S.; SCHOTZ, M. C. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 667-693, 1980.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson, genética na medicina**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 8, p. 170-178, cap. 12, p. 299-303, 387 p.

O'BRIEN, P. J.; ALBORN, W. E.; SLOAN, J. H.; ULMER, M.; BOODHOO, A.; KNIERMAN, M. D.; SCHULTZE, A. E.; KONRAD, R. J. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 351-359, 2005.

OLIVIER, M.; WANG, X.; COLE, R.; GAU, B.; KIM, J.; RUBIN, E. M.; PENNACCHIO, L. A. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. **Genomics**, v. 83, n. 5, p. 912-923, 2004.

OLOFSSON, S. O. ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, n. 6, p. 1097-1099, 2005.

ORDOVAS, J. M.; LITWACK-KLEIN, L.; WILSON, P. W. F.; SCHAEFER, M. M.; SCHAEFER, E. J. Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of apoE1 and apoE5 isoforms. **Journal of Lipid Research**, v. 28, p. 371-380, 1987.

ORDOVAS, J. M. Nutrigenics, plasma lipids, and cardiovascular risk. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 106, n. 7, p. 1074-1081, 2006.

PAN, J. P.; CHIANG, A. N.; TAI, J. J.; WANG, S. P.; CHANG, M. S. Restriction fragment length polymorphisms of apolipoprotein B gene in Chinese population with coronary heart disease. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 424-429, 1995.

PAJUKANTA, P. E.; VALSTA, L. M.; ARO, A.; PIETINEN, P.; HELIÖ, T.; TIKKANEN, M. J. The effects of the apolipoprotein B signal peptide (ins/del) and XbaI polymorphisms on plasma lipid responses to dietary change. **Atherosclerosis**, v. 122, n. 1, p. 1-10, 1996.

PAJUKANTA, P.; NUOTIO, I.; TERWILLIGER, J. D.; PORKKA, K. V.; YLITALO, K.; PIHLAJAMÄKI, J.; SUOMALAINEN, A. J.; SYVÄNEN, A. C.; LEHTIMÄKI, T.; VIIKARI, J. S.; LAAKSO, M.; TASKINEN, M. R.; EHNHOLM, C.; PELTONEN, L. Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. **Nature Genetics**, v. 18, n. 4, p. 369-373, 1998.

PAJUKANTA, P.; LILJA, H. E.; SINSHEIMER, J. S.; CANTOR, R. M.; LUSIS, A. J.; GENTILE, M.; DUAN, X. J.; SORO-PAAVONEN, A.; NAUKKARINEN, J.; SAARELA, J.; LAAKSO, M.; EHNHOLM, C.; TASKINEN, M. R.; PELTONEN, L. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). **Nature Genetics**, v. 36, n. 4, p. 371-376, 2004.

PANDEY, S. N.; SRIVASTAVA, A.; DIXIT, M.; CHOUDHURI, G.; MITTAL, B. Haplotype analysis of signal peptide (insertion/deletion) and XbaI polymorphisms of the APOB gene in gallbladder cancer. **Liver International**, v. 27, n. 7, p. 1008-1015, 2007.

PEACOCK, R.; DUNNING, A.; HAMSTEN, A.; TORNvall, P.; HUMPHRIES, S.; TALMUD, P. Apolipoprotein B gene polymorphisms, lipoproteins and coronary atherosclerosis: a study of young myocardial infarction survivors and healthy population-based individuals. **Atherosclerosis**, v. 92, n. 2-3, p. 151-164, 1992.

PELLANDA, L. C.; ECHENIQUE, L.; BARCELLOS, L. M. A.; MACCARI, J.; BORGES, F. K.; ZEN, B. L. Doença cardíaca isquêmica: a prevenção inicia durante a infância. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 91-96, 2002.

PENNACCHIO, L. A.; OLIVIER, M.; HUBACEK, J. A.; COHEN, J. C.; COX, D. R.; FRUCHART, J. C.; KRAUSS, R. M.; RUBIN, E. M. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. **Science**, v. 294, n. 5540, p. 169-173, 2001.

PONGRAPEEPORN, K. U.; PIMSAWAT, T.; LIKIDLILID, A.; POLDEE, S.; YAMWONG, P.; AMORNATTANA, A.; ONG-AJYOOH, S. Effect of Ava II and NcoI polymorphism at the low density lipoprotein receptor gene on plasma lipid levels in a group of Thai subjects. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 83, n. 2, p. S74-80, 2000.

POULIOT, M. C.; DESPRÉS, J. P.; DIONNE, F. T.; VOHL, M. C.; MOORJANI, S.; PRUD'HOMME, D.; BOUCHARD, C.; LUPIEN, P. J. ApoB-100 gene EcoRI polymorphism. Relations to plasma lipoprotein changes associated with abdominal visceral obesity. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 14, n. 4, p. 527-533, 1994.

PRICE, W. H.; MORRIS, S. W.; BURGON, R.; DONALD, P. M.; KITCHIN, A. H. Apolipoprotein CIII polymorphism and coronary heart disease. **The Lancet**, v. 328, n. 8514, p. 1041, 1986.

PRIESTLEY, L.; KNOTT, T.; WALLIS, S.; POWELL, L.; PEASE, R.; BRUNT, H.; SCOTT, J. RFLP for the human apolipoprotein B gene: V/XbaI. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 18, p. 6793, 1985.

PULLINGER, C. R.; HENNESSY, L. K.; CHATTERTON, J. E.; LIU, W.; LOVE, J. A.; MENDEL, C. M.; FROST, P. H.; MALLOY, M. J.; SCHUMAKER, V. N.; KANE, J. P. Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 3, p. 1225-1234, 1995.

RABÈS, J. P.; VARRET, M.; SAINT-JORE, B.; ERLICH, D.; JONDEAU, G.; KREMPF, M.; GIRAUDET, P.; JUNIEN, C.; BOILEAU, C. Familial ligand-defective apolipoprotein B-100: simultaneous detection of the ARG₃₅₀₀→GLN and ARG₃₅₃₁→CYS mutations in a French population. **Human Mutation**, v. 10, n. 2, p. 160-163, 1997.

RADER, D. J.; HOBBS, H. H. Distúrbios do metabolismo das lipoproteínas. In HARRISON, T. R.; FAUCI, A.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D.; HAUSER, S. L.; LONGO, D.; JAMENSON, J. L.; LOSCALZO, J. **Medicina interna**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2008. Seção 3, cap.350, p. 2416-2428.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; GIRALDI, T. A complexidade da mistura racial no Brasil: A hemoglobina S como marcador étnico nas suas populações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 1, p. 69-70, 2006.

RAUH, G.; KELLER, C.; SCHUSTER, H.; WOLFRAM, G.; ZÖLLNER, N. Familial defective apolipoprotein B-100: a common cause of primary hypercholesterolemia. **The Clinical Investigator**, v. 70, n. 1, p. 77-84, 1992.

REAVEN, G. M. Syndrome X: 6 years later. **Journal of Internal Medicine. Supplement**, v. 736, p. 13-22, 1994.

REECE, E. A.; LEGUIZAMÓN, G.; WIZNITZER, A. Gestational diabetes: the need for a common ground. **The Lancet**, v. 373, n. 9677, p. 1789-1797, 2009.

RENGES, H. H., WILE, D. B.; McKEIGUE, P. M.; MARMOT, M. G. ; HUMPHRIES, S. E. Apolipoprotein B gene polymorphisms are associated with lipid levels in men of South Asian descent. **Atherosclerosis**, v. 91, n. 3, p. 267-275, 1991.

RENGES, H. H.; PEACOCK, R.; DUNNING, A. M.; TALMUD, P.; HUMPHRIES, S. E. Genetic relationship between the 3'-VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphisms: haplotype analysis in individuals of European and south Asian origin. **Annals of Human Genetics**, v. 56, p. 11-33, 1992.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 503 p.

RIDDELL, D. R.; ZHOU, H.; ATCHISON, K.; WARWICK, H. K.; ATKINSON, P. J.; JEFFERSON, J.; XU, L.; ASCHMIES, S.; KIRKSEY, Y.; HU, Y.; WAGNER, E.; PARRATT, A.; XU, J.; LI, Z.; ZALESKA, M. M.; JACOBSEN, J. S.; PANGALOS, M. N.; REINHART, P. H. Impact of Apolipoprotein E (ApoE) Polymorphism on Brain ApoE Levels. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 45, p. 11445–11453, 2008.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 752 p.

RIOS, D. L.; VARGAS, A. F.; TORRES, M. R.; ZAGO, A. J.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; HUTZ, M. H. Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. **Clinical Genetics**, v. 63, n. 5, p. 380-385, 2003.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 801-809, 1993.

SAHA, N.; TONG, M. C.; TAY, J. S.; JEYASEELAN, K.; HUMPHRIES, S. E. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in Chinese coronary artery disease patients. **Clinical Genetics**, v. 42, n. 4, p. 164-170, 1992.

SALZANO, M. F.; HURTADO, M. A. **Lost paradises and the ethics of research publication**. Nova York: Oxford University Press, 2004. p. 234.

SANTAMARINA-FOJO, S. The familial chylomicronemia syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 27, n. 3, p. 551-567, 1998.

SAKUMA, T.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 18, n. 6, p. 309-316, 2004.

SAS Institute INC (2000). SAS/STAT use guide. CARY, N.C. version 8.1

SCARTEZINI, M.; ZAGO, M. A.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PAZIN-FILHO, A.; MARIN-NETO, J. A.; HOTTA, J. K. S.; NASCIMENTO, A. J.; DOS-SANTOS, J. E. The X-X-/E+E+ genotype of the XbaI/EcoRI polymorphisms of the apolipoprotein B gene as a marker of coronary artery disease in a Brazilian sample. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 3, p. 369-375, 2003.

SCHUMAKER, V. N.; ADAMS, G. H. Circulating lipoproteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 38, p. 113-136, 1969.

SILVA, E. B. Estudo do perfil lipídico de um grupo de idosos. **NewsLab**, v. 72, p. 142-158, 2005.

SMITH, J. D. Apolipoprotein E4: an allele associated with many diseases. **Annals of Medicine**, v. 32, n. 2, p. 118-127, 2000.

SCOTT, J.; KNOTT, T. J.; SHAW, D. J.; BROOK, J. D. Localization of genes encoding apolipoproteins CI, CII and E to the p13→cen region of human chromosome 19. **Human Genetics**, v. 71, n. 2, p. 144-146, 1985.

SEDA, O.; SEDOVÁ, L. New Apolipoprotein A-V: comparative genomics meets metabolism. **Physiological Research**, v. 52, n. 2, p.141-146, 2003.

SEGREST, J. P.; JONES, M. K.; DE LOOF, H.; DASHTI, N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 9, p. 1346-1367, 2001.

SERRUYS, P. W.; MORICE, M. C.; KAPPETEIN, A. P.; COLOMBO, A.; HOLMES, D. R.; MACK, M. J.; STAHL, E.; FELDMAN, T. E.; VAN DEN BRAND, M.; BASS, E. J.; VAN DYCK, N.; LEADLEY, K.; DAWKINS, K. D.; MOHR, F. W. Percutaneous Coronary Intervention versus Coronary-Artery Bypass Grafting for Severe Coronary Artery Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 360 n. 10, p. 961-971, 2009.

SHOULDERS, C. C.; GRANTHAM, T. T.; NORTH, J. D.; GASPARDONE, A.; TOMAI, F.; DE FAZIO, A.; VERSACI, F.; GIOFFRE, P. A.; COX, N. J. Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein CIII gene locus: lack of association with the variant insulin response element in Italian school children. **Human Genetics**, v. 98, n. 5, p. 557-566, 1996,

SING, C. F., DAVIGNON, J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. **American Journal of Human Genetics**, v. 37, n. 2, p. 268-285, 1985.

SNIDERMAN, A. D.; FURBERG, C. D.; KEECH, A.; ROETERS VAN LENNEP, J. E.; FROHLICH, J.; JUNGNER, I.; WALLDIUS, G. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. **The Lancet**, v. 361, n. 9359, p. 777-780, 2003.

SNIDERMAN, A. D. Apolipoprotein B versus non-high-density lipoprotein cholesterol: and the winner is... **Circulation**, v. 112, n. 22, p. 3366-3367, 2005.

SORCI-THOMAS, M. G.; THOMAS, M. J. The effects of altered apolipoproteins A-I structure on plasma HDL concentration. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 121-128, 2002.

SORIA, L. F.; LUDWIG, E. H.; CLARKE, H. R.; VEGA, G. L.; GRUNDY, S. M.; MCCARTHY, B. J. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B100. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 2, p. 587-591, 1989.

SOUTAR, A. K.; NAOUMOVA, R. P.; TRAUB, L. M. Genetics, clinical phenotype, and molecular cell biology of autosomal recessive hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 1963-1970, 2003.
SOWERS, J. R. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. **Archives of Internal Medicine**, v. 158, n. 6, p. 617-621, 1998.

STAMLER, J.; VACCARO, O.; NEATON, J. D.; WENTWORTH, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. **Diabetes Care**, v. 16, n. 2, p. 434-444, 1993.

STAMPFER, M. J.; KRAUSS, R. M.; MA, J.; BLANCHE, P. J. ; HOLL, L. G. ; SACKS, F. M.; HENNEKENS, C. H. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. **Journal of the American Medical Association**, v. 276, n. 11, p. 882-888, 1996.

STEYRER, E.; KOSTNER, G. M. Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 958, n. 3, p. 484-491, 1988.

TAHRI-DAIZADEH, N.; TREGOUET, D. A.; NICAUD, V.; POIRIER, O.; CAMBIEN, F.; TIRET, L. Exploration of multilocus effects in a highly polymorphic gene, the apolipoprotein (APOB) gene, in relation to plasma apoB levels. **Annals of Human Genetics**, v. 68, n. 5, p. 405-418, 2004.

TAI, D. Y.; PAN, J. P.; LEE-CHEN, G. J. Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg₃₅₀₀→Trp mutation in hyperlipidemic Chinese. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1659-1665, 1998.

TAI, E. S.; KOAY, E. S.; CHAN, E.; SENG, T. J.; LOH, L. M.; SETHI, S. K.; TAN, C. E. Compound heterozygous familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100 produce exaggerated hypercholesterolemia. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 438-443, 2001.

TAKAISHI, H.; TANIGUCHI, T.; FUJIOKA, Y.; ISHIKAWA, Y.; YOKOYAMA, M. Impact of increasing diabetes on coronary artery disease in the past decade. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 11, n. 5, p. 271-277, 2004.

TALMUD, P. J.; HAWE, E.; MARTIN, S.; OLIVIER, M.; MILLER, G. J.; RUBIN, E. M.; PENNACCHIO, L. A.; HUMPHRIES, S. E. Relative contribution of variation within the

APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 24, p. 3039-3046, 2002.

TAN, C. E.; CHEW, L. S.; CHIO, L. F.; TAI, E. S.; LIM, H. S.; LIM, S. C.; JAYAKUMAR, L.; ENG, H. K.; PACKARD, C. J. Cardiovascular risk factors and LDL subfraction profile in type 2 diabetes mellitus subjects with good glycaemic control. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 51, n. 2, p. 107-114, 2001.

THOMPSON, G. R. Primary hyperlipidaemia. **British Medical Bulletin**, v. 46, n. 4, p. 986-1004, 1990.

TIKKANEN, M. J.; HELIÖ, T. Genetic variants of apolipoprotein B: relation to serum lipid levels and coronary artery disease among the Finns. **Annals of Medicine**, v. 24, n. 5, p. 357-361, 1992.

TRIA, E.; SCANU, A. M. **Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems**, London, New York. Academic Pres, 1969.

TYBJAERG-HANSEN, A.; NORDESTGAARD, B. G.; GERDES, L. U.; HUMPHRIES, S. E. Variation of apolipoprotein B gene is associated with myocardial infarction and lipoprotein levels in Danes. **Atherosclerosis**, v. 89, n. 1, p. 69-81, 1991.

TYROLER, H. A. Review of lipid-lowering clinical trials in relation to observational epidemiologic studies. **Circulation**, v. 76, n. 3, p. 515-522, 1987.

UTERMANN, G.; HESS, M.; STEINMETZ, A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. **Nature**, v. 269, n. 5629, p. 604-607, 1977.

VAN DER VLIET, H. N.; SAMMELS, M. G.; LEEGWATER, A. C.; LEVELS, J. H.; REITSMA, P. H.; BOERS, W.; CHAMULEAU, R. A. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with early phase of liver regeneration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 44512-44520, 2001.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. **Human genetics: problems and approaches**. 3 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 851 p.

VOHL, M. C.; TCHERNOF, A.; DIONNE, F. T.; MOORJANI, S.; PRUD'HOMME, D.; BOUCHARD, C.; NADEAU, A.; LUPIEN, P. J.; DESPRÉS, J. P. The apoB-100 gene EcoRI polymorphism influences the relationship between features of the insulin resistance syndrome and the hyper-apoB and dense LDL phenotype in men. **Diabetes**, v. 45, n. 10, p. 1405-1411, 1996.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, n. 1, p. 13-27, 2001.

VU-DAC, N.; GERVOIS, P.; JAKEL, H.; NOWAK, M.; BAUGE, E.; DEHONDT, H.; STAELS, B.; PENNACCHIO, L. A.; RUBIN, E. M.; FRUCHART-NAJIB, J.; FRUCHART, J. C. Apolipoprotein A5, a crucial determinant plasma triglyceride

levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 17982-17985, 2003.

WÄGNER, A. M.; PÉREZ, A.; ZAPICO, E.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B in the dyslipidemic classification of type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 26, n. 7, p. 2048-2051, 2003.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I.; HOLME, I.; AASTVEIT, A. H.; KOLAR, W.; STEINER, E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. **The Lancet**, v. 358, n. 9298, p. 2026-2033, 2001.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, n. 5, p. 493-519, 2006.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Apolipoprotein A-I versus HDL cholesterol in the prediction of risk for myocardial infarction and stroke. **Current Opinion in Cardiology**, v. 22, n. 4, p. 359-367, 2007.

WEINBERG, R. B.; COOK, V. R.; BECKSTEAD, J. A.; MARTIN, D. D.; GALLAGHER, J. W.; SHELNESS, G. S.; RYAN, R. O. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 34438-34444, 2003.

WENHAM, P. R.; HENDERSON, B. G.; PENNEY, M. D.; ASHBY, J. P.; RAE, P. W.; WALKER, S. W. Familial ligand-defective apolipoprotein B-100: detection, biochemical features and haplotype analysis of the R3531C mutation in the UK. **Atherosclerosis**, v. 129, n. 2, p. 185-192, 1997.

WERNETTE-HAMMOND, M. E.; LAUER, S. J.; CORSINI, A.; WALKER, D.; TAYLOR, J. M.; RALL JR, S. C. Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 15, p. 9094-9101, 1989.

WHITFIELD, A. J.; BARRETT, P. H.; VAN BOCKXMEER, F. M.; BURNETT, J. R. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 1725-1732, 2004.

WHO – World Health Organization. The World Health Report, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/whr2002_annex2.pdf> Acesso em: 27 jun 2012.

WILSON, P. W.; CUPPLES, L. A.; KANNEL, W. B. Is hyperglycemia associated with cardiovascular disease? The Framingham Study. **American Heart Journal**, v. 121, n. 2, p. 586-590, 1991.

WITZTUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **The Lancet**, v. 344, n. 8925, p. 793-795, 1994.

YANG, C. Y.; CHEN, S. H.; GIANTURCO, S. H.; BRADLEY, W. A.; SPARROW, J. T.; TANIMURA, M.; LI, W. H.; SPARROW, D. A.; DELOOF, H.; ROSSENEU, M.; LEE, F. S.; GU, Z. W.; GOTTO JR, A. M.; CHAN, L. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeat of human apolipoprotein B-100. **Nature**, v. 323, p. 738-742, 1986.

YANG, C. Y.; GU, Z. W.; WENG, S. A.; KIM, T. W.; CHEN, S. H.; POWNALL, H. J.; SHARP, P. M.; LIU, S. W.; LI, W. H.; GOTTO JR, A. M. Structure of apolipoprotein b-100 of human low density lipoprotein. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 9, p. 96-108, 1989.

YANG, C. Y.; GU, Z. W.; BLANCO-VACA, F.; GASKELL, S. J.; YANG, M.; MASSEY, J. B.; GOTTO JR, A. M.; POWNALL, H. J. Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. **Biochemistry**, v. 33, n. 41, p. 12451-12455, 1994.

YOKOTA, R. T. C.; ISER, B. P. M.; ANDRADE, R. L. M.; SANTOS, J.; MEINERS, M. M. A.; ASSIS, D. M.; BERNAL, R. T. I.; MALTA, D. C.; MOURA, L. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças e agravos não transmissíveis em município de pequeno porte, Brasil, 2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 1, p. 55-68, 2012.

YOO, T. W.; SUNG, K. C.; SHIN, H. S.; KIM, B. J.; KIM, B. S.; KANG, J. H.; LEE, M. H.; PARK, J. R.; KIM, H.; RHEE, E. J.; LEE, W. Y.; KIM, S. W.; RYU, S. H.; KEUM, D. G. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. **Circulation Journal**, v. 69, n. 8, p. 928-933, 2005.

YOUNG, S. G. Recent progress in understanding apolipoprotein B. **Circulation**, v. 82, n. 5, p. 1574-1594, 1990.

YOUNG, C. E.; KARAS, R. H.; KUVIN, J. T. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. **Cardiology in Review**, v. 12, n. 2, p. 107-119, 2004.

ZANNIS, V. I.; BRESLOW, J. L. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. **Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1033-1041, 1981.

ZANNIS, V. I.; BRESLOW, J. L.; UTEMANN, G.; MAHLEY, R. W.; WEISGRABER, K. H.; HAVEL, R. J.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; SCHONFELD, G.; HAZZARD, W. R.; BLUM, C. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. **Journal of Lipid Research**, v. 23, n. 6, p. 911-914, 1982.

ZANNIS, V. I. Genetic polymorphism in human apolipoprotein E. **Methods in Enzymology**, v. 128, p. 823-851, 1986.

ZENG, Q.; DAMMERMAN, M.; TAKADA, Y.; MATSUNAGA, A.; BRESLOW, J. L.; SASAKI, J. An apolipoprotein CIII marker associated with hypertriglyceridemia in Caucasians also confers increased risk in a west Japanese population. **Human Genetics**, v. 95, n. 4, p. 371-375, 1995.

ANEXO 1

Termo de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da UEPG



PARECER Nº 116/2011
Protocolo: 13664/11

No dia 27 de Outubro de 2011, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "Estudos de Polimorfismos genéticos associados a hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose" de responsabilidade da pesquisadora Viviane Nogaroto Vicari.

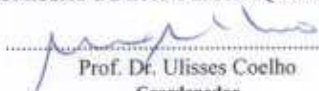
Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório Parcial: 01 de Novembro de 2012.

Data para entrega do relatório Final: 01 de Novembro de 2013.

Ponta Grossa, 31 de Outubro de 2011.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Prof. Dr. Ulisses Coelho
Coordenador

ANEXO 2

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

PESQUISA COM SERES HUMANOS

Eu, _____, original da cidade de _____, Estado _____, nascido (a) no dia/mês/ano _____, portador (a) do documento de identidade número _____ e C.P.F número _____, residente à Rua/Av. _____, número _____, complemento _____, no Bairro _____, localizado no município de _____, Estado _____, concordo com a minha participação no projeto de pesquisa intitulado “Estudos de polimorfismos genéticos associados a hipertensão arterial sistêmica e aterosclerose” à realizar-se na Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob supervisão da Profa Dra. Viviane Nogaroto Vicari, contato pelo telefone (42) 3220-3739 / celular (42) 9965-6338.

Estou ciente de que o objetivo deste trabalho consiste em coletar material biológico (4 mL de sangue) que será utilizado com o intuito de desenvolver estudos genéticos de caracterização de alguns polimorfismos relacionados à hipertensão e quadros de dislipidemia, presentes em alguns genes a serem prospectados neste projeto, utilizando-se metodologias envolvendo técnicas de biologia molecular (exemplo PCR – Reação em Cadeia da Polimerase). Segundo alguns estudos, os genes a serem analisados neste projeto (quando mutados) possuem relação com as síndromes relatadas acima, caracterizando o papel da genética neste tipo de síndrome multifatorial. Assim, o conhecimento do papel da genética influenciando no fenótipo (características) do paciente trará benefícios quanto a um tratamento mais direcionado ao indivíduo, utilizando-se frentes de intervenção terapêutica benéficas ao paciente, como medicamentos que tragam uma resposta mais efetiva frente à patologia em estudo.

Apenas pacientes voluntários serão incluídos como participantes deste estudo, no qual qualquer tipo de identificação pessoal será mantido sob sigilo e não constará em nenhum relatório ou publicação científica. Além disso, estou ciente de que os resultados destes trabalhos poderão ser apresentados à comunidade científica em geral, respeitando toda a informação adquirida que será tratada como confidencial pelos pesquisadores. Os procedimentos não trarão ônus nenhum aos pacientes participantes deste estudo. Como as coletas serão realizadas na Clínica Cray da Costa, especializada em tratamentos cardiorrespiratórios, os pacientes serão assistidos no local e atendidos pelo médico responsável pela pesquisa (Dr. Mário Augusto Cray da Costa), caso seja observado que algum paciente tenha algum tipo de indisposição durante a coleta de sangue.

Estou ciente ainda de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento. Da mesma forma, não haverá qualquer dano e, que em caso de reclamação, ou recurso poderei entrar em contato com a secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, Campus Uvaranas – UEPG, localizado na Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP: 84030-900, Bloco M, Sala 12, e-mail: secoep@uepg.br, telefone (42) 3220-3108.

Li, portanto, este termo, fui orientado (a) quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nenhum valor econômico por minha participação.

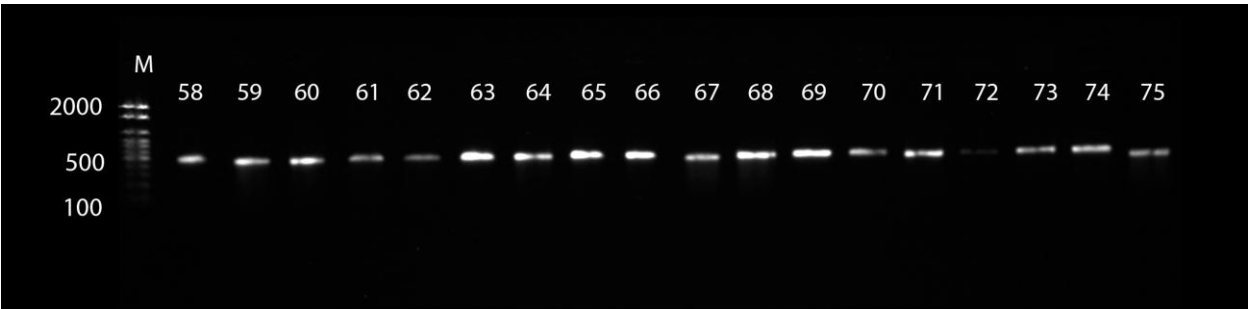
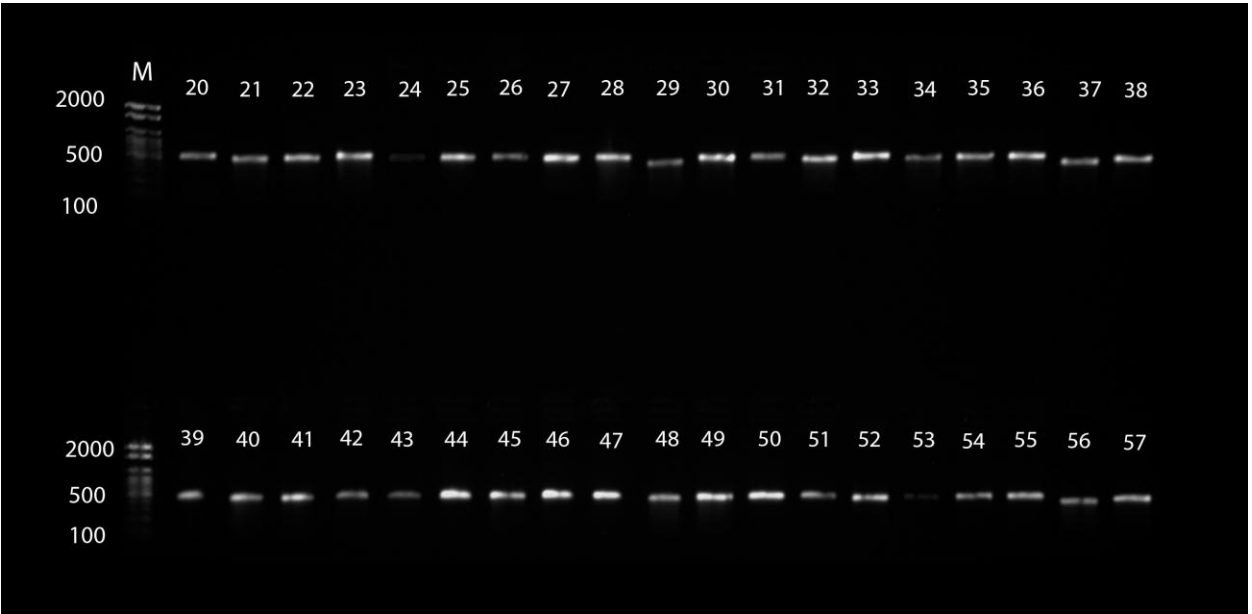
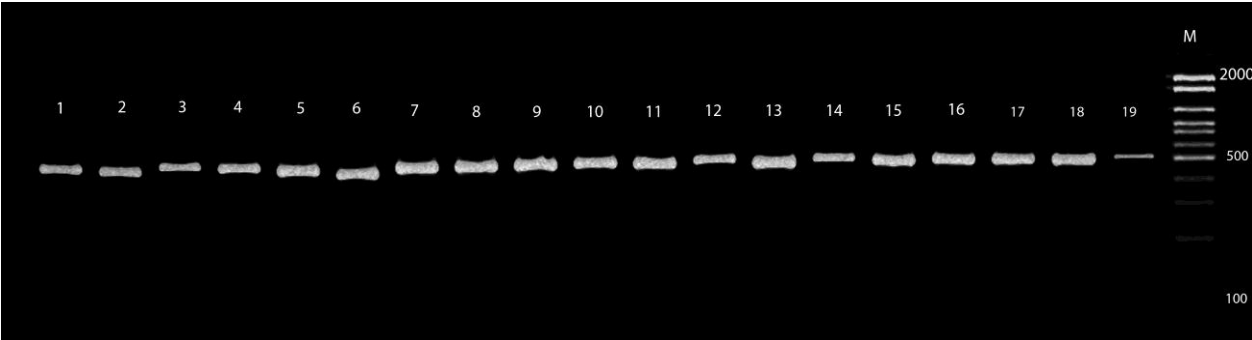
Voluntário

Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari
(Pesquisadora responsável)

Ponta Grossa de de 20

ANEXO 3

Ilustrações do perfil de bandas da eletroforese em gel de agarose a 1%
das amostras da amplificação da PCR



ANEXO 4

Sequência de base do gene da apolipoproteína B

(Retirado do GenBank NM 000.384)

APOB100 3500 (SORIA et al., 1989)

TCTCGGGAATATTCAGGAACTATTGCTAGTGAGGCCAACACTTACTTGAATTCCAAGAGCAC
ACGGTCTTCAGTGAAGCTGCAGGGCACTTCCAAAATTGATGATATCTGGAACCTTGAAGTAA
AAGAAAATTTTGCTGGAGAAGCCACACTCCAACGCATATATTCCCTCTGGGAGCACAGTACG
AAAAACCACTTACAGCTAGAGGGCCTCTTTTTCACCAACGGAGAACATACAAGCAAAGCCAC
CCTGGAACCTCTCTCCATGGCAAATGTCAGCTCTTGTTTCAGGTCCATGCAAGTCAGCCCAGTT
CCTTCCATGATTTCCCTGACCTTGGCCAGGAAGTGGCCCTGAATGCTAACACTAAGAACCAG
AAGATCAGATGGAAAAATGAAGTCCGGATTTCATTCTGGGTCTTTCCAGAGCCAGGTCTGAGCT
TTCCAATGACCAAGAAAAGGCACACCTTGACATTGCAGGATCCTTAG

ApoB100_f: 3'TCTCGGGAATATTCAGGAACTATTG 5'

ApoB100_r: 3'CTAAGGATCCTGCAATGTCAAGGT 5'

Enzima restrição: *MspI*: C[^]CGG

Normal: CGG arginina

Afetado: CAG glutamina

NORMAL: clivagem do fragmento de 481 pb

396 pb

TCTCGGGAATATTCAGGAACTATTGCTAGTGAGGCCAACACTTACTTGAATTCCAAGAGCAC
ACGGTCTTCAGTGAAGCTGCAGGGCACTTCCAAAATTGATGATATCTGGAACCTTGAAGTAA
AAGAAAATTTTGCTGGAGAAGCCACACTCCAACGCATATATTCCCTCTGGGAGCACAGTACG
AAAAACCACTTACAGCTAGAGGGCCTCTTTTTCACCAACGGAGAACATACAAGCAAAGCCAC
CCTGGAACCTCTCTCCATGGCAAATGTCAGCTCTTGTTTCAGGTCCATGCAAGTCAGCCCAGTT
CCTTCCATGATTTCCCTGACCTTGGCCAGGAAGTGGCCCTGAATGCTAACACTAAGAACCAG
AAGATCAGATGGAAAAATGAAGTC

85 pb

CGGATTTCATTCTGGGTCTTTCCAGAGCCAGGTCTGAGCTTTCCAATGACCAAGAAAAGGCACA
CCTTGACATTGCAGGATCCTTAG

ANEXO 5

Dados da Análise de Correlação do Genótipo 1 (M_1M_1), do Genótipo 2 (M_1M_2) e da População Geral

Análise de Correlação por Genótipo:

----- gen=1 -----								
The CORR Procedure								
8 Variables:	idade	dm	ldlA	tgA	hdlB	hipot	peso	imc
Simple Statistics								
Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum		
idade	51	57.82353	10.72139	2949	38.00000	78.00000		
dm	51	1.64706	0.48264	84.00000	1.00000	2.00000		
ldlA	51	1.17647	0.38501	60.00000	1.00000	2.00000		
tgA	51	1.54902	0.50254	79.00000	1.00000	2.00000		
hdlB	51	1.58824	0.49705	81.00000	1.00000	2.00000		
hipot	51	1.86275	0.34754	95.00000	1.00000	2.00000		
peso	51	78.49804	12.66928	4003	51.00000	106.00000		
imc	51	29.12824	4.06356	1486	20.96000	40.90000		
Pearson Correlation Coefficients, N = 51								
Prob > r under H0: Rho=0								
	idade	dm	ldlA	tgA	hdlB	hipot	peso	imc
idade	1.00000	-0.18234 0.2003	-0.34115 0.0143	0.07773 0.5877	-0.01016 0.9436	0.02021 0.8881	-0.35814 0.0099	-0.21184 0.1356
dm	-0.18234 0.2003	1.00000	0.01899 0.8948	0.07276 0.6119	0.13241 0.3543	0.06312 0.6599	-0.04918 0.7318	-0.24497 0.0832
ldlA	-0.34115 0.0143	0.01899 0.8948	1.00000	0.10945 0.4445	-0.03074 0.8305	-0.11430 0.4245	0.04599 0.7486	0.07588 0.5966
tgA	0.07773 0.5877	0.07276 0.6119	0.10945 0.4445	1.00000	0.28259 0.0445	-0.01796 0.9004	-0.39343 0.0043	-0.26640 0.0588
hdlB	-0.01016 0.9436	0.13241 0.3543	-0.03074 0.8305	0.28259 0.0445	1.00000	0.12940 0.3655	-0.02077 0.8849	-0.04037 0.7785
hipot	0.02021 0.8881	0.06312 0.6599	-0.11430 0.4245	-0.01796 0.9004	0.12940 0.3655	1.00000	0.04127 0.7737	0.07007 0.6251
peso	-0.35814 0.0099	-0.04918 0.7318	0.04599 0.7486	-0.39343 0.0043	-0.02077 0.8849	0.04127 0.7737	1.00000	0.71149 <.0001
imc	-0.21184 0.1356	-0.24497 0.0832	0.07588 0.5966	-0.26640 0.0588	-0.04037 0.7785	0.07007 0.6251	0.71149 <.0001	1.00000

Análise de Correlação por Genótipo:

----- gen=2 -----

The CORR Procedure

8 Variables: idade dm ldlA tgA hdlB hipot peso imc

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
idade	14	63.57143	11.61375	890.00000	34.00000	81.00000
dm	14	1.50000	0.51887	21.00000	1.00000	2.00000
ldlA	14	1.07143	0.26726	15.00000	1.00000	2.00000
tgA	14	1.50000	0.51887	21.00000	1.00000	2.00000
hdlB	14	1.50000	0.51887	21.00000	1.00000	2.00000
hipot	14	1.85714	0.36314	26.00000	1.00000	2.00000
peso	14	80.78571	19.49035	1131	59.00000	130.00000
imc	14	29.11214	4.54251	407.57000	21.41000	40.12000

Pearson Correlation Coefficients, N = 14

Prob > |r| under H0: Rho=0

	idade	dm	ldlA	tgA	hdlB	hipot	peso	imc
idade	1.00000	-0.08936 0.7613	0.43193 0.1230	0.05106 0.8624	-0.06383 0.8284	-0.38043 0.1797	-0.55810 0.0381	-0.56705 0.0345
dm	-0.08936 0.7613	1.00000	-0.27735 0.3370	0.71429 0.0041	0.14286 0.6261	0.00000 1.0000	-0.41454 0.1405	-0.46751 0.0919
ldlA	0.43193 0.1230	-0.27735 0.3370	1.00000	-0.27735 0.3370	-0.27735 0.3370	-0.67937 0.0075	-0.01160 0.9686	0.01697 0.9541
tgA	0.05106 0.8624	0.71429 0.0041	-0.27735 0.3370	1.00000	0.14286 0.6261	0.00000 1.0000	-0.52103 0.0561	-0.48122 0.0815
hdlB	-0.06383 0.8284	0.14286 0.6261	-0.27735 0.3370	0.14286 0.6261	1.00000	0.00000 1.0000	-0.02662 0.9280	-0.19076 0.5136
hipot	-0.38043 0.1797	0.00000 1.0000	-0.67937 0.0075	0.00000 1.0000	0.00000 1.0000	1.00000	-0.02639 0.9286	-0.07628 0.7955
peso	-0.55810 0.0381	-0.41454 0.1405	-0.01160 0.9686	-0.52103 0.0561	-0.02662 0.9280	-0.02639 0.9286	1.00000	0.90012 <.0001
imc	-0.56705 0.0345	-0.46751 0.0919	0.01697 0.9541	-0.48122 0.0815	-0.19076 0.5136	-0.07628 0.7955	0.90012 <.0001	1.00000

Análise de Correlação Geral:

The CORR Procedure								
8 Variables:	gen	dm	ldlA	tgA	hdlB	hipot	peso	imc
Simple Statistics								
Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum		
gen	66	1.24242	0.46610	82.00000	1.00000	3.00000		
dm	66	1.62121	0.48880	107.00000	1.00000	2.00000		
ldlA	66	1.16667	0.37553	77.00000	1.00000	2.00000		
tgA	66	1.54545	0.50175	102.00000	1.00000	2.00000		
hdlB	66	1.57576	0.49801	104.00000	1.00000	2.00000		
hipot	66	1.86364	0.34580	123.00000	1.00000	2.00000		
peso	66	79.15758	14.21848	5224	51.00000	130.00000		
imc	66	29.18439	4.13080	1926	20.96000	40.90000		
Pearson Correlation Coefficients, N = 66								
Prob > r under H0: Rho=0								
	gen	dm	ldlA	tgA	hdlB	hipot	peso	imc
gen	1.00000	-0.06343 0.6129	0.02930 0.8154	0.01794 0.8863	-0.01406 0.9108	0.01735 0.8900	0.10325 0.4094	0.05385 0.6676
dm	-0.06343 0.6129	1.00000	0.01397 0.9114	0.22811 0.0655	0.15129 0.2253	0.05378 0.6680	-0.15287 0.2204	-0.28062 0.0225
ldlA	0.02930 0.8154	0.01397 0.9114	1.00000	0.08165 0.5146	-0.02742 0.8270	-0.17770 0.1534	0.04889 0.6967	0.09423 0.4517
tgA	0.01794 0.8863	0.22811 0.0655	0.08165 0.5146	1.00000	0.26307 0.0328	-0.00806 0.9488	-0.40968 0.0006	-0.29801 0.0151
hdlB	-0.01406 0.9108	0.15129 0.2253	-0.02742 0.8270	0.26307 0.0328	1.00000	0.10558 0.3988	-0.01649 0.8955	-0.06160 0.6232
hipot	0.01735 0.8900	0.05378 0.6680	-0.17770 0.1534	-0.00806 0.9488	0.10558 0.3988	1.00000	0.02509 0.8415	0.04146 0.7410
peso	0.10325 0.4094	-0.15287 0.2204	0.04889 0.6967	-0.40968 0.0006	-0.01649 0.8955	0.02509 0.8415	1.00000	0.76217 <.0001
imc	0.05385 0.6676	-0.28062 0.0225	0.09423 0.4517	-0.29801 0.0151	-0.06160 0.6232	0.04146 0.7410	0.76217 <.0001	1.00000