

MARILEIA SCARTEZINI



ASSOCIAÇÃO DA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA
COM MARCADORES GENÉTICOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de Genética.

Orientador: Dr. José Ernesto dos Santos

Co-orientadores:

Dr. Marco Antônio Zago

Dra. Eleidi Chautard Freire Maia

CURITIBA

2000

MARILEIA SCARTEZINI

ASSOCIAÇÃO DA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA
COM MARCADORES GENÉTICOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de Genética.

Orientador: Dr. José Ernesto dos Santos

Co-orientadores:

Dr. Marco Antônio Zago

Dra. Eleidi Chautard Freire Maia

CURITIBA
2000



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Curso de Pós-Graduação em Genética

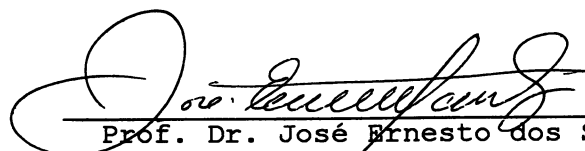
P A R E C E R

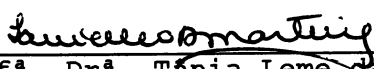
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado, a que se submeteu **MARILÉIA SCARTEZINI**, para fins de adquirir o título de Doutora em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito **“A” com louvor**.

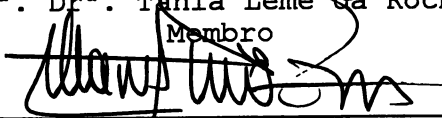
Secretaria da Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

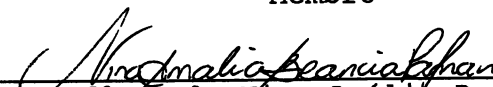
Curitiba, 16 de maio de 2000.

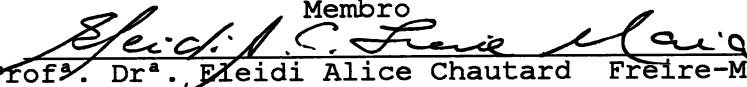
Banca Examinadora:


Prof. Dr. José Ernesto dos Santos
Orientador e Presidente


Prof.ª Dr.ª Tânia Leme da Rocha Martinez
Membro



Prof.ª Dr.ª Marco Antonio Zago
Membro


Prof.ª Dr.ª Nina Amália Brancia Pagnan
Membro


Prof.ª Dr.ª Eleidi Alice Chautard Freire-Maia
Membro



Visto:


Prof. Dr. José S. Cunha Fernandes
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Genética

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Hugo Luiz Scartezini e Geni Poletto Scartezini, por terem me ensinado com coragem e determinação, lutar por tudo o que planejei em minha vida até conseguir. Muito obrigada pelo incentivo, amor e carinho constantes.

Às minhas filhas, Caroline e Amanda,
sentido maior de minha vida,
meu amor e meu carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me acompanha e ilumina.

À Profa. Dra. Eleidi Chautard Freire Maia, pelo incentivo em iniciar este doutorado, pela paciência e grande ajuda que dispensou na análise dos dados deste trabalho, pela co-orientação e também pela amizade e carinho.

Ao professor Dr. José Ernesto dos Santos, pela orientação, por ter viabilizado este trabalho na USP-Ribeirão Preto, pelo incentivo em minhas diversas atividades científicas, pela amizade.

Ao professor Dr. Marco Antônio Zago, pelo apoio e prontidão em sempre me ajudar na co-orientação deste trabalho, pela eficiência e amizade.

Ao Prof. Dr. José Antônio Marin Neto junto à sua equipe do Serviço de Hemodinâmica do HC-USP-RP, pela seleção e encaminhamento dos pacientes, pela atenção.

Ao cardiologista responsável do Serviço de Hemodinâmica HC-USP-RP, Dr. Antônio Pazin Filho, pela análise, paciência e persistência em ajudar no diagnóstico dos pacientes, pela amizade.

À Dra. Tânia L.R. Martinez, InCor-HC-FMUSP, pela ajuda e colaboração sempre pronta em todos os momentos, pelo incentivo constante nos rumos de minha vida, pelo carinho e amizade.

Aos professores e amigos da Seção de Lípidos-EPM, pela amizade.

Ao professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento, pela análise estatística e ajuda indispensável na análise dos dados, pela amizade.

À Julia S. K. Hotta, farmacêutica bioquímica responsável pelo Laboratório de Nutrição da USP-RP, pelo auxílio e parceria na implantação do Laboratório de Biologia Molecular em Nutrição na USP-RP, pela amizade.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Hematologia e Biologia Molecular, Marli Haydée Tavela, Amélia Goes de Araújo, Júlia Komoto, pela paciência e ajuda na padronização das técnicas que utilizei no trabalho, pela amizade.

Às amigas e farmacêuticas bioquímicas responsáveis pelo Laboratório Behring em Ribeirão Preto, pela presteza, execução de dosagens bioquímicas das apolipoproteínas e carinho com que me acolheram em sua cidade.

Aos amigos que me incentivaram e fizeram parte deste período em que estive em Ribeirão Preto.

Aos professores das disciplinas de Bioquímica Clínica I e II, Geraldo Picheth e Vânia Manfredini de Alcântara, pela disposição, incentivo e ajuda em minha atividade docente na UFPR, pelo carinho e amizade constante.

Ao amigo e Diretor do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, Prof. Dr. Carlos Augusto Moreira Júnior, pelo incentivo e disposição para que este trabalho pudesse ser finalizado.

Aos professores e funcionários do Setor de Ciências da Saúde, pelo incentivo e compreensão de minha ausência para término deste trabalho.

Ao amigo Levino Triebess, que sempre acreditou em minha atividade científica, e gentilmente cedeu os Kits da Behring, para dosagem das apolipoproteínas e Lp(a).

Ao aluno da Pós-Graduação em Genética, Christian Macagnan Probst, pelo auxílio na utilização do programa Arlequin, pela compreensão.

À minha família, pais, irmãs e irmão, cunhados, tios, primas e primos, que me ajudaram, apoiaram e sempre estiveram presentes em todos os momentos.

Às minhas amigas, Lidiane, Marlies, Marli, Anacleto, Lígia e Maria Inês, pelo incentivo, carinho e ajuda em muitos momentos desta fase em minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	6
2.2 APOLIPOPROTEÍNA B.....	6
2.3 O GENE DA APO B	7
2.4 VARIABILIDADE DO GENE DA APO B.....	7
2.4.1 Polimorfismo de <i>Xba</i> I da Apo B	8
2.4.2 Polimorfismo de <i>Eco</i> RI da Apo B.....	13
2.4.3 Polimorfismo de inserção/deleção do peptídeo sinal da Apo B	15
2.4.4 Haplótipos do Gene da Apo B e Desequilíbrio de Ligação.....	18
2.4.5 Polimorfismo Apo B 3'VNTR	20
2.5 O GENE DA APO E	23
2.6 VARIABILIDADE DO GENE DA APO E.....	24
2.7 O GENE DA ECA.....	30
2.8 VARIABILIDADE DO GENE DA ECA	30
2.9 O GENE DO FATOR V	33
2.10 VARIABILIDADE DO GENE DO FATOR V	33

3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 AMOSTRAS DE PACIENTES	36
4.2 MÉTODOS LABORATORIAIS.....	36
4.2.1 Análise dos lípides, lipoproteínas e apolipoproteínas	36
4.2.2 Extração do DNA	37
4.2.3 Análise da variabilidade do DNA.....	38
4.2.3.1 Preparo dos reagentes	39
4.2.3.2 Amplificação do DNA.....	41
4.2.3.3 Identificação dos produtos da PCR	44
4.3 MÉTODOS NUMÉRICOS	52
5 RESULTADOS	53
5.1 DESCRIÇÃO GERAL DA AMOSTRA	53
5.2 NÍVEIS SÉRICOS DE LÍPIDES, LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS NOS GRUPOS ESTUDADOS	54
5.3 NÍVEIS SÉRICOS DE LÍPIDES, LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS DE ACORDO COM O SEXO NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	56
5.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DOS GENES DA APO B, DA APO E, DA ENZIMA CONVERSORA DO ANGIOTENSINOGENO-I E DO FATOR V EM RELAÇÃO À DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.....	57
5.5 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS HAPLÓTIPOS E GENÓTIPOS DO GENE DA APO B E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA	62
5.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM O POLIMORFISMO DE <i>Xba</i> I DO GENE DA APO B.....	69
5.7 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM O POLIMORFISMO DE <i>Eco</i> RI DO GENE DA APO B	72
5.8 GENÓTIPOS <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI E NÍVEIS SÉRICOS DE LÍPIDES, LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS.....	73

5.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM O POLIMORFISMO DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DO PEPTÍDEO SINAL DO GENE DA APO B.....	76
5.10 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM A VARIABILIDADE DO GENE DA APO E.....	78
5.11 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM O POLIMORFISMO DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DO GENE DA ECA	80
6 DISCUSSÃO	82
6.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL, LIPÍDES, LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS.....	82
6.2 VARIABILIDADE GENÉTICA E DAC	83
6.2.1 Variações relacionadas com a apo B.....	83
6.2.2 Variações da apo E.....	87
6.2.3 Variações da ECA.....	88
6.2.4 Variações do fator V.	89
6.2.5 Variação genética e nível de colesterol total.....	89
7 CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE TABELAS

1	Freqüências (%) da presença e ausência do sítio de restrição <i>XbaI</i> em indivíduos controle e com DAC, em caucasóides e orientais, de acordo com a literatura.....	9
2	Freqüências (%) da presença (E+) e ausência (E-) do sítio de restrição <i>EcoRI</i> em indivíduos controle e com DAC, em caucasóides e orientais, de acordo com a literatura.....	14
3	Freqüências (%) dos alelos do peptídeo sinal do gene da apo B, em amostras de diferentes grupos étnicos, com e sem DAC, de acordo com a literatura.....	16
4	Freqüências haplotípicas quanto a <i>XbaI/EcoRI</i> e <i>XbaI</i> /peptídeo sinal do gene da apo B, em caucasóides e asiáticos, de acordo com a literatura	19
5	Freqüências alélicas do 3'VNTR ligado ao gene da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-, em diferentes grupos étnicos, de acordo com a literatura.....	22
6	Freqüências (%) dos alelos da apo E em indivíduos controle e com DAC, em diferentes grupos étnicos, de acordo com a literatura	25
7	Freqüências (%) dos alelos do gene da ECA, em amostras de caucasóides e orientais, com e sem DAC, de acordo com a literatura	31
8	Freqüências (%) dos alelos do gene do fator V, em caucasóides e ameríndios, com e sem DAC, de acordo com a literatura.....	34
9	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na metodologia da PCR.....	41
10	Ciclos programados para a ampliação do DNA genômico	43
11	Informações a respeito da identificação direta dos fragmentos em eletroforese.....	45
12	Informações a respeito dos processos de digestão enzimática	48
13	Informação a respeito do processo de eletroforese.....	49
14	Distribuições de freqüências por sexo, cor e fatores de risco para DAC, encontradas nos indivíduos diagnosticados com DAC (DAC+, N=116) e sem DAC (DAC-, N=78) pela angiografia	53
15	Médias (\pm DP) dos níveis séricos (mg/dL) de lípidos, lipoproteínas, apolipoproteínas e relação apo B/apo A-I nos grupos DAC+ (N=109) e DAC- (N=78)	55
16	Médias (\pm DP) dos níveis séricos dos lípidos, lipoproteínas, apoproteínas e relação apo B/apo A-I em pacientes nos grupos DAC+ e DAC-, classificados por sexo	56

17	Freqüências dos genótipos da apo B (<i>XbaI</i> ; <i>EcoRI</i> ; <i>ins/del</i>), da apo E, da ECA e do fator V nos grupos DAC+ (N=114) e DAC- (N=78), com comparações entre os dois grupos por χ^2	57
18	Freqüências (%) dos alelos dos genes da apo B (<i>XbaI</i> ; <i>EcoRI</i> ; <i>ins/del</i> peptídeo sinal), apo E, ECA (I/D) e fator V nos grupos DAC+ e DAC-, comparadas por χ^2	59
19	Freqüências alélicas do polimorfismo do 3'VNTR do gene da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-	60
20	Resultados de χ^2 para verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, referentes aos locos da apo B, apo E e ECA, nos grupos DAC+ e DAC-.....	61
21	Distribuições de freqüências de genótipos do gene da apo B (<i>XbaI</i> , <i>EcoRI</i> e <i>ins/del</i> do peptídeo sinal) nos grupos DAC+ e DAC-	63
22	Distribuições de freqüências haplotípicas*, referentes ao gene da apo B (<i>XbaI</i> , <i>EcoRI</i> e <i>ins/del</i> do peptídeo sinal) nos grupos DAC+ e DAC-	64
23	Freqüências* absolutas e relativas dos diferentes haplótipos do gene da apo B (<i>XbaI</i> / <i>EcoRI</i> , <i>XbaI/ins/del</i> e <i>EcoRI/ins/del</i>) nos grupos DAC+ e DAC-	66
24	Valores relacionados com desequilíbrio de ligação, levando-se em conta os haplótipos do gene da apo B.....	66
25	Distribuições das freqüências (%) dos genótipos da apo B (<i>XbaI/EcoRI</i>), X-X-/E+E+ e outros, nos grupos DAC+ e DAC-	68
26	Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos <i>XbaI</i> da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-	69
27	Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos <i>EcoRI</i> da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-	72
28	Médias (\pm DP) dos níveis séricos (mg/dL) de lípides, lipoproteínas, apolipoproteínas e relação apo B/apo A-I, do genótipo X-X-/E+E+ nos grupos DAC+ (N=22) e DAC- (N=6), comparadas por teste t	74
29	Médias (\pm DP) dos níveis séricos (mg/dL) de lípides, lipoproteínas, apolipoproteínas e relação apo B/apo A-I, comparadas entre o genótipo X-X-/E+E+ (N=22) e outros genótipos <i>XbaI/EcoRI</i> (N=87) do grupo DAC+	75
30	Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos do peptídeo sinal da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-	76
31	Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos da apo E, nos grupos DAC+ e DAC-	78

32	Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total (mg/dL) dos genótipos do gene da apo E sem o alelo E4 (2/2, 2/3, 3/3) e com o alelo E4 (2/4, 3/4, 4/4), nos grupos DAC+ e DAC-	79
33	Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos D/D, I/D, I/I do gene da ECA, nos os grupos DAC+ e DAC-.....	80

LISTA DE FIGURAS

1	Mapa do gene da apolipoproteína B indicando o tamanho dos exons e introns.....	8
2	Diagrama esquemático da estrutura do 3'VNTR próximo ao gene da apo B indicando o tamanho dos exons e introns.....	21
3	Modelo da estrutura tridimensional dos domínios aminoterminais das apos E3 e E4, por cristalografia com raio X	28
4	Variações do peptídeo sinal do gene da apo B.....	46
5	Variações do 3'VNTR do gene da apo B.....	46
6	Variações do gene da ECA (INS/DEL).....	47
7	Variações do gene da ECA (INS).....	47
8	Variações <i>Xba</i> I do gene da apo B.....	49
9	Variações <i>Eco</i> RI do gene da apo B.....	50
10	Variações do gene da apo E.....	50
11	Variações do gene do fator V.....	51
12	Distribuições de freqüências de idade, encontradas nos grupos DAC+ (N=116) e DAC- (N=78).....	54
13	Freqüências (%) de genótipos <i>Xba</i> I da apo B com presença ou ausência dos alelos X+ e X-, nos grupos DAC+ e DAC-	58
14	Freqüências dos genótipos do 3'VNTR do gene da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-	61
15	Freqüências dos diferentes haplótipos observados e inferidos, nos grupos DAC+ e DAC-.....	64
16	Freqüências de genótipos (<i>Xba</i> I, <i>Eco</i> I e <i>ins/del</i>) da apo B encontradas nos grupos DAC+ e DAC-, classificados como X-X-/E+E+/ins/ins e outros.....	65
17	Freqüências dos haplótipos <i>Xba</i> I/peptídeo sinal observados nos grupos DAC+ e DAC-	67
18	Freqüências de genótipos (<i>Xba</i> I, <i>Eco</i> RI) da apo B, classificados como X-X-/E+E+ e outros, encontradas nos grupos DAC+ e DAC-.....	68

19	Frequências do genótipo <i>XbaI</i> <i>+/+</i> com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	70
20	Frequências do genótipo <i>XbaI</i> <i>+/-</i> com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	70
21	Frequências do genótipo <i>XbaI</i> <i>-/-</i> com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	70
22	Frequências de genótipos <i>XbaI</i> da apo B, levando-se em conta presença ou ausência do alelo X (+), em relação com os níveis de CT, considerando-se os grupos DAC+ e DAC-	71
23	Frequências do genótipo <i>EcoRI</i> <i>+/+</i> da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	72
24	Frequências do genótipo <i>EcoRI</i> <i>+/-</i> da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	73
25	Frequências do genótipo <i>del/del</i> do peptídeo sinal da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	76
26	Frequências do genótipo <i>ins/del</i> do peptídeo sinal da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	77
27	Frequências do genótipo <i>ins/ins</i> do peptídeo sinal da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	77
28	Frequências dos genótipos da apo E sem o alelo E4 (2/2, 2/3, 3/3) e com o alelo E4 (2/4, 3/4, 4/4), de acordo com os diferentes níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	79
29	Frequências do genótipo D/D da ECA, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	80
30	Frequências do genótipo I/D do gene da ECA, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	81
31	Frequências do genótipo I/I da ECA, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	acilCoA: colesterol acil transferase
apo	apolipoproteína
apo B-100	apolipoproteína B-100
apo B-48	apolipoproteína B-48
pb	pares de base
CETP	proteína de transferência do colesterol esterificado
CT	colesterol total
DAC	Doença Arterial Coronariana
DNA	ácido desoxi-ribonucléico
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
DAC-	sem doença arterial coronariana
DAC+	com doença arterial coronariana
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol da HDL
HF	hipercolesterolemia familiar
HMG-CoA	3-hidroxi 3-metil-glutaril Coenzima A
HSPG	heparan sulfato proteoglicans
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
kb	kilobase
KD	Kilo Dalton
LCAT	lecitina-colesterol acil transferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	colesterol da LDL
LH	lipase hepática
Lp(a)	lipoproteína (a)
LPL	lipase lipoproteica
LRP	proteína semelhante ao receptor da LDL
PCR	reação em cadeia da polimerase
QM	quilomícrons
RFLP	polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição
RNA _m	RNA mensageiro
RQM	remanescentes de quilomícrons
SDS	dodecil sulfato de sódio
TG	triglicérides
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-C	colesterol da VLDL

RESUMO

Associações entre a doença arterial coronariana (DAC) e genes ou marcadores genéticos foram investigadas em 116 coronariopatas (92 homens e 24 mulheres; DAC+) segundo o diagnóstico angiográfico, comparados com 78 controles (26 homens e 52 mulheres) sem isquemia e sem lesão pela angiografia (DAC-). A idade média foi 44 ± 7 anos (averiguados com idade inferior a 56 anos) nos dois grupos. Os níveis de Colesterol total, Triglicérides, HDL-Colesterol (HDL-C), LDL-Colesterol, Lipoproteína (a), apoproteína B (apo B), apoproteína AI (apo AI), apoproteína AII, apoproteína E (apo E) e a relação apo B/apo AI foram analisados por métodos enzimáticos (Roche Diagnostic Systems) e nefelométricos (Behring Diagnostic). O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue total coletado com EDTA, e a metodologia da PCR foi utilizada para amplificar os segmentos desejados. Não houve diferenças significativas entre os grupos DAC+ e DAC- nas frequências alélicas dos locos estudados: apo B (*XbaI*; *EcoRI*; *ins/del* peptídeo sinal; 3' VNTR), apo E, enzima conversora da angiotensina I (ECA) e fator V da coagulação. Como esperado, esses grupos apresentaram diferenças significativas quanto aos níveis das variáveis bioquímicas que caracterizam o perfil lipídico. Não encontramos nenhuma associação entre genótipo e nível de CT com relação a cinco dos sítios investigados: apo B (*XbaI*, *EcoRI* e peptídeo sinal), apo E e ECA. O alelo 36 do 3'VNTR do gene da apo B foi menos frequente em DAC+ (26,3%) do que em DAC- (38,4%; $\chi^2_{(1)} = 6,38$; $p < 0,05$), entretanto, após a correção de Bonferroni o valor de p foi igual a 0,17, perdendo a significância. O haplótipo X+del (*XbaI*/peptídeo sinal do gene da apo B) apresentou diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 3,97$; $p < 0,05$) entre os dois grupos estudados, sendo mais frequente em DAC-. Considerando-se o genótipo X-X-/E+E+ (*XbaI/EcoRI* do gene da apo B) e uma outra classe, que englobou todos os demais genótipos, houve diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 6,27$; $p < 0,02$) entre os grupos

DAC+ e DAC-. O genótipo X-X-/E+E+ foi mais freqüente no grupo DAC+, apresentando uma razão de chance (*odds ratio*) de 3,2 (1,24 a 8,25, com intervalo de confiança de 95%) de desenvolvimento de DAC em adultos jovens, quando comparado aos outros genótipos *XbaI/EcoRI*. Os indivíduos com o genótipo X-X-/E+E+ (N=22) em relação aos demais genótipos *XbaI/EcoRI* (N=87) do grupo DAC+, apresentaram maior nível médio de apo E ($p = 0,041$). Nos indivíduos com o genótipo marcador (X-X-/E+E+), quando se comparou o grupo DAC- (N = 6) com DAC+ (N = 22), a média de HDL-C apresentou diferença estatisticamente significativa: DAC+ = 37 ± 14 mg/dL e DAC- = 53 ± 18 mg/dL ($t = 2,35$; $p < 0,05$). O alto nível relativo de HDL-C em DAC- parece ser um fator protetor, compensando a presença do genótipo marcador de DAC. Sugere-se, nesse caso, uma interação gene-gene ou gene-ambiente. Como o alelo X- não implica em diferença de aminoácido, o maior risco do genótipo X-X-/E+E+ é considerado indicativo da atuação de outro gene na etiopatogenia da DAC, cujas variações estejam em desequilíbrio de ligação com aquelas de *XbaI/EcoRI*. Além disso, é possível que o desequilíbrio de ligação seja com alguma variação desconhecida do próprio gene da apo B. Enquanto a diferença entre as freqüências do genótipo X-X-/E+E+ é significativa entre DAC+ e DAC- ($p = 0,012$), a diferença entre as freqüências do haplótipo X-E+ entre esses dois grupos apenas se aproxima da significância ($p = 0,052$).

ABSTRACT

Associations between Coronary Artery Disease (CAD) and gene or genetic markers were searched in 116 individuals (92 men and 24 women) with cardiovascular disease (CAD+), according to the angiographic diagnosis, compared to 78 controls (26 men and 52 women) without ischaemia and without lesion as diagnosed by angiography (CAD-). The mean age was 44 ± 7 years (ascertainment below to 56) for both groups. The levels of Total Cholesterol, Triglycerides, HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol, Lipoprotein (a), apoprotein B (apo B), apoprotein AI (apo AI), apoprotein AII, apoprotein E (apo E) and the ratio apoB/apoAI were analysed by enzymatic (Roche Diagnostic Systems) and nephelometric (Behring Diagnostic) methods. The genomic DNA was extracted from leucocytes of total blood collected with EDTA and the PCR methodology was used for the amplification of the chosen segments. No significant differences were detected between the CAD+ and CAD- groups on the allelic frequencies of the studied loci: apoB (*Xba*I; *Eco*RI; *ins/del* of the signal peptide; 3'VNTR), apo E, angiotensin converting enzyme (ACE) and coagulation factor V. As expected, these groups showed significant differences on the levels of the biochemical variables that characterize the lipid profile. No association was found between genotype and TC level in relation to five of the investigated sites: apo B (*Xba*I, *Eco*RI and signal peptide), apo E and ACE. The 3'VNTR 36 allele of the apo B gene was less frequent in CAD+ (26.3%) than in CAD- (38.4%; $\chi^2_{(1)} = 6.38$; $p < 0.05$), changing to $p = 0.17$ with the Bonferroni's correction. The X+*del* haplotype (*Xba*I/signal peptide of the apo B gene) showed significant difference ($\chi^2_{(1)} = 3.97$; $p < 0.05$) between the two studied groups, being more frequent in CAD-. Considering the X-X-/E+E+ genotype (*Xba*I/*Eco*RI of the apo B gene) against another class that gathered all the other genotypes, there was a significant

difference ($\chi^2_{(1)} = 6.27$; $p < 0.02$) between the CAD+ and CAD- groups. The X-X-/E+E+ genotype was more frequent in the the CAD+ group, showing odds ratio of 3.2 (1.24 to 8.25, with 95% of confidence interval) of developing CAD in young adults when compared to the other *XbaI/EcoRI* genotypes. In the CAD+ group, the individuals with the X-X-/E+E+ genotype (N = 22) when compared to the other *XbaI/EcoRI* genotypes (N=87) showed higher mean level of apo E ($p = 0,041$). In the individuals with the marker genotype (X-X-/E+E+), when the CAD- (N = 6) was compared with the CAD+ group (N = 22), the mean of HDL-C showed statistically significant difference: CAD+ = 37 ± 14 mg/dL and CAD- = 53 ± 18 mg/dL ($t = 2.35$; $p < 0.05$). The relative high level of HDL-C in CAD- seems to be a protective factor, compensating the presence of the marker genotype of CAD. In this case, it is suggested a gene-gene or gene-environment interaction. As the X- allele does not imply in amino-acid change, the higher risk of the X-X-/E+E+ genotype is supposed to be an indication of the action of another gene in the etiopathology of CAD+, whose variations are in linkage disequilibrium with those of *XbaI/EcoRI*. It is also possible that the linkage disequilibrium occurs with some unknown variation of the own apo B gene. While the difference between the frequencies of the X-X-/E+E+ genotype is significant between CAD+ and CAD- ($p = 0.012$), the difference between the frequencies of the X-E+ haplotype between these two groups is only close to significance ($p = 0.052$).

1 INTRODUÇÃO

Ao descrever o achado de gordura nas coronárias em 1878, Adam Hammer correlacionou-o com a trombose e não imaginava que estava assentando a pedra fundamental para a caracterização do depósito de lípidos como um fator causal preponderante para doença cardiovascular (HAMMER, 1878; citado por MAJOR, 1978).

O primeiro relato de um caso de trombose coronária, diagnosticado em vida e confirmado por achados de necrópsia, foi publicado em 1896 por Georg Dock (DOCK, 1896; citado por MAJOR, 1978). Desde então, a aterosclerose vem se destacando como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade, em toda a sociedade ocidental, fazendo com que a elevada frequência de eventos cardiovasculares nos países desenvolvidos direcione as pesquisas no sentido de identificar e controlar seus fatores determinantes.

Dentre as doenças cardiovasculares, a doença arterial coronariana (DAC), representada pelo infarto agudo do miocárdio (IAM) e angina, destaca-se como a maior causadora da incapacidade e morte no nosso meio. É uma doença da idade adulta, de etiologia multifatorial, resultado de uma interação complexa de múltiplos fatores, genéticos e ambientais (VOGEL e MOTULSKY, 1997).

A prevalência da DAC varia amplamente no mundo e geralmente a maior frequência é encontrada em países ocidentais ou com estilo de vida ocidental. O papel importante do meio ambiente é documentado pelo aumento de DAC quando migrantes de países como o Japão, onde a frequência de DAC é baixa, deslocam-se para áreas de alta frequência como os EUA e passam a ter maior risco de DAC (KAYS *et al.*, 1958; MARMOT *et al.*, 1975).

A frequência de DAC é cerca de 6 vezes maior nas famílias de pacientes do que em famílias controle. Os fatos referentes à agregação familiar na DAC são: a) um aumento com a

diminuição da idade do paciente afetado, sendo DAC prematura (<55 anos) um forte fator de risco; b) a mulher apresenta menor frequência de DAC em relação ao homem; c) consangüíneos de mulheres afetadas têm maior risco do que consangüíneos de homens afetados; d) diabete melito, hiperlipidemia e hipertensão são fatores de risco para DAC, entretanto, a agregação familiar observada não pode ser explicada totalmente por esses fatores (VOGEL e MOTULSKY, 1997).

Entretanto, a observação de agregação familiar não significa necessariamente determinação genética. Membros da mesma família compartilham ambientes semelhantes, incluindo agentes de risco para DAC, tais como: estilo de vida, fumo e hábitos dietários (VOGEL e MOTULSKY, 1997).

A aterosclerose, processo básico da DAC, consiste no espessamento e endurecimento das artérias de médio e grande calibres através da formação da placa aterosclerótica. Quadros de isquemia crônica são provocados pela obstrução progressiva da luz arterial ao longo de décadas. Manifestações agudas, como a angina instável e o infarto agudo do miocárdio, são geralmente desencadeadas por desestabilização da placa aterosclerótica com redução significativa e abrupta da luz do vaso, devida à formação local de trombo (ANDERSON e KING, 1992).

A participação do colesterol no desenvolvimento da DAC vem sendo demonstrada com base em vários estudos publicados na literatura mundial. O fascínio e a devoção ao estudo da molécula do colesterol, desde que foi isolada há 204 anos, já concedeu aos cientistas das mais diversas áreas da ciência uma recompensa de treze Prêmios Nobel.

O colesterol é o principal esteróide do homem, álcool monoídrico insaturado, derivado do ciclo pentanoperidrofenantreno e está presente em todas as células do corpo e na maioria dos fluidos. O colesterol também serve como precursor para síntese de hormônios esteróides,

vitamina D e ácidos biliares. A característica mais importante do colesterol é a sua insolubilidade em água. Pode se apresentar na forma livre (componente estrutural das membranas celulares e na superfície das lipoproteínas), ou esterificada (armazenado no interior das células ou no interior das lipoproteínas). A esterificação do colesterol ocorre no plasma sanguíneo pela ação da enzima LCAT (lecitina-colesterol acil transferase) que, ativada pela apo AI, transfere uma molécula de ácido graxo da lecitina para a posição 3-beta-hidróxi do colesterol. A esterificação intracelular ocorre pela ação da ACAT (acil-CoA-colesterol acil transferase).

O colesterol está presente nos alimentos e a maior parte encontrada no organismo é proveniente da síntese *de novo* a partir de acetato ativado (AcetilCoA). A etapa que regula a velocidade na via de síntese é a conversão do 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A para mevalonato, catalizada pela enzima hidroximetilglutarilCoA redutase (HMG-CoA redutase). O fígado é o órgão responsável pela maior parte da síntese do colesterol endógeno.

O colesterol, assim como os outros lípides plasmáticos (triglicérides, fosfolípidos e ácidos graxos), é transportado na forma de partículas lipoprotéicas pelos fluidos do organismo humano. As lipoproteínas são macromoléculas que se organizam naturalmente na forma de partículas, nas quais os lípidos hidrofóbicos ficam no centro e os hidrofílicos na parte externa, permitindo que as lipoproteínas se tornem solúveis na corrente circulatória.

A função das lipoproteínas plasmáticas é transportar os lípidos obtidos por via exógena e endógena até os tecidos. Diferem quanto à origem, composição química, tamanho e mobilidade eletroforética, porém foi pelo método da ultracentrifugação, pela propriedade física da densidade, que se baseou a atual classificação.

Existem quatro classes de lipoproteínas plasmáticas que se apresentam em maior concentração no organismo humano, Quilomícron, VLDL, LDL e HDL, e duas classes em menor concentração, IDL e Lp(a) (BACHORIK *et al.*, 1995).

As apolipoproteínas permeiam a molécula de lipoproteína conferindo solubilidade ao macrocomplexo. Desempenham diversas funções no metabolismo lipoprotéico: ligação com receptor específico, ativação ou inibição de enzimas, determinação dos sítios de captação e da velocidade de degradação dos constituintes lipoprotéicos. Foram isoladas e caracterizadas (ALAUPOVIC, 1971), sendo reunidas em grupos, designadas pela ordem alfabética (A-I, A-II, A-IV, B-48, B-100, C-I, C-II, C-III, D e E).

A apolipoproteína B (apo B) pode ser encontrada em duas formas, a apo B-48 e a apo B-100. A apo B-48 é sintetizada no intestino, completamente homóloga à região amino-terminal da apo B-100 e seu tamanho corresponde a 48% do peso molecular da apo B-100, com 2152 aminoácidos de extensão (BLACKHART *et al.*, 1986; CHEN *et al.*, 1986). É o principal constituinte protéico dos quilomícrons e exerce função primordial na estrutura desta lipoproteína (KANE e HAVEL, 1994). Como a apo B-48 não possui o domínio carboxi-terminal da apo B-100, não se liga aos receptores da LDL, e portanto os quilomícrons não podem ser removidos por essa via (CHEN *et al.*, 1987).

A apolipoproteína B-100 é o principal constituinte protéico da lipoproteína LDL, responsável pela manutenção da integridade da LDL (YANG *et al.*, 1986) e da sua ligação nos receptores celulares (BROWN e GOLDSTEIN, 1983). Suas variações podem se refletir no catabolismo do colesterol plasmático, constituindo-se em fator de risco para DAC.

O desenvolvimento da doença arterial coronariana (DAC) pode ser indicada pela variabilidade do DNA nos genes candidatos, cujos produtos encontram-se envolvidos com o metabolismo lipídico, estrutura e função das apolipoproteínas, aterogênese e trombogênese

(LUSIS, 1986). O estudo de associação entre doenças e variações polimórficas de genes ou de marcadores (seqüências de DNA não codificantes) é empregado para demonstrar o papel de fatores genéticos na etiologia de doenças multifatoriais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estudo das variações do DNA nos genes envolvidos com os níveis dos lípides, a hipertensão e o processo trombolítico contribui para avaliar as diferenças funcionais na expressão desses genes candidatos ao processo aterotrombótico, diretamente envolvido com a DAC. A variabilidade dos genes das apolipoproteínas B e E, da enzima conversora da angiotensina (ECA) e do fator V da coagulação foi estudada por vários pesquisadores, que relataram associações importantes com a DAC.

2.2 APOLIPOPROTEÍNA B

A estrutura completa da apolipoproteína B (apo B) foi elucidada pelo seqüenciamento de DNAC clonado (CHEN *et al* , 1986; KNOTT *et al* , 1986a). A proteína precursora da apo B contém um peptídeo sinal de 27 aminoácidos (KNOTT *et al* , 1986a; PROTTER *et al* , 1986) sendo que a proteína madura contém 4536 aminoácidos. É uma glicoproteína com aproximadamente 513 kD (LAW *et al.*, 1986a), com cinco domínios estruturais, sendo o quarto domínio (aminoácidos 3070-4100) responsável pela interação da apo B com os receptores da LDL, processo que modula a remoção das LDL do plasma e regula a biossíntese do colesterol (BROWN e GOLDSTEIN, 1979).

2.3 O GENE DA APO B

O gene da apo B possui aproximadamente 43 kb (BLACKHART *et al.*, 1986), localiza-se no braço curto do cromossomo 2p24 (KNOTT *et al.*, 1985) e contém 29 exons e 28 introns (BLACKHART *et al.*, 1986; LUDWIG *et al.*, 1987).

A apo B-48 é codificada pelo mesmo gene que codifica a apo B-100 (apo B), resultando de um mecanismo de edição do RNA mensageiro. Ocorre a troca da base nucleotídica citosina pela uracila, modificando o códon CAA, que codifica o aminoácido glutamina (posição 2153), para um códon de terminação UAA (CHEN *et al.*, 1987).

2.4 VARIABILIDADE DO GENE DA APO B

A clonagem e o seqüenciamento do gene da apo B permitiram a identificação de vários polimorfismos: a) de restrição, devido à substituição de um nucleotídeo, destruindo ou criando uma região de reconhecimento por uma enzima de restrição (por exemplo, *XbaI*, *EcoRI*); b) de inserção/deleção de um número variável de nucleotídeos referentes ao peptídeo sinal; c) da região hipervariável (VNTR) ligada ao gene da apo B e que está localizada a menos de 100 bases da extremidade 3'desse gene. Os sítios polimórficos mais estudados do gene da apo B são: *XbaI*, *EcoRI*, peptídeo sinal *ins/del* e 3'VNTR.

Posteriormente à identificação destes polimorfismos, tem sido explorada a associação dessas variações genéticas com fenótipos clínicos, como a hipercolesterolemia e a DAC. Devido à sua freqüência relativamente alta, as mutações polimórficas podem contribuir de maneira mais significativa do que as mutações raras para os estudos que relacionam a variabilidade genética com os níveis dos lípidos de uma população.

2.4.1 Polimorfismo de *Xba*I da Apo B

O polimorfismo da apo B *Xba*I refere-se a uma substituição de um nucleotídeo no exon 26 do gene da apo B (Figura 1), da qual resulta uma mutação silenciosa, que não afeta a seqüência de aminoácidos da apo B (PRIESTLEY *et al*, 1985; BARNI *et al*, 1986). Ocorre a troca de um nucleotídeo na terceira posição do codon 2488 (ACC→ACT), que codifica para o mesmo aminoácido treonina. A timina cria um sítio de restrição para a enzima *Xba*I, originando o alelo X+, sendo sua ausência a característica do alelo X-. Essa variação determina três genótipos: X+X+, X+X- e X-X-. O segmento de 710 pb, gerado pelo método mais amplamente utilizado, é clivado em dois fragmentos de 433 e 277 pb no alelo X+ e não é clivado no X-.

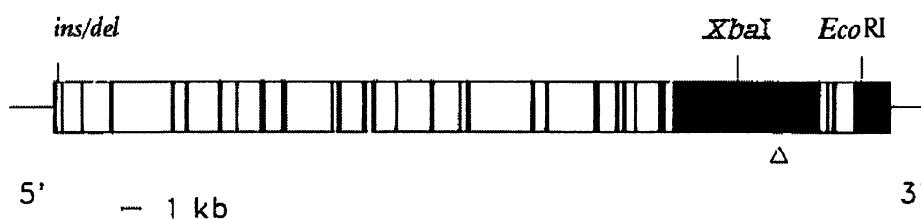


Figura 1 - Mapa do gene da apolipoproteína B indicando o tamanho dos exons e introns. Os exons são mostrados em preto, a localização das regiões polimórficas é indicada: *ins/del* no exon 1 (aminoácidos Leu-Ala-Leu: -16/-14), *Xba*I no exon 26 (aa: Thr₂₄₈₈) e *Eco*RI no exon 29 (aa: Glu₄₁₅₄→Lys). Δ Indica a localização aproximada no exon 26 do gene da apo B (KNOTT *et al*, 1986a; YANG *et al*, 1986) correspondente à ligação da proteína com o receptor de LDL (aa: 3147-3157, 3345-3381). Adaptado de Renges *et al*. (1991).

As freqüências dos alelos X+ e X- em caucasóides e orientais, de acordo com a literatura, nos grupos controle e com DAC, encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Freqüências (%) da presença e ausência do sítio de restrição *Xba*I em indivíduos controle e com DAC, em caucasóides e orientais, de acordo com a literatura.

Grupo étnico (País)	Apo B <i>Xba</i> I		Grupo	Referência
	X +	X -		
CAUCASÓIDES				
Estados Unidos	0,500	0,500	DAC +	Genest <i>et al.</i> , 1990.
	0,529	0,471	DAC -	
Suécia	0,550	0,450	DAC -	Renges <i>et al.</i> , 1991.
Europa	0,465	0,535	DAC +	Turner <i>et al.</i> , 1995.
	0,454	0,546	DAC -	
Inglaterra	0,460	0,540	DAC +	Myant <i>et al.</i> , 1989.
	0,530	0,470	DAC -	
Finlândia	0,420	0,580	DAC -	Aalto-Setälä <i>et al.</i> , 1988.
Finlândia	0,387	0,613	DAC +	Nieminen <i>et al.</i> , 1992.
	0,457	0,543	DAC -	
França	0,431	0,569	DAC +	Régis-Bailly <i>et al.</i> , 1996.
	0,470	0,530	DAC -	
Itália	0,311	0,689	DAC +	Corbo <i>et al.</i> , 1997.
	0,403	0,597	DAC -	
Itália	0,380	0,620	DAC -	Benedictis <i>et al.</i> , 1997.
Brasil	0,470	0,530	DAC +	Machado, 1997.
	0,390	0,610	DAC -	
Brasil	0,414	0,586	DAC +	Mansur, 1998.
	0,382	0,618	DAC -	
ORIENTAIS				
China	0,088	0,912	DAC +	Ye <i>et al.</i> , 1995.
	0,025	0,975	DAC -	
China	0,076	0,924	DAC +	Saha <i>et al.</i> , 1992b.
	0,091	0,909	DAC -	
Índia (descendentes)	0,200	0,800	DAC +	Renges <i>et al.</i> , 1991.
	0,290	0,710	DAC -	
Japão	0,020	0,980	DAC +	Aburatani <i>et al.</i> , 1988.
	0,040	0,960	DAC -	
China	0,010	0,990	DAC +	Pan <i>et al.</i> , 1995.
	0,010	0,990	DAC -	

RENGES *et al.* (1991) encontraram diferença significativa ao comparar a frequência do alelo X⁺, em DAC⁻, que encontraram em descendentes de indianos (0,29) com a de finlandeses (0,44; XU *et al.*, 1990b), ingleses (0,53; MYANT *et al.*, 1989) e austríacos (0,48; PAULWEBER *et al.*, 1990). Num trabalho seguinte (RENGES *et al.*, 1992) a mesma amostra de indivíduos se mostrou diferente daquela de caucasóides suecos (0,55).

Vários pesquisadores investigaram associações entre as variações *Xba*I do gene da apo B e a DAC. Estudos em caucasóides europeus (TURNER *et al.*, 1995) e em chineses (PAN *et al.*, 1995) não verificaram associação significativa entre elas e a DAC. No entanto, BOHN e BERG (1994) mostraram que em 5 (HEGELE *et al.*, 1986; MONSALVE *et al.*, 1988; MYANT *et al.*, 1989; TYBJAERG-HANSEN *et al.*, 1991 e BOHN *et al.*, 1993a) de 12 estudos publicados na literatura (DEEB *et al.*, 1986, citado por BOHN e BERG, 1994; FERNS *et al.*, 1988; WIKLUND *et al.*, 1989; GENEST *et al.*, 1990; PAULWEBER *et al.*, 1990; PEACOCK *et al.*, 1992; NIEMINEM *et al.*, 1992) ocorreu associação estatisticamente significativa entre o alelo X⁻ e/ou o genótipo X⁻X⁻ com DAC, quando o grupo DAC⁺ foi comparado com o respectivo grupo controle.

BOHN *et al.* (1993a), usando análise de regressão multivariada, concluíram que indivíduos enfartados, portadores do genótipo X⁻X⁻, quando comparados com os de genótipos X⁺X⁺ e X⁺X⁻, mostraram uma razão de chance de 2,16 (p<0,01) para apresentar a doença. Esses autores consideraram o genótipo X⁻X⁻ como um fator de risco para o infarto do miocárdio e que o aumento do risco não é aparentemente conferido pelos níveis elevados de CT, LDL-C ou apo B, mas através de outras variáveis ou mecanismos não relacionados com os fatores de risco tradicionais.

HUMPHRIES *et al.* (1992) e TIKKANEN e HELIÖ (1994) sugerem que pode estar ocorrendo uma variação adicional na seqüência do gene da apo B, em desequilíbrio de ligação com a variação de *XbaI*, que modifique os níveis de lípides no soro.

Os primeiros relatos de associação entre variação de *XbaI* e concentrações séricas de CT, LDL-C e apo B (BERG, 1986; LAW *et al.*, 1986b) foram confirmados em seguida (TALMUD *et al.*, 1987; AALTO-SETÄLÄ *et al.*, 1988; AALTO-SETÄLÄ *et al.*, 1989). Algumas discrepâncias, com diferentes associações entre os genótipos e os níveis plasmáticos dos lípides (HEGELE *et al.*, 1986; ABURATANI *et al.*, 1988; DARNFORS *et al.*, 1989) foram publicadas.

A região da apo B que se liga ao receptor da LDL corresponde àquela no exon 26, o mesmo onde se localiza o sítio *XbaI*. Por isso, as variações nesse exon ou próximas podem estar relacionadas com a afinidade da apo B pelo receptor da LDL, refletindo-se nos níveis dos lípides no plasma.

O alelo X⁺ foi associado com elevados níveis de CT e de LDL-C no plasma, em adultos sadios da população caucasóide (AALTO-SETÄLÄ *et al.*, 1988) e em pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigota (AALTO-SETÄLÄ *et al.*, 1989), enquanto o alelo X⁻ foi associado com diminuição no plasma de CT, LDL-C, apo B e possivelmente triglicérides (LAW *et al.*, 1986b; BERG *et al.*, 1986; PAULWEBER *et al.*, 1990; PEACOCK *et al.*, 1992).

Indivíduos com o genótipo X⁺X⁺ apresentaram redução no “clearance” de LDL, significando um aumento de colesterol no plasma. Evidências a favor desse dado foram observadas: a) dois estudos *in vivo* mostraram que o alelo X⁺ está associado a uma redução no catabolismo da lipoproteína LDL (DEMANT *et al.*, 1988; HOULSTON *et al.*, 1988); b) estudo de ligação competitiva e ensaios de internalização com LDL radioativa em fibroblasto

normal (SERIES *et al.*, 1989), onde LDL/X+ competiu fracamente comparada com LDL/X-, indicando que a LDL de indivíduos com genótipo X-X- liga-se ao receptor da LDL com maior afinidade, quando comparada com LDL de indivíduos com genótipo X+X+. Essa afinidade pelo receptor é traduzida em LDL internalizada com maior facilidade, diminuindo a concentração dos níveis plasmáticos do LDL-C, com conseqüente diminuição de seu papel aterogênico.

A hipótese de que a resposta dos lípides séricos à ingestão de gordura na dieta pode ser geneticamente determinada foi testada (TIKKANEN *et al.*, 1990) considerando-se as variações *XbaI*, em indivíduos que haviam participado de um estudo de intervenção dietária de seis meses, na Coreia do Norte. Os portadores do alelo X+ (X+X+ e X+X-) responderam à dieta com pouca gordura e pouco colesterol, com redução mais significativa de CT, LDL-C e apo B, quando comparados com os indivíduos X-X-. Em teoria, isto pode ser exemplificado pelo conceito de variabilidade gênica (BERG, 1989), considerando-se o genótipo X+X+ associado com amplas respostas às mudanças da dieta, enquanto que o genótipo X-X- estaria associado com resposta restrita.

TIKKANEN e HELIÖ (1994), tentando compatibilizar achados de maior risco de DAC em X-X- e maior nível de CT em X+X+, sugerem que exista um desequilíbrio de ligação do alelo X- com alguma alteração na seqüência do DNA, que seja mais deletéria do que a aterogenicidade do alelo X+. Sugerem que essa possível alteração no DNA poderia causar um aumento no risco para DAC pela alteração qualitativa ao invés de quantitativa na apo B, tal como suscetibilidade a modificações oxidativas.

Por outro lado, em outros estudos o genótipo X-X- foi associado com valores elevados de CT e LDL-C (DUNNING *et al.*, 1988; TYBJAERG-HANSEN *et al.*, 1991; GUZMÁN, 1998). GUZMÁN (1998), estudando uma amostra da população caucasóide

brasileira com 104 indivíduos de alto risco para DAC e 93 indivíduos controle, encontrou associação positiva entre o genótipo X-X-/E+E+ e os níveis de CT.

2.4.2. Polimorfismo de *EcoRI* da Apo B.

O polimorfismo apo B *EcoRI* refere-se a uma mutação da base guanina em adenina (GAA→AAA) no exon 29 (PRIESTLEY *et al.*, 1985; BARNI *et al.*, 1986), resultando na troca do amino ácido (Glu→Lys) (SHOULDERS *et al.*, 1985). Quando ocorre essa alteração, a enzima *EcoRI* perde o sítio de restrição E+ que passa a ser E-. O segmento de 480 pb, gerado pelo método mais amplamente utilizado, é clivado em dois fragmentos de 253 e 227 pb no alelo E+ e não é clivado no E-. As variações da apo B *EcoRI* são devidas aos alelos E+ e E- e aos genótipos E+E+, E+E- e E-E-.

As frequências dos alelos E+ e E- da apo B *EcoRI*, em caucasóides e orientais, de acordo com a literatura, em grupos controle e com DAC, encontram-se na tabela 2. RENGES *et al.* (1991) não encontraram diferença significativa ao comparar a distribuição da frequência do alelo E-, que encontraram em descendentes de indianos (0,11) com a de finlandeses (0,15; XU *et al.*, 1990b), ingleses (0,15; MYANT *et al.*, 1989) e austríacos (0,14; PAULWEBER *et al.*, 1990). Num trabalho seguinte (RENGES *et al.*, 1992) a mesma amostra de indivíduos mostrou diferença significativa com a de caucasóides suecos (0,19).

Essa troca de aminoácido altera a carga da apo B, mas essa diferença não chega a ser detectada como variante isoelétrica pois o peso molecular dessa proteína é muito grande. Dois estudos revelaram que essa mudança de aminoácido altera o epítipo da proteína, que é reconhecido por um dos anticorpos da série de Ag, descrito como antígeno t, associado com a

presença do sítio *EcoRI* (Glu), sendo o antígeno z associado com a sua ausência (MA *et al.*, 1987; DUNNING *et al.*, 1988).

Tabela 2 - Frequências (%) da presença (E+) e ausência (E-) do sítio de restrição *EcoRI* em indivíduos controle e com DAC, em caucasóides e orientais, de acordo com a literatura.

Grupo étnico (País)	Apo B <i>EcoRI</i>		Grupo	Referência
	E +	E -		
CAUCASÓIDES				
Estados Unidos	0,730	0,270	DAC +	Genest <i>et al.</i> , 1990.
	0,793	0,207	DAC -	
Suécia	0,810	0,190	DAC -	Renges <i>et al.</i> , 1991.
Inglaterra	0,790	0,210	DAC +	Myant <i>et al.</i> , 1989.
	0,850	0,150	DAC -	
Itália	0,745	0,255	DAC +	Corbo <i>et al.</i> , 1997.
	0,778	0,222	DAC -	
Itália	0,807	0,193	DAC -	Benedictis <i>et al.</i> , 1997.
Brasil	0,800	0,200	DCA +	Machado, 1997.
	0,840	0,160	DAC -	
ORIENTAIS				
China	0,890	0,110	DAC +	Ye <i>et al.</i> , 1995.
	0,960	0,040	DAC -	
China	0,917	0,083	DAC +	Saha <i>et al.</i> , 1992b.
	0,929	0,071	DAC -	
Índia (descendentes)	0,890	0,110	DAC +	Renges <i>et al.</i> , 1991.
	0,890	0,110	DAC -	
China	0,960	0,040	DAC +	Pan <i>et al.</i> , 1995.
	0,950	0,050	DAC -	

HUMPHRIES (1988) relata que o significado funcional ainda é desconhecido, mas a alta frequência de apo B (Lys), alelo E-, em pacientes com DAC sugere que essa substituição de aminoácido possa alterar o metabolismo de lipoproteínas que contêm apo B ou ser a causa para a apo B ser mais aterogênica. Alternativamente, é possível que essa variação esteja em desequilíbrio de ligação com outra mutação dentro do gene da apo B ou nas suas vizinhanças (MYANT, 1989).

Os resultados de estudos de associação das variações *EcoRI* com fenótipos clínicos são discordantes. Altas frequências do alelo E⁻ em pacientes com DAC em relação ao controle foram observadas em quatro estudos em amostras caucasóides, em diferentes partes do mundo: Boston (HEGELE *et al.*, 1986), Seattle (DEEB *et al.*, 1986, citado por BOHN e BERG, 1994), Salzburg (PAULWEBER *et al.*, 1990) e Londres (MYANT *et al.*, 1989).

Estudos de associação do alelo E⁻ com os níveis dos lípides também mostraram resultados discordantes. Alguns autores (PAN *et al.*, 1995; JUVONEN *et al.*, 1995; GLISIC *et al.*, 1995) não encontraram relações significativas entre esse alelo e os níveis dos lípides. No entanto, PAULWEBER *et al.* (1990) e TYBJAERG-HANSEN *et al.* (1991) observaram que indivíduos portadores do alelo E⁻ muitas vezes apresentavam taxas elevadas de lípides em relação aos portadores do alelo E⁺, tanto em amostras de sadios como naquelas com DAC.

2.4.3 Polimorfismo de inserção/deleção do peptídeo sinal da Apo B.

Os peptídeos sinais de eucariotos são elementos importantes na maioria das proteínas secretoras, sendo necessários para a passagem da cadeia peptídica nascente para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (CHAN e BRADLEY, 1986, citado por VISVIKIS *et al.*, 1990; RANDALL e HARDY, 1989). Qualquer modificação na sequência do peptídeo sinal pode provocar irregularidade na síntese proteica (ANGELE *et al.*, 1989).

BOERWINKLE e CHAN (1989) publicaram um método rápido para detectar inserção/deleção de 9 pares de base (bp) na região que codifica o peptídeo sinal do gene da apo B. A região do gene da apo B que codifica os aminoácidos -14 a -16 (Leu-Ala-Leu) é retirada no produto do alelo menor. Portanto, existem dois alelos na região que codifica o peptídeo sinal, com diferentes comprimentos: o alelo, que codifica o peptídeo maior de 27

aminoácidos, é chamado de *inserção (ins)* e o alelo que codifica o peptídeo menor de 24 aminoácidos, é chamado de *deleção (del)*. Pelo método de amplificação mais utilizado, o maior fragmento de DNA possui 93 pb e o menor 84 pb. A nomenclatura adotada neste trabalho foi aquela utilizada por RENGES *et al.* (1991) e SAHA *et al.* (1992b).

Utilizando-se a metodologia da PCR, essa diferença de nucleotídeos entre os dois alelos é detectada pela eletroforese do produto amplificado. Os genótipos encontrados são: *ins/ins*, *ins/del* ou *del/del*. As freqüências alélicas do peptídeo sinal do gene da apo B, em populações de diferentes grupos étnicos, de acordo com a literatura, encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Freqüências (%) dos alelos do peptídeo sinal do gene da apo B, em amostras de diferentes grupos étnicos, com e sem DAC, de acordo com a literatura.

Grupo étnico (País)	Peptídeo sinal apo B			
CAUCASÓIDES	<i>ins</i>	<i>del</i>	Grupo	Referência
França	0,655	0,345	DAC -	Visvikis <i>et al.</i> , 1990.
França	0,650	0,350	DAC -	Boerwinkle <i>et al.</i> , 1991.
Estados Unidos	0,660	0,340	DAC -	Hixson <i>et al.</i> , 1992.
Suécia	0,690	0,310	DAC -	Renges <i>et al.</i> , 1991.
Europa	0,680	0,320	DAC +	Turner <i>et al.</i> , 1995.
	0,680	0,320	DAC -	
Itália	0,796	0,204	DAC +	Corbo <i>et al.</i> , 1997.
	0,718	0,282	DAC -	
França	0,731	0,269	DAC +	Régis-Bailly <i>et al.</i> , 1996.
	0,654	0,346	DAC -	
Finlândia	0,700	0,300	DAC -	Pajukanta <i>et al.</i> , 1996.
Brasil	0,640	0,360	DAC +	Machado, 1997.
	0,670	0,330	DAC -	
Brasil	0,700	0,300	DAC +	Mansur, 1998.
	0,720	0,280	DAC -	
ASIÁTICOS				
Índia (descendentes)	0,880	0,120	DAC +	Renges <i>et al.</i> , 1991.
	0,800	0,200	DAC -	
China	0,771	0,229	DAC +	Saha <i>et al.</i> , 1992a.
	0,793	0,207	DAC -	
Malásia	0,900	0,100	DAC -	Gajra <i>et al.</i> , 1997.
NEGRÓIDES				
Estados Unidos	0,800	0,200	DAC -	Hixson <i>et al.</i> , 1992.

RENGES *et al.* (1991) encontraram diferença significativa ao comparar a distribuição da frequência do alelo *del* que encontraram em descendentes de indianos (0,20) com a de finlandeses (0,32; XU *et al.*, 1990b). Num trabalho seguinte (RENGES *et al.*, 1992) a mesma amostra de indivíduos também mostrou diferença significativa com a de caucasóides suecos (0,31).

SAHA *et al.* (1992a) não encontraram associação significativa de variação do peptídeo sinal do gene da apo B, com a DAC nos chineses. Entretanto, em outro trabalho (SAHA *et al.*, 1992b) encontraram uma associação positiva e significativa do alelo *del*, com os níveis séricos de LDL-C nos chineses saudáveis.

Outros estudos populacionais pesquisaram associações entre variações do peptídeo sinal com níveis de lípidos. HIXSON *et al.* (1992) constataram que o alelo *del* apresentava associação com níveis elevados de CT e de LDL-C, e com lesões arteriais aumentadas em negros norte-americanos, porém não em brancos. Em famílias de mexicanos residentes nos EUA, KAMMERER *et al.* (1996) também encontraram associação do alelo *del* com níveis altos de LDL-C.

HANSEN *et al.* (1993) encontraram influência do índice de massa corporal na associação entre os polimorfismos apo *Xba*I e inserção/deleção do peptídeo sinal com a variação dos níveis de CT e da apo B.

Vários estudos relataram associações entre variações da apo B e os níveis de TG (BERG, 1976, citado por BERG, 1986; LAW *et al.*, 1986b). Não é surpresa que variação no loco da apo B possa influenciar os níveis de TG, uma vez que a apo B é um componente estrutural da lipoproteína rica em TG (VLDL).

Uma significativa relação entre a variação no peptídeo sinal e os níveis de TG foi observada no estudo da Coreia do Norte (XU *et al.*, 1990b). Durante o período basal com alto teor de gordura e colesterol, o maior nível médio de TG foi observado nos portadores do genótipo *ins/ins* e o menor, no *del/del*, enquanto que em *ins/del* o nível foi intermediário. O efeito da variação genética foi significativo e explicou 6,7% da variação nos níveis de TG. Durante o período de ingestão da dieta com diminuição de gordura e colesterol, o efeito desapareceu, mas quando os participantes desse estudo voltaram à alimentação original de gordura e colesterol, o efeito reapareceu, explicando 7,2% da variação fenotípica (XU *et al.*, 1990a). Esse é um bom exemplo do efeito da variabilidade gênica, no qual um dado genótipo permite uma resposta à ingestão de gordura na dieta (BERG, 1983, citado por BERG, 1986; BERG, 1989), dependendo dos níveis desta. Fica clara, neste caso, a interação gene-ambiente.

2.4.4 Haplótipos do Gene da Apo B e Desequilíbrio de Ligação

O grau de informação da análise individual de polimorfismos pode ser melhorado consideravelmente pela da obtenção de haplótipos. O haplótipo consiste em um padrão definido de variações num determinado segmento de DNA de um dos cromossomos. Se dois marcadores genéticos encontram-se distantes apenas alguns milhares de pares de base, algumas de suas combinações podem ocorrer com frequência diferente da esperada pelo acaso, o que se constitui em desequilíbrio de ligação.

MYANT *et al.* (1989) sugerem que, devido ao provável sítio de ligação da apo B com o receptor da LDL ocorrer entre os aminoácido 3147 e 3381 (KNOTT *et al.*, 1986a; YANG *et al.*, 1986), codificados pelos nucleotídeos entre os sítios *Xba*I e *Eco*RI no gene da apo B, possa aparecer associação entre DAC e esses marcadores tomados em conjunto em algumas

populações, refletindo o desequilíbrio de ligação entre esses sítios e uma mutação na seqüência de reconhecimento do receptor, que afetaria o metabolismo da lipoproteína LDL.

DUNNING *et al.* (1992) comentam que a determinação de haplótipos no gene da apo B, com múltiplos marcadores, possivelmente ajudaria a definir mais especificamente os genótipos associados com DAC.

A tabela 4 apresenta as freqüências haplotípicas quanto a *XbaI/EcoRI* e *XbaI/peptídeo sinal*, em caucasóides e asiáticos, de acordo com a literatura.

Tabela 4 - Freqüências haplotípicas quanto a *XbaI/EcoRI* e *XbaI/peptídeo sinal* do gene da apo B, em caucasóides e asiáticos, de acordo com a literatura.

Grupo étnico (País)	Haplótipos <i>XbaI/EcoRI</i>				D	Grupo	Referência
	X-E+	X-E-	X+E+	X+E-			
CAUCASÓIDES							
EUA	0,340	0,140	0,510	0,000	-	DAC -	Monsalve <i>et al.</i> , 1988
Dinamarca	0,429	0,080	0,400	0,091	0,007	DAC -	Hansen <i>et al.</i> , 1993
Itália (Apulia)	0,359	0,208	0,370	0,027	-0,066	DAC -	Benedictis <i>et al.</i> , 1993
Itália (Calabria)	0,416	0,214	0,257	0,113	-0,008	DAC -	
Itália	0,470	0,150	0,337	0,043	-0,030	DAC -	Benedictis <i>et al.</i> , 1997
ASIÁTICOS							
China	0,450	0,430	0,000	0,120	-	DAC +	Myant <i>et al.</i> , 1989
	0,540	0,360	0,000	0,090	-	DAC -	
China	0,855	0,059	0,079	0,006	-	DAC -	Saha <i>et al.</i> , 1992a
	Haplótipos <i>XbaI/peptídeo sinal</i>						
CAUCASÓIDES	X-/ins	X-/del	+/ins	X+/del	D	Grupo	
Dinamarca	0,191	0,319	0,429	0,061	-0,125	DAC -	Hansen <i>et al.</i> , 1993

D : desequilíbrio de ligação

RENGES *et al.* (1991), em estudo com descendentes de indianos e europeus, sugerem haver uma variação genética no gene da apo B, em desequilíbrio de ligação com os sítios *XbaI/peptídeo sinal*, que contribui para a variação dos níveis de CT e HDL-C.

RENGES *et al.* (1992), analisando os haplótipos da amostragem pesquisada anteriormente (RENGES *et al.*, 1991), constituídos por variações no gene da apo B (*XbaI*,

EcoRI, peptídeo sinal e 3'VNTR), encontraram forte desequilíbrio de ligação entre 3'VNTR e cada um dos outros sítios e entre o sítio do peptídeo sinal e *XbaI*.

Os pesquisadores STEPANOV e PUZYREV (1994) também encontraram evidências de desequilíbrio de ligação entre *XbaI* e *EcoRI*.

PAJUKANTA *et al.* (1996) encontraram desequilíbrio de ligação significativo ($p < 0,0001$) entre peptídeo sinal /*XbaI*, com o alelo *del* associado ao X⁺ e o alelo *ins* associado ao X⁻.

2.4.5 Polimorfismo Apo B 3'VNTR

WYMAN e WHITE (1980) foram os primeiros a demonstrar que o genoma humano contém um grande número de segmentos polimórficos, mais tarde conhecidos como “variable number of tandem repeats” (VNTRs), porque os alelos nesses locos podem ser convencionalmente definidos pelo número de unidades de repetição de uma seqüência determinada.

TAUTZ e RENZ (1984) descreveram VNTRs caracterizados por seqüências com pequeno número de pares de base como unidade de repetição, chamando-os de “short tandem repeats” (STRs). Hoje, a variação na unidade de repetição *in tandem* das seqüências variando de 6 a 100 pares de base é geralmente caracterizada como VNTRs ou minissatélites, enquanto que os STRs ou microsatélites apresentam unidades de repetição variando de 2 a 5 pares de bases.

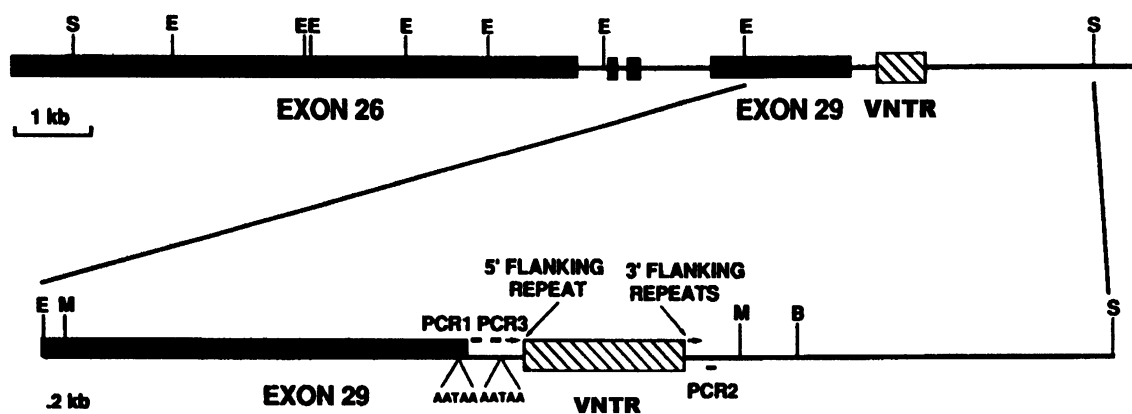


Figura 2 - Diagrama esquemático da estrutura do 3'VNTR próximo ao gene da apo B indicando o tamanho dos exons e introns. A escala superior mostra 13,5 kb de fragmento *SalI* (S) e 7 sítios de restrição *EcoRI*. A escala inferior indica uma parte do exon 29, a região hipervariável (VNTR) e regiões que a flanqueiam. Observam-se os locos de dois sinais de interrupção de transcrição (AATAA) e 3 oligonucleotídeos iniciadores de amplificação (PCR 1, 2 e 3). Também são mostrados os sítios de restrição *MspI* (M) e *BamHI* (B). Adaptado de Ludwig *et al* (1989).

Um exemplo desse tipo de variabilidade é representada por um VNTR ligado ao gene da apo B. A região hipervariável está localizada a menos de 100 bases da extremidade 3' do gene da apo B, no cromossomo 2 (KNOTT *et al.*, 1986b; HUANG e BRESLOW, 1987; LUDWIG *et al.*, 1989). O 3'VNTR ligado ao gene da apo B compreende uma seqüência de 14 a 16 pb que se repetem em número de 22 a 52 vezes, originando pelo menos 14 alelos (FRIELD *et al.*, 1990; LUDWIG *et al.*, 1989; LUDWIG e McCARTHY, 1990).

As freqüências alélicas quanto ao 3'VNTR ligado ao gene da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-, em amostras de diferentes grupos étnicos, de acordo com a literatura, encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Freqüências alélicas* do 3'VNTR ligado ao gene da apo B, nos grupos DAC + E DAC⁻, em diferentes grupos étnicos, de acordo com a literatura.

Grupo étnico (País)	Alelos							
CAUCASÓIDES	32	34	36	42	46	48	GRUPO	Referência
Europa	-	0,20	0,37	-	-	0,11	DAC +	Friedl <i>et al.</i> , 1990.
	-	0,25	0,38	-	-	-	DAC -	
Europa		0,25	0,38	-	-	-	DAC +	Turner <i>et al.</i> , 1995.
		0,23	0,39	-	-	-	DAC -	
Brasil	-	0,17	0,40	-	-	-	DAC -	Zago <i>et al.</i> , 1996.
NEGRÓIDES								
Brasil	-	0,14	0,28	0,18	-	-	DAC -	Zago <i>et al.</i> , 1996.
ASIÁTICOS								
Brasil	0,17	0,58	0,15	-	-	-	DAC -	Zago <i>et al.</i> , 1996.
AMERÍNDIOS								
Brasil	-	-	0,47	-	0,37	-	DAC -	Zago <i>et al.</i> , 1996.

* registradas apenas as acima de 10%.

As distribuições dos alelos desse 3'VNTR em duas populações brasileiras, branca e de descendentes de japoneses, relatadas por ZAGO *et al.* (1996) mostraram diferenças entre as raças. A distribuição é unimodal entre japoneses, com moda nos alelos 32-36, e bimodal nos brancos, concordando com os relatos anteriores de HIXSON *et al.* (1993) e RENGES *et al.* (1992).

Os diversos alelos desse minissatélite podem estar associados a variações de risco de DAC, em consequência de diferenças quantitativas ou qualitativas da apolipoproteína produzida pelo gene que está vizinho.

Os primeiros relatos baseados na digestão do DNA genômico por enzima de restrição, seguida por "Southern blot", sugeriam que fragmentos *MspI* grandes eram levemente mais comuns em pacientes com DAC, quando comparados com grupos controle (HEGELE *et al.*, 1986; GENEST *et al.*, 1990). Usando a metodologia da PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida para genotipagem, FRIELD *et al.* (1990) relataram uma associação positiva entre alelos do 3'VNTR grandes e DAC em indivíduos austríacos. Esses alelos também mostraram alguma correlação com os níveis da apo B sérica e de CT.

Esse VNTR tem sido relatado como fator determinante sobre os níveis plasmáticos de lípidos (HUMPHRIES, 1988) e em DAC (HEGELE *et al.*, 1986; MYANT *et al.*, 1989; RENGES *et al.*, 1992). Alelos com grande número de repetições foram encontrados com maior frequência em pacientes com DAC em amostras de caucasóides europeus e americanos (HEGELE *et al.*, 1986; FRIELD *et al.*, 1990).

Tentou-se confirmar esses dados em dois diferentes estudos populacionais. Um examinou homens finlandeses dislipidêmicos, participantes em levantamento de prevenção primária, com 67 pacientes sobreviventes de IM (Infarto do Miocárdio), 114 sem IM e 49 homens sadios (HELIÖ *et al.*, 1991). Entretanto, não houve correlação entre alelos do 3'VNTR e IM. O outro estudo comparou 187 pacientes com cateterismo positivo (DAC+), 121 controles com cateterismo normal e 79 indivíduos aparentemente sadios (HELIÖ *et al.*, 1992). Novamente não houve diferença significativa na distribuição de grandes alelos do 3'VNTR, ou qualquer outro alelo, entre o grupo de pacientes e os grupos controle, nem correlação de alelos específicos com níveis séricos de lípidos.

2.5 O GENE DA APO E

O gene da apo E foi seqüenciado (PAIK *et al.*, 1985), sendo mapeado (DAS *et al.*, 1985) no cromossomo 19q13.2. Sua estrutura consiste de quatro exons, com muitas das seqüências codificadoras da proteína contidas no exon 4. No homem, o gene da apo E tem 3 alelos polimórficos. Os três alelos E2, E3 e E4 codificam as 3 isoformas da apo E: E2, E3 e E4 (UTERMANN *et al.*, 1977; UTERMANN *et al.*, 1979; ZANNIS e BRESLOW, 1981), responsáveis por seis genótipos (E 2/2, E 2/3, E 2/4, E 3/3, E 3/4 e E 4/4). Os produtos

protéicos desses três alelos diferem em um ou dois aminoácidos, quando se consideram os resíduos 112 e 158 (WEISGRABER *et al.*, 1981), na molécula de apo E, que contém 299 aminoácidos. A apo E3 tem Cys no sítio 112 e Arg no sítio 158, enquanto que a apo E2 tem Cys e a E4 tem Arg em ambos os sítios. Além dos alelos comuns, mutações raras nesse gene têm sido relatadas (ZANNIS, 1986; WARDELL *et al.*, 1987). A apo E também apresenta variações secundárias, resultantes de diferentes quantidades de ácido siálico, adquiridas pós-tradução (ZANNIS *et al.*, 1981 ; JAIN e QUARFORDT, 1979).

2.6 VARIABILIDADE DO GENE DA APO E

Os alelos da apo E podem ser genotipados pela isoeletrofocalização (UTERMANN *et al.*, 1979; ZANNIS *et al.*, 1981) ou pela metodologia da PCR com a utilização de enzima de restrição específica (HIXSON e VERNIER, 1990). Esse procedimento se baseia na amplificação de uma região do gene apo E, que compreende a seqüência codificadora dos aminoácidos 91 até 165 da proteína apo E madura. Um oligonucleotídeo é utilizado como iniciador para amplificar o DNA que contenha as posições 112 e 158, referentes aos aminoácidos que caracterizam as variações. A clivagem do DNA é realizada com *HhaI* e os produtos são separados em gel de poliacrilamida sob condições não desnaturantes. O reconhecimento ou não da seqüência GCG'C pela *HhaI* proporciona diferentes tamanhos de fragmentos, resultantes da digestão, permitindo que os indivíduos sejam genotipados pelas possíveis combinações (comprimento dos fragmentos de restrição em pares de base - bp):

E4 = 16 , 18 , 19 , 35 , 38 , 48 e 72;

E3 = 16 , 18 , 35 , 38 , 48 e 91;

E2 = 16 , 18 , 38 , 83 e 91.

As freqüências desses três alelos, em indivíduos de grupos controle e com DAC, em diferentes grupos étnicos, de acordo com a literatura, são mostradas na tabela 6.

Tabela 6 - Freqüências (%) dos alelos da apo E em indivíduos controle e com DAC, em diferentes grupos étnicos, de acordo com a literatura.

CAUCASÓIDES	Apo E			Grupo	Referência
	E2	E3	E4		
Alemanha	0,089	0,790	0,121	DAC +	Utermann <i>et al.</i> , 1984.
	0,077	0,773	0,150	DAC -	
França	0,130	0,742	0,128	DAC -	Boerwinkle <i>et al.</i> , 1987.
Finlândia	0,041	0,733	0,227	DAC -	Ehnholm <i>et al.</i> , 1986.
Finlândia	0,034	0,676	0,293	DAC +	Nieminen <i>et al.</i> , 1992.
	0,076	0,750	0,174	DAC -	
Estados Unidos	0,060	0,780	0,160	DAC +	Marshall <i>et al.</i> , 1994.
	0,070	0,760	0,170	DAC -	
França	0,064	0,767	0,169	DAC +	Régis-Bailly <i>et al.</i> , 1996.
	0,070	0,823	0,107	DAC -	
Itália	0,056	0,898	0,046	DAC +	Corbo <i>et al.</i> , 1997.
	0,059	0,836	0,105	DAC -	
Estados Unidos	0,083	0,779	0,138	DAC -	Pasagian-Macaulay <i>et al.</i> , 1997.
Canadá	0,050	0,820	0,130	DAC -	Hegele <i>et al.</i> , 1997.
Nova Guiné	0,146	0,486	0,368	DAC -	Kamboh <i>et al.</i> , 1990.
Brasil	0,080	0,770	0,150	DAC +	Mansur, 1998.
	0,030	0,790	0,180	DAC -	
ORIENTAIS					
China	0,074	0,844	0,082	DAC -	Evans <i>et al.</i> , 1993.
China	0,076	0,875	0,049	DAC -	Kao <i>et al.</i> , 1995.
Japão	0,081	0,849	0,067	DAC -	Utermann, 1987.
NEGRÓIDES					
Estados Unidos	0,034	0,706	0,260	DAC -	Kamboh <i>et al.</i> , 1990.
África do Sul	0,077	0,553	0,370	DAC -	Sandholzer <i>et al.</i> , 1995.
AMERÍNDIOS					
Estados Unidos	-	0,816	0,184	DAC -	Asakawa <i>et al.</i> , 1985.
Brasil (Amazônia)	-	0,831	0,169	DAC -	Marin <i>et al.</i> , 1998.
ESQUIMÓS					
Alasca	0,020	0,787	0,193	DAC -	Scheer <i>et al.</i> , 1995.

A apo E liga-se aos lípidos, à heparina e aos receptores das lipoproteínas. Portanto, a apo E deve estar ligada na superfície da partícula de lipoproteína para ser capaz de entregar a

lipoproteína ao receptor, deve ligar-se às HSPG (*heparan sulfate proteoglicans*-moléculas semelhantes à heparina) para que o receptor LRP exerça sua função, e deve interagir com o receptor para a lipoproteína ser capturada (MAHLEY *et al.*, 1988; MAHLEY e JI, 1999; MAHLEY e HUANG, 1999).

A apo E tem maior afinidade pelo receptor da LDL que a própria LDL através da apo B (INNERARITY e MAHLEY, 1978). A importância fisiológica da interação da apo E com o receptor de LDL foi demonstrada pela doença genética Hiperlipoproteinemia do tipo III (classificação de Fredrickson), devido a sua associação com a isoforma E2 (MAHLEY e RALL, 1995, citado por MAHLEY e HUANG, 1999). Ficou demonstrado que a substituição de um aminoácido é a responsável pela ligação eficiente ou não, no receptor específico (RALL *et al.*, 1982).

Estudos da estrutura molecular e atividade biológica da apo E forneceram subsídios para o entendimento do papel funcional que distingue as isoformas. A apo E tem dois domínios estruturais, 2/3 amino terminais da molécula e 1/3 carboxi terminal, que são unidos por uma região em dobradiça (WEISGRABER, 1994, citado por MAHLEY e HUANG, 1999). O domínio amino terminal é composto por 4 feixes em hélices e contém os sítios de ligação com o receptor e com a heparina. O domínio carboxi terminal contém a região de ligação com os lípidos.

A região crítica que determina a ligação da apo E aos lípidos e lipoproteínas localiza-se entre os aminoácidos 244 e 272. Também há uma interação entre a Arg-61 e a Glu-255. Os resíduos de aminoácidos básicos (136, 140, 142, 143, 145, 146, 147 e 150) são importantes para a interação com a heparina e com o receptor. Portanto, variantes com mutações, que afetam essas regiões, influenciarão no modo de captação das partículas pelos dois tipos de receptores, LDL e LRP.

A apo E3, considerada a isoforma normal, possui Arg-158 e a apo E2 possui Cys-158. Essa substituição prejudica a ligação com o receptor LDL e secundariamente altera a conformação da região de ligação ao receptor envolvendo os aminoácidos 136-150. Na apo E3, a Arg-158 forma uma ponte salina com Asp-154. Na apo E2, entretanto, Asp-154 forma uma ponte salina com Arg-150. A lateral na cadeia da Arg-150, a qual é parte da região de ligação ao receptor, é realocada dentro de um plano diferente, alterando o tamanho e a orientação da região de ligação ao receptor, interrompendo a ligação ao receptor (LALAZAR *et al.*, 1988). Os 4 feixes em hélices, que caracterizam o domínio amino terminal, não diferem significativamente entre as três isoformas, exceto no ambiente local do resíduo 112 (Figura 3). A apo E3 possui Cys-112 e a cadeia lateral da Arg-61 parece esconder-se entre as hélices 2 e 3. Na apo E2, a qual também possui Cys-112, a Arg-61 ocorre em orientação similar. No entanto, a apo E4 tem Arg-112 que forma ponte salina com Glu-109, que reorienta a cadeia lateral da Arg-61 e a expõe mais na superfície da molécula (MAHLEY e HUANG, 1999). Como resultado dessa modificação na apo E4, a Arg-61 está mais disponível para interagir com Glu-255 no domínio carboxi terminal e altera profundamente a conformação da proteína, distinguindo-a das apos E2 e E3. A interação desses domínios é influenciada por essas diferenças, distinguindo as isoformas com respeito ao metabolismo dos lípidos.

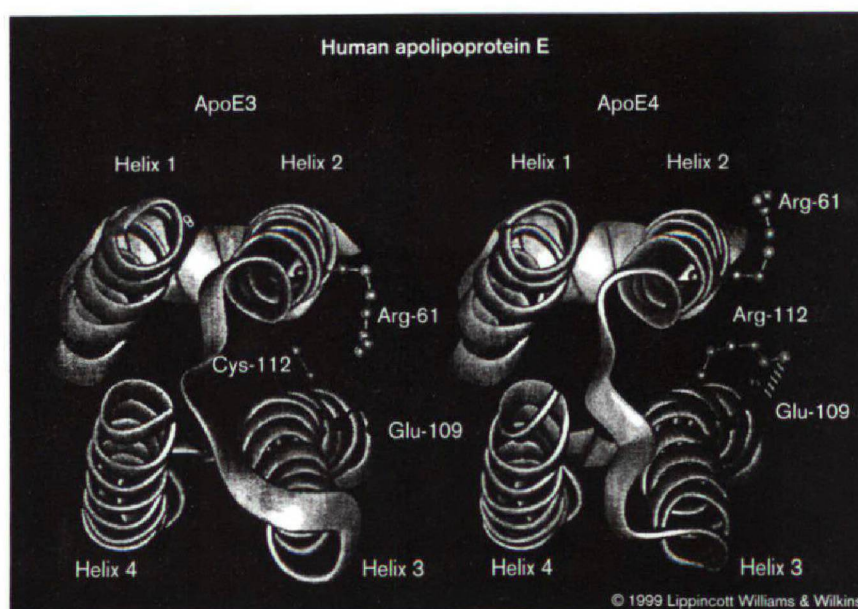


Figura 3 - **Modelo da estrutura tridimensional dos domínios aminoterminais das apos E3 e E4**, por cristalografia com raio X. (publicado por Karl H. Weisgraber, Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, São Francisco, USA; retirado de MAHLEY e HUANG, 1999).

Numerosos estudos mostraram influência da variação do gene da apo E nos níveis plasmáticos dos lípides. Embora a distribuição das freqüências alélicas da apo E seja heterogênea entre as populações, o efeito desse gene é relativamente consistente: em média o efeito do alelo E2 é diminuir os níveis de colesterol no plasma e do alelo E4 é aumentá-lo (UTERMANN *et al.*, 1979).

Baseando-se nos resultados de vários estudos epidemiológicos, uma associação entre genótipos de apo E e prevalência de DAC foi relatada por MENZEL *et al.* (1983). Em vários estudos, pacientes com DAC (ETO *et al.*, 1988; DAVIGNON *et al.*, 1988; EICHNER *et al.*, 1993) apresentaram uma freqüência do alelo E4 aumentada, em relação ao grupo controle; em contraste o alelo E2 era o menos freqüente nesse mesmo grupo com DAC.

Comprovou-se que 95% dos pacientes com Hiperlipidemia tipo III (Disbetalipoproteinemia familiar) apresentavam fenótipo E 2/2. No entanto, somente 5% dos

indivíduos E 2/2 na população geral desenvolvem a Hiperlipidemia tipo III. Aparentemente a manifestação dessa doença requer outros fatores adicionais tais como: hiperlipidemia familiar combinada, hipercolesterolemia familiar, diabete melito, hipotireoidismo, obesidade, deficiência de estrógenos, dieta com alto teor em gordura ou uso de certas drogas (FREDRICKSON, 1975; MAHLEY e RALL, 1995, citado por MAHLEY e HUANG, 1999). As freqüências de Hiperlipidemia tipo III encontradas na população geral variou de 0,01% a 0,10%.

Estudando famílias, BOERWINKLE e SING (1987) estimaram que a variação do gene da apo E foi responsável por 12,5 % do total da variância poligênica nos níveis de CT. Em seguida, BOERWINKLE e UTERMANN (1988) verificaram que o efeito da variação desse loco sobre os níveis plasmáticos da apo E foi o oposto do observado em relação aos níveis do CT. Com base nesses e em outros resultados, formularam um modelo para explicar o efeito do gene da apo E no metabolismo lipídico e prognosticaram que esse efeito difere entre as populações, pela diferença na ingesta de gordura na dieta. De acordo com esse modelo, diferenças entre os alelos na ligação com o receptor, retirada de quilomícrons e subsequente regulação do receptor da LDL, são responsáveis pelos efeitos observados nos níveis de CT e risco para DAC.

Um estudo de DALLONGEVILLE *et al.* (1992), que incluiu amostras de 45 populações de 17 países, analisou a relação entre os genótipos da apo E e os níveis plasmáticos de CT, TG e HDL-C. Os indivíduos com genótipo E 4/3 e E 4/4 apresentaram os níveis de CT aumentados em relação aos indivíduos E 3/2 e E 2/2. Um grande número de pesquisadores encontrou dados similares, em relação ao efeito dos genótipos da apo E sobre o CT e a LDL-C (SING e DAVIGNON, 1985; ETO *et al.*, 1988; EICHNER *et al.*, 1990; XHIGNESSE *et al.*, 1991; XU *et al.*, 1991; HALLMAN *et al.*, 1991).

2.7 O GENE DA ECA

O gene da enzima conversora da angiotensina I (ECA) foi clonado (SOUBRIER *et al.*, 1988), está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q23), e sua estrutura apresenta dois domínios altamente homólogos e funcionais, sugerindo que ele é resultante de uma duplicação gênica.

2.8 VARIABILIDADE DO GENE DA ECA

Estudos a respeito do gene da ECA (RIGAT *et al.*, 1992; TIRET *et al.*, 1992) mostraram um polimorfismo no íntron 16, relativo a uma inserção de 287 pares de bases de uma seqüência Alu, caracterizando dois alelos: o alelo I correspondendo à presença da inserção e o alelo D, à sua ausência, resultando em três genótipos (DD, II e ID). As freqüências dos alelos, em indivíduos controle e com DAC, em caucasóides e orientais, de acordo com a literatura, são mostradas na tabela 7.

Os níveis da enzima ECA na circulação estão associados com a variação do gene da ECA (RIGAT *et al.*, 1990; LINDPAINNER *et al.*, 1995). Os indivíduos homozigotos para o alelo D têm, em média, níveis séricos da ECA duas vezes maiores que os indivíduos homozigotos para o alelo I, sendo que os heterozigotos (ID) têm níveis séricos intermediários (RIGAT *et al.*, 1990).

A ECA circula no plasma e está presente na superfície das células endoteliais. Tem papel fundamental na homeostase da pressão sangüínea, hidrolisando a angiotensina I em angiotensina II. A angiotensina I é um peptídeo inativo, liberado após clivagem do angiotensinogênio pela ação da renina.

Tabela 7 - Frequências (%) dos alelos do gene da ECA, em amostras de caucasóides e orientais, com e sem DAC, de acordo com a literatura.

Grupo étnico (País) CAUCASÓIDES	ECA		Grupo	Referência
	I	D		
França	0,406	0,594	DAC -	Rigat <i>et al.</i> , 1990.
Irlanda	0,470	0,530	DAC +	Cambien <i>et al.</i> , 1992.
	0,500	0,500	DAC -	
França	0,460	0,540	DAC +	Cambien <i>et al.</i> , 1992.
	0,330	0,670	DAC -	
Noruega (homens)	0,520	0,480	DAC +	Bohn <i>et al.</i> , 1993b.
	0,430	0,570	DAC -	
EUA	0,425	0,575	DAC +	Lindpaintner <i>et al.</i> , 1995.
	0,445	0,555	DAC -	
Inglaterra	0,396	0,604	DAC +	Mattu <i>et al.</i> , 1995.
	0,422	0,578	DAC -	
Brasil	0,420	0,580	DAC +	Mansur, 1998.
	0,390	0,610	DAC -	
ORIENTAIS				
Japão	0,580	0,420	DAC +	Oike <i>et al.</i> , 1995.
	0,640	0,360	DAC -	
Coréia	0,660	0,440	DAC +	Hong <i>et al.</i> , 1997.
	0,580	0,420	DAC -	

A angiotensina II é um potente vasoconstritor e pode aumentar o crescimento da musculatura lisa nos vasos, particularmente após lesão endotelial (WIEMER *et al.*, 1991; KATO *et al.*, 1991; DAEMAN *et al.*, 1991). Inibidores da ECA impedem essa proliferação após dano vascular (POWELL *et al.*, 1989). A ECA também inativa a bradicinina, portanto, inibidores da ECA ao mesmo tempo diminuem os níveis de angiotensina II e aumentam os níveis de bradicinina. A bradicinina é um vasodilatador, que inibe a proliferação das células musculares lisas, podendo estimular a liberação de vasodilatadores endoteliais, incluindo o óxido nítrico e as prostaciclina (FARHY *et al.*, 1992; PELC *et al.*, 1991). O tratamento da hipertensão com inibidores da ECA leva a uma maior regressão da hipertrofia ventricular esquerda do que se atribui à redução da pressão arterial sozinha (DAHLOF e HANSSON, 1992).

Níveis teciduais (JAN DANSER *et al.*, 1995) e circulantes de atividade da ECA estão sob forte controle genético (TIRET *et al.*, 1992). Variações na pressão sanguínea, como a hipertensão, são influenciadas por fatores genéticos e ambientais. A hipertensão tem sido considerada um dos principais fatores de risco para DAC (TRUETT *et al.*, 1967).

Em alguns estudos, as médias da pressão sanguínea não apresentaram diferenças entre os genótipos da variação da ECA (SOUBRIER *et al.*, 1990; JEUNEMAITRE *et al.*, 1992; AALTO-SETÄLÄ *et al.*, 1998). Em recente trabalho, discordando dos anteriores, O'DONNELL *et al.* (1998) encontraram evidências de associação do loco da ECA com a hipertensão e pressão sanguínea diastólica em homens, mas não em mulheres. A associação positiva da hipertensão foi com o genótipo DD e ID e da pressão sanguínea diastólica com o genótipo DD. Defendem a hipótese de que o gene da ECA ou outro gene a ele ligado, é um gene sexo-específico candidato ao condicionamento da hipertensão.

A variabilidade no gene que codifica a ECA foi correlacionada com risco para DAC por CAMBIEN *et al.* (1992), ao mostrarem que o genótipo DD era mais freqüente em indivíduos com IAM, considerados de baixo risco pelos critérios comuns, do que em seus controles. Vários estudos surgiram com o mesmo interesse, sendo que alguns confirmaram a associação do alelo D com DAC (MATTU *et al.*, 1995; OIKE *et al.*, 1995), e outros discordaram (LINDPAINTNER *et al.*, 1995; HONG *et al.*, 1997).

Uma importante distorção, provocada pela metodologia antiga da genotipagem (RIGAT *et al.*, 1992; SCHMIDT *et al.*, 1993), segundo a qual os genótipos DD foram superestimados, pode justificar algumas das correlações do alelo D com DAC, conforme SINGER *et al.* (1996).

Mais tarde, essa metodologia foi modificada por SHANMUGAM *et al.*, (1993), os quais observaram que, ao repetir a amplificação pelo método da PCR, em condições levemente diferentes, alguns indivíduos antes caracterizados como de genótipo DD, amplificavam como

ID. Chegaram à conclusão de que ocorre uma amplificação preferencial do alelo D em relação ao alelo I, no heterozigoto. Sugeriu-se realizar uma nova amplificação, incluindo dois novos iniciadores, com inserção específica (hace 5a e hace 5c), para cada genótipo DD encontrado. A reação produz um produto amplificado de 335 bp, somente na presença do alelo I (ID e II) conforme descrito por LINDPAINTNER *et al.* (1995).

2.9 O GENE DO FATOR V.

O loco do gene do fator V da coagulação (F5) foi mapeado no cromossomo 1 (1q21-25) por WANG *et al.* (1988), citado por BERTINA *et al.*, (1994). Alguns pesquisadores verificaram uma mutação de ponto no exon 10 desse gene (BERTINA *et al.*, 1994). Ocorre uma substituição do nucleotídeo Guanina (G) pela Adenina (A) na posição 1691 e, conseqüentemente, a troca do aminoácido Arg da posição 506 (CGA) pelo aminoácido Gln (CAA). Essa mutação é denominada FV de Leiden (FVL) ou FV Q506. Essas variações no exon 10 são detectadas após amplificação do DNA genômico e digestão com a enzima *MnII*. Obtém-se fragmentos de 37, 82 e 104 bp para o alelo 1691G e fragmentos de 82 e 141 bp para o alelo 1691A (RIDKER *et al.*, 1995).

2.10 VARIABILIDADE DO GENE DO FATOR V

A variação polimórfica FVL foi associada com a resistência à proteína C ativada (APC), por DAHLBACK *et al.* (1993) e BERTINA *et al.* (1994), sendo considerada a mais prevalente causa genética de trombose venosa (RIDKER *et al.*, 1995), ocorrendo de 20 a 60 % dos pacientes com trombofilia. Recentemente foi descrita uma associação entre FVL e predisposição aumentada para DAC prematura em mulheres (ROSENDAAL *et al.*, 1997).

As freqüências alélicas do gene do fator V, em caucasóides e ameríndios, de acordo com a literatura, encontram-se na tabela 8.

Um trabalho desenvolvido no Brasil por FRANCO *et al.* (1999) avaliou a prevalência da mutação FVL em 4 grupos étnicos: 152 caucasóides, 97 negros africanos, 40 asiáticos (descendentes de japoneses) e 151 ameríndios. Não foi observada variação nos africanos e asiáticos.

A freqüência do alelo A (FVL) é heterogênea em diferentes populações humanas, contribuindo para diferenças étnicas e geográficas na prevalência de doenças trombóticas e cardiovasculares.

Tabela 8 - Freqüências (%) dos alelos do gene do fator V, em caucasóides e ameríndios, com e sem DAC, de acordo com a literatura.

Grupo étnico (País)	Alelos		Grupo	Referência
	G	A*		
CAUCASÓIDES				
EUA	0,970	0,030	DAC -	Ridker <i>et al.</i> , 1995.
Alemanha	0,909	0,091	DAC +	Prohaska <i>et al.</i> , 1995.
	0,905	0,095	DAC -	
Alemanha	0,890	0,110	DAC +	März <i>et al.</i> , 1995.
	0,920	0,080	DAC -	
Austrália	0,950	0,050	DAC +	Van Bockxmeer <i>et al.</i> , 1995.
	0,960	0,040	DAC -	
Brasil	0,987	0,013	DAC -	Franco <i>et al.</i> , 1999.
AMERÍNDIOS				
Brasil	0,997	0,003	DAC -	Franco <i>et al.</i> , 1999.

* A = FVL.

3 OBJETIVOS

3.1 Verificar se há diferenças entre um grupo de indivíduos com a doença arterial coronariana (DAC+) e o grupo controle (DAC-), quanto aos parâmetros bioquímicos que avaliam o metabolismo lipídico.

3.2 Verificar as frequências alélicas, haplotípicas e genótípicas dos genes ou marcadores das apolipoproteínas B e E, da enzima conversora da angiotensina I (ECA) e do fator V da coagulação, correlacionando-as com a DAC.

3.3 Procurar identificar haplótipos e genótipos que sirvam como marcadores positivos ou negativos da probabilidade de desenvolvimento da DAC em adultos jovens.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE PACIENTES

Foram selecionados pacientes com doença arterial coronariana (DAC+) pertencentes ao banco de dados da disciplina de Cardiologia, diagnosticados no máximo há dois anos antes desse estudo e com idade inferior a 56 anos. O resultado do teste de cineangiocoronariografia no Serviço de Hemodinâmica do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - Ribeirão Preto (SP) foi confirmado pelo cardiologista responsável. O grupo DAC+ foi constituído de 116 pacientes (92 homens e 24 mulheres) com síndromes isquêmicas agudas: infarto agudo do miocárdio com angina instável e infarto com coronárias afetadas ou normais.

O grupo controle (DAC-) foi constituído de 78 pacientes (26 homens e 52 mulheres), com idade inferior a 56 anos, que foram submetidos a cineangiocoronariografia por motivos de cardiopatia congênita não cianogênica ou de valvulopatias, e que apresentaram coronárias normais nestes exames.

4.2 MÉTODOS LABORATORIAIS

4.2.1 Análise dos lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas

Foram coletados 10 mL de sangue total sem anticoagulante, após 12 h de jejum. O soro foi separado do coágulo para a determinação dos lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas. Os níveis de Colesterol total (CT) e Triglicérides (TG) foram obtidos utilizando-se reações enzimáticas (Roche) em aparelho automatizado Cobas Mira S (Roche

Diagnostic Systems). O nível de HDL-Colesterol (HDL-C) foi dosado no sobrenadante, após precipitação do soro com fosfotungstato-MgCl₂ (Roche), pela mesma reação utilizada na determinação do colesterol total. O teor de LDL-C foi estimado pela fórmula de Friedewald: $LDL-C = CT - [HDL-C + (TG/5)]$, segundo FRIEDEWALD *et al.*, 1972, desde que TG inferior a 400 mg/dL. Todas as análises bioquímicas acima descritas foram realizadas no Laboratório de Nutrição do Hospital de Clínicas da USP-RP. As quantificações séricas das apolipoproteínas e da lipoproteína Lp(a) foram realizadas pelo método de imunonefelometria (Nephelometer Behring), no Laboratório Behring de Ribeirão Preto.

4.2.2 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos com o kit “Super Quick Gene” (Analytical Genetic Testing Center, Inc.). Foram coletados 10 mL de sangue total com o anticoagulante EDTA (1 mg/dL) pelo sistema de coleta a vácuo. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 20 minutos, o plasma foi removido e a fração contendo os leucócitos foi transferida para outro tubo plástico cônico com tampa e esterilizado. Inicialmente adicionou-se a solução de lise de eritrócitos (diluída 1mL em 10mL de água esterilizada) e o tubo permaneceu sob agitação leve durante 15 minutos. Em seguida foi centrifugado a 2500 rpm, durante 20 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e acrescentados mais 3 mL de solução de lise de eritrócitos com posterior eliminação total, escorrendo o tubo em gaze. Adicionaram-se então 1,5 mL da solução tampão de lise de leucócito, agitando-se até desfazer o *pellet*, deixando 30 minutos em banho-maria (BM) a 55°C. Foram adicionados 100 µL de SDS (duodecil sulfato de sódio) e 500 µL de solução precipitante de proteína, seguindo-se forte agitação de 30 segundos, permanecendo 15 minutos em BM a 55°C. Os

tubos foram centrifugados durante 20 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo onde foram acrescentados de 2 volumes de álcool etílico P.A. Misturou-se suavemente para que o DNA fosse precipitado e, com uma pipeta Pasteur de vidro esterilizada, o DNA foi retirado e colocado em tubo tipo *ependorf* limpo e numerado. O excesso de álcool etílico foi retirado, sendo acrescentada água milliQ (Millipore), cerca de 200 a 500 μL , proporcional ao teor de DNA. O tubo permaneceu durante uma noite em geladeira e no dia seguinte foi homogeneizado sob agitação.

Procedeu-se a quantificação do DNA, diluindo-se 5 μL da solução homogeneizada em 1000 μL de água milliQ, em espectrofotômetro com um comprimento de onda UV de 260 nm, usando-se cubeta de quartzo e zerando-se o aparelho com água milliQ. A densidade ótica, obtida em cada leitura das amostras, foi anotada para calcular qual a diluição a ser realizada em cada amostra para atingir a concentração final de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.2.3 Análise da variabilidade do DNA

As variações do DNA foram analisadas de acordo com procedimentos descritos na literatura, seguindo-se os protocolos: Apo B-VNTR, Apo B-*Xba*I; Apo B-*Eco*RI e Apo B-*ins/del* peptídeo sinal (RENGES *et al.*, 1992); Apo E (HIXSON *et al.*, 1990); ECA-INS/DEL (SCHMIDT *et al.*, 1993) e ECA-INS (LINDPAINTNER *et al.*, 1995); exon 10 do gene do Fator V (RIDKER *et al.*, 1995).

4.2.3.1 Preparo dos Reagentes

O preparo dos reagentes e aqueles que foram adquiridos e utilizados serão descritos a seguir.

1) Preparo da solução tampão TEB 10X:

Ácido bórico	55 g/L
TRIS	108 g/L
EDTA dissódico	9,3 g/L (pH = 7,8)

Solução 1X: diluição 1:10 (100ml de tampão TEB 10X completa para 1000ml de água).

2) Preparo da agarose 1,5%

1,5 g de agarose diluída em 100 mL de tampão TEB 1X.

3) Preparo do gel de acrilamida

Prepara-se a solução concentrada de acrilamida (40%) para ser utilizada no preparo do gel, de acordo com a concentração desejada (4%, 6% ou 8%).

Acrilamida 40%:

Acrilamida	38 g
Bis-acrilamida	2 g

Diluir em 100 ml de água milliQ, filtrar e guardar em geladeira.

Poliacrilamida a 4%		Poliacrilamida a 6%		Poliacrilamida a 8%	
Água destilada	32 mL	Água destilada	30 mL	Água destilada	28 mL
TEB 10X	4 mL	TEB 10X	4 mL	TEB 10X	4 mL
Acrilamida 40%	4 mL	Acrilamida 40%	6 mL	Acrilamida 40%	8 mL
Persulfato de amônio 220 µL		Persulfato de Amônio 220 µL		Persulfato de Amônio 220 µL	
TEMED	22 µL	TEMED	22 µL	TEMED	22 µL

TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina; T-8133 Sigma).

Persulfato de amônio 0,25%.

VNTR = Acrilamida 4%-uréia 7 M.

4) Preparo dos corantes

- Ficoll 15%: 15g Ficoll em 100 mL de água milliQ.

- Azul de bromofenol (BF) 0,25% (250 mg de corante) + Ficoll 15%.

- Xileno Cianol (XC) 0,25% (250 mg de corante) + Ficoll 15%.

Os corantes foram preparados fazendo-se primeiro a solução de Ficoll em água (15g para 100 ml de água). Em seguida pesam-se 250 mg do XC ou 250 mg de BF para 100 ml da solução de Ficoll.

- Formamida: solução de Formamida 95% em água milliQ + 20mM EDTA (pH 8,0)
+ 0,05 mg/mL de Xileno Cianol FF + 0,05 mg/mL de Azul de Bromofenol.

5) Preparo da revelação para os fragmentos de VNTR

- a) Fixador – em agitador 25 minutos (100 mL de etanol + 5 mL de ácido acético e 900 mL de água destilada).
- b) Solução de prata – em agitador 25 minutos (0,2 g de prata para 150 ml de água destilada).
- c) Água destilada - em agitador 2 minutos.
- d) Revelador - em agitador até aparecerem fragmentos (30g de hidróxido de sódio, 3 mL de formaldeído em 1L de água destilada).

6) Tampão 10X para reação da PCR: 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1mg/mL de Albumina bovina (BSA DNA free - Pharmacia Biotech 2781501).

7) Tampão OPA 10X: 100 mM Tris-acetato (pH 7,5), 100 mM acetato de magnésio, 500 mM acetato de potássio. Diluir 1X para utilizar no processo de digestão.

8) Tampão NE2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT em pH 7,9, acrescidos de 100 µg/mL de albumina bovina (BSA, Biolabs).

4.2.3.2 Amplificação do DNA

A metodologia da PCR foi utilizada para amplificar os segmentos desejados. Os oligonucleotídeos empregados como iniciadores foram produzidos em um sintetizador (Applied Biosystems 391 DNA Synthesizer), ou foram adquiridos da GIBCO BRL, e as suas seqüências encontram-se na tabela 9.

Tabela 9 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na metodologia da PCR.

VARIÁVEL		INICIADORES	Referência
Apo B-VNTR	5'	5'ATGGAAACGGAGAAATTATG 3'	Renges <i>et al</i> , 1992.
	3'	5'CCTTCTCACTTGGCAAATAC 3'	
Apo B- <i>Xba</i> I	5'	5'GGAGACTATTCAGAAGCTAA 3'	Renges <i>et al</i> , 1992
	3'	5'GAAGAGCCTGAAGACTGACT 3'	
Apo B- <i>Eco</i> RI	5'	5'CTGAGAGAAGTGTCTTCGAAG 3'	Renges <i>et al</i> , 1992.
	3'	5'CTCGAAAGGAAGTGTAATCAC 3'	
Apo B- <i>ins/del</i>	5'	5'CAGCTGGCGATGGACCCGCCGA 3'	Renges <i>et al</i> , 1992
	3'	5'ACCGGCCCTGGCGCCCGCCAGCA 3	
Apo E	5'	5'ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC 3'	Hixson e Vernier, 1990
	3'	5'TAAGCTT GGCACGGCTGTCCAAGGA 3'	
ECA-INS/DEL	5'	5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3'	Schmidt <i>et al</i> , 1993.
	3'	5'ATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT 3'	
ECA-INS	5'	5'TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC 3'	Lindpaintner <i>et al</i> , 1995.
	3'	5'TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA 3'	
Fator V	5'	5'ACCCACAGAAAATGATGCCAG 3'	Ridker <i>et al</i> , 1995
	3'	5'TGCCCCATTATTTAGCCAGGAG 3'	

Todas as amplificações do DNA genômico foram realizadas com base no método descrito por SAIKI *et al* (1988), adaptado para uma mistura de reação com volume final de 25 μ L. Para cada reação preparamos uma mistura contendo:

- 2,5 μ L de Tampão de PCR para 25 μ L de volume final de reação.
- 5,0 μ L de Iniciadores (2,5 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador - tabela 9). O iniciador liofilizado é diluído em 1000 μ L de água milliQ, homogeneizado, e retiram-se 10 μ L para serem

diluídos em 990 μL de água milliQ. Em seguida faz-se a leitura no espectrofotômetro em 260 nm, e a D. O. obtida é multiplicada por 100 (diluição) e por 33 (concentração de DNA em 1 μL), obtendo-se a quantidade de DNA em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esse resultado é multiplicado por 1000 e dividido pelo PM do oligonucleotídeo, o que resulta em x μM em 1000 μL . Como trabalhamos com 2,5 μM , retira-se o volume correspondente para essa concentração.

- 2,0 μL de dNTP (10 μL de cada dNTP diluídos em 960 μL de água milliQ, sendo a concentração final do volume pipetado de 200 μM de cada nucleotídeo).
- 0,2 μL de Taq DNA polimerase (frasco com 5 U/ μL - Pharmacia Biotech, e utilizamos 1U para cada reação).
- Água milliQ para completar o volume final de 25 μL .

O DNA genômico de cada paciente foi acrescido a essa mistura na concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA e homogeneizado em tubo tipo *eppendorf*. As reações foram conduzidas em um equipamento automatizado Perkin Elmer/GeneAmp PCR System 2400.

As amplificações foram realizadas em ciclos programados de acordo com os protocolos descritos na tabela 10. Todos foram submetidos inicialmente a uma pré-PCR a 94^o C por 5 minutos, extensão final a 72^o C por 7 minutos e resfriamento a 4^o C para interromper a reação.

Após o término do processo de amplificação, a ocorrência ou não de amplificação foi avaliada em gel de agarose a 1%, em um sistema de eletroforese horizontal. O gel foi preparado com 1 g de agarose em tampão TEB 1X, a agarose foi aquecida em um forno de microondas, durante aproximadamente 1 minuto para solubilização. Após resfriamento parcial do gel, adicionaram-se 3 μL de brometo de etídio 1,5% (1,5 g de brometo de etídio em água milliQ), depositou-se o gel em um suporte de acrílico para eletroforese. Solidificado o gel, aplicaram-se

as amostras: 5 μ L de produto da PCR misturado com 3 μ L do corante (15g de Ficoll; 100 ml de água milliQ em 250 mg Xileno Cianol ou 250 mg de Azul de Bromofenol), 3 μ L de um marcador de tamanho de DNA. A separação eletroforética foi realizada a 100V, durante aproximadamente 45 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV confirmando a presença e intensidade da amplificação. Quando não houvesse produto da amplificação ou esse fosse de baixa intensidade, repetia-se o procedimento da PCR.

Tabela 10 - Ciclos programados para a amplificação do DNA genômico.

GENE		Temperatura (tempo)			ciclos			
Apo B	<i>Xba</i> I	92°	(1')	58°	(5')	35		
	<i>Eco</i> RI	92°	(1')	58°	(5')	35		
	ins/del	94°	(1')	66°	(1'30'')	35		
Apo E		94°	(30'')	65°	(2')	40		
Apo B	VNTR	94°	(25'')	58°	(1')	72°	(2')	35
ECA	INS/DEL	94°	(1')	58°	(1')	72°	(2')	30
ECA	INS	94°	(30'')	67°	(45'')	72°	(2')	35
Fator V		93°	(1')	50°	(30'')	72°	(2')	35

4.2.3.3 Identificação dos produtos da PCR

As identificações dos produtos da PCR foram realizadas por análise direta ou após restrição enzimática.

A) Análise direta

Os produtos amplificados foram analisados diretamente em um sistema de eletroforese horizontal ou vertical, de acordo com o tamanho de seus fragmentos.

O sistema de eletroforese horizontal utilizado foi produzido em acrílico na USP, e o vertical foi o Protean II da BioRad. A fonte de energia utilizada foi da Pharmacia Biotech (Electrophoresis Power Supplied EPS 600).

Utilizou-se um marcador de tamanho molecular de DNA, aproximado em pares de bases ao fragmento a ser analisado e de acordo com o suporte da eletroforese. Para a agarose aplicaram-se 3 μL de um marcador \otimes X-174-RF DNA *Hinc* Digest (Pharmacia) com os seguintes fragmentos em pares de base: 1057, 770, 612, 495, 392, 345, 341, 335, 297, 291, 210, 162, 79, acrescidos de 4 μL do corante XC.

Quando o processo envolvia gel de acrilamida e os fragmentos diferenciavam-se por um pequeno número de pares de bases, utilizávamos 3 μL do marcador pBr 322 DNA (Biolabs) que apresentava os seguintes fragmentos: 622, 527, 404, 307, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 160, 147, 123, 110, 90, 76, 67, 34, 26, 15 e 9, acrescidos de 4 a 5 μL de corante BF. Na tabela 11, encontramos um resumo do que foi realizado.

Tabela 11 - Informações a respeito da identificação direta dos fragmentos em eletroforese.

Gene		Fragmentos amplificados (pb)	Gel	Corante	Voltagem (V)	Tempo (horas)
Apo B	<i>ins/del</i>	93 ou 84	Acril.8%	4 µL BF	150	2
	VNTR	450-800	Acril.4% e Uréia 7M	12µL Formamida	250	12
ECA	INS/DEL	490 ou 190	Agarose 1,5%	4 µL XC	100	1
	INS	335	Agarose 1,5%	4 µL XC	100	1

As variações foram visualizadas após corrida eletroforética em gel de agarose ou de poliacrilamida (variando a concentração da agarose e da acrilamida, tampão, tempo e voltagem), com brometo de etídio em luz U.V., sendo a placa fotografada em seguida.

A identificação dos fragmentos do 3'VNTR do gene da apo B foi diversa das demais e a descrevemos a seguir: o gel de poliacrilamida foi preparado com uréia e as cavidades de aplicação foram lavadas com água imediatamente para não haver depósito, e novamente na hora da aplicação.

Após a aplicação, utilizou-se a solução corante de formamida na proporção de 12 µl e 5 µl do produto de PCR. Usaram-se quatro marcadores e um branco da reação, com corrida eletroforética durante a noite, obedecendo-se um dos seguintes procedimentos: 250 V/12 horas; 230 V/13 horas; 214 V/14 horas; 200 V/15 horas.

As seqüências ricas em A - T contém de 14 a 16 bp e a nomenclatura utilizada foi a original de LUDWIG *et al.* (1989). Utilizaram-se controles cedidos pelo Dr. James E. Hixson (Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, USA). Essa nomenclatura, seguida do número de repetições das seqüências de pares de bases, é a seguinte:

5 = 20	9 = 28	13 = 36	17 = 44	21 = 52
6 = 22	10 = 30	14 = 38	18 = 46	22 = 54
7 = 24	11 = 32	15 = 40	19 = 48	23 = 56
8 = 26	12 = 34	16 = 42	20 = 50	24 = 58

As figuras de 4 a 7 mostram as placas de gel de agarose ou de poliacrilamida, referentes à Apo B e ECA.

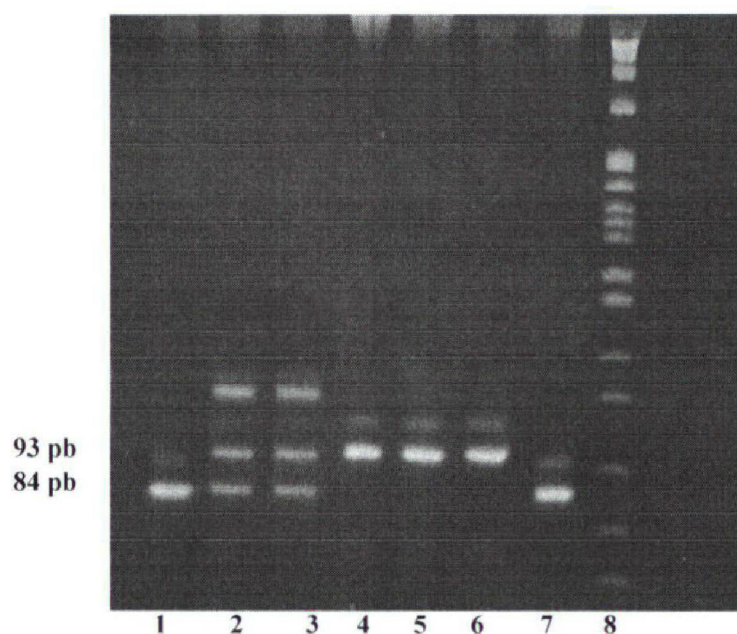


Figura 4 - **Variações do peptídeo sinal do gene da apo B.** Separação eletroforética do produto da PCR em gel de poliacrilamida 8%. Das posições 1 a 8 são mostrados: *del/del*, *ins/del*, *ins/del*, *ins/ins*, *ins/ins*, *ins/ins*, *del/del* e marcador de tamanho de DNA (pBr).

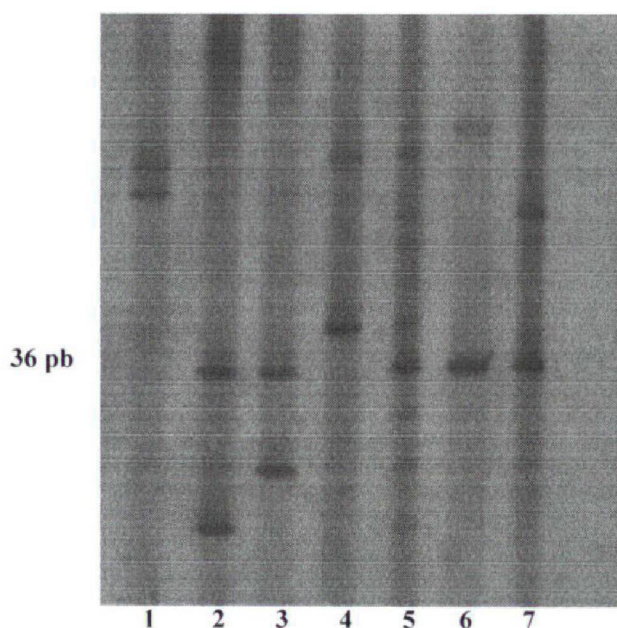


Figura 5 - **Variações do 3'VNTR do gene da apo B.** Separação eletroforética do produto da PCR em gel de poliacrilamida, 4% - uréia 7M. Das posições 1 a 7 são mostrados: genótipos 48/46, 36/30, 36/32, 48/38, marcador de tamanho de DNA, 50/36 e 44/36.

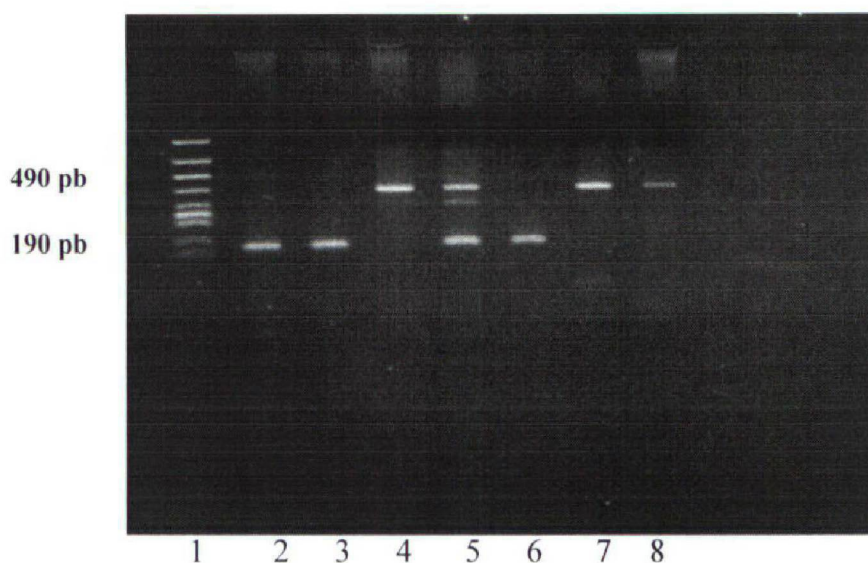


Figura 6 - **Variações do gene da ECA (INS/DEL)**. Separação eletroforética do produto da PCR em gel de agarose 1,5%. Das posições 1 a 8 são mostrados: marcador de tamanho de DNA (X-174), D/D, D/D, I/I, I/D, D/D, I/I e I/I.

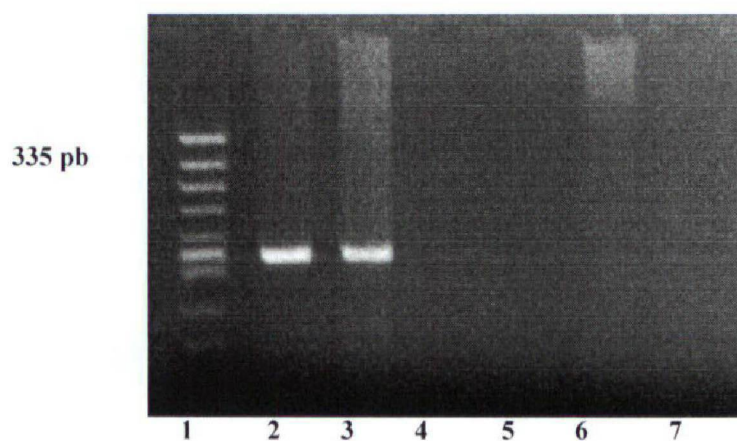


Figura 7 - **Variações do gene da ECA (INS)**. Separação eletroforética do produto da PCR em gel de agarose 1,5%. São mostrados: 1- marcador de tamanho de DNA (X-174), 2 e 3 -INS/INS ou INS/DEL (fragmento de 355 pb) e 4 a 7 - DEL/DEL (ausência).

B) Análise por restrição enzimática

As informações sobre os produtos amplificados, que foram submetidos ao processo de digestão, com as respectivas enzimas de restrição, encontram-se de maneira resumida na tabela 12.

Utilizando-se como exemplo o processo de digestão para a apoB *XbaI*, preparou-se um mistura de 5 U de *XbaI* e 8 μ L de tampão OPA (1X) em banho de gelo e foram acrescentados 10 μ l do produto da PCR. Após homogeneização, essa mistura foi colocada em BM a 37°C por 3 horas.

Decorrido o tempo de incubação, misturou-se todo o produto da digestão com 5 μ L de corante XC e aplicou-se em uma placa de eletroforese horizontal com agarose e 3 μ L de brometo de etídio 1,5%. Aplicaram-se também 5 μ L de um marcador de tamanho molecular X-174, e 5 μ L de um produto de amplificação sem digestão, acrescentados de 5 μ L do corante XC.

Quando precisávamos diferenciar fragmentos com números de pares de base próximos, utilizávamos o marcador pBr 322 DNA (Biolabs), acrescentado de 4 a 5 μ L de corante BF. Na tabela 13, encontramos um resumo dos procedimentos.

O sistema de eletroforese vertical foi o Protean II da BioRad e a fonte da Pharmacia Biotech (Electrophoresis Power Supplied EPS 600).

Tabela 12 - Informações a respeito dos processos de digestão enzimática.

DIGESTÃO							
Gene	Enzimas	Tampão	Temperatura	Tempo	Fragmentos (pb)		
		5 U	8 μ L	em BM	Horas	Inicial	Resultantes
Apo B	<i>XbaI</i>	<i>XbaI</i>	OPA	37°C	3	710	433 + 277
	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>	OPA	37°C	3	480	253 + 227
Apo E		<i>HhaI</i>	OPA	37°C	4	244	91 + 83 + 72
Fator V		<i>MnII</i>	NE2	50°C	3	223	104+82+37

Tabela 13 - Informações a respeito do processo de eletroforese.

Gene	Corante (5µL)	Separação eletroforética			
		Gel	Voltagem (V)	Tempo (horas)	
Apo B	<i>Xba</i> I	XC	Agarose 1,5%	100	1:00
	<i>Eco</i> RI	BF	Acril.6%	180	2:30
Apo E		BF	Acril.6%	250	2:00
Fator V		BF	Acril.8%	150	2:30

As variações foram visualizadas após corrida eletroforética em gel de agarose ou de poliacrilamida, com brometo de etídio em luz U.V., sendo a placa fotografada em seguida.

Os dados foram armazenados em planilha do EXCEL para análise posterior.

As figuras de 8 a 11 mostram as placas de gel de agarose ou de poliacrilamida, referentes aos genes da Apo B (*Xba*I e *Eco*RI), da Apo E e do Fator V.

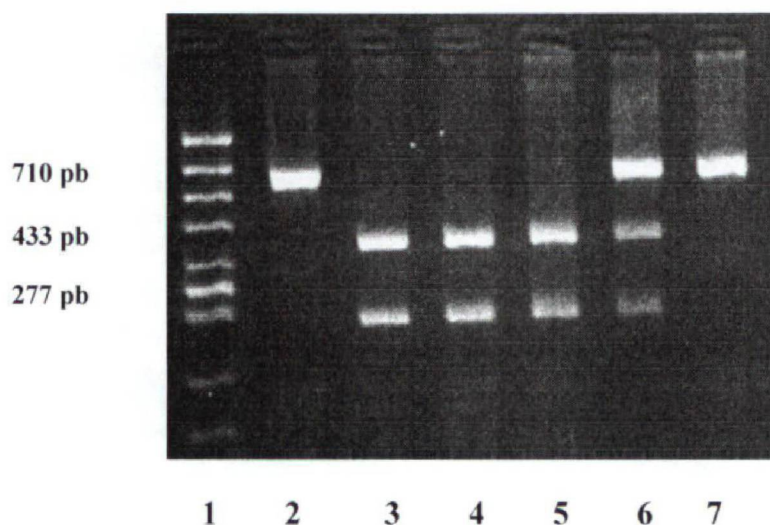


Figura 8 - **Variações *Xba*I do gene da apo B.** Separação eletroforética do produto da PCR e fragmentos de restrição em gel de agarose 1,5%. Das posições 1 a 7 são mostrados: marcador de tamanho de DNA (X-174), X-X-, X+X+, X+X+, X+X+, X+X- e produto da PCR sem digestão.

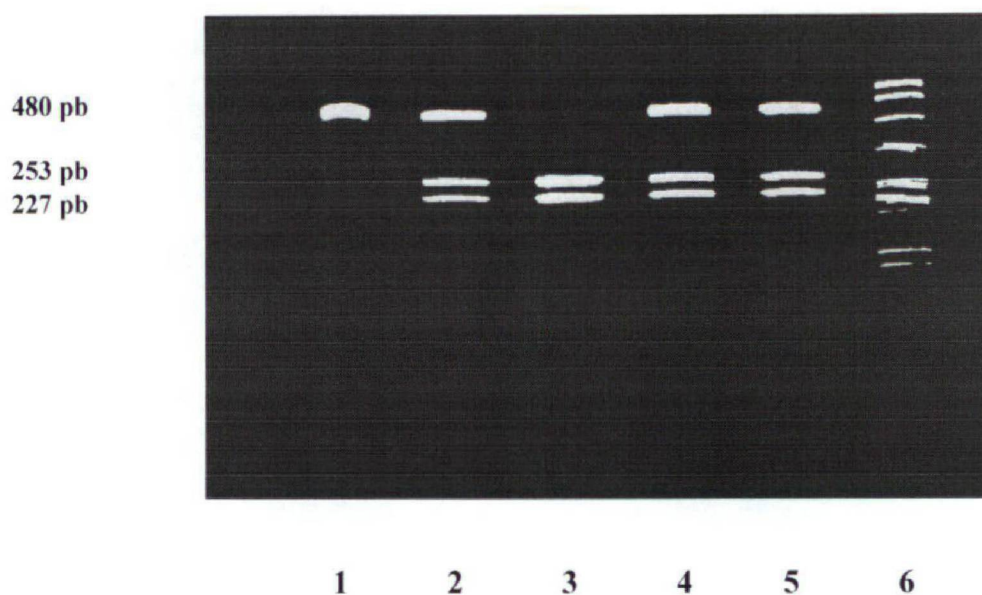


Figura 9 - **Variações *EcoRI* do gene da apo B.** Separação eletroforética do produto da PCR e fragmentos de restrição em gel de poliacrilamida 6%. Das posições 1 a 6 são mostrados: produto da PCR sem digestão, E+E⁻, E+E⁺, E+E⁻, E+E⁻, marcador de tamanho de DNA (pBr).

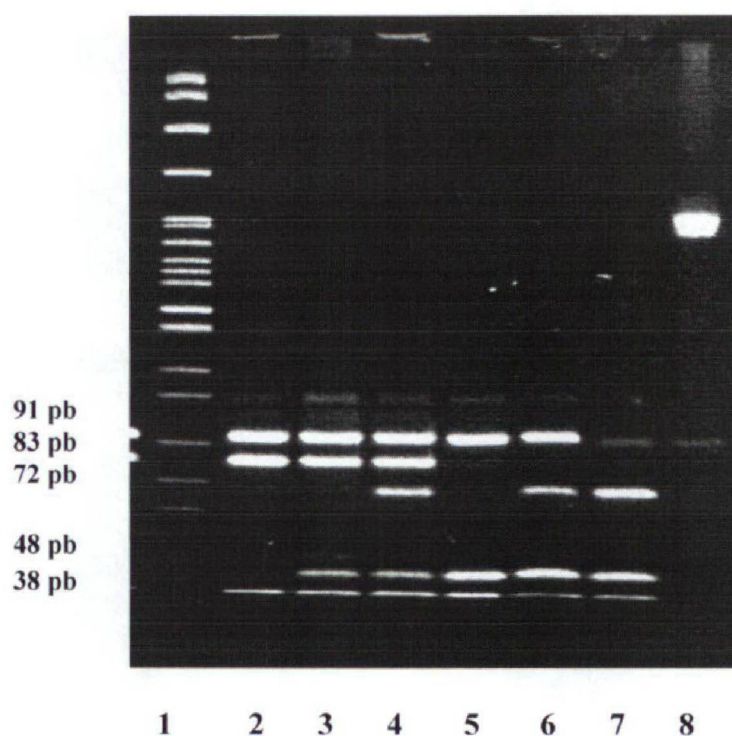


Figura 10 - **Variações do gene da apo E.** Separação eletroforética do produto da PCR e fragmentos de restrição em gel de poliacrilamida 6%. Das posições 1 a 8 são mostrados: marcador de tamanho de DNA (pBr), 2/2, 2/3, 2/4, 3/3, 3/4, 4/4 e produto da PCR sem digestão.

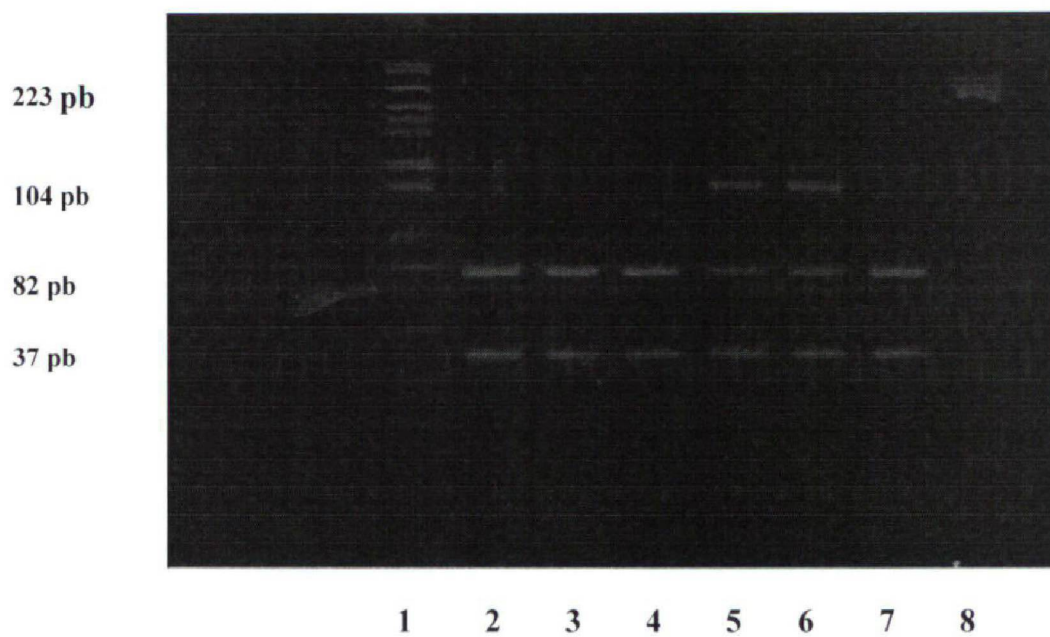


Figura 11 - **Variações do gene do fator V.** Separação eletroforética do produto da PCR e fragmentos de restrição em gel de poliacrilamida 8%. Das posições 1 a 8 são mostrados: marcador de tamanho de DNA (pBr), GG, GG, GG, AG, AG, GG e produto da PCR sem digestão.

4.3 MÉTODOS NUMÉRICOS

Para as comparações de médias entre os grupos DAC+ e DAC- foram utilizados, de acordo com as situações, o teste t de *Student* ou o teste *Mann Whitney U* (não paramétrico).

Os teste ANOVA MANOVA e Kruskal-Wallis ANOVA (não paramétrico) foram utilizados para as análises de variâncias.

As freqüências alélicas foram estimadas pela contagem dos genes. O teste do χ^2 foi utilizado para comparar freqüências alélicas e genotípicas entre os grupos DAC+ e DAC-, e verificar se as freqüências genotípicas estavam de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os haplótipos e suas freqüências, bem como o desequilíbrio de ligação, foram determinados pelo programa ARLEQUIN (versão 1.1; EXCOFFIER *et al.*, 1997).

A razão de chance (*odds ratio*) foi calculada segundo HOSNER e LEMESHOW, (1989).

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO GERAL DA AMOSTRA

A amostra estudada foi de 194 indivíduos. As distribuições dos indivíduos por sexo, cor e fatores de risco para doença arterial coronariana (DAC) estão descritas na tabela 14.

Tabela 14 - Distribuições de frequências por sexo, cor e fatores de risco para DAC, encontradas nos indivíduos diagnosticados com DAC (DAC+, N = 116) e sem DAC (DAC-, N = 78) pela angiografia

VARIÁVEIS			Total N	DAC+ (%)	DAC - (%)
SEXO	Homens		118	78	22
	Mulheres		76	32	68
COR	brancos		154	59	41
	Mulatos + negros		40	63	37
FATORES DE RISCO	HA	presente	116	62	38
		ausente	78	38	62
	DM	presente	24	75	25
		ausente	170	58	42
	TAB	presente	105	77	23
		ausente	89	39	61
	HF	presente	55	65	35
		ausente	139	58	42

N (número de indivíduos); HA (hipertensão arterial), DM (diabete melito), TAB (tabagismo), HF (hipercolesterolemia familiar)

O teste χ^2 indicou diferença significativa apenas para as análises de sexo ($\chi^2_{(1)} = 41,38$, $p < 0,001$) e dos fatores de risco HA ($\chi^2_{(1)} = 10,42$, $p < 0,01$) e TAB ($\chi^2_{(1)} = 28,66$, $p < 0,001$), quando se compararam os grupos DAC+ e DAC-

Os indivíduos do grupo DAC+ apresentaram idade média de $43,7 \pm 6,7$, variando de 19 a 56 anos, e os indivíduos do grupo DAC-, $44,5 \pm 7,0$, variando de 19 a 56 anos. Os dois grupos estudados não apresentaram diferença estatisticamente significativa pelo teste t, quando essas médias foram comparadas.

As distribuições de freqüências de idade encontradas nos grupos DAC+ e DAC- estão ilustradas na figura 12.

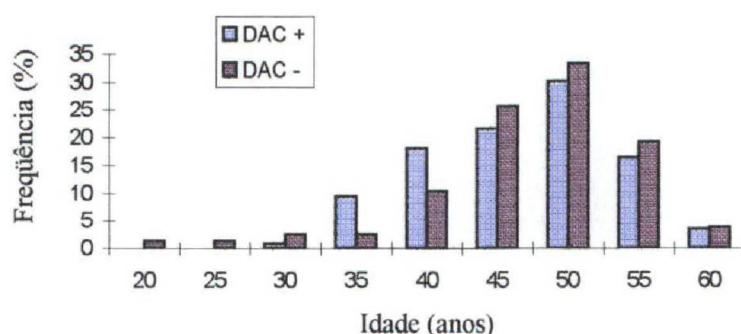


Figura 12 - Distribuições de freqüências de idade, encontradas nos grupos DAC+ (N = 116) e DAC- (N = 78).

5.2 NÍVEIS SÉRICOS DE LÍPIDES, LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS NOS GRUPOS ESTUDADOS

As médias (\pm desvio padrão) das concentrações séricas dos lípides, lipoproteínas, apolipoproteínas e relação apo B/apo A-I dos indivíduos dos grupos DAC+ e DAC- estão relacionadas na tabela 15. Os níveis de triglicérides (TG), Lipoproteína (a) [Lp(a)], apolipoproteína E (apo E) e relação apo B/apo A-I não apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Foi utilizado o teste t de *Student* e teste de

Mann Whitney U (não paramétrico) sempre que indicados para comparar os valores das médias das variáveis analisadas entre os grupos DAC+ e DAC-

Tabela 15 - Médias (\pm DP) dos níveis séricos (mg/dL) de lípides, lipoproteínas, apolipoproteínas e relação apo B/apo A-I nos grupos DAC+ (N =109) e DAC- (N = 78).

Variável	Média \pm DP		GL	p	
	DAC +	DAC -		Teste t	Mann-Whitney U
Colesterol total	207 \pm 52	177 \pm 42	185	< 0,001	
Triglicérides	163 \pm 105	117 \pm 69	185		< 0,001
HDL-Colesterol *	39 \pm 13	44 \pm 15	184	< 0,05	
LDL-Colesterol **	136 \pm 41	108 \pm 34	182	< 0,001	
Lipoproteína (a)	52 \pm 48	34 \pm 31	185		< 0,05
Apoproteína B	146 \pm 41	109 \pm 32	185	< 0,001	
Apoproteína A-I	137 \pm 34	139 \pm 35	185	= 0,700	
Apoproteína A-II	32 \pm 9	27 \pm 8	185	< 0,001	
Apoproteína E	4,3 \pm 1,7	3,5 \pm 1,4	185		< 0,01
Relação apo B / apo A-I	1,1 \pm 0,5	0,82 \pm 0,3	185		< 0,001

GL- graus de liberdade, * (N = 186); ** (N = 184).

As comparações das médias das variáveis Colesterol total (CT), TG, HDL-Colesterol (HDL-C), LDL-Colesterol (LDL-C), Lp (a), apolipoproteína B (apo B), apolipoproteína A-II (apo A-II) e a relação apo B/apo A-I, entre o grupo DAC+ e o grupo DAC-, apresentaram diferenças estatisticamente significativas, enquanto que somente as médias da variável apo A-I não diferiram entre os dois grupos estudados.

5.3 NÍVEIS SÉRICOS DE LÍPIDES, LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS DE ACORDO COM O SEXO NOS GRUPOS ESTUDADOS

As médias (\pm DP) de lípides, lipoproteínas, apolipoproteínas e relação apo B/apo A-I nos grupos, classificados por sexo, são apresentadas na tabela 16.

Tabela 16 - Médias (\pm DP) dos níveis séricos dos lípides, lipoproteínas, apoproteínas e relação apo B/apo A-I em pacientes nos grupos DAC+ e DAC -, classificados por sexo.

VARIÁVEIS (mg/dL)	DAC +			DAC -		
	HOMENS (n=86)	MULHERES (n=23)	TOTAL (n=109)	HOMENS (n=26)	MULHERES (n=52)	TOTAL (n=78)
Colesterol total	206 \pm 53	210 \pm 47	207 \pm 52	176 \pm 57	177 \pm 32	177 \pm 42
Triglicérides	167 \pm 112	149 \pm 73	163 \pm 105	119 \pm 74	115 \pm 66	117 \pm 69
HDL-Colesterol *	38 \pm 13	41 \pm 11	39 \pm 13	40 \pm 13	46 \pm 15	44 \pm 15
LDL-Colesterol **	136 \pm 44	139 \pm 32	136 \pm 41	108 \pm 42	108 \pm 30	108 \pm 34
Lipoproteína (a)	51 \pm 48	52 \pm 44	52 \pm 48	42 \pm 38	30 \pm 25	34 \pm 31
Apoproteína B	147 \pm 41	140 \pm 37	146 \pm 41	112 \pm 40	108 \pm 28	109 \pm 32
Apoproteína A-I	136 \pm 36	139 \pm 30	137 \pm 34	127 \pm 40	145 \pm 32	139 \pm 35
Apoproteína A-II	32 \pm 9	29 \pm 9	32 \pm 9	27 \pm 8	27 \pm 7	27 \pm 8
Apoproteína E	4,2 \pm 1,5	4,6 \pm 2,0	4,3 \pm 1,7	3,1 \pm 1,4	3,7 \pm 1,4	3,5 \pm 1,4
Relação apo B/apo A-I	1,1 \pm 0,5	1,0 \pm 0,3	1,1 \pm 0,5	0,9 \pm 0,4	0,8 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3

n - número de indivíduos, * (N = 186), ** (N = 184).

Considerando-se como fontes de variação grupo, sexo, e a interação entre grupo e sexo, a análise de variância indicou, com relação aos dados da tabela 16, que as médias diferem apenas entre os grupos, para todas as variáveis, com exceção do HDL-C e da apo A-I. Assim, sexo e a interação entre grupo e sexo não influenciaram nesses dados.

5.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DOS GENES DA APO B, DA APO E, DA ENZIMA CONVERSORA DO ANGIOTENSINOGENO-I E DO FATOR V EM RELAÇÃO À DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

As variações dos 4 genes estudados serão apresentadas através de tabelas e figuras que se referem aos genótipos e alelos obtidos com as metodologias empregadas

Tabela 17 - Frequências dos genótipos da apo B (*Xba*I, *Eco*RI; *ins/del*), da apo E, da ECA e do fator V nos grupos DAC+ (N =114) e DAC- (N = 78), com comparações entre os dois grupos por χ^2

		Frequências (%)				
		Genótipos	DAC +	DAC -	GL	$\chi^2(p)$
Apo B	<i>Xba</i> I	+/+	0,158	0,180	2	3,54 (0,17)
		+/-	0,456	0,564		
		-/-	0,386	0,256		
	<i>Eco</i> RI	+/+	0,620	0,600	2	0,07 (0,96)
		+/-	0,345	0,360		
		-/-	0,035	0,040		
Apo E	<i>ins/del</i>	<i>del/del</i>	0,060	0,110	2	3,01 (0,22)
		<i>ins/del</i>	0,440	0,490		
		<i>ins/ins</i>	0,500	0,400		
	ECA	2/2	0,000	0,013	5	4,43 (0,49)
		2/3	0,090	0,064		
		2/4	0,010	0,013		
3/3		0,635	0,700			
Fator V (1691)	3/4	0,240	0,210	1	0,82 (0,36)	
	4/4	0,025	0,000			
	D/D	0,340	0,320			
Fator V (1691)	I/D	0,470	0,526	2	0,72 (0,70)	
	I/I	0,190	0,154			
Fator V (1691)	G/G	0,950	0,970	1	0,82 (0,36)	
	A/G	0,050	0,030			

Analisando os genótipos (tabela 17) da apo B (*Xba*I, *Eco*RI e *ins/del* do peptídeo sinal), da apo E, da ECA e do fator V, não encontramos diferença estatisticamente

significativa nas frequências dos dois grupos estudados (DAC+ e DAC-), quando comparadas por testes χ^2 .

Quando se compararam os genótipos dos grupos DAC+ e DAC-, para os 4 locos mencionados nota-se que a diferença mais próxima do nível de significância de 5% foi observada para o loco da apo B, quando o polimorfismo *Xba*I é analisado (tabela 17). Assim, esses genótipos foram agrupados para testar se a presença ou ausência de um determinado alelo poderia ser considerada como marcadora para a DAC. As frequências dos genótipos *Xba*I, com presença ou ausência dos alelos X+ e X- nos grupos DAC+ e DAC- estão representadas na figura 13. Note-se que, comparamos *Xba*I -/- com os demais genótipos e, também, *Xba*I +/+ é comparado com os demais.

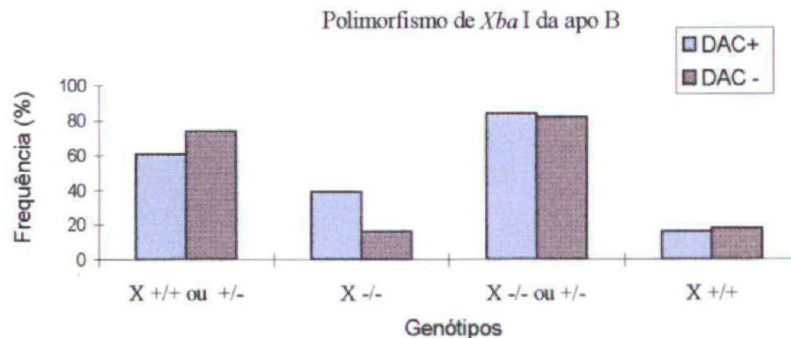


Figura 13 - Frequências (%) de genótipos *Xba*I da apo B com presença ou ausência dos alelos X+ e X- nos grupos DAC+ e DAC-.

As frequências de genótipos com presença do alelo X+, quando comparadas com sua ausência ($\chi^2_{(1)} = 3,50$; $p = 0,061$), não diferem entre os grupos DAC+ e DAC-, pelo teste χ^2 . Da mesma forma, as frequências de genótipos com presença do alelo X-, quando comparadas com sua ausência ($\chi^2_{(1)} = 0,16$; $p = 0,693$), também não diferem entre esses grupos. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa nessas comparações realizadas, entretanto o valor

do χ^2 na primeira comparação (X-/- com os demais) está próximo do nível de 5% de significância.

Analisando os genótipos da apo E sem o alelo E4 (2/2, 2/3, 3/3) e com o alelo E4 (2/4, 3/4, 4/4), não encontramos diferença estatisticamente significativa nas frequências dos dois grupos estudados (DAC+ e DAC-), quando comparadas por teste χ^2 ($\chi^2_{(1)} = 0,53$, $p = 0,468$).

As frequências alélicas dos polimorfismos dos genes da apo B, apo E, ECA e fator V, nos grupos DAC+ e DAC-, são mostradas na tabela 18. Em todos os casos, quando comparamos as frequências nos dois grupos, pelo teste χ^2 , não notamos diferença significativa.

Tabela 18 - Frequências (%) dos alelos dos genes da apo B (*Xba*I, *Eco*RI, *ins/del* peptídeo sinal), apo E, ECA (I/D) e fator V nos grupos DAC+ e DAC-, comparadas por χ^2

	ALELOS	GRUPOS		GL	$\chi^2(p)$
		DAC +	DAC -		
Apo B	X +	0,386	0,462		
	X -	0,614	0,538	1	2,18 (0,14)
	E +	0,793	0,782		
	E -	0,207	0,218	1	0,07 (0,79)
	<i>del</i>	0,280	0,359		
	<i>ins</i>	0,720	0,641	1	2,70 (0,10)
Apo E	E 2	0,048	0,052		
	E 3	0,800	0,838		
	E 4	0,152	0,110	2	1,38 (0,50)
ECA	D	0,574	0,583		
	I	0,426	0,417	1	0,03 (0,85)
FV	1691G	0,974	0,987		
	1691A	0,026	0,013	1	0,80 (0,37)

As frequências alélicas do 3'VNTR do gene da apo B, nos grupos DAC + e DAC-, são mostradas na tabela 19.

Tabela 19 - Frequências alélicas do polimorfismo do 3'VNTR do gene da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-

Alelo	DAC +		DAC -	
	N	(%)	N	(%)
< ou = 30	18	7,7	14	8,9
32	15	6,5	9	5,8
34	56	24,1	26	16,7
35	2	0,9	1	0,6
36	61	26,3	60	38,4
38	16	7,0	7	4,5
40	7	3,0	4	2,5
42	8	3,5	2	1,3
44	4	1,7	6	3,9
46	27	11,6	14	9,0
48	17	7,3	10	6,4
50	1	0,4	3	1,9

N- número de cromossomos

Nas comparações entre os dois grupos, pelo teste do χ^2 , com relação aos alelos do 3'VNTR do gene da apo B, encontramos os maiores desvios no caso dos alelos 34 (DAC+ = 24,1%, DAC- = 16,7%, $\chi^2_{(1)} = 3,17$) e 36 (DAC+ = 26,3%, DAC- = 38,4%, $\chi^2_{(1)} = 6,38$), com os respectivos valores de p igual a 0,076 e 0,012. Porém, com a correção de Bonferroni, o valor de p passa para 0,17 para o alelo 36, perdendo assim, a significância. Quando analisamos pelo teste do χ^2 todos os alelos juntos ($\chi^2_{(10)} = 14,19$, p = 0,165), concluímos não haver diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos com relação a esses alelos.

Os genótipos do 3'VNTR foram agrupados em três classes genotípicas (<42/<42; >=42/ <42, >=42/>=42), com base na aparente bimodalidade mostrada na tabela 19. As frequências encontradas nos dois grupos estudados encontram-se na figura 14.

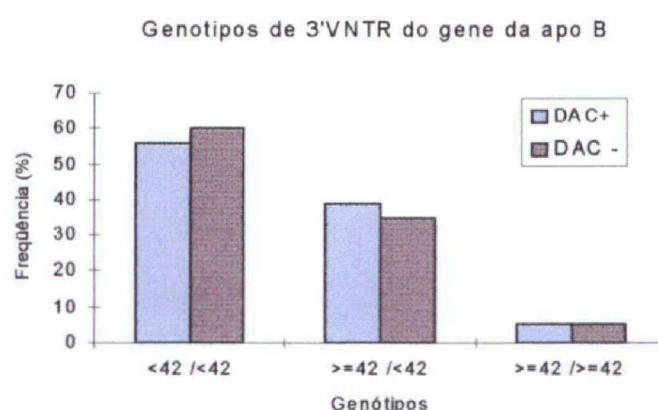


Figura 14 - Frequências dos genótipos do 3'VNTR do gene da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-.

Comparando-se os dois grupos estudados, com relação aos três genótipos do 3'VNTR apresentados na Figura 14, não encontramos diferença estatisticamente significativa pelo teste χ^2 ($\chi^2_{(2)} = 0,364$; $p = 0,834$), entre DAC+ e DAC-.

Na tabela 20 estão os resultados das comparações por χ^2 para testar se os genótipos da apo B, da apo E e da ECA, nos grupos DAC+ e DAC-, distribuem-se de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg.

Tabela 20 - Resultados de χ^2 para verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, referentes aos locos da apo B, apo E e ECA, nos grupos DAC+ e DAC-.

GENÓTIPOS	χ^2 (p)	
	DAC +	DAC -
Apo B <i>XbaI</i>	0,16 (p>0,50)	1,40 (p>0,20)
<i>EcoRI</i>	0,31 (p>0,50)	0,21 (p>0,50)
<i>ins/del</i>	0,93 (p>0,30)	0,27 (p>0,50)
Apo E	0,75 (p>0,80)	4,63 (p>0,50)
ECA	0,19 (p>0,50)	0,49 (p>0,20)

GL = 1, com exceção de apo E que foi 3.

As distribuições das frequências observadas desses genótipos, nos grupos DAC+ e DAC- não mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparadas com aquelas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.5 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS HAPLÓTIPOS E GENÓTIPOS DO GENE DA APO B E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Apresentamos na tabela 21 as frequências dos genótipos do gene da apo B (*XbaI*, *EcoRI*, e *ms/del* do peptídeo sinal) encontradas nos grupos DAC+ e DAC-. Analisando pelo teste do χ^2 todas as classes genotípicas observadas ($\chi^2_{(19)} = 22,54$; $p = 0,258$), concluímos não ter encontrado diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos DAC+ e DAC-, quanto a essas distribuições

As frequências dos genótipos do gene da apo B (*XbaI* e *EcoRI*), quando analisadas pelo teste do χ^2 ($\chi^2_{(7)} = 7,87$, $p = 0,344$), também não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos DAC+ e DAC-

Para obtermos as frequências dos haplótipos (tabela 22) do gene da apo B, empregamos o método da verossimilhança máxima (programa ARLEQUIN) com base nos genótipos observados, referentes a *XbaI*, *EcoRI*, e *ms/del* do peptídeo sinal, nos grupos DAC+ e DAC-.

Tabela 21 - Distribuições de frequências de genótipos do gene da apo B (*Xba*I, *Eco*RI e *ins/del* do peptídeo sinal) nos grupos DAC+ e DAC-

Genótipos			DAC+		DAC-	
<i>Xba</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>ins/del</i>	N	(%)	N	(%)
+/+	+/+	<i>del/del</i>	4	3,5	4	5,1
+/+	+/+	<i>ins/del</i>	6	5,3	3	3,8
+/+	+/+	<i>ins/ins</i>	4	3,5	4	5,1
+/+	+/-	<i>del/del</i>	0	0,0	1	1,3
+/+	+/-	<i>ins/del</i>	2	1,8	2	2,6
+/+	+/-	<i>ins/ins</i>	1	0,8	0	0,0
+/+	-/-	<i>del/del</i>	0	0,0	0	0,0
+/+	-/-	<i>ins/del</i>	1	0,8	0	0,0
+/+	-/-	<i>ins/ins</i>	0	0,0	0	0,0
+/-	+/+	<i>del/del</i>	0	0,0	1	1,3
+/-	+/+	<i>ins/del</i>	22	19,4	23	29,5
+/-	+/+	<i>ins/ins</i>	11	9,6	6	7,7
+/-	+/-	<i>del/del</i>	0	0,0	0	0,0
+/-	+/-	<i>ins/del</i>	12	10,5	9	11,5
+/-	+/-	<i>ins/ins</i>	7	6,1	5	6,4
+/-	-/-	<i>del/del</i>	0	0,0	0	0,0
+/-	-/-	<i>ins/del</i>	0	0,0	0	0,0
+/-	-/-	<i>ins/ins</i>	0	0,0	0	0,0
-/-	+/+	<i>del/del</i>	3	2,6	1	1,3
-/-	+/+	<i>ins/del</i>	6	5,3	0	0,0
-/-	+/+	<i>ins/ins</i>	15	13,2	5	6,4
-/-	+/-	<i>del/del</i>	0	0,0	2	2,6
-/-	+/-	<i>ins/del</i>	0	0,0	1	1,3
-/-	+/-	<i>ins/ins</i>	17	15,0	8	10,3
-/-	-/-	<i>del/del</i>	0	0,0	0	0,0
-/-	-/-	<i>ins/del</i>	2	1,8	0	0,0
-/-	-/-	<i>ins/ins</i>	1	0,8	3	3,8
Total			114	100	78	100

N = número de indivíduos.

Tabela 22 - Distribuições de frequências haplotípicas*, referentes ao gene da apo B (*XbaI*, *EcoRI* e *ins/del* do peptídeo sinal) nos grupos DAC+ e DAC-.

HAPLÓTIPOS <i>XbaI/EcoRI/ins/del</i>	DAC+		DAC-		χ^2 (p)
	N	%	N	%	
X- E+ <i>ins</i>	87	38,3	47	29,9	2,63 (0,11)
X+ E+ <i>ins</i>	35	15,2	25	16,3	0,03 (0,86)
X- E- <i>ins</i>	35	15,4	27	17,1	0,26 (0,61)
X+ E+ <i>del</i>	44	19,3	42	27,0	3,09 (0,08)
X- E+ <i>del</i>	15	6,6	8	5,0	0,35 (0,56)
X-E- <i>del</i> ; X+E- <i>del</i> ; X+E- <i>ins</i>	12	5,2	7	4,7	0,12 (0,73)

N = número de indivíduos; * inclui observadas mais inferidas.

Na comparação das frequências dos haplótipos (6 classes da Figura 15) do gene da apo B (*XbaI*~*EcoRI*~*ins/del*), não encontramos diferença significativa ($\chi^2_{(5)} = 4,80$, $p = 0,441$) entre os dois grupos (DAC+ e DAC-).

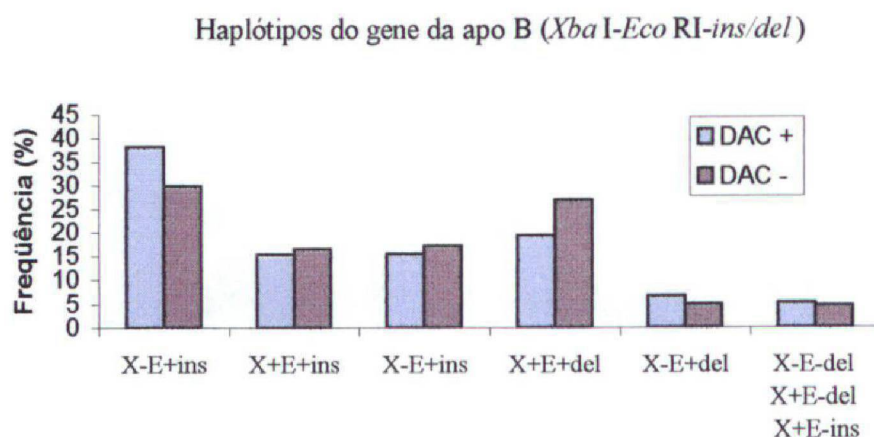


Figura 15 - Frequências dos diferentes haplótipos observados e inferidos, nos grupos DAC+ e DAC-.

Dos haplótipos do gene da apo B analisados, os que apresentaram diferença mais próxima da significância foram o X+E+*del* e o X-E+*ins* (tabela 22), com respectivas frequências de 19% e 38% no grupo DAC+ e de 27% e 30% no grupo DAC- ($\chi^2_{(1)} = 3,09$, $p =$

0,08; $\chi^2_{(1)} = 2,63$, $p = 0,11$, respectivamente). Considerando os homozigotos quanto a esses haplótipos, o genótipo X-X-/E+E+/ *ins/ins*, mostrou a maior diferença entre DAC+ e DAC- (tabela 21), além de ser o que apresentou maior número de observações.

Assim, resolvemos verificar se poderia existir associação de DAC com os polimorfismos *XbaI*, *EcoRI* e *ins/del* do peptídeo sinal do gene da apo B, comparando-se duas classes de genótipos (X-X- / E+E+/ *ins/ins* e outros) em DAC+ ($0,13 \pm 0,03$) e DAC- ($0,06 \pm 0,03$). Aplicando-se o teste χ^2 verificamos que a frequência desse genótipo X-X-/E+E+/ *ins/ins* não é estatisticamente diferente ($\chi^2_{(1)} = 2,26$; $p > 0,05$) nos dois grupos testados.

Apresentamos na figura 16 as frequências dos genótipos do gene da apo B (*XbaI*, *EcoRI*, e *ins/del* do peptídeo sinal), classificados como X-X-/E+E+/ *ins/ins* e outros, encontradas nos grupos DAC+ e DAC-.

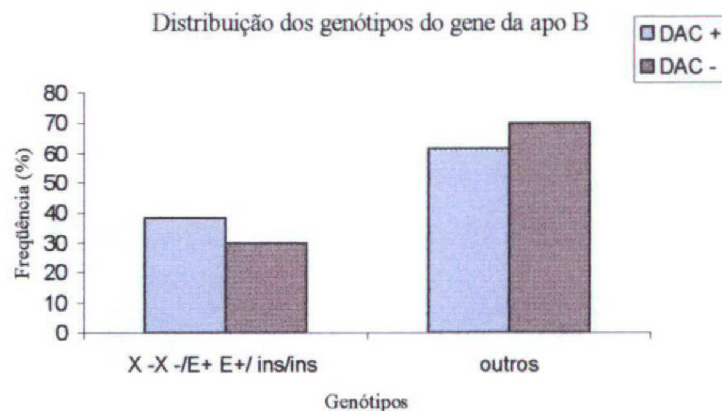


Figura 16 - Frequências de genótipos (*XbaI*, *EcoRI* e *ins/del*) da apo B encontradas nos grupos DAC+ e DAC-, classificados como X-X-/E+E+/ *ins/ins* e outros.

Em outras análises, verificamos se existia associação de DAC com os haplótipos do gene da apo B, referentes a *XbaI/EcoRI*; *XbaI/ins/del* ou *EcoRI/ins/del*. Os resultados de testes χ^2 são mostrados na tabela 23.

Tabela 23 - Frequências* absolutas e relativas dos diferentes haplótipos do gene da apo B (*XbaI/EcoRI*; *XbaI/ins/del* e *EcoRI/ins/del*) nos grupos DAC+ e DAC-.

Apo B	Haplótipo	DAC+		DAC-		χ^2 (p)
		N	%	N	%	
<i>XbaI/EcoRI</i>	X+ E+	78	34,2	67	43,0	3,00 (0,08)
	X+ E-	10	4,4	5	3,2	0,34 (0,56)
	X- E+	103	45,2	55	35,2	3,76 (0,052)
	X- E-	37	16,2	29	18,6	0,36 (0,55)
	<i>Total</i>	228	100	156	100	
<i>XbaI/ins/del</i>	X+ del	47	20,7	46	29,2	3,97 (0,046)
	X+ ins	41	17,9	26	16,9	0,11 (0,74)
	X- del	18	7,8	10	6,7	0,30 (0,58)
	X- ins	122	53,6	74	47,2	1,37 (0,24)
	<i>Total</i>	228	100	156	100	
<i>EcoRI/ins/del</i>	E+ del	59	25,9	50	32,0	1,74 (0,19)
	E+ ins	122	53,5	72	46,2	2,04 (0,16)
	E- del	6	2,6	6	3,9	0,43 (0,50)
	E- ins	41	18,0	28	17,9	—
	<i>Total</i>	228	100	156	100	

*Foram incluídos os haplótipos inferidos a partir dos duplos heterozigotos.

Cis e Trans nas análises de desequilíbrio de ligação.

Com base nos dados da tabela 23 também foram feitas análises a respeito de desequilíbrio de ligação. A tabela 24 mostra os valores de desequilíbrio de ligação (D), o D máximo esperado ($D_{\text{máx}}$), o D observado em relação ao D máximo ($D/D_{\text{máx}}$). Os testes de χ^2 foram feitos da comparação dos 4 haplótipos com os esperados com base em segregação independente.

Tabela 24 - Valores relacionados com desequilíbrio de ligação, levando-se em conta os haplótipos do gene da apo B.

Haplótipos	Amostra	χ^2 (p)	D	$D_{\text{máx}}$	$D / D_{\text{máx}}$
<i>XbaI/EcoRI</i>	DAC-	17,29 (<0,001)	+ 0,071	0,101	0,70
	DAC+	7,50 (<0,01)	+ 0,036	0,080	0,45
<i>XbaI/ins/del</i>	DAC-	43,61 (<0,001)	+ 0,126	0,193	0,65
	DAC+	43,76 (<0,001)	+ 0,097	0,172	0,56
<i>EcoRI/ins/del</i>	DAC-	6,30 (<0,02)	+ 0,042	0,078	0,54
	DAC+	5,87 (<0,02)	+ 0,030	0,058	0,52

Na comparação das frequências dos haplótipos do gene da apo B (*XbaI*~*ins/del*; tabela 23), mostradas na figura 17, encontramos quanto ao haplótipo *X+del* diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 3,97$; $p = 0,046$) entre os grupos DAC+ e DAC-, que se mostrou mais freqüente em DAC-.

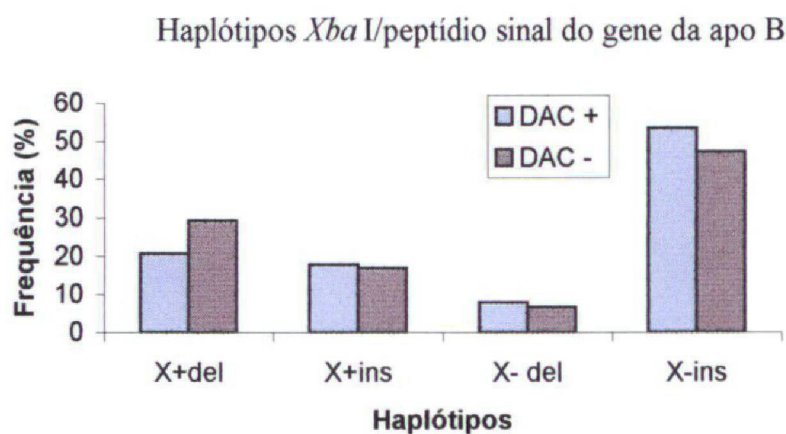


Figura 17 - Frequências dos haplótipos *XbaI*/peptídeo sinal observados nos grupos DAC+ e DAC-.

Investigamos associação de DAC com *XbaI* e peptídeo sinal, comparando-se duas classes genóticas: genótipos que geram a maior parte do haplótipo *X+del* ($X+X+/\text{del del}$, $X+X+/\text{del ins}$, $X+X-/\text{del ins}$) e demais genótipos. Essa comparação não mostrou diferença significativa entre DAC+ e DAC- ($\chi^2_{(1)} = 3,59$; $p = 0,058$).

De todos os haplótipos *XbaI/EcoRI* mostrados na tabela 23, foi o haplótipo $X-E+$ que apresentou diferença mais próxima da significância ($\chi^2_{(1)} = 3,76$; $p = 0,052$). Procuramos, então uma possível associação de DAC com *XbaI* e *EcoRI*, comparando-se a proporção dos genótipos $X-X-/E+E+$ e outros, em DAC+ e DAC- (Tabela 25).

Tabela 25 - Distribuições das frequências (%) dos genótipos da apo B (*XbaI/EcoRI*), X-X-/E+E+ e outros, nos grupos DAC+ e DAC-.

	DAC +		DAC-	
	N	(%)	N	(%)
X-X-/E+E+	24	21,1	6	7,7
Outros	90	78,9	72	92,3
<i>Total</i>	<i>114</i>	<i>100</i>	<i>78</i>	<i>100</i>

N = número de indivíduos; $\chi^2_{(1)} = 6,27$; $p = 0,012$.

As distribuições desses genótipos em DAC+ e DAC- são estatisticamente diferentes ($\chi^2_{(1)} = 6,27$; $p = 0,012$). Como mostra a figura 18 o maior desvio relativo é dado pela falta de X-X-/E+E+ no grupo DAC- em relação ao grupo DAC+.

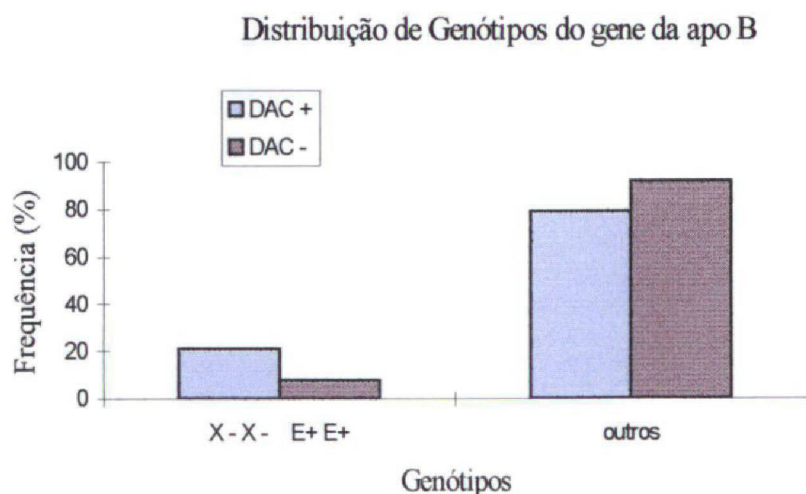


Figura 18 - Frequências de genótipos (*XbaI* e *EcoRI*) da apo B, classificados como X-X-/E+E+ e outros, encontradas nos grupos DAC+ e DAC-.

A razão de chance (*odds ratio*) de DAC estimada para o genótipo X-X-/E+E+ em relação aos outros genótipos *XbaI/EcoRI* é de 3,2 (intervalo de confiança de 95%: 1,2 a 8,3), calculada segundo HOSNER e LEMESHOW (1989).

5.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM O POLIMORFISMO DE *Xba*I DO GENE DA APO B

Através de análise de variância, verificamos a relação entre os genótipos *Xba*I apo B e os níveis de Colesterol total. Os valores das médias e os respectivos desvios padrões encontram-se na tabela 26.

Tabela 26 - Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos *Xba*I da apo B, nos grupos DAC + e DAC-

Genótipo	Colesterol total (mg/dL)		
	DAC +	DAC -	Total
X +/+	206 \pm 41 (17)	162 \pm 44 (14)	186 \pm 47 (31)
X +/-	203 \pm 44 (51)	184 \pm 45 (44)	194 \pm 46 (95)
X -/-	213 \pm 64 (40)	170 \pm 29 (20)	198 \pm 59 (60)

N = número de indivíduos

As distribuições de frequências dos níveis de CT, para os genótipos *Xba*I da apo B, nos indivíduos dos grupos DAC+ e DAC-, estão representadas nas figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

A análise de variância dos valores de CT considerando-se como fonte de variação os genótipos de *Xba*I, os grupos e a sua interação, nos indica que existe diferença significativa apenas entre os grupos DAC+ e DAC-. Entretanto, as médias do CT não diferem entre os genótipos de *Xba*I do loco da apo B. Também não há interação significativa entre grupo e genótipo.

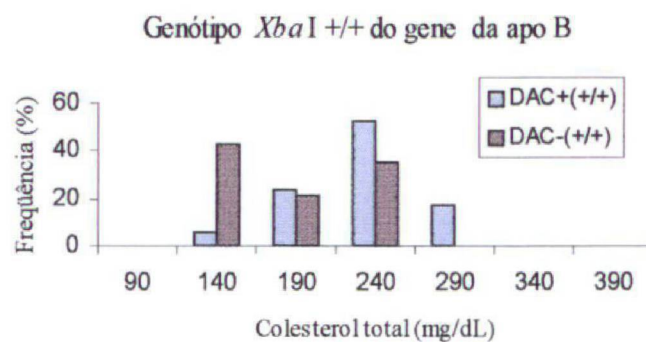


Figura 19 - Frequências do genótipo *Xba*I *+/+* com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-.

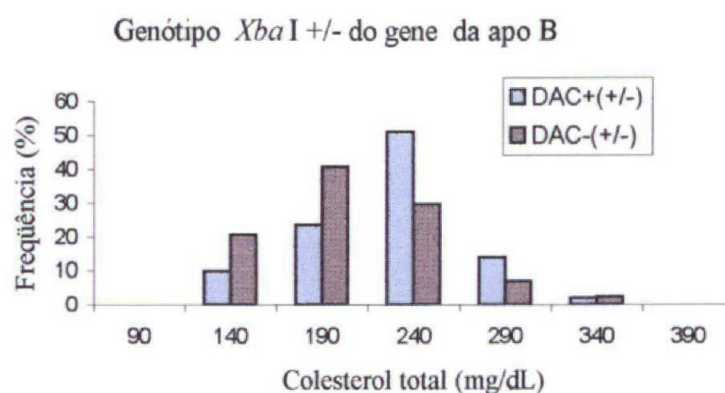


Figura 20 - Frequências do genótipo *Xba*I *+/-* com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-.

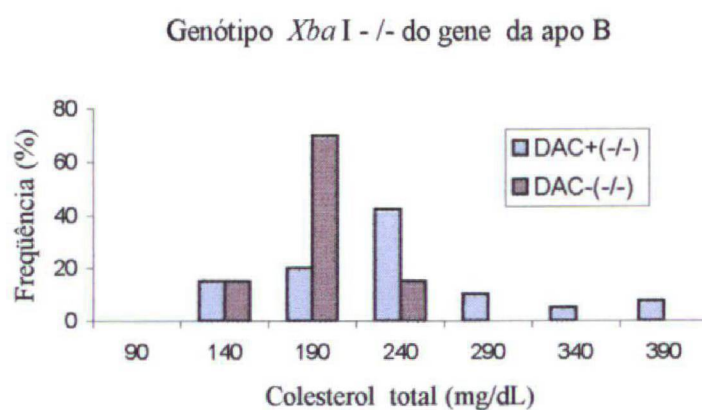


Figura 21 - Frequências do genótipo *Xba*I *-/-* com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-.

O genótipo *XbaI* $-/-$, quando comparado com os demais, apontou para uma tendência de maior frequência nos indivíduos com DAC+ (figura 13). Para observar a relação entre o alelo X^- e os níveis de CT, mostramos a frequência dos genótipos de *XbaI* com a presença ou ausência de X^+ , em relação aos níveis de CT (figura 22).

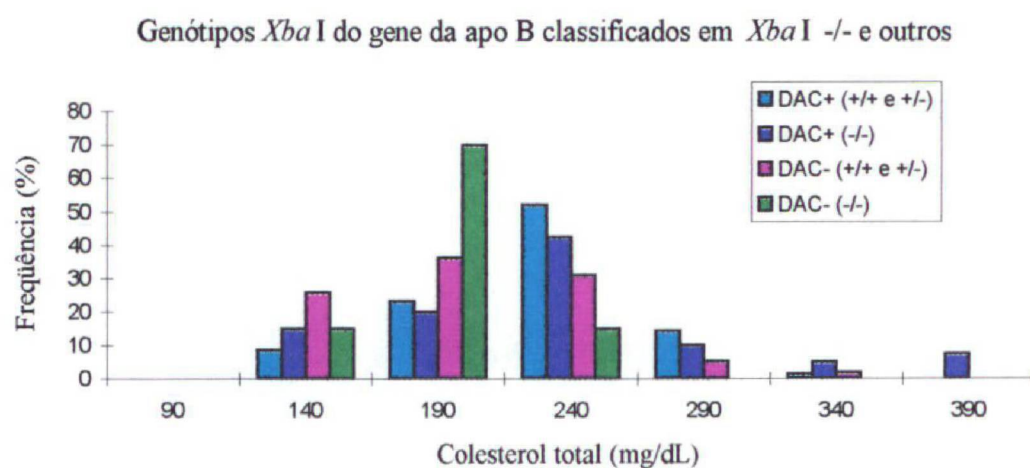


Figura 22 - Frequências de genótipos *XbaI* da apo B, levando-se em conta presença ou ausência do alelo X^+ , em relação com os níveis de CT, considerando-se os grupos DAC+ e DAC-.

A análise de variância dos valores de CT considerando-se como fonte de variação os genótipos de *XbaI*, os grupos e a sua interação, nos indica que existe diferença significativa apenas entre os grupos DAC+ e DAC-. Entretanto, não há diferença quanto à média do CT entre os genótipos considerando-se a presença ou ausência do alelo X^+ . Também não há interação significativa entre grupo e genótipo.

5.7 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM O POLIMORFISMO DE *EcoRI* DO GENE DA APO B

Através de análise de variância, verificamos a relação entre os genótipos *EcoRI* apo B e os níveis de Colesterol total. Os valores das médias e os respectivos desvios padrões encontram-se na tabela 27.

Tabela 27 - Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos *EcoRI* da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-.

Genótipo	Colesterol Total (mg/dL)		
	DAC +	DAC -	Total
E +/+	210 \pm 52 (68)	178 \pm 47 (47)	197 \pm 52 (115)
E +/-	202 \pm 55 (37)	173 \pm 35 (28)	189 \pm 49 (65)
E -/-	204 \pm 14 (4)	176 \pm 14 (3)	192 \pm 19 (7)

N = número de indivíduos.

As distribuições de freqüências dos níveis de CT, para os genótipos *EcoRI* da apo B, nos indivíduos dos grupos DAC+ e DAC-, estão representadas nas figuras 23 e 24.

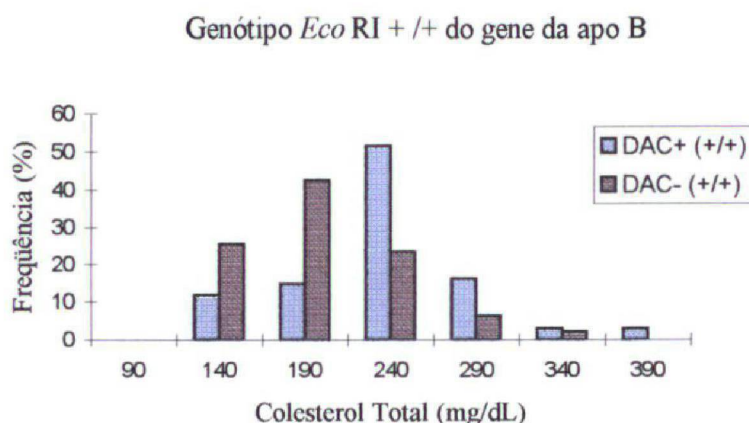


Figura 23 - Frequências do genótipo *EcoRI* +/+ da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-.

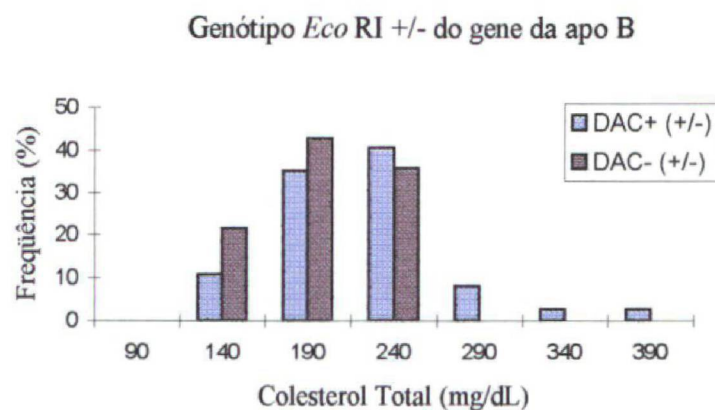


Figura 24 - Frequências do genótipo *EcoRI* +/- da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-.

Em vista da baixa frequência do genótipo *EcoRI* --, não foi apresentada a figura respectiva, com relação aos níveis de CT.

A análise de variância dos valores de CT considerando-se como fonte de variação os genótipos de *EcoRI*, os grupos e a sua interação, nos indica que existe diferença significativa apenas entre os grupos DAC+ e DAC-. Entretanto, as médias do CT não diferem entre os genótipos de *EcoRI* do loco da apo B e também não há interação significativa entre grupo e genótipo.

5.8 GENÓTIPOS *XbaI/EcoRI* E NÍVEIS SÉRICOS DE LÍPIDES, LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS

Para verificar como o genótipo X-X-/E+E+, mais freqüente no grupo DAC+ (tabela 25), comporta-se em relação aos demais genótipos *XbaI/EcoRI*, analisamos e comparamos os níveis dos lípides, lipoproteínas e apolipoproteínas, nos grupos DAC+ e DAC-.

Considerando-se o genótipo X-X-/E+E+ e comparando-se as médias das variáveis já citadas (tabela 28), entre os grupos DAC+ (N = 22) e DAC- (N = 6), somente as médias do HDL-C apresentaram diferença estatisticamente significativa: DAC+ = 37 ± 14 mg/dL e DAC- = 53 ± 18 mg/dL (t = 2,35; p = 0,027). Nota-se que a diferença entre as médias da apo B está próxima da significância (p = 0,07)

Tabela 28 - Médias (± DP) dos níveis séricos (mg/dL) de lípides, lipoproteínas, apolipoproteínas e relação apo B/apo A-I, do genótipo X-X-/E+E+ nos grupos DAC+ (N = 22) e DAC- (N = 6), comparadas por teste t

Variável	X-X-/E+E+		P
	DAC+	DAC-	
Colesterol total	215 ± 71	183 ± 26	> 0,20
Triglicérides	171 ± 131	89 ± 34	> 0,10
HDL-Colesterol	37 ± 14	53 ± 18	= 0,027
LDL-Colesterol*	139 ± 52	112 ± 30	> 0,20
Lipoproteína (a)	47 ± 45	47 ± 29	> 0,90
Apoproteína B	154 ± 57	109 ± 25	> 0,05
Apoproteína A-I	135 ± 36	147 ± 25	> 0,40
Apoproteína A-II	31 ± 9	30 ± 3	> 0,80
Apoproteína E	5,0 ± 2,2	3,6 ± 1,2	> 0,10
Relação apo B / apo A-I	1,2 ± 0,6	0,8 ± 0,3	> 0,10

*N = 21.

Quando foram comparadas as médias dessas variáveis considerando-se outros genótipos *XbaI/EcoRI*, excluindo-se X-X-/E+E+, entre DAC+ (N = 86 ou 87, dependendo do exame) e DAC- (N = 71 ou 72), somente as médias da apo A-I e do HDL-C não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, reproduzindo-se praticamente o mesmo resultado do teste t entre os grupos estudados, conforme já mostrado na tabela 15.

Para verificar como os indivíduos com o genótipo X-X-/E+E+ comportam-se em relação aos dos demais genótipos *XbaI/EcoRI* dentro do grupo DAC+, analisamos os níveis dos lípides, lipoproteínas e apolipoproteínas (tabela 29)

Tabela 29 - Médias (\pm DP) dos níveis séricos (mg/dL) de lípidos, lipoproteínas, apolipoproteínas e relação apo B/apo A-I, comparadas entre o genótipo X-X-/E+E+ (N = 22) e outros genótipos *XbaI/EcoRI* (N = 87) do grupo DAC+.

Variável	Média \pm DP		p
	Outros <i>XbaI/EcoRI</i>	X-X-/E+E+	
Colesterol total	205 \pm 46	215 \pm 71	> 0,10
Triglicérides	161 \pm 98	170 \pm 131	> 0,50
HDL-Colesterol	39 \pm 13	37 \pm 14	> 0,50
LDL-Colesterol *	135 \pm 38	139 \pm 52	> 0,50
Lipoproteína (a)	53 \pm 49	47 \pm 45	> 0,50
Apoproteína B	143 \pm 35	154 \pm 57	> 0,50
Apoproteína A-I	137 \pm 34	134 \pm 36	> 0,10
Apoproteína A-II	32 \pm 9	31 \pm 9	> 0,50
Apoproteína E	4,1 \pm 1,5	5,0 \pm 2,2	= 0,041
Relação apo B / apo A-I	1,1 \pm 0,4	1,2 \pm 0,6	> 0,10

* N = 86 e N = 21.

Quando as variáveis da tabela 29 foram comparadas entre esses dois grupos de genótipos, houve apenas uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,041$), no que se refere às médias da apo E.

Quando as comparações foram realizadas no grupo DAC-, não houve diferença significativa entre o genótipo X-X-/E+E+ (N = 6) e os outros genótipos *XbaI/EcoRI* (N = 71 ou 72) Entretanto, é interessante notar as médias de HDL-C do genótipo X-X-/E+E+ (53 \pm 18 mg/dL) e dos outros genótipos *XbaI/EcoRI* (43 \pm 14 mg/dL) do grupo DAC-, apesar de não diferirem significativamente ($t = 1,7$; $p = 0,09$)

5.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM O POLIMORFISMO DE *INSERÇÃO/DELEÇÃO* DO PEPTÍDEO SINAL DO GENE DA APO B

Através de análise de variância, verificamos a relação entre os genótipos, *ins/del* do peptídeo sinal apo B e os níveis de Colesterol total. Os valores das médias e os respectivos desvios padrões encontram-se na tabela 30.

Tabela 30 - Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos do peptídeo sinal da apo B, nos grupos DAC+ e DAC-.

Genótipo	Colesterol Total (mg/dL)		
	DAC +	DAC -	Total
<i>del/del</i>	199 \pm 60 (5)	163 \pm 40 (9)	175 \pm 50 (14)
<i>ins/del</i>	208 \pm 54 (50)	184 \pm 49 (38)	198 \pm 53 (88)
<i>ins/ins</i>	207 \pm 50 (54)	171 \pm 32 (31)	194 \pm 47 (85)

N = número de indivíduos.

As distribuições de freqüências dos níveis de CT, para os genótipos do peptídeo sinal da apo B, nos indivíduos dos grupos DAC+ e DAC-, encontram-se nas figuras 25-27.

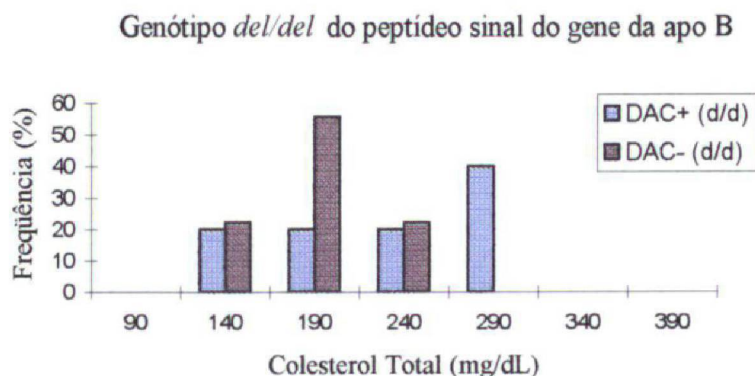


Figura 25 - Freqüências do genótipo *del/del* do peptídeo sinal da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC + e DAC -.

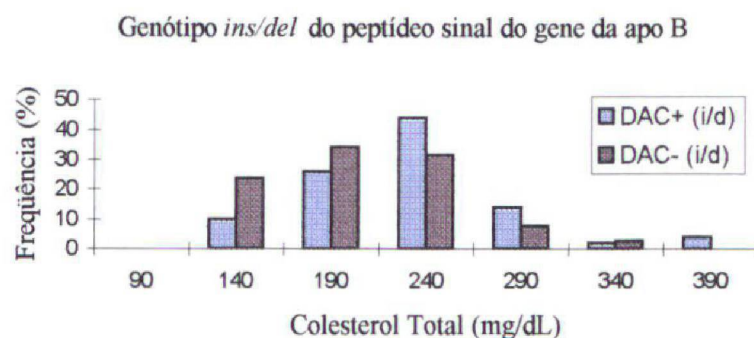


Figura 26 - Frequências do genótipo *ins/del* do peptídeo sinal da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC + e DAC -.

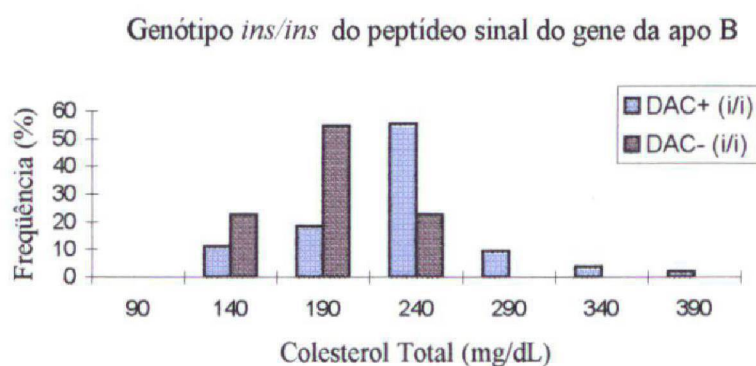


Figura 27 - Frequências do genótipo *ins/ins* do peptídeo sinal da apo B, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC + e DAC -.

A análise de variância dos valores de CT considerando-se como fonte de variação os genótipos *ins/del* do peptídeo sinal do gene da apo B, os grupos e a sua interação, nos indica que existe diferença significativa apenas entre os grupos DAC+ e DAC-. Entretanto, as médias do CT não diferem entre os genótipos e também não há interação significativa entre grupo e genótipo.

5 10 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM A VARIABILIDADE DO GENE DA APO E

Através de análise de variância, verificamos a relação entre os genótipos apo E e os níveis de Colesterol total. Os valores das médias e os respectivos desvios padrões encontram-se na tabela 31.

Tabela 31 - Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos da apo E, nos grupos DAC+ e DAC-.

Genótipos	Colesterol Total (mg/dL)		
	DAC+	DAC-	Total
E 2 / 2	—	156 (1)	156 (1)
E 2 / 3	178 \pm 49 (10)	153 \pm 45 (5)	170 \pm 48 (15)
E 2 / 4	110 (1)	181 (1)	145 \pm 50 (2)
E 3 / 3	210 \pm 49 (69)	177 \pm 44 (54)	196 \pm 49 (123)
E 3 / 4	214 \pm 57 (25)	178 \pm 35 (16)	200 \pm 52 (41)
E 4 / 4	221 \pm 38 (3)	—	221 \pm 38 (3)

N = número de indivíduos

A análise de variância dos valores de CT, considerando-se como fonte de variação os genótipos do gene da apo E, os grupos e a sua interação, nos indica que existe diferença significativa apenas entre os grupos DAC+ e DAC-. Entretanto, as médias do CT não diferem entre os genótipos do gene da apo E e também não há interação significativa entre grupo e genótipo.

Os valores médios de CT dos genótipos do gene da apo E sem o alelo E4 (2/2, 2/3, 3/3), e com o alelo E4 (2/4, 3/4, 4/4), nos grupos DAC+ e DAC-, são apresentados na tabela 32. As respectivas frequências desses genótipos, de acordo com os níveis de CT são mostradas na figura 28.

Tabela 32 - Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total (mg/dL) dos genótipos do gene da apo E sem o alelo E4 (2/2, 2/3, 3/3) e com o alelo E4 (2/4, 3/4, 4/4), nos grupos DAC+ e DAC-.

Genótipos	Colesterol total (mg/dL)		
	DAC +	DAC -	Total
Sem E4	206 \pm 50 (79)	175 \pm 44 (60)	193 \pm 50 (139)
Com E4	211 \pm 60 (29)	178 \pm 34 (17)	199 \pm 53 (46)

N = número de indivíduos.

A análise de variância dos valores de CT, considerando-se como fonte de variação os genótipos do gene da apo E sem o alelo E4 e com o alelo E4, os grupos e a sua interação, nos indica que existe diferença significativa apenas entre os grupos DAC+ e DAC-. Entretanto, as médias do CT não diferem entre os genótipos do gene da apo E sem e com o alelo E4 e também não há interação significativa entre grupo e genótipo.

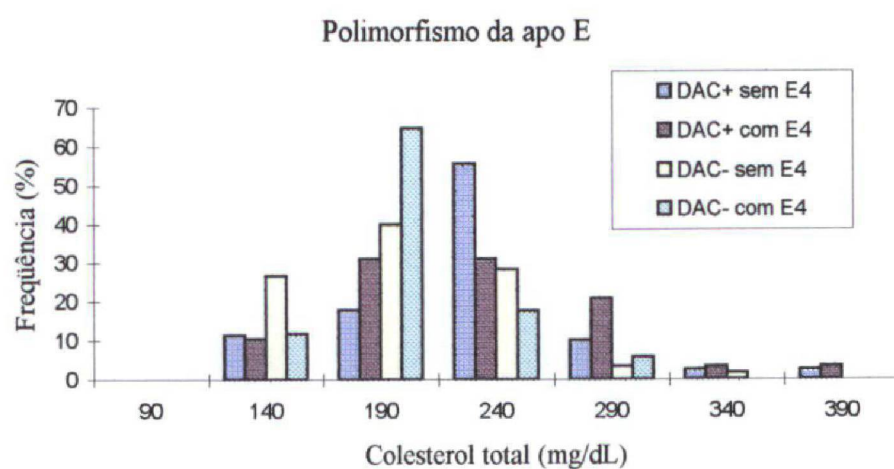


Figura 28 - Frequências dos genótipos da apo E sem o alelo E4 (2/2, 2/3, 3/3) e com o alelo E4 (2/4, 3/4, 4/4), de acordo com os diferentes níveis de CT, nos grupos DAC+ e DAC-.

5.11 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL COM O POLIMORFISMO DE INSERÇÃO/DELEÇÃO DO GENE DA ECA

Através de análise de variância, verificamos a relação entre os genótipos do gene da ECA e os níveis de Colesterol total. Os valores das médias e os respectivos desvios padrões encontram-se na tabela 33.

Tabela 33 - Valores de médias \pm desvio padrão (N) de colesterol total para os genótipos D/D, I/D, I/I do gene da ECA, nos grupos DAC+ e DAC-.

Genótipo	Colesterol Total (mg/dL)		
	DAC +	DAC -	TOTAL
D/D	212 \pm 49 (39)	166 \pm 39 (25)	193 \pm 50 (64)
I/D	203 \pm 52 (49)	186 \pm 42 (41)	195 \pm 47 (90)
I/I	210 \pm 61 (20)	167 \pm 44 (12)	194 \pm 58 (32)

N = número de indivíduos.

As distribuições de frequências dos níveis de CT, para os genótipos da ECA, nos indivíduos dos grupos DAC+ e DAC-, encontram-se nas figuras 26-28.

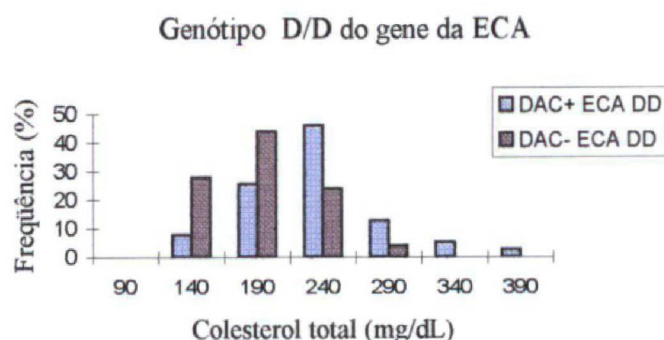


Figura 29 - Frequências do genótipo D/D da ECA, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC + e DAC -.

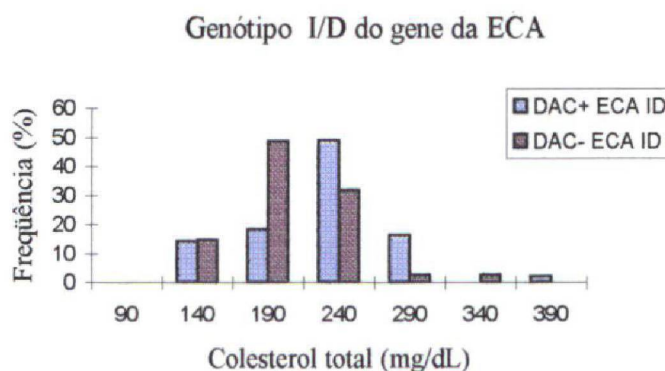


Figura 30 - Frequências do genótipo I/D da ECA, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC + e DAC -.

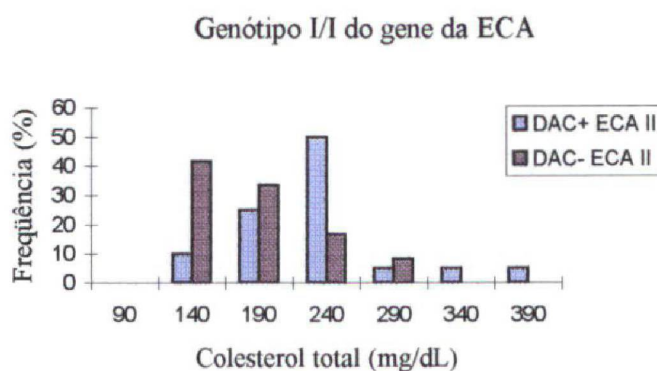


Figura 31 - Frequências do genótipo I/I da ECA, com relação aos níveis de CT, nos grupos DAC + e DAC -.

A análise de variância dos valores de CT considerando-se como fonte de variação os genótipos D/D, I/D, I/I da ECA, os grupos e a sua interação, nos indica que existe diferença significativa apenas entre os grupos DAC+ e DAC-. Entretanto, as médias do CT não diferem entre esses genótipos e também não há interação significativa entre grupo e genótipo.

6 DISCUSSÃO

A tentativa de elucidar quais os genes envolvidos com a predisposição à DAC e com as variações das concentrações lipídicas no plasma tem sido motivo de vários estudos clínicos e epidemiológicos. A análise das variações genéticas de diferentes apolipoproteínas, especialmente da apo B, tem sido indicada como ferramenta indispensável nessas investigações.

6.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL, LIPÍDES, LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS

Analisamos as variáveis sexo, cor e fatores de risco, como hipertensão arterial (HAS), diabetes melito (DM), tabagismo (TAB), e historia familiar (HF), dos pacientes com a doença arterial coronariana diagnosticada pelo cateterismo (DAC+), e no grupo controle também diagnosticado sem essa doença, pelo cateterismo (DAC-).

Verificamos uma maior prevalência do sexo masculino no grupo DAC+ e do sexo feminino no grupo DAC-. As ocorrências dos fatores de risco, HAS e TAB, foram estatisticamente mais altas no grupo DAC+, quando comparadas ao DAC- (tabela 14). Esses resultados estão de acordo com a literatura mundial.

A idade nos dois grupos foi em média muito próxima, em torno de 44 anos, pois os indivíduos foram selecionados com idade inferior a 56 anos.

Com exceção da apo A-I, as médias dos níveis séricos de lipídes, lipoproteínas e apolipoproteínas foram estatisticamente mais altas em DAC+ do que em DAC-, caracterizando diferenças entre os grupos (tabela 15). Não há diferença entre as médias dos

lípidos entre os sexos, quando são considerados os grupos estudados separadamente (tabela 16).

Os trabalhos publicados na literatura, que estudaram a associação entre os níveis dos lípidos no soro e DAC, são concordantes em sua totalidade, confirmando o aumento médio dos níveis dos lípidos com a presença da doença. As diferenças, quando se comparam os sexos, são observadas geralmente quando o número de indivíduos é maior e as amostras são retiradas ao acaso da população.

6.2 VARIABILIDADE GENÉTICA E DAC

A análise da variabilidade genética dos genes da apo B, da apo E, da enzima conversora do angiotensinogênio-I (ECA) e do fator V em relação à DAC, foi verificada pela análise direta do DNA com a metodologia da PCR.

6.2.1 Variações relacionadas com a apo B

As variações do gene da apo B foram identificadas pelas enzimas de restrição *Xba*I e *Eco*RI, presença de *inserção/deleção* no exon do peptídeo sinal e pelo número de unidades de repetição do fragmento do 3'VNTR.

De acordo com RENGES *et al.* (1991), RENGES *et al.* (1992) e outros autores, as frequências dos alelos determinantes da presença e ausência dos sítios de restrição *Xba*I e *Eco*RI, com ou sem DAC, diferem em populações caucasianas e orientais (tabelas 1 e 2). Por esse motivo, em nossas comparações utilizamos somente indivíduos de origem caucasóide.

Os dados da tabela 1, pela revisão da literatura, mostraram que o alelo X⁻ em controles varia de 0,45 a 0,62 e em DAC⁺ de 0,50 a 0,69. Nossos dados (DAC⁻ = 0,54; DAC⁺ = 0,61) estão dentro desta faixa de variação.

Comparando os nossos dados de frequências alélicas de X⁺ e X⁻, com os dados de MACHADO, 1997 (tabela 1) de 67 pacientes com DAC⁺, não encontramos diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 2,46$, $p > 0,10$). O mesmo aconteceu quando comparamos as frequências encontradas nos seus 93 controles com as dos controles do presente estudo ($\chi^2_{(1)} = 1,93$, $p > 0,15$).

Quando nossos dados de controles e DAC⁺ foram comparados com os de MANSUR, 1998 (tabela 1) referentes a 136 controles e 249 pacientes não encontramos diferenças significativas (respectivamente: $\chi^2_{(1)} = 2,57$, $p > 0,10$; $\chi^2_{(1)} = 0,50$, $p > 0,40$).

Baseando-se nos pesquisadores que encontraram associação positiva do alelo X⁻ e do genótipo X⁻X⁻ com DAC (HEGELE *et al.*, 1986; MONSALVE *et al.*, 1988; MYANT *et al.*, 1989; TYBJAERG-HANSEN *et al.*, 1991 e BOHN *et al.*, 1993a), agrupamos os genótipos com a presença do alelo X⁺ (X⁺X⁺ e X⁺X⁻) que foram comparados com sua ausência, X⁻ (X⁻X⁻), entre os dois grupos estudados. Nosso resultado foi próximo da significância ($p = 0,061$). Verificamos uma tendência não significativa do genótipo *Xba*I X⁻X⁻ da apo B estar em maior prevalência no grupo DAC⁺, em relação ao DAC⁻ (figura13).

Os dados da literatura, na tabela 2, mostram que o alelo E⁻ em controles varia de 0,15 a 0,22 e em DAC⁺ de 0,20 a 0,27. Nossos dados (DAC⁻ = 0,22; DAC⁺ = 0,21) estão dentro dos limites encontrados na literatura.

Comparando os nossos dados de frequências alélicas de E⁺ e E⁻ com os dados de MACHADO, 1997 (tabela 2) de 67 pacientes com DAC⁺, não encontramos diferença

significativa ($\chi^2_{(1)} = 0,08$, $p > 0,78$). O mesmo aconteceu quando comparamos as freqüências encontradas nos seus 93 controles com as dos controles do presente estudo ($\chi^2_{(1)} = 2,17$, $p > 0,14$).

Os dados da tabela 3 em populações caucasianas, mostraram que o alelo *ins* em controles varia de 0,65 a 0,72 e em DAC+ de 0,64 a 0,80. Nossos dados (DAC- = 0,64; DAC+ = 0,72) estão dentro dos limites encontrados na literatura.

Comparando os nossos dados de freqüências alélicas de *ins* e *del* com os dados de MACHADO, 1997 (tabela 3) de 67 pacientes com DAC+, não encontramos diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 2,18$, $p > 0,14$). O mesmo aconteceu quando comparamos as freqüências encontradas nos seus 93 controles com as encontradas nos controles do presente estudo ($\chi^2_{(1)} = 0,50$, $p > 0,47$). Quando comparamos nossos dados com os de MANSUR (1998) de 251 pacientes com DAC+, não encontramos diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 0,17$, $p > 0,68$). Porém ao compararmos as freqüências encontradas nos seus 137 controles, com as encontradas nos controles do presente estudo ($\chi^2_{(1)} = 3,11$, $p > 0,08$), o resultado foi próximo da significância.

Os dados da tabela 4, mostraram que o haplótipo X-E+ em controles caucásides varia de 0,34 a 0,47. Nosso resultado (DAC- = 0,35) está dentro dos limites encontrados na literatura.

As freqüências dos haplótipos de *XbaI/EcoRI* analisados no presente estudo não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre DAC+ e DAC-. Apenas o haplótipo X-E+ mostrou uma diferença próxima da significância ($\chi^2_{(1)} = 3,76$, $p = 0,052$; tabela 23).

As comparações das freqüências haplotípicas de *XbaI*/peptideo sinal entre nossas amostras DAC+ e DAC-, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) somente quanto ao haplótipo X+*del*, que foi mais freqüente em DAC-, como se fosse um

marcador protetor de DAC. Observamos que esses nossos resultados não são semelhantes àqueles obtidos por RENGES *et al.* (1991) e PAJUKANTA *et al.* (1996), que indicaram X+*del* como marcador de DAC.

Encontramos associação significativa positiva ($p < 0,05$) de DAC com o genótipo X-X-/E+E+, quando este foi comparado com os demais genótipos em DAC+ e DAC- (tabela 25).

Quando os indivíduos X-X-/E+E+ do grupo DAC- (N = 6) foram comparados com os do grupo DAC+ (N = 22), o HDL-C apresentou média estatisticamente menor em DAC+ (37 ± 14 mg/dL) do que em DAC- (53 ± 18 mg/dL; $t = 2,35$; $p < 0,05$; tabela 28). Esse dado sugere que os indivíduos com esse genótipo marcador, no grupo DAC-, estão possivelmente sendo protegidos da DAC, pelo alto nível de HDL-C no plasma. Quando comparamos o grupo composto por outros genótipos *XbaI/EcoRI*, em DAC+ e DAC-, com relação às mesmas variáveis relacionadas com o metabolismo lipídico, somente apo A-I e HDL-C não apresentaram diferença estatisticamente significativa, reproduzindo-se praticamente o mesmo resultado do teste t, verificado anteriormente entre os grupos estudados, no início desse estudo (tabela 15).

As freqüências dos alelos de 3'VNTR da apo B, em grupos com ou sem DAC, em populações caucasianas também são diferentes das orientais, de acordo com ZAGO *et al.*, 1996. Por esse motivo nossa amostra foi comparada somente com as de grupos caucasóides.

As freqüências dos alelos 34 e 36 do polimorfismo de 3'VNTR do gene da apo B da tabela 5, foram 0,17 e 0,38 em DAC-, respectivamente, e 0,20 e 0,37, em DAC+. Esses resultados (DAC- = 0,17 e 0,38; DAC+ = 0,24 e 0,26) para os alelos 34 e 36 respectivamente, estão dentro dos limites encontrados na literatura.

Comparando os nossos dados de freqüências dos alelos 34 e 36 de 3'VNTR (tabela 19) com os dados de FRIELD *et al.*, 1990 (tabela 5) de 126 pacientes com DAC+, encontramos diferença significativa ($\chi^2 = 4,74$, $p < 0,05$). O mesmo não aconteceu quando comparamos as freqüências encontradas nos seus 117 controles com as encontradas nos controles do presente estudo ($\chi^2 = 2,54$, $p > 0,10$).

Quando os nossos dados de freqüências dos alelos 34 e 36 de 3'VNTR (tabela 19) foram comparados com os dados de TURNER *et al.*, 1995 (tabela 5) de 682 pacientes com DAC+, não encontramos diferença significativa ($\chi^2 = 2,54$, $p > 0,10$). O mesmo aconteceu comparando as freqüências encontradas nos seus 1312 controles com as encontradas nos controles do presente estudo ($\chi^2 = 1,53$, $p > 0,20$).

6.2.2 Variações da apo E

As freqüências dos alelos da apo E (E2, E3 e E4), em grupos com ou sem DAC, de acordo com a literatura pesquisada (tabela 6) também apresentam algumas diferenças raciais. Por esse motivo, novamente nossa amostra foi comparada apenas com as amostras caucasóides.

Analisando a revisão da literatura (tabela 6), verificamos que os alelos E2, E3 e E4 em controles apresentaram, respectivamente, os valores variando de 0,03; 0,49; 0,11 a 0,15; 0,84; 0,37. Em DAC+ de 0,03; 0,68; 0,05 a 0,09; 0,90; 0,29. Nossos dados (DAC- = 0,05; 0,84 e 0,11; DAC+ = 0,05; 0,80 e 0,15) estão dentro dos limites encontrados na literatura.

Comparando os nossos dados de freqüências alélicas de E2, E3 e E4 com os dados de MANSUR, 1998 (tabela 6) de 251 pacientes com DAC+, não encontramos diferença significativa ($\chi^2_{(2)} = 2,75$, $p > 0,20$). O mesmo aconteceu quando comparamos as freqüências

encontradas nos seus 137 controles com as dos controles do presente estudo ($\chi^2_{(2)} = 4,93$, $p > 0,05$).

Não encontramos nenhuma associação entre DAC e a variação da apo E, ao contrário do que foi relatado por outros autores (ETO *et al.*, 1988; DAVIGNON *et al.*, 1988; EICHNER *et al.*, 1993). De acordo com esses autores, os pacientes com DAC apresentaram uma frequência do alelo E4 aumentada, em relação ao grupo controle; em contraste, o alelo E2 era o menos freqüente no mesmo grupo com DAC.

6.2.3 Variações da ECA

Os dados de caucasóides da tabela 7, pela revisão da literatura, mostraram que o alelo I em controles varia de 0,33 a 0,50 e em DAC+ de 0,40 a 0,52. Nossos dados (DAC- = 0,42; DAC+ = 0,43) estão dentro dos limites encontrados na literatura.

Comparando os nossos dados de frequências alélicas de I e D com os dados de MANSUR, 1998 (tabela 7) de 251 pacientes com DAC+, não encontramos diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 2,20$, $p > 0,10$). O mesmo aconteceu quando comparamos as frequências encontradas nos seus 137 controles com as dos controles do presente estudo ($\chi^2_{(1)} = 0,28$, $p > 0,50$).

Não encontramos nenhuma associação entre DAC e a variação da ECA. Nossos dados concordam com os de LINDPAINNER *et al.* (1995) e HONG *et al.* (1997) e discordam dos de CAMBIEN, *et al.* (1992); MATTU *et al.* (1995) e OIKE *et al.* (1995).

6.2.4 Variações do fator V

Os dados de caucasóides da tabela 8, pela revisão da literatura, mostraram que o alelo A em controles varia de 0,01 a 0,10 e em DAC+ de 0,05 a 0,11. Nosso dado de DAC- (0,01) está dentro dos limites encontrados na literatura e o de DAC+ (0,03) está um pouco abaixo do limite mínimo.

Comparando os nossos dados de frequências alélicas do fator V com os dados de FRANCO *et al.*, 1999 (tabela 8) de 152 indivíduos sem DAC, não encontramos diferença significativa ($\chi^2 = 0,34$, $p > 0,70$).

Não encontramos nenhuma associação entre DAC e a variação do fator V. Nossos dados estão de acordo com o de outros autores (RIDKER *et al.*, 1995; PROHASKA, *et al.*, 1995; MÄRZ, *et al.*, 1995; VAN BOCKXMEER, *et al.*, 1995), discordando dos de ROSENDAAL *et al.*, 1997.

6.2.5 Variação genética e nível de colesterol total

No presente trabalho, investigamos associação entre nível de CT e as variações da apo B (*Xba*I, *Eco*RI e peptídeo sinal), apo E e da ECA. Não fizemos análise semelhante, com relação à variação do fator V, uma vez que o número de heterozigotos é muito reduzido.

Não encontramos nenhuma associação entre genótipo e nível de CT com relação aos cinco sítios de variação investigados. Em todos os casos, as análises mostraram apenas maior

nível de CT no grupo com DAC+, quando comparado ao DAC-, não aparecendo nenhuma associação com genótipo ou com a interação entre genótipo e grupo.

Ao contrário do que sugerem os pesquisadores que encontraram associação positiva do genótipo X+X+ da apo B com o CT e LDL-C (AALTO-SETÄLÄ *et al.*, 1988; DEMANT *et al.*, 1988; HOULSTON *et al.*, 1988), o nosso resultado, dado pela análise de variância, mostrou diferença somente entre os grupos DAC+ e DAC-, porém não entre os genótipos. Observamos, entretanto, uma tendência do genótipo X-X- apresentar-se com os níveis de CT mais elevados em relação aos outros genótipos X+X+ e X+X-, no grupo DAC+, o que está em discordância com os dados desses autores, mas em concordância com outros (DUNNING *et al.*, 1988; TYBJAERG-HANSEN *et al.*, 1991; GUZMÁN, 1998).

A comparação quanto ao nível de CT entre os genótipos com a presença do alelo X+ (X+X+ e X+X-) e o genótipo com sua ausência, X- (X-X-), entre os dois grupos estudados, também não mostrou interação entre grupo e genótipo.

Com relação à associação entre CT e o polimorfismo de *EcoRI* da apo B, há discordância na literatura. Como no presente estudo, alguns autores (PAN *et al.*, 1995; JUVONEN *et al.*, 1995; GLISIC *et al.*, 1995) não encontraram correlações significativas, enquanto PAULWEBER *et al.* (1990) e TYBJAERG-HANSEN *et al.* (1991) verificaram diferença entre as variações desse sítio com os níveis dos lípidos.

A associação entre o genótipo X-X-/E+E+ com os níveis de CT, na população caucasóide brasileira de alto risco para DAC, encontrada por GUZMÁN (1998) não está de acordo com os nossos resultados (tabela 29) quando comparamos esse genótipo com os demais, no grupo DAC+ ($p > 0,10$).

HIXSON *et al.* (1992) encontraram associação do alelo *del* do peptídeo sinal da apo B, com níveis elevados de CT e de LDL-C. No presente estudo houve uma tendência de aumento

do nível de CT, com a presença do alelo *ins*, porém como o número de indivíduos portadores do genótipo *del/del* é muito pequeno (N = 5), nossos dados não são suficientes para uma boa comparação nesse sentido.

Os valores médios de CT em relação aos genótipos da apo E apresentaram uma tendência de aumento com a presença do alelo E4 (tabela 31 e figura 28), conforme tem indicado os dados da literatura (UTERMANN, et al., 1979; SING e DAVIGNON, 1985; ETO *et al.*, 1988; EICHNER *et al.*, 1990; XHIGNESSE *et al.*, 1991; XU *et al.*, 1991; HALLMAN *et al.*, 1991; DALLONGEVILLE *et al.*, 1992; EGGERTSEN *et al.*, 1993).

Com relação às variações da ECA e os valores médios de CT, em nosso trabalho não foi encontrada nenhuma correlação positiva, concordando com CAMBIEN *et al.* (1992). Na literatura poucos investigaram a esse respeito, muito provavelmente pelo fato da ECA não participar do metabolismo lipídico, interferindo em DAC através de sua influência na hipertensão.

7 CONCLUSÕES

1. Os dois grupos estudados apresentaram diferenças significativas, quanto aos níveis das variáveis bioquímicas que avaliam o metabolismo lipídico, caracterizando-se muito bem a diferença do perfil lipídico entre os indivíduos com e sem a doença arterial coronariana, respectivamente DAC+ e DAC-.
2. O alelo 36 do 3'VNTR do gene da apo B foi menos freqüente em DAC+ (26,3%) do que em DAC- (38,4%; $\chi^2_{(1)} = 6,38$; $p < 0,05$), entretanto, com a correção de Bonferroni, o valor de p ficou igual a 0,17, perdendo a significância.
3. Não houve diferenças significativas entre as demais freqüências alélicas dos locos estudados, relacionados a: apolipoproteína B (*XbaI*; *EcoRI*; *ins/del* peptideo sinal; 3' VNTR), apolipoproteína E, enzima conversora da angiotensina I (ECA) e fator V da coagulação, quando se compararam os grupos DAC+ e DAC-.
4. A freqüência do haplótipo X+*del* (*XbaI*/peptideo sinal do gene da apo B) apresentou diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 3,97$; $p < 0,05$) entre os dois grupos estudados, sendo mais freqüente em DAC-.
5. Considerando-se o genótipo X-X-/E+E+ (*XbaI/EcoRI* da apo B) e uma outra classe genotípica que englobou todos os demais genótipos, houve diferença significativa ($\chi^2_{(1)} = 6,27$; $p < 0,02$) entre os grupos DAC+ e DAC-. O genótipo X-X-/E+E+ foi mais freqüente no grupo DAC+.

6. A diferença entre as frequências do haplótipo X-E+ em DAC+ e DAC- apenas se aproxima da significância ($p = 0,052$), enquanto a diferença entre as frequências do genótipo X-X-/E+E+ é significativa entre esses dois grupos ($p = 0,012$).

7. Identificamos como marcador positivo da probabilidade de desenvolvimento de doença coronariana em adultos jovens, o genótipo X-X-/E+E+, em relação aos outros genótipos *XbaI/EcoRI*, com uma razão de chance (*odds ratio*) estimada em 3,2 (1,24 a 8,25, com intervalo de confiança de 95%).

8. Nos indivíduos com o genótipo marcador (X-X-/E+E+), quando se comparou o grupo DAC- (N = 6) com o DAC+ (N = 22), a média de HDL-C apresentou diferença estatisticamente significativa: DAC+ = 37 ± 14 mg/dL e DAC- = 53 ± 18 mg/dL ($t = 2,35$; $p < 0,05$). O alto nível relativo de HDL-C em DAC-, mostra-se como um fator protetor, talvez compensando a presença do marcador de DAC. Sugere-se, nesse caso, um tipo de interação gene-gene ou gene-ambiente.

9. Como o alelo X- não implica diferença de aminoácido, supomos que o maior risco associado ao genótipo X-X-/E+E+ poderia ser indicativo da ação de outro gene na etiopatogenia da DAC, cujas variações estejam em desequilíbrio de ligação com aquelas de *XbaI /EcoRI*. Além disso, é possível que o desequilíbrio de ligação seja com alguma variação desconhecida do próprio gene da apo B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTO-SETÄLÄ, K.; GYLLING, H.; HELVE, E. *et al.* Genetic polymorphism of the apolipoprotein B gene locus influences serum LDL cholesterol level in familial hypercholesterolemia. **Hum. Genet.**, v. 82, p. 305-307, 1989.
- AALTO-SETÄLÄ, K.; PALOMAKI, H.; MIETTINEN, H. *et al.* Genetic risk factors and ischaemic cerebrovascular disease: role of common variation of the genes encoding apolipoproteins and angiotensin-converting enzyme. **Ann. Med.**, v. 30, n. 2, p. 224-233, 1998.
- AALTO-SETÄLÄ, K.; TIKKANEN, M. J.; TASKINEN, M.R. *et al.* XbaI and c/g polymorphisms of the apolipoprotein B gene locus are associated with serum cholesterol and LDL-cholesterol levels in Finland. **Atherosclerosis**, v. 74, p. 47-54, 1988.
- ABURATANI, H.; MATSUMOTO A.; ITOH, H. *et al.* A study of DNA polymorphism in the apolipoprotein B gene in a Japanese population. **Atherosclerosis**, v. 72, p.71-76, 1988.
- ALAUPOVIC, P. Apolipoproteins and lipoproteins. **Atherosclerosis**, v. 13, p. 141-149, 1971.
- ANDERSON, V. H., KING III, S.B. Modern approaches to the diagnosis of coronary artery disease. **Am. Heart Journal**, v. 123, n.5, p.1312-1322, 1992.
- ANGELE C.; WELLMANN, T.; THIOUDELLET, C. *et al.* Expression of rat renal gamma-glutamyltransferase cDNA in *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 160, p. 1040-1046, 1989.
- ASAKAWA, J.; TABAHASHI, N.; ROSENBLUM, B.B. *et al.* Two-dimensional gel studies of genetic variation in the plasma protein of Amerindians and Japanese. **Hum. Genet.**, v. 50, p. 222-230, 1985.
- BACHORIK, P.S.; RIFKIND, B.M.; KWITEROVICH, P.O. Lipids and dyslipoproteinemia. In: HENRY, J.B. ed. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 19 ed. W.B. Saunders Company, p. 208-238, 1995.
- BARNI, N.; TALMUD, P.J.; CARLSSON, P. *et al.* The isolation of genomic recombinants for the human apolipoprotein B gene and the mapping of three common DNA polymorphisms of the gene - a useful marker for human chromosome 2. **Hum. Genet.**, v. 73, p. 313-319, 1986.
- BENEDICTIS, G. de; FALCONE, E.; ROSE, G. *et al.* DNA multiallelic systems reveal gene/longevity associations not detected by diallelic systems. The APOB locus. **Hum. Gen.**, v. 99, p. 312-318, 1997.
- BENEDICTIS, G. de; LEONE, O.; FALCONE, E. *et al.* RFLPs of the APOB Gene: comparative study between Greeks and southern Italian peoples. **Human Biology**, v. 65, n. 3, p. 401-411, 1993.

- BERG, K. DNA polymorphism at the apolipoprotein B locus is associated with lipoprotein level. **Clin. Genet.** v. 30, p. 515, 1986.
- BERG, K. Predictive genetic testing to control coronary heart disease and hyperlipidemia. **Arter. Suppl. I**, v. 9, p. I-50- I-58, jan/fev, 1989.
- BERG, K.; POWELL, L.M.; WALLIS, S.C. *et al.* Genetic linkage between the antigenic group (Ag) variation and the apolipoprotein B gene: assignment of the Ag locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 7367-7370, 1986.
- BERTINA, R. M; BOBBY, P.C.; KOELEMAN, T.K. *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**, v. 369, p. 64-67, 1994.
- BLACKHART, B.D.; LUDWIG, E. M.; PIEROTTI, V. R. *et al.* Structure of the human apolipoprotein B gene. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 33, p. 15364-15367, 1986.
- BOERWINKLE, E.; CHAN, L. A three codon insertion/deletion polymorphism in the signal peptide region of the human apolipoprotein B (apo B) gene directly typed by the polymerase chain reaction. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 17, p. 4003-4004, 1989.
- BOERWINKLE, E.; CHEN, S.H.; VISVIKIS, S. *et al.* Signal peptide-length variation in human apolipoprotein B gene: molecular characteristics and association with plasma glucose levels. **Diabetes**, v. 40, p. 1539-1544, 1991.
- BOERWINKLE, E.; UTERMANN, G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 42, p. 104-112, 1988.
- BOERWINKLE, E.; VISVIKIS, S.; WELSH, D. *et al.* The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of the apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability, and covariability of cholesterol, betalipoprotein, and triglycerides in a sample of unrelated individuals. **Am. J. Med. Genet.**, v. 27, p. 567-582, 1987.
- BOHN, M.; BERG K. The *Xba*I polymorphism at the apolipoprotein B locus and risk of atherosclerotic disease. **Clin. Genet.**, v. 46, p. 77-79, 1994.
- BOHN, M.; BAKKEN, A.; ERIKSSEN, J.; BERG, K. *Xba*I polymorphism in DNA at the apolipoprotein B locus is associated with myocardial infarction (MI). **Clin. Genet.**, v. 44, p. 241-248, 1993a.
- BOHN, M.; BERG, K.E.; BAKKEN, A. *et al.* Insertion/deletion polymorphism at the locus for angiotensin I-converting enzyme and myocardial infarction. **Clin. Genet.**, v. 44, p. 292-297, 1993b.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Receptor mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.76, p.3330-3337, 1979.

- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Familial hypercholesterolaemia. In: **The Metabolic Basis of Inherited Disease**, 5^a ed. , J.B. Stanbury, J.B. Wyngarden, D.S. Fredrikson *et al.* eds. New York : McGraw-Hill, p. 672-712, 1983.
- CAMBIEN, F.; POIRIER, O.; LECERF, L. *et al.* Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature**, v. 359, p. 641-644, 1992.
- CHEN, S-H.; HABIB, E.; YANG, C.Y. *et al.* Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. **Science**, Washington, v.238, p. 363-366, 1987.
- CHEN, S-H.; YANG, C.Y.; CHEN, P.F. *et al.* The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 28, 12918-12921, 1986.
- CORBO, R.M.; VILARDO, T.; MANTUANO, E. *et al.* Apolipoproteins B and E, and angiotensin I-converting enzyme (ACE) genetic polymorphisms in Italian women with coronary artery disease (CAD) and their relationships with plasma lipid and apolipoprotein levels. **Clin. Genet.**, v. 52, p. 77-82, 1997.
- DAEMAN, M.J.A.P.; LANBARDI, D.M.; BOSMA, F.T. *et al.* Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. **Circ. Res.**, v. 68, p. 450-456, 1991.
- DAHLBACK, B.; CARLSSON, M.; SVENSSON, P.J. *et al.* Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90: p. 1004-1008, 1993.
- DAHLOF, B.; HANSSON, L. Regression of left ventricular hypertrophy in previously untreated essential hypertension: different effects of enalapril and hydrochlorothiazide. **J. Hypertens.**, v. 10, p. 1513-1524, 1992.
- DALLONGEVILLE J.; LUSSIER-CACAN, S.; DAVIGNON, J. Modulation of plasma triglyceride levels by apo E phenotype: a meta analysis. **J. Lipid. Res.**, v. 33, p. 447-457, 1992.
- DARNFORS, C.; WIKLUND, O.; NILSSON, J. *et al.* Lack of correlation between the apolipoprotein B *Xba*I polymorphism and blood lipid levels in a Swedish population. **Atherosclerosis**, v. 75, p. 183-188, 1989.
- DAS, H.K.; MCPHERSON, J.; BRUNS, G.A.P. *et al.* Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 10, p. 6240-6247, 1985.
- DAVIGNON, J.; GREGG, R.E.; SING, C.F. Apolipoprotein polymorphism and atherosclerosis. **Arteriosclerosis**, v. 8, p. 1-21, 1988.

- DEEB, S; FAILOR, A; BROWN, B.G. *et al.* **Molecular genetics of apolipoprotein and coronary heart disease.** Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 56: 403-409, 1986.
- DEMANT, T.; HOULSTON, R.S.; CASLAKE, M.J. *et al.* Catabolic rate of low density lipoprotein is influenced by variation in the apolipoprotein B gene. **J. Clin. Invest.**, v. 82, p. 797-802, 1988.
- DUNNING, A.M.; RENGES, H.H.; HAMSTEN, A. *et al.* A postulated phylogenetic tree for the human apolipoprotein B gene: unpredicted haplotype are associated with elevated apo B levels. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1165, p. 271-278, 1992.
- DUNNING, A.M; TIKKANEN, M.J.; EHNHOLM, C. *et al.* Relationships between DNA and protein polymorphisms of apolipoprotein B. **Hum. Genet.**, v. 78, p. 325-329, 1988.
- EHNHOLM, C.; LUKKA, M.; KUUSI, T. *et al.* Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. **J. Lipid. Res.**, v. 27, p. 227-235, 1986.
- EICHNER, J.E.; KULLER, L.H.; FERRELL, R.E. *et al.* Phenotypic effects of apolipoprotein structural variation on lipid profiles: III. Contribution of apolipoprotein E phenotype to prediction of total cholesterol, apolipoprotein B, and low density lipoprotein cholesterol in the Healthy Women Study. **Arteriosclerosis**, v. 10, p. 379-385, 1990.
- EICHNER, J.E.; KULLER, L.H.; ORCHARD, T.J. *et al.* Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 71, p. 160-165, 1993.
- ETO, M. Familial hypercholesterolemia and apolipoprotein E4. **Atherosclerosis**, v. 72, p. 123-128, 1988.
- EVANS, A.E.; ZHANG, W.; MOREEL, J.F.R. *et al.* Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy Chinese men. **Hum. Genet.**, v. 92, p. 191-197, 1993.
- EXCOFFIER, L.; SCHNEIDER, S; KUEFFER, J.M.; ROESSLI, D. Arlequin: versão 1.1. Geneva, 1997. Capturado em 1998 pela <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>.
- FARHY, R.D.; HO, K.L; CARRETERO, O. A. *et al.* Kinins mediate the antiproliferative effect of ramipril in rat carotid artery. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 182, p. 283-288, 1992.
- FERNS, G.A.A.; ROBINSON, D.; GALTON, D.J. DNA haplotypes of the human apolipoprotein B gene in coronary atherosclerosis. **Hum. Genet.**, n. 81, p. 76-80, 1988.
- FRANCO, R.F.; ELION, J.; SIDNEY, E.B. *et al.* Heterogeneous ethnic distribution of the factor V Leiden mutation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 2, p. 143-145, 1999.

- FREDRICKSON, D.S.; MORGANROTH, J.; LEVY, R.I. Type III hyperlipoproteinemia: an analysis of two contemporary definitions. **Ann. Intern. Med.**, v. 150, p. 157, 1975.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Chin. Chem.**, v.18, p. 499-502, 1972.
- FRIELD, W.; LUDWIG, E.H.; PAULWEBER, B. *et al* . Hypervariability in a minisatellite 3' of the apolipoprotein B gene in patients with coronary heart disease compared with normal controls. **J. Lipid. Res.**, v. 31, p. 659-665, 1990.
- GAJRA, B.; CANDLISH, J.K.; HENG, C.K. *et al* . Genotype associations among seven apolipoprotein B polymorphisms in a populations of Orang Asli of Western Malaysia. **Hum. Biol.**, n. 69, p. 629-640, 1997.
- GENEST, J.J.; ORDOVAS, J.M.; MCNAMARA, J.R. *et al* . DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 82, p. 7-17, 1990.
- GLISIC, S.; SAVIC, I.; ALAVANTINC, 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. **Genet. Epidemiol.**, v. 12, p. 499-508, 1995.
- GUZMÁN, Elizabeth Cecília Rodrigues. **Polimorfismo genético da apolipoproteína B em indivíduos com perfil lipídico de alto risco para doenças cardiovasculares**. São Paulo, 1998. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Pós-Graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo.
- HALLMAN, D.M.; BOERWINKLE, E.; SAHA, N. *et al* . The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. **Am. J. Hum. Genet.** v. 49, p. 338-349, 1991.
- HANSEN, P.S; GERDES, L.; KLAUSEN, L.C. *et al* . Polymorphisms in the apolipoprotein B-100 gene contributes to normal variation in plasma lipids in 464 Danish men born in 1948. **Hum. Genet.**, n. 91, p. 45-50, 1993.
- HEGELE, R.A.; YOUNG, T.K.; CONNELLY, P.W. Are Canadian Inuit at increased genetic risk for coronary heart disease? **J. Mol. Med.**, v. 75, p. 364-370, 1997.
- HEGELE, R.A; HUANG, L.; HERBERT, P.N. *et al* . Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. **N. Engl. J. Med.**, v. 315, p. 1509-1515, 1986.
- HELIÖ, T; LUDWIG, E.H; PALOTIE, A. *et al* . Apolipoprotein B gene 3'hypervariable region polymorphism and myocardial infarction in dyslipidemic Finnish men participating in a primary prevention trial. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 1, p. 178-182, 1991.

- HELIÖ, T; PALOTIE, A.; TÖTTERMAN, K.J. *et al.* Lack of association between the apolipoprotein B gene 3' hypervariable - region alleles and coronary artery disease in Finnish patients with angiographically documented coronary artery disease. **J. Int. Med.**, v. 23, p. 49-57, 1992.
- HIXSON, J.E.; MCMAHAN, C.A.; MCHILL, J.R. *et al.* Apo B insertion/deletion polymorphisms are associated with atherosclerosis in young Black but not young White males. **Artherosclerosis and Thrombosis**, v. 12, p. 1023-1029, 1992.
- HIXSON, J.E.; POWERS, P. K.; MCMAHAN, C.A. The human apolipoprotein B 3' hypervariable region: detection of eight new alleles and comparisons of allele frequencies in Blacks and Whites. **Hum. Genet.**, n. 91, p. 475-479, 1993.
- HIXSON, J.E.; VERNIER, D.T. Restriction of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha*I. **J Lip. Res.** v. 31, p. 545-548, 1990.
- HONG, S.H.; KANG, B.Y.; PARK, W.H. *et al.* Genetic variation of the angiotensin-converting enzyme gene: increased frequency of the insertion allele in Koreans. **Clin. Genet.**, v. 51, p. 35-38, 1997.
- HOSNER, D.W.; LEMESHOW Jr., S. **Applied Logistic Regression**. John Wiley & Sons, Inc., 1989, p. 44.
- HOULSTON, R.S.; TURNER, P.R.; REVILL, J. *et al.* The fractional catabolic rate of low density lipoprotein in normal individuals is influenced by variation in the apolipoprotein B gene. **Atherosclerosis**, v. 71, p. 81-85, 1988.
- HUANG, L.S.; BRESLOW, J. A unique AT-rich hypervariable minisatellite 3'to the apo B gene defines a high information restriction fragment polymorphism. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 8952-9855, 1987.
- HUMPHRIES, S.E. DNA polymorphisms of the apolipoprotein genes - their use in the investigation of genetic component of hyperlipidaemia in atherosclerosis. **Atherosclerosis**; v. 72, p. 89-108, 1988.
- HUMPHRIES, S.E.; DUNNING, A.; XU, C.F. *et al.* DNA polymorphism studies. Approaches to elucidating multifactorial ischaemic heart disease: The apo B gene as an example. **Annals of Medicine**, n. 24, p. 349-356, 1992.
- INNERARITY, T.L.; MAHLEY, R.W. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. **Biochemistry**, v. 17, p. 1440-1447, 1978.
- JAIN, R.S.; QUARFORDT, S.H. The carbohydrate content of apolipoprotein E from human very low density lipoproteins. **Life Sci.**, v. 25, p. 1315-1323, 1979.
- JAN DANSER, A.H.; SCHALEKAMP, M.A.D.H.; BAX, W.A. *et al.* ACE in the human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism. **Circulation**, v. 92, p. 1387-1388, 1995.

- JEUNEMAITRE, X.; LIFTON, R.P.; HUNT, S.C. *et al.* Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. **Nature Genet.**, p. 72-75, 1992.
- JUVONEN, T.; SAVOLAINEN, M.J.; KAIRALUOMA, M.L. *et al.* Polymorphisms at the apoB, apoA-I, and cholesteryl ester transfer protein gene loci in patients with gallbladder disease. **J. Lipid. Res.**, v. 36, p. 804-812, 1995.
- KAMBOH, M.I.; FERRELL, R.E. Genetic studies of human apolipoproteins. XV. An overview of IEF immuno - blotting methods to screen apolipoprotein polymorphisms. **Hum. Hered.**, v. 40, p. 193-207, 1990.
- KAMMERER, C.M.; VANDEBERG, J.L.; HAFFNER, S.M. *et al.* Apolipoprotein B (apo B) signal peptide length polymorphisms are associated with apo B, low density lipoprotein cholesterol, and glucose levels in Mexican Americans. **Atherosclerosis**, n. 120, p. 37-46, 1996.
- KANE, J.P.; HAVEL, R.J. Disorders of biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: STANBURY, J.B., WYNGARDEN, J.B., FREDRIKSON, D.S.GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. **The metabolic basis of inherited disease**, 6 ed., New York : McGraw-Hill, 1994.p.1853-1885.
- KAO, J.T.; TSAI, K.S.; CHANG, C.J. *et al.* The effects of apolipoprotein E polymorphism on the distribution of lipids and lipoproteins in the Chinese population. **Atherosclerosis**, v. 114, p. 55-59, 1995.
- KATO, H.; SUZUKI, H.; TAJIMA, S. *et al.* Angiotensin 2 stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. **J. Hypertens**, v. 9, p. 17-22, 1991.
- KAYS, A.; KIMURA, N.; KUSUNAWA, A. *et al.* Lessons from serum cholesterol studies in Japan, Hawaii, and Los Angeles. **Ann. Intern. Med.**, v. 48, p. 83, 1958.
- KLASEN, E.C.; SMIT, M.; DE KNIJFF, P.; *et al.* Apolipoprotein E phenotype and gene distribution in the Netherlands. **Hum. Hered**, v. 37, p. 340-344, 1987.
- KNOTT, T.J.; PEASE, R.J.; POWELL, L.M. *et al.* Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. **Nature**, v. 323, p. 724, 1986a.
- KNOTT, T.J.; RALL, S.C.; INNERARITY, T.L. *et al.* Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. **Science**, v. 230, p. 37-43, 1985.
- KNOTT, T.J.; WALLIS, S.C.; PEASE, R.J. *et al.* A hypervariable region 3' the human apolipoprotein B gene. **Nucleic. Acid. Res.**, v. 14, p. 9215-9216, 1986b.
- LALAZAR, A.; WEISGRABER, K.H.; RALL, S.C. *et al.* Site-specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 3542-3545, 1988.

- LAW, S.W.; GRANT, S.M.; HIGUCHI, K. *et al.* Human liver apolipoprotein B-100 cDNA: complete nucleic acid sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 8142, 1986a.
- LAW, A.; POWELL, L.M.; BRUNT, H. *et al.* Common DNA polymorphism within coding sequence of apolipoprotein B gene associated with altered lipid levels. **The Lancet**; v. 1, p.1301, 1986b.
- LINDPAINTNER, K; PFEFFER, M.A ; KREUTZ, R. *et al.* A prospective evaluation of an angiotensin- converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 332-706, 1995.
- LUDWIG, E.H.; BLACKHART, B.D.; PIEROTTI, V.R. *et al.* DNA sequence of the human apolipoprotein B gene. **DNA**, v. 6, p. 363-372, 1987.
- LUDWIG, E.H; FRIELD. W; McCARTHY, B.J. High resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene. **Am. J. Hum. Genet.**, n. 45, p.458- 64, 1989.
- LUDWIG, E.H; McCARTHY, B.J. Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apo lipoprotein B100. **Am. J. Hum. Genet.**, n 47, p. 712-720, 1990.
- LUSIS, A.J. Genetic factors affecting blood lipoproteins: the candidate gene approach. **J. Lipid. Res.**, v. 29, p. 397, 1986.
- MA, Y.; SCHUMAKER, V.; BÜTLER, R. *et al.* Two DNA restriction fragment length polymorphisms associated with Ag(tz) and Ag(cg) antigenic sites of human apolipoprotein B. **Arteriosclerosis**, v. 71, p. 301-305, 1987.
- MACHADO, Marcos de Oliveira. **Polimorfismo genético da apolipoproteína B em indivíduos com doença cardíaca isquêmica.** São Paulo, 1997. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Farmácia.
- MAHLEY, R.W. Apolipoprotein E : cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, v. 240, p. 622-630, 1988.
- MAHLEY, R.W.; HUANG, Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 10, p. 207-217, 1999.
- MAHLEY, R.W.; JI, Z.S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. **J. Lipid. Res.**, v. 40, n. 1-16, 1999.
- MAJOR, R H. **Classic Descriptions of Disease.** 3rd.ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, p. 428-431, 1978.
- MANSUR, Antonio de Padua. **Análise dos genótipos das apolipoproteínas AI, B, E, enzima conversora da angiotensina e dos fenótipos de Lewis nos pacientes com síndromes coronárias estável e instável.** São Paulo, 1998. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

- MARIN, G.B.; TAVELLA, M. H.; GUERREIRO, J.F.; SANTOS S.E.B.; ZAGO M.A. Absence of the E2 allele of apolipoprotein in Amerindians. **Revista Brasileira de Genética**, v. 20: 741-743, 1997.
- MARMOT, M.G; SYME, S.L; KAGAN, A. *et al.* Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: Prevalence of coronary and hypertensive heart disease and associated risk factors. **Am. J. Epidemiol.**, v. 102, p. 514, 1975.
- MARSHALL, H.W.; MORRISON, L.C.; WU, L.L. *et al.* Apolipoprotein polymorphisms fail to define risk of coronary artery disease. Results of a prospective, angiographically controlled study. **Circulation**, v. 89: 567-577, 1994.
- MÄRZ, W.; SEYDEWITZ, H.; WINKELMANN, B. *et al.* Mutation in coagulation factor V associated with resistance to activated protein C in patients with coronary artery disease. **The Lancet**, v. 345, p. 526-527, 1995.
- MATTU, R.K.; NEEDHAM, E.W.A.; GALTON, D.J. *et al.* A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly Heart Study. **Circulation**, v. 91, p. 270-274, 1995.
- MENZEL H.J.; KLADETZKY, R.G.; ASSMANN, G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. **Arteriosclerosis**, v. 3, p. 310-315, 1983.
- MONSALVE, M.V; YOUNG, R.; JOBSIS, J. *et al.* DNA polymorphisms of the gene for apolipoprotein B in patients with peripheral arterial disease. **Atherosclerosis**, v. 70, p. 123-129, 1988.
- MYANT, N.B.; GALLAGHER, J.; BARBIR, M. *et al.* Restriction fragment length polymorphism in the apo B gene relation to coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 71, p. 193-201, 1989.
- NIEMINEN, M.S.; MATTILA, K.J.; AALTO-SETÄLÄ, K. *et al.* Lipoproteins and their genetic variation in subjects with and without angiographically verified coronary artery disease. **Arteriosclerose and Thombosis**, v. 12, p. 58-69, 1992.
- O'DONNELL, C.J.; LINDPAINNER, K.; LARSON, M.G. *et al.* Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 97, n. 18, p. 1766-1772, 1998.
- OIKE, Y.; HATA, A.; OGATA, Y. *et al.* Angiotensin converting enzyme as a genetic risk factor for coronary artery spasm. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 2975-2979, 1995.
- PAIK, Y.K.; CHANG, D.J.; REARDON, C.A. *et al.* Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 3445-3449, 1985.
- PAJUKANTA, P.E.; VALSTA, L. M.; ARO, A. *et al.* The effects of the apolipoprotein B signal peptide (ins/del) and *Xba*I polymorphism on plasma lipid response to dietary change. **Atherosclerosis**, v. 122, p. 1-10, 1996.

- PAN, J.; CHIANG, A.; TAI, J.J.; WANG, S.; CHANG, M. Restriction fragment length polymorphisms of apolipoprotein B gene in Chinese population with coronary heart disease. **Clin. Chem.**, v. 41, p. 424-429, 1995.
- PASAGIAN-MACAULAY, A.; ASTON, C.E.; FERRELL, R.E. A dietary and behavioral intervention designed to lower coronary heart disease. Risk factors are unaffected by variation at the APOE gene locus. **Atherosclerosis**, v. 132, p. 221-227, 1997.
- PAULWEBER, B.; FRIELD, W.; KREMPLER, F. *et al.* Association of DNA polymorphism at the apolipoprotein B gene locus with coronary heart disease and serum very low density lipoprotein levels. **Arteriosclerosis**, v. 10, p. 17-24, 1990.
- PEACOCK, R.; DUNNING, A.; HAMSTEN, A. *et al.* Apolipoprotein B gene polymorphism, lipoproteins and coronary atherosclerosis: a study of young myocardial infarction survivors and healthy population-based individuals. **Atherosclerosis**, v. 92, p. 151-164, 1992.
- PELC, L.R.; GROSS, G.J.; WARLTIER, D.C. Mechanisms of coronary vasodilation produced by bradykinin. **Circulation**, v. 873, p. 2048-2056, 1991.
- POWELL, J.S.; CLOZEL, J.P.; MULLER, R.K.M. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme myointimal proliferation arter vascular injury. **Science**, v. 245, p. 186-188, 1989.
- PRIESTLEY, L.; KNOTT, T. WALLIS, S. *et al.* RFLP for the human apolipoprotein B gene. **Nucleic. Acids Res.**, v. 13, p. 6793, 1985.
- PROHASKA, W.; MANNEBACH, H.; SCHMIDT, M. *et al.* Evidence against heterozygous coagulation factor V 1691 G-A mutation with resistance to activated protein C being a risk factor for coronary artery disease and myorcardial infarctation. **J. Mol. Med.**, v. 73, p. 521-524, 1995.
- PROTTER, A. A.; HARDMAN, D.A.; SATO, K.Y. Analysis of cDNA clones encoding the entire B-26 region of human apolipoprotein B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 5678-5682, 1986.
- RALL JUNIOR, S.C.; WEIGRABER, K.H.; MAHLEY, R.W. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 2518-2521, 1982.
- RANDALL, L.L.; HARDY, S.J.S. Unity in function in the absence of consensus in sequence: role of leader peptides in export . **Science**, v. 243, p. 1156-1159, 1989.
- RÉGIS-BAILLY, A.; VISVIKIS, S.; STEINMETZ, J. *et al.* Frequencies of five genetic polymorphisms in coronarographed patients and effects on lipid levels in a supposedly healthy population. **Clin. Genet.**, v. 50, p. 339-347, 1996.
- RENGES, H.H.; PEACOCK, R.; DUNNING, A.M. *et al.* Genetic relationship between the 3'VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphisms: haplotype analysis in individuals of European and South Asian origin. **Ann. Hum. Genet.**, v. 56, p. 11-33, 1992.

- RENGES, H.H.; WILE, D.B.; MCKEIGUE, P.M. *et al* . Apolipoprotein B gene polymorphisms are associated with lipid levels in men of South Asian descent. **Atherosclerosis**, v. 91, p. 267-275, 1991.
- RIDKER, P. M.; HENNEKENS, C.H.; LINDPAINNER, K. *et al*. Mutation in the gene coding for coagulation Factor V and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 14, p. 912-917, 1995.
- RIGAT, B.; HUBERT, C.; ALHENC-GELAS, F. *et al*. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 1343-1346, 1990.
- RIGAT, B.; HUBERT, C.; CORVOR, P. *et al*. PCR detection of insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxipeptidase 1). **Nucleic. Acids. Res.**, v. 20, p. 1433. 1992.
- ROSENDALL, F.R.; SISCOVICK, D.S.; SCWARTS, S.M. *et al*. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. **Blood**, v. 80, p. 2817-2821, 1997.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S. *et al*. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.
- SAHA, N.; TAY, J.S.H.; CHEW, L.S. *et al*. Influence of apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism on serum lipids and apolipoprotein in a Chinese population. **Clin. Genet.**, n. 41, p. 152-156, 1992a.
- SAHA, N.; TONG, M.C.; TAY, J.S.H. *et al*. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in Chinese coronary artery disease patients. **Clin. Genet.**, v. 42, p. 164-170, 1992b.
- SANDHOLZER, C.; DELPORT, R.; VERMAAK, H. High frequency of the apo E4 allele in Khoi San from South Africa. **Hum. Genet.**, v. 95, p. 46-48, 1995.
- SCHEER, W.D.; BROUDEAU, D.A.; MALCON, G.T. *et al*. Apolipoprotein E and atherosclerosis in Alaska Natives. **Atherosclerosis**, v. 114, p. 197-202, 1995.
- SCHMIDT, S.; HOOFT, van I. M.S.; GROBBEE, D.E. *et al*. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. **Journal Hypertension**, v. 11, p. 345-348, 1993.
- SERIES, J.; CAMERON, I.; CASLAKE, M. *et al*. The *Xba*I polymorphism of the apolipoprotein B gene influences the degradation of low density lipoprotein in vivo. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1003, p. 183-188, 1989.
- SHANMUGAM, V.; SELL, K.W.; SAHA, B.K. Mistyping ACE heterozygotes. **PCR Methods Appl.**, v. 3, p. 120-121, 1993.

- SHOULDERS, C.C.; MYANT, N.B.; SIDOLI, A. *et al.* Molecular cloning of human LDL-apolipoprotein B cDNA. Evidence for more than one gene per haploid genome **Atherosclerosis**, v. 58, p. 277-292, 1985.
- SING, C.F.; DAVIGNON, J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 37, p. 268-285, 1985.
- SINGER, D.R.J.; MISSOURIS, C.G.; JEFFERY, S. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism: what to do about all the confusion? **Circulation**, v. 94, n. 3, p. 236-239, 1996.
- SOUBRIER, F.; JEUNEMAITRE, X.; RIGAT, B. *et al.* Similar frequencies of renin gene restriction fragment length polymorphisms in hypertensive and normotensive subjects. **Hypertension**, v. 16, p. 712-717, 1990.
- SOUBRIER, K.E.; ALHENC-GELAS, F.; HUBERT, C. *et al.* Two putative active centers in human angiotensin I converting enzyme revealed by molecular cloning. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 9386-9390, 1988.
- STEPANOV, V. A.; PUZYREV, V.P. Apolipoprotein B polymorphism in Russian population. **Hum. Biol.**, v. 66, p. 527-531, 1994.
- TALMUD, P.J.; BARNI, N.; KESSLING, A.M. *et al.* Apolipoprotein B gene variants are involved in the determination of serum cholesterol levels: a study in normo and hyperlipidaemic individuals **Atherosclerosis**, v. 67, p. 81-89, 1987.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Single sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, p. 4127-4138, 1984.
- TIKKANEN, M.J.; HELIÖ, T. From Ag phenotyping to molecular genetics: apolipoprotein B, serum lipid levels and coronary artery disease in Finland. **Clin. Genet.**, v. 46, p. 71-76, 1994.
- TIKKANEN, M.J.; XU, C.F.; HÄMÄLÄINEN, T. *et al.* *Xba*I polymorphism of the apolipoprotein B gene influences plasma lipid response to diet intervention. **Clin. Genet.**, v. 37, p. 327-334, 1990.
- TIRET, L.; RIGAT, B.; VISVIKIS, S. *et al.* Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 51, p. 197-205, 1992.
- TRUETT, J.; CORNFIELD, J.; KANNEL, W.A. A multivariate analysis of the risk of coronary heart disease in Framingham. **J. Chrons. Dis.**, v. 20, p. 511-524, 1967.
- TURNER, P.R.; TALMUD, P.J.; VISVIKIS, S. *et al.* DNA polymorphisms of the apoprotein B gene are associated with altered plasma lipoprotein concentrations but not with perceived risk of cardiovascular disease: European Atherosclerosis Research Study. **Atherosclerosis**, v. 116, p. 221-234, 1995.

- TYBJAERG-HANSEN, A.; NORDESTGAARD, B.G.; GERDES, L.U. *et al.* Variation of apolipoprotein B gene is associated with myocardial infarction and lipoprotein levels in Danes. **Atherosclerosis**, v. 89, p. 69-81, 1991.
- UTERMANN, G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. **Am. Heart J.**, v. 113, p. 433-440, 1987.
- UTERMANN, G.; HARDEWIG, A.; ZIMMER, F. Apolipoprotein E phenotypes in patients with myocardial infarction. **Hum. Genet.**, v. 65, p. 237-241, 1984.
- UTERMANN, G.; HESS, M.; STEINMETZ, A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. **Nature**, v. 269, p. 604-607, 1977.
- UTERMANN, G.; PRUIN, N.; STEINMETZ, A. Polymorphism of apolipoprotein E. III Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. **Clinical Genetics**, v. 15, p. 63-72, 1979.
- VAN BOCKXMEER, F.M.; BAKER, R.I.; TAYLOR, R.R. Premature ischaemic heart disease and the gene for coagulation factor V. **Nature Medicine**, v. 1, n. 3, 1995.
- VISVIKIS, S.; CHAN, L.; SIEST, G. *et al.* An insertion deletion polymorphism in the signal peptide of the human apolipoprotein B gene. **Hum. Genet.**, v. 84, p. 373-375, 1990.
- VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. **Human genetics: problems and approaches**. 3^a ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1997. 851 p.
- WARDELL, M.R.; BRENNAN, S.D.; JANUS, E.D. *et al.* Apolipoprotein E2-Christchurch (136 Arg-Ser), new variant of human apolipoprotein E in a patient with type III hyperlipoproteinemia, **Clin. Invest.**, v. 80, p. 483-490, 1987.
- WEISGRABER, K. H., RALL JUNIOR, S.C.; MAHLEY, R.W. Human E apoprotein heterogeneity : cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of apo E isoforms. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 9077-9083, 1981.
- WIEMER, G.; SCHOLKENS, B.A.; BECKER, R.H.A. *et al.* Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. **Hypertension**, v. 18, p. 558-563, 1991.
- WIKLUND, O.; DARNFORS, C.; BJURSELL, G. *et al.* XbaI restriction fragment length polymorphism of apolipoprotein B in Swedish myocardial infarction patients. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 19, p. 255-258, 1989.
- WYMAN, A.R.; WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 6754-6758, 1980.
- XHIGNESSE, M.; LUSSIER-CACAN, S.; SING, C.F. *et al.* Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of metabolism in a sample selected for health. **Arterioscler. Thromb.**, 11, p. 1100-1110, 1991.

- XU, C-F.; TALMUD, P.I.; ANGELICO, F. *et al.* Apolipoprotein E polymorphism and plasma lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels in Italian children. **Genetic Epidemiology**, v. 8, p. 389-98, 1991.
- XU, C-F.; BOERWINKLE, F.; TIKKANEN, M.J. *et al.* Genetic variation at the apolipoprotein gene loci contribute to response of plasma lipids to dietary change. **J. Genet. Epidemiol.**, v. 7, p. 261-275, 1990a.
- XU, C-F.; TIKKANEN, M.J.; HUTTUNEN, J.K. *et al.* Apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion polymorphism is associated with Ag epitopes and involved in the determination of serum triglyceride levels. **J. Lipid. Res.**, v. 31, p. 1255, 1990b.
- YANG, C.Y.; CHEN, S.H.; GIANTURCO, S.H. *et al.* Sequence, structure, receptor binding domains, and internal repeat of human apolipoprotein B-100. **Nature**, v. 323, p. 738-742, 1986.
- YE, P.; BAOSHENG, C.; WANG, S. Association of polymorphisms of the apolipoprotein B gene with coronary heart disease in Han Chinese. **Atherosclerosis**, v. 117, p. 43-50, 1995.
- ZAGO, M.A.; SILVA JUNIOR, W.A.; TAVELLA, M.H. *et al.* Interpopulational and intrapopulational genetic diversity of Amerindians as revealed by six variable number of tandem repeats. **Hum. Hered.**, v. 46, p. 274-289, 1996.
- ZANNIS, V.I. Genetic polymorphism in human apolipoprotein E. In: SEGREST, J.P.; ALBERS, J.J. (eds). **Methods in Enzymology**, Academic Press, Orlando, Florida, v. 128, p. 823-851, 1986.
- ZANNIS, V.I.; BRESLOW, J.L. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and post-translational modification. **Biochemistry**, v. 20, p 1033-1041, 1981.
- ZANNIS, V.I.; JUST, P. W.; BRESLOW, J.L. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. **Am. J. Human. Genet.**, v. 33, p. 11-24, 1981.