

Estudo da influência da variabilidade em genes de apolipoproteínas sobre níveis lipídicos e parâmetros de massa e gordura corporal na população de Porto Alegre.

Marilu Fiegenbaum

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Mara Helena Hutz

Porto Alegre, 2001.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mara H. Hutz pela orientação durante estes anos e também pela amizade.

À Dra. Sídia Maria Callegari-Jaques, por sempre estar disponível para ajudar em problemas estatísticos e também pela apresentação à "análise fatorial".

À Fabiana de Andrade, Silvana de Almeida e Marcel Arsand pela coleta da amostra na Faculdade de Farmácia.

À Vanessa Mattevi e André F. Vargas pela coleta da amostra no HCPA.

À todo pessoal dos laboratórios de eletroforese e de DNA pela amizade e bom humor durante o trabalho.

Ao André por todo apoio no laboratório.

À Silvana, pela indicação deste local para trabalhar.

Aos amigos Bia, Bina, Fabi, Sil e Vanessa pelas diárias "hora do café", pela ajuda em todos os sentidos e também pela amizade.

Aos demais amigos feitos neste Departamento.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, todo suporte durante a minha formação e confiança depositada em mim.

À minha irmã, pelo amor e por todos os momentos que passamos juntas.

Ao meu namorado, por sempre estar ao meu lado e ser visitante constante deste Departamento.

À minha segunda família, Sandra e Miguel, por terem me adotado como uma filha e não uma nora.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

As pesquisas realizadas no Laboratório de DNA e Eletroforese do Departamento de Genética da UFRGS são financiadas pelo CNPq, FINEP, PRONEX, FAPERGS e FIPE-HCPA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	06
1.1. Metabolismo de Lipídeos	06
<i>Considerações iniciais</i>	06
<i>Como ocorre o metabolismo de lipídeos?</i>	07
1.2. Níveis lipídicos e seus fatores determinantes	09
1.3. A distribuição das apolipoproteínas no genoma humano.....	11
1.4. O papel das apos C-I, C-II, C-III e A-IV no metabolismo lipídico	12
<i>Apolipoproteína C-I</i>	12
<i>Apolipoproteína C-II</i>	13
<i>Apolipoproteína C-III</i>	15
<i>Apolipoproteína A-IV</i>	16
1.5. Influência da variabilidade dos genes das apos C-I, C-II, C-III e A-IV, nos níveis de lipídeos plasmáticos	18
<i>Apolipoproteína C-I</i>	19
<i>Apolipoproteína C-II</i>	20
<i>Apolipoproteína C-III</i>	20
<i>Apolipoproteína A-IV</i>	23
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Amostra	27
3.2. Dosagens bioquímicas e medidas antropométricas	28
3.3. Análise dos polimorfismos.....	28
3.4. Análise estatística	30
3.4.1. Frequências gênicas e haplotípicas, comparação de frequências e desequilíbrio de ligação	30
3.4.2. Fatores determinantes e ajuste das variáveis lipídicas e antropométricas	31
3.4.3. Análise de variância e delineamento fatorial	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Análise descritiva da amostra	33
4.2. Frequência dos RFLPs.....	34

4.2.1. Freqüências na amostra total.....	34
4.2.2. Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos	35
4.2.3. Freqüências de acordo com os níveis de colesterol total (CT) e de triglicérides (TG).....	36
4.2.4. Freqüências de acordo com as variáveis antropométricas	39
4.3. Influência dos polimorfismos sobre os níveis lipídicos	42
<i>Apolipoproteína C-I</i>	42
<i>Apolipoproteína C-II</i>	50
<i>Apolipoproteína C-III</i>	51
<i>Apolipoproteína A-IV</i>	55
4.4. Influência da variabilidade da apo A-IV sobre variáveis antropométricas	57
5. DISCUSSÃO	62
5.1. Efeito da variabilidade em genes de apolipoproteínas sobre variáveis lipídicas	62
5.1.1. Efeito sobre os níveis de triglicérides	62
5.1.2. Efeito sobre os níveis de HDL colesterol	64
5.1.3. Efeito sobre os níveis de colesterol total e LDL colesterol	65
5.2. Efeito da variabilidade da apo A-IV sobre variáveis antropométricas	67
5.3. Importância de interações gene-ambiente	69
6. RESUMO E CONCLUSÕES	71
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS	75
8. BIBLIOGRAFIA	79
ANEXOS	92
Anexo 1	93
Anexo 2	94
Anexo 3	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Apo: apolipoproteína
ANOVA: análise de variância
CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol
CO: contraceptivos orais
CT: colesterol total
DAC: doença arterial coronariana
H: horas
HDL: lipoproteína de alta densidade
HDL-C: HDL colesterol
HTG: hipertrigliceridemia
IDL: lipoproteína de densidade intermediária
IMC: índice de massa corporal
IRE: elemento de resposta à insulina
LCAT: enzima lecitina-colesterol aciltransferase
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LDL-C: LDL colesterol
LDL-R: receptor de LDL
LPL: enzima lipoproteína lipase
LRP: proteína relacionada ao receptor de LDL
LTR: lipoproteína rica em triglicerídeos
NCEP: National Cholesterol Education Program
OMS: Organização Mundial da Saúde
PCR: reação em cadeia da polimerase
PYY: peptídeo gama-gama
RFLP: polimorfismo de tamanhos de fragmento de restrição
SNC: sistema nervoso central
SR-BI: receptor de HDL (scavenger receptor class B type I)
TG ou Tri: triglicerídeos
TRC: transporte reverso de colesterol
U: unidades
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade
WHR: relação cintura/quadril

1. INTRODUÇÃO

1.1. METABOLISMO DE LIPÍDEOS

Considerações iniciais

Os lipídeos podem ser obtidos de duas maneiras: a partir da dieta ou sintetizados *de novo*. O principal local de síntese é o fígado, mas outros locais, como o intestino também produzem quantidades apreciáveis. Este aporte lipídico endógeno e exógeno pode ser transportado para os seus sítios de estocagem (fígado e tecido adiposo) ou ser usado como fonte imediata de energia (STRYER, 1987; WEISS, 1993).

Como os lipídeos são moléculas apolares e insolúveis em água precisam ser transportados ativamente pela corrente sanguínea até os tecidos alvo, o que é realizado na forma de lipoproteínas, que são classificadas segundo a sua densidade e constituição. A estrutura e a composição destas lipoproteínas são enzimaticamente reguladas e, de forma geral, são formadas por uma parte central de lipídeos hidrófobos circundada por uma capa de lipídeos polares e proteínas, denominadas apolipoproteínas (apos). Várias apolipoproteínas já foram caracterizadas e cada lipoproteína contém uma ou mais destas proteínas, que tem como função proporcionar estabilidade estrutural, solubilizar os lipídeos altamente hidrófobos, servir como ligantes para receptores celulares ou agir como co-fatores para enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas (STRYER, 1987; WEISS, 1993; WITZTUM, 1996).

Como ocorre o metabolismo de lipídeos?

Durante a última década, grandes avanços foram feitos em relação ao conhecimento dos papéis das apolipoproteínas, receptores, enzimas e proteínas de transporte na modulação do metabolismo lipídico. Por esta razão, para melhor compreensão, esta rota metabólica pode ser dividida em dois grandes subgrupos: o metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (origem endógena e exógena) e o transporte reverso do colesterol.

O Metabolismo de Lipoproteínas Ricas em Triglicerídeos

Em sociedades industrializadas, o consumo diário de colesterol e fosfolipídeos é de 0,2 a 0,5 g e 2 a 3 g, respectivamente. Estes valores são bem menores quando comparados com a quantidade de triglicerídeos que é ingerida, que é de 60 a 150 g/dia, o que torna o metabolismo deste lipídeo o mais abundante no homem (MONTGOMERY e cols., 1996).

Após a ingestão de gordura, os triglicerídeos e o colesterol livre são absorvidos nas células intestinais como ácidos graxos e colesterol livre. Dentro das células da mucosa intestinal, os ácidos graxos são reesterificados e, juntamente com o colesterol, incorporados no cerne de uma partícula nascente de *quilomícron*, que assume um diâmetro variável de 80 a 500 nm. Sua densidade é muito baixa ($<0,94\text{g/cm}^3$) porque são ricos em triglicerídeos e têm um teor protéico menor do que 2%. As apolipoproteínas ligadas aos quilomícrons são a apo A-I, apo A-II, apo A-IV e apo B-48. Os quilomícrons entram no plasma, onde são incorporados também as apos C-II, C-III e E. A apo C-II capacita a enzima lipoproteína lipase (LPL) a hidrolisar os triglicerídeos em partículas menores, liberando os ácidos graxos para absorção nos tecidos periféricos. A lipoproteína lipase se liga a células endoteliais e as apos Cs são perdidas neste processo, resultando em partículas conhecidas como *quilomícrons remanescentes*, que são menores e contêm muitas cópias de apo E. Elas possuem uma meia-vida curta (cerca de alguns minutos) e são removidas rapidamente, pois são reconhecidas, ligadas e absorvidas pelo receptor de LDL (LDL-R) e proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP) nos hepatócitos (STRYER, 1987; WEISS, 1993; MONTGOMERY e cols., 1996; WITZTUM, 1996).

Os triacilgliceróis sintetizados endogenamente, diferentemente daqueles obtidos da dieta, são transportados pelas *lipoproteínas de muito baixa densidade* (VLDL), produzidas primariamente no fígado. As apolipoproteínas presentes na superfície das partículas de VLDL são a apo B-100, apo E, apo C-I, apo C-II e apo C-III, sendo a primeira principal e indispensável à secreção de VLDL. Quando as VLDL circulam, seu conteúdo de triglicerídeos é hidrolisado pela enzima lipoproteína lipase (LPL), que está ligada ao endotélio dos capilares e da mesma forma que nos quilomícrons, é ativada pela apo C-II ligada a partícula de VLDL. Os ácidos graxos liberados podem entrar nos adipócitos, onde são reesterificados e armazenados como triglicerídeos, ou nos músculos, onde são oxidados para produção de energia. A partícula residual de VLDL, rica em ésteres de colesterol, agora é considerada uma *lipoproteína de densidade intermediária* (IDL) e possui dois destinos: metade delas é captada pelo fígado, onde é removida pelo receptor de LDL, enquanto que a outra metade é convertida em *lipoproteína de baixa densidade* (LDL), a principal carreadora de colesterol no sangue. A LDL contém uma parte central com cerca de 1500 moléculas de colesterol esterificado circundada por uma capa de fosfolipídeos, colesterol não esterificado e uma única cópia de apo B-100. Em condições normais, a meia-vida de IDL é curta (minutos a algumas horas) e os níveis de IDL são muito baixos. Por outro lado, a meia-vida de LDL é muito mais longa (cerca de dois dias) e é por isso que a LDL representa dois terços do conteúdo de colesterol do plasma (STRYER, 1987; WEISS, 1993; MONTGOMERY e cols., 1996; WITZTUM, 1996).

As partículas de LDL estão envolvidas no transporte de colesterol para as células periféricas, as quais podem utilizá-lo para necessidades fisiológicas (obtenção de energia) ou estocá-lo. Quando estes tecidos necessitam de mais colesterol eles aumentam o número de receptores de LDL na sua superfície e removem mais LDL do plasma via receptor de LDL, sendo que o inverso também ocorre quando a necessidade de colesterol diminui. Nos seres humanos, aproximadamente 75% das partículas de LDL são removidas do plasma via receptor de LDL e, quase dois terços desta quantidade são removidos pelo fígado (WEISS, 1993; WITZTUM, 1996).

O Transporte Reverso do Colesterol (TRC)

O TRC consiste basicamente na remoção do excesso de colesterol e triglicerídeos circulante via tecido hepático para reutilização ou excreção pela bile. Este excesso de colesterol é proveniente de duas fontes: 1) componentes de superfície, como colesterol não-esterificado, fosfolípidos e várias apolipoproteínas resultado da hidrólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos e 2) colesterol sintetizado nos tecidos extra-hepáticos.

Nesta rota, este excesso é transferido às *lipoproteínas de alta densidade* (HDL), que são sintetizadas por macrófagos e pelos tecidos hepático e intestinal. A HDL é formada por discos de fosfolípidos que contém apolipoproteínas A-I, A-II e A-IV, C-I e C-III. Estes discos contatam e absorvem o colesterol das membranas celulares que é colocado na partícula de HDL por uma reação de esterificação catalisada pela enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). Esta esterificação torna o colesterol apolar fazendo com que ele se mova para o cerne da HDL, o que torna a superfície da partícula disponível para aceitar mais colesterol livre. A remoção do colesterol da HDL pelo fígado é mediada por um receptor denominado SR-BI (*scavenger receptor class B type I*) que internaliza somente ésteres de colesterol e libera a lipoproteína para captação de mais lipídeos (WEISS, 1993; WITZTUM, 1996, KRIEGER, 1999).

Além disso, a proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) que circula, em maior proporção, ligada à HDL media a transferência de ésteres de colesterol das partículas de HDL para VLDLs e LDLs em troca de triglicerídeos (HILL e cols., 1998; BARTER, 2000). Este mecanismo permite que também ocorra a recaptação hepática via outros receptores, como LDL-R que reconhecem VLDLs e LDLs.

1.2. NÍVEIS LIPÍDICOS E SEUS FATORES DETERMINANTES

A relação entre níveis lipídicos e o risco de doença cardiovascular já está bem estabelecido. Até alguns anos, um mau perfil lipídico era definido quase exclusivamente pelos níveis de LDL, mas hoje em dia sabe-se que baixos

níveis de HDL e níveis elevados de triglicerídeos, principalmente de lipoproteínas remanescentes, também são fatores importantes para o cálculo de risco para doença cardiovascular (revisões em BALLANTYNE, 1998; KWITEROVICH, 1998; BREWER, 1999).

O NCEP (National Cholesterol Education Program), principal órgão que define as diretrizes do que seria um perfil lipídico considerado bom, atualiza periodicamente seus dados visando auxiliar profissionais da área em proceder tratamentos adequados (NCEP, 2001). A tabela 1.1 apresenta os valores recomendados:

Tabela 1.1: Valores recomendados pelo NCEP – ATP III.

Nível (mg/dl)	Classificação
LDL	
< 100	ótimo
100 –129	próximo ao ótimo
130 –159	levemente elevado
160 –189	elevado
≥ 190	muito elevado
colesterol total	
< 200	desejável
200 –239	levemente elevado
≥ 240	elevado
HDL	
< 40	baixo
≥ 60	elevado
triglicerídeos	
< 150	normal
150 –199	levemente elevado
200 – 499	elevado
≥ 500	muito elevado

Os níveis lipídicos, assim como as demais características multifatoriais, são determinadas por vários fatores. Estudos familiares e populacionais determinaram que aproximadamente 50% da variância observada podem ser atribuídos a variabilidade genética entre indivíduos, e que fatores ambientais tais como dieta, exercício físico, consumo de álcool e tabagismo são responsáveis pelos outros 50% (TALMUD e WATERWORTH, 2000).

No metabolismo de lipídeos (descrito resumidamente no item anterior), pode-se observar que várias proteínas (tanto estruturais como com atividade catalítica) estão envolvidas para o correto balanço metabólico. Desta

forma, a variabilidade dos genes codificadores para proteínas que atuam em diferentes pontos desta rota metabólica é de especial interesse para explicar a variância encontrada nos níveis lipídicos.

Esta dissertação será focada em polimorfismos dos genes das apolipoproteínas C-III e A-IV do agrupamento gênico A-I/C-III/A-IV e das apos C-I e C-II pertencentes ao agrupamento E/C-I/C-II, sobre os quais serão detalhados a organização gênica, funções específicas no metabolismo e outras funções desempenhadas, além de como a variabilidade nestes genes está associada a alterações nos níveis de lipídeos e lipoproteínas.

1.3. A DISTRIBUIÇÃO DAS APOLIPOPROTEÍNAS NO GENOMA HUMANO

Os genes das apolipoproteínas apresentam, com exceção das apos D e B, uma organização estrutural comum composta de quatro éxons e três íntrons. Os íntrons possuem localizações similares: o primeiro íntron termina na região 5' não traduzida do mensageiro; o segundo íntron termina na região que codifica o peptídeo sinal e o terceiro íntron termina na região codificadora da proteína madura (LI e cols., 1988; HOUPPERMANS, 1994). O gene da apo A-IV difere do das demais apolipoproteínas pois o primeiro íntron foi perdido, mas os demais íntrons foram conservados e sua estrutura global permanece inalterada (HOUPPERMANS, 1994).

Os genes das apolipoproteínas são derivados de um gene ancestral localizado no cromossomo 19 que codificava as apos E, A-I, C-III, A-II, C-II e C-I. No homem moderno, a apolipoproteína A-II é codificada por um gene isolado mapeado no cromossomo 1. As apos A-I, C-III e A-IV no cromossomo 11 e as apos E, C-I e C-II no cromossomo 19 formam dois agrupamentos gênicos distintos.

O agrupamento gênico A-I/C-III/A-IV tem cerca de 20 Kb. O gene da apo A-IV é resultante de uma duplicação do gene da apo A-I e por transposição o gene da apo C-III foi introduzido entre os genes das apolipoproteínas A-I e A-IV. Além disso, o sentido da transcrição (oposto aos

genes das apos A-I e A-IV) mostra que o gene da apo C-III não localizava-se nesta posição no gene precursor (LI e cols., 1988; HOUPPERMANS, 1994).

Já o agrupamento gênico E/C-I/C-II tem cerca de 48 Kb e além de codificar essas três apos inclui na sua seqüência o pseudo-gene apo C-I e o gene apo C-IV descoberto mais recentemente (LI e cols., 1988; JONG e cols., 1999).

1.4. O PAPEL DAS APOS C-I, C-II, C-III E A-IV NO METABOLISMO LIPÍDICO

A compreensão da função das apolipoproteínas de baixo peso molecular presentes em quilomícrons, VLDLs e HDLs denominadas, em conjunto, de apolipoproteínas Cs, tem progredido rapidamente com os avanços da biologia molecular (estudos com expressão *in vitro* e modelos animais, principalmente). Estas apolipoproteínas foram classificadas primeiramente como sendo uma única proteína, e adquiriram a denominação atual (apos C-I, C-II e C-III) após o reconhecimento das suas propriedades distintas que serão apresentadas a seguir.

Apolipoproteína C-I

A apo C-I é uma proteína de 6,6 KDa sintetizada principalmente no fígado, mas que também é encontrada em níveis moderados na pele, baço e pulmão. No metabolismo lipídico, esta proteína é constituinte de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (quilomícrons e VLDLs) e HDLs (revisão em JONG e cols., 1999).

Assim como outras apolipoproteínas, a apo C-I parece inibir a remoção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (LRTs) via receptor de apo E, além de também ser capaz de inibir a ligação mediada por apo E de partículas de β -VLDL a proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP). O mecanismo pelo qual isso ocorre pode ser similar ao da apo C-III, ou seja, por deslocamento de

moléculas de apo E da lipoproteína ou por alteração da conformação da apo E pela apo C-I como foi sugerido por WEISGRABER e cols. (1990).

A apo C-I parece também ter ação sobre enzimas envolvidas no metabolismo lipídico. Apesar da apo A-I ser a principal ativadora da LCAT, a apo C-I também se mostra efetiva (revisão em JONG e cols., 1999). Além disso, GAUTIER e cols. (2000) mostraram que, em altas concentrações de HDL, a transferência de ésteres de colesterol para outras lipoproteínas mediada pela CETP é inibida, e que esta inibição é causada pela partícula de HDL e mais especificamente pela apo C-I presente nesta lipoproteína.

Estudos com ratos *knockout* para apo C-I e transgênicos para apo A-I revelaram uma depuração retardada de partículas de VLDL (JONG e cols., 1996a). Já em estudos com animais transgênicos para apo C-I os resultados obtidos também foram de hiperlipidemia associada a anormalidades cutâneas (JONG e cols., 1998) e inibição da ligação de lipoproteínas à receptores (SHACHTER e cols., 1996, JONG e cols., 1996b, JONG e cols., 1996c), mas independente de resistência à insulina, outra causa de hiperlipidemia bastante comum (KOOPMANS e cols., 2001). Sendo assim, tanto animais *knockout* como transgênicos apresentam a depuração de VLDL retardada e o que se pode pensar é que a apo C-I influencia a depuração de lipoproteínas de maneira dose-dependente, mas de forma descontínua (JONG e cols., 1998).

Em outro estudo recente desenvolvido por BJÖRKEGREN e cols. (2000), com o objetivo de verificar a composição de LRTs pós-prandiais em pacientes normolipidêmicos com doença coronariana, foi verificado que além destes pacientes apresentarem uma hipertrigliceridemia pós-prandial exagerada quando comparados a um grupo controle, eles também apresentavam um acúmulo de VLDLs grandes enriquecidas de apo C-I e que as VLDLs remanescentes continuavam ricas em apo C-I e colesterol, o que pode ser relevante para o desenvolvimento de aterosclerose.

Apolipoproteína C-II

Apo C-II humana é uma proteína de 8,8 KDa composta de 79 aminoácidos e ao contrário das outras apolipoproteínas abordadas na presente investigação, tem sua função bem estabelecida. A apolipoproteína C-II tem um

importante papel no metabolismo lipídico, pois é responsável pela ativação da enzima lipoproteína lipase (LPL), além de promover a remoção de VLDLs e quilomícrons remanescentes pelo fígado (JONG e cols., 1999).

Estudos com fragmentos desta proteína mostram que a porção carboxi-terminal contém estruturas responsáveis pela interação com a LPL e com a sua ativação. Já a parte amino-terminal forma hélices anfipáticas que ancoram a proteína à lipoproteína. O mecanismo detalhado de ativação da LPL pela apo C-II ainda não está totalmente estabelecido. A apo C-II é um constituinte normal das lipoproteínas, apesar da LPL poder se ligar a partículas lipídicas na sua ausência. Por isso se assume que esta interação ocorre após a ligação da LPL à partícula da lipoproteína e que a apo C-II atua mudando a orientação da LPL em relação às moléculas lipídicas de uma forma favorável. A dependência da ativação da lipase em relação a apo C-II varia de acordo com a natureza do substrato lipídico. Interessantemente existem casos onde a LPL tem atividade normal mesmo na ausência de apo C-II e por isso se torna difícil entender porque pacientes com deficiência de apo C-II tem níveis tão altos de triglicérides. Após alguns estudos cinéticos se concluiu que o maior efeito da apo C-II é aumentar a afinidade da enzima pelas partículas lipídicas (OLIVECRONA e BEISIEGEL, 1997).

Outros dados que mostram a relevância desta proteína são os casos de deficiência de apo C-II, onde se observa uma severa hipertrigliceridemia, principalmente com elevação de quilomícrons. Heterozigotos para deficiência da apo C-II geralmente possuem níveis lipídicos normais, o que mostra que a apo C-II está normalmente em excesso. Apesar de sua ausência causar hipertrigliceridemia, a super-expressão de seu gene em ratos transgênicos também causa esta alteração por uma depuração retardada de VLDLs, o que pode ser explicado pela inibição da LPL por excesso de apo C-II na lipoproteína. Estes dados sugerem que a apo C-II deve desempenhar um complexo papel no metabolismo de triglicérides (OLIVECRONA e BEISIEGEL, 1997; JONG e cols., 1999).

Apolipoproteína C-III

A apolipoproteína C-III (apo C-III) é uma proteína com 79 aminoácidos (cerca de 8,8 KDa) que circula no plasma associada a lipoproteínas ricas em triglicerídeos e HDL e tem como principal local de síntese o fígado. Sua função no metabolismo lipídico ainda não está clara e o que se sabe atualmente é resultado de estudos *in vitro* e em modelos animais (*knockout* ou com super-expressão do gene).

WANG e cols. (1985) estudaram a função da apolipoproteína na modulação da atividade da LPL e mostraram que somente a apo C-III possui atividade inibitória sobre esta enzima; atuando como um inibidor não competitivo. Este efeito também foi observado por outros pesquisadores (revisão em JONG e cols., 1999).

Esta apolipoproteína também parece diminuir a remoção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (LRTs) via receptor de apo E. FREDENRICH e cols. (1997), estudando a relação apo C-III/apo E em pacientes normotrigliceridêmicos e hipertrigliceridêmicos, verificaram que pacientes com hiperlipoproteinemia tipo IV (aumento de triglicerídeos em VLDLs) apresentavam um aumento de apo C-III em relação a apo E em lipoproteínas de tamanho intermediário (remanescentes), o que poderia explicar o aumento de triglicerídeos neste grupo de pacientes, já que estas lipoproteínas tem seu reconhecimento pelos receptores celulares para apo E diminuído e sua depuração reduzida. MARCOUX e cols. (2001) replicaram estes resultados mostrando um aumento de apo C-III em LTRs e LTRs remanescentes também em pacientes hipertrigliceridêmicos. Outra investigação conduzida por BREYER e cols. (1999) mostrou que o deslocamento da apo E pela apo C-III de partículas de VLDL é tamanho dependente: o deslocamento é maior quando estas partículas são menores. Além do aumento direto nos níveis de triglicerídeos esta troca de apos nas lipoproteínas leva a um prolongamento no intervalo de circulação das LTRS devido a presença de mais apo C-III, o que aumenta a probabilidade de ocorrer o contato com as paredes arteriais e o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (SPRECHER, 1998).

Outras evidências da ação desta proteína sobre o metabolismo de LTRs são observadas: o catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos é

acelerado em pessoas com deficiência de apo C-III e em cobaias *knockout* para este gene, onde também ocorre uma acentuada queda nos níveis de triglicerídeos (MAEDA e cols., 1994; PATSCH e GOTTO, 1996; FREDENRICH, 1998). Por outro lado, a expressão aumentada de apo C-III humana em ratos transgênicos está associada a severa hipertrigliceridemia, e o mecanismo pelo qual isso ocorre provavelmente se deve a junção do efeito inibitório sobre a LPL e a substituição de apo E por apo C-III, o que diminui o catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (AALTO-SETÄLÄ e cols., 1992; DE SILVA e cols., 1994; EBARA e cols., 1997).

Apolipoproteína A-IV

A apolipoproteína A-IV é uma glicoproteína plasmática com peso molecular de 46 KDa sintetizada primariamente nos enterócitos do intestino delgado durante a absorção de gordura. Ela é o maior componente pós-prandial de quilomícrons e HDL (GREEN e cols., 1980; LEFEVRE e ROHEIM, 1984).

Apesar de sua função específica no metabolismo lipídico não estar completamente esclarecida, estudos mostram que partículas de apo A-IV participam do metabolismo destas lipoproteínas. Foi demonstrado que a apo A-IV atua como um cofator para a lecitina-colesterol aciltransferase, uma enzima chave na esterificação do colesterol. A ação da lecitina-colesterol aciltransferase modifica *in vitro* a distribuição da apo A-IV de uma maneira em que paralelamente há formação e retirada de colesterol ésteres (STEINMETZ e UTERMANN, 1985; BISGAIER e cols. 1987). A apo A-IV também parece promover o efluxo de colesterol das células e desta maneira participa do transporte reverso do colesterol (STEINMETZ e cols., 1990; WEINBERG e JORDAN, 1990), além de modular a ativação de lipoproteína lipase (GOLDBERG e cols., 1990). Em estudos com ratos transgênicos para esta proteína observou-se uma diminuição no desenvolvimento de lesões ateromatosas e níveis significativamente elevados de HDL (COHEN e cols., 1997) enquanto que construções *knockout* para este gene tem níveis diminuídos de HDL (WEINSTOCK e cols., 1997).

O comportamento bioquímico e biofísico da apo A-IV, entretanto, é distinto das outras apolipoproteínas. Apesar de conter grande parte de sua estrutura como α -hélices anfífilas, a apo A-IV é a mais hidrofílica das

apolipoproteínas humanas, o que torna sua ligação a superfície lipídica bastante lábil. Além disso, a apo A-IV facilmente forma dímeros com grande afinidade tanto *in vitro* como *in vivo*. Devido as suas características, a apo A-IV circula primariamente não associada às lipoproteínas (WEINBERG e JORDAN, 1990).

Apesar dos estudos realizados mostrarem a participação desta proteína no metabolismo lipídico, as funções desempenhadas pela apo A-IV são, de uma forma geral, compartilhadas com a apo A-I, que está em maior concentração na circulação. Além disso, o seu comportamento biofísico (circular dissociada da fração lipídica) e ter sua expressão e síntese aumentadas durante a ingestão de gordura sugerem que esta proteína tenha outras funções. Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado que a apo A-IV pode ser um sinalizador de saciedade em curto período e um potencial controlador de apetite e ganho de peso a longo prazo (revisões em KALOGERIS e cols., 1997; LIU e cols., 1999 e TSO e cols., 1999). O mecanismo pelo qual isso ocorre provavelmente se dá por controle ao nível de sistema nervoso central (SNC). Como a síntese de apo A-IV no SNC é improvável, uma hipótese proposta é a de que a proteína atravesse a barreira cérebro-espinhal para influenciar o comportamento alimentar.

Outra descoberta relativamente recente é a ação da apo A-IV como um modulador da atividade gástrica superior. A infusão de apo A-IV inibe a secreção ácida e o esvaziamento gástrico. A apo A-IV, então, deve agir como uma enterogastrona, ou seja, um mediador humoral da inibição da secreção gástrica por gordura intestinal. Não se sabe se há uma ligação entre o efeito sobre a secreção gástrica e a de controle de apetite (KALOGERIS e cols., 1997), mas estudos realizados visando estabelecer o efeito do peptídeo tirosina-tirosina (PYY), um hormônio gastrointestinal que também possui atividade de enterogastrona, sobre a síntese de apo A-IV mostram que este estimula a síntese desta proteína (KALOGERIS e cols., 1998; SONOYAMA e cols., 2000).

Como a função da apo A-IV em modular o apetite pode ser um efeito secundário decorrente de alterações nas concentrações de outras proteínas importantes para o controle do apetite, estudos com o objetivo de verificar estas relações estão sendo desenvolvidos, mas os resultados ainda são inconclusivos. Recentemente, KALOGERIS e cols. (2001) verificaram que ocorre uma rápida adaptação (aumento) dos níveis de apo A-IV induzida por gordura que é independente dos níveis de leptina. Por outro lado, MORTON e cols. (1998)

mostraram que a administração intravenosa de leptina diminui em duas vezes o nível de transcrição da apo A-IV.

Um outro estudo realizado por QIN e cols. (1998) mostrou que a apo A-IV pode ser um potente antioxidante de lipoproteínas, o que leva a se pensar em uma outra função para essa proteína. Apesar de existirem vários antioxidantes naturais, a apo A-IV pode ser importante devido aos seguintes aspectos: 1) é um produto endógeno que tem sua síntese aumentada com consumo de gordura; 2) tem estrutura anfipática, circula tanto associada como dissociada de lipoproteínas e pode agir como antioxidante tanto em meio aquoso como hidrofóbico (em meio aos lipídeos). Estes resultados parecem explicar a proteção contra o desenvolvimento de aterosclerose em ratos transgênicos para apo A-IV, uma vez que estariam “protegidos” da oxidação lipoproteica. Outra investigação que mostra esta função da apo A-IV como antioxidante foi recentemente descrita por OSTOS e cols. (2001), onde duas construções *knockout* para apo E foram desenvolvidas, sendo que em uma também havia expressão da apo A-IV. Os resultados mostraram, que em ambas as linhagens, o perfil lipídico era péssimo, mas aquela onde a apo A-IV era expressa estava protegida de dano oxidativo.

1.5. INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE DOS GENES DAS APOS C-I, C-II, C-III E A-IV, NOS NÍVEIS DE LIPÍDEOS PLASMÁTICOS

Vários polimorfismos nos agrupamentos gênicos A-I/C-III/A-IV e E/C-I/C-II já foram descritos. A figura 1.1 resume os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) que serão analisados na presente investigação:

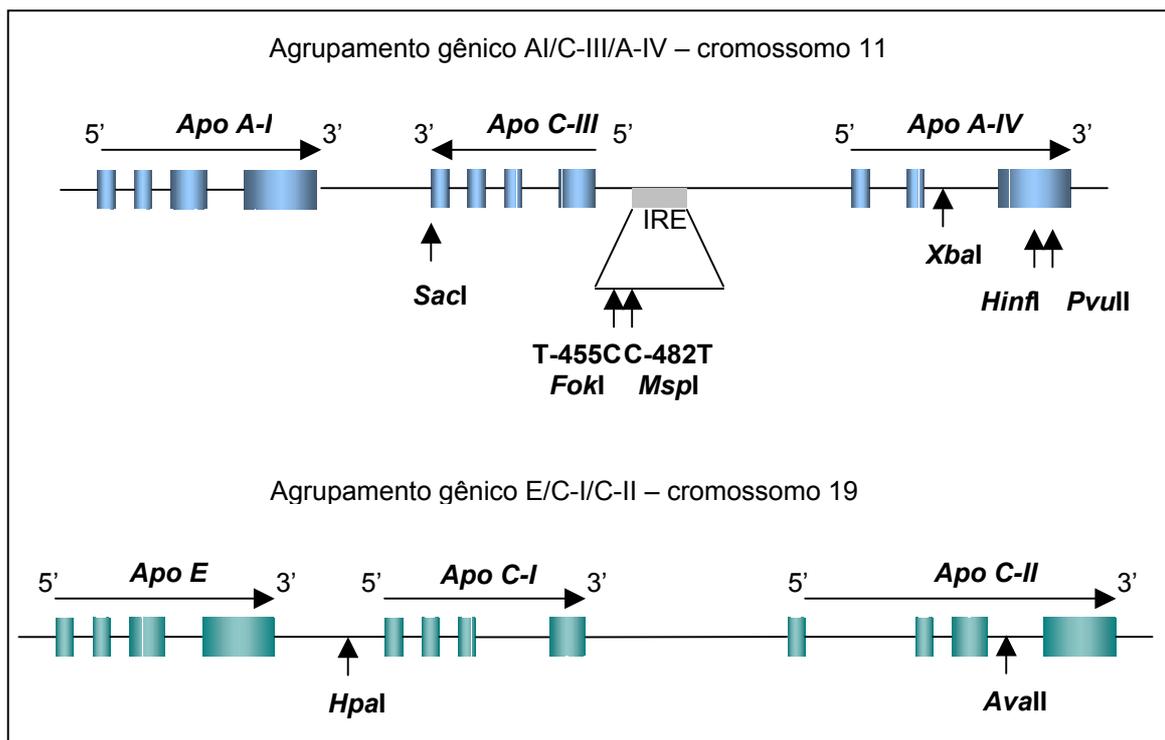


Figura 1.1: Esquema simplificado dos agrupamentos gênicos A-I/C-III/A-IV e E/C-I/C-II e a localização dos RFLPs.

Apolipoproteína C-I

O gene para apolipoproteína C-I apresenta um sítio polimórfico para a endonuclease de restrição *HpaI* localizado na região promotora (posição -317) que é resultado de uma inserção de 4 pares de base (CGTT). A frequência do alelo H*1 (ausência da inserção) varia de 0,67 (Países Baixos) a 0,87 (Coreia) (NILLESEN e cols., 1990; HONG e cols., 1997; SEIXAS e cols., 1999; XU e cols., 1999; WATERWORTH e cols., 2000, DE ANDRADE e cols., 2001b; HUBACEK e cols., 2001).

XU e cols. (1999) estudaram este marcador em dois grupos étnicos e verificaram um perfil distinto de desequilíbrio de ligação entre os alelos deste loco com os alelos da apo E entre caucasóides e negróides norte-americanos além de encontrarem uma associação significativa entre a presença do alelo H*2 e níveis diminuídos de triglicerídeos (-19%) e aumentados de HDL (+18%) no grupo negróide com genótipo ϵ^*3/ϵ^*3 para apo E. Outro enfoque dado por esses pesquisadores em experimentos de expressão gênica *in vitro* mostrou que a

seqüência com a inserção (H*2) apresentava um aumento de cerca de 50% na expressão do gene.

Em outro estudo, WATERWORTH e cols. (2000) investigaram a influência deste RFLP sobre níveis de lipoproteínas remanescentes. Neste trabalho verificou-se uma associação entre o alelo H*2 e aumento tanto de lipoproteínas remanescentes ricas em triglicerídeos como em colesterol. O polimorfismo para *HpaI* foi também estudado em coreanos e tchecos, onde não foram observadas associações com o perfil lipídico (HONG e cols., 1997, HUBACEK e cols., 2001, respectivamente).

Apolipoproteína C-II

Embora várias mutações raras que abolem totalmente a função desta apolipoproteína terem sido descritas (revisão em JONG e cols., 1999), poucos polimorfismos nesta proteína são conhecidos. Em 1987, KORNELUK e colaboradores verificaram a presença de um polimorfismo para endonuclease de restrição *Avall* por *southern blot*. A alteração responsável pela eliminação do sítio de restrição para esta enzima foi elucidada por GEISEL e cols. (1996) como sendo a substituição de T para C na posição 3548 do gene. Em 1997, HONG e colaboradores verificaram a presença do mesmo sítio polimórfico para *Avall* em um fragmento de PCR descrito por ZYSOW e cols. (1992). Este sítio é bastante polimórfico na população caucasóide onde foi descrito (KORNELUK e cols, 1987) e também em coreanos (HONG e cols., 1997) com uma freqüência de 45% e 46%, respectivamente. Em tribos indígenas brasileiras, por outro lado, a freqüência deste mesmo alelo variou de 0 a 3% (DE ANDRADE e cols., 2001b).

Um único trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a influência deste RFLP sobre os níveis lipídicos. Nesta investigação a análise de associação realizada mostrou que os níveis de triglicerídeos e colesterol em portadores do alelo A*2 eram menores (HONG e cols., 1997).

Apolipoproteína C-III

A variabilidade da apo C-III vem sendo amplamente investigada em diversas populações. Um dos RFLPs mais estudados é o para a endonuclease

de restrição *Sacl* (*Sst*I). Este polimorfismo é decorrente da substituição C3238G na região 3' não traduzida do gene (3'UTR). Apesar de não ser funcional, a presença do sítio de restrição (alelo S*2) parece estar associada a alterações nos níveis lipídicos em diversas populações, mas não em todas (tabela 1.2).

Tabela 1.2: Alguns estudos sobre a associação do polimorfismo *Sacl* com níveis lipídicos.

População	Associação encontrada	Referência
FRANÇA	↑ VLDL, ↑ LDL, ↑ VLDL-C/VLDL-tri, ↑ S*2 em HTG	OPPERT e cols. (1992)
FRANÇA	↑ Tri, apo C-III	DALLONGEVILLE e cols. (2000)
FRANÇA	↑ S*2 em diabéticos HTG	MARÇAIS e cols. (2000)
ESPANHA	↓ LDL-C após dieta rica em gordura	LÓPEZ-MIRANDA e cols. (1997)
ITÁLIA	→	MARASCO e cols. (1993)
FINLÂNDIA	↑ colesterol, ↑ LDL-C	PORKKA e cols. (1994)
IRLANDA	↑ apo C-III ↑ Tri, ↑ colesterol, ↑ LDL-C	DALLINGA-THIE e cols. (1996)
REPÚBLICA TCHECA	→	HUBACEK e cols. (2001)
EUROPA*	→	KEE e cols. (1999)
ALEMANHA	↑ colesterol, ↑ Tri	WICK e cols. (1995)
JAPÃO	↑ S*2 em HTG	ZENG e cols. (1995)
CHINA	↑ Tri, ↑ colesterol ↑ S*2 em HTG	KO e cols. (1997)
BRASIL	↑ S*2 em indivíduos com DAC	BYDLOWSKI e cols. (1996)

DAC: doença arterial coronariana, HTG: hipertrigliceridemia, Tri: triglicerídeos, * indivíduos selecionados de vários países europeus, ↑: aumento, ↓: diminuição, →: não achou associação.

Como o mecanismo pelo qual a presença do alelo S*2 altera os níveis de colesterol e triglicerídeos ainda é desconhecido, acredita-se que este

polimorfismo possa estar em desequilíbrio de ligação com outros sítios polimórficos em elementos regulatórios que seriam responsáveis pelas desordens lipídicas apresentadas por pacientes portadores do alelo variante. Uma região polimórfica candidata é o IRE (*insulin response element*) situada a 5' do gene para apo C-III. O IRE é um importante ponto de controle para a transcrição do apo C-III: a insulina se liga a este sítio inibindo a transcrição do gene.

Duas variantes descritas neste elemento, C-482T (*MspI*) e T-455C (*FokI*), parecem abolir o efeito inibitório da insulina sobre a transcrição deste gene, o que leva a expressão contínua de apo C-III, com conseqüente hipertrigliceridemia (LI e cols., 1995). Estudos de associação com níveis lipídicos e de lipoproteínas incluindo os três RFLPs mostram que existe desequilíbrio de ligação forte entre os três sítios (HEGELE e cols., 1997; GROENENDIJK e cols. 1999; WATERWORTH e cols., 2000), mas se verificou que, em alguns casos, a associação encontrada para cada sítio é independente dos outros (SHOULDERS e cols., 1996; SURGUCHOV e cols., 1996; WATERWORTH e cols., 2000) e em outros casos, a associação é resultado do desequilíbrio de ligação (DALLONGEVILLE e cols., 2000).

Outra abordagem realizada com objetivo de avaliar a influência destes polimorfismos é a construção de haplótipos com os três RFLPs (-482, -455 e *SacI*). Em dois trabalhos (SURGUCHOV e cols., 1996; HOFFER e cols., 1998) que abordaram os três polimorfismos simultaneamente foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre pacientes normotrigliceridêmicos (maior prevalência do haplótipo -482T/-455T/S*1) e hipertrigliceridêmicos (maior prevalência do haplótipo -482T/-455C/S*2), mas a retirada do polimorfismo para *SacI* da análise fez com que as freqüências se igualassem nos dois grupos. DAMMERMAN e cols. (1993) investigaram os polimorfismos *MspI* e *SacI* e verificaram que pacientes portadores do haplótipo -482T/S*2 tinham um risco aumentado de desenvolver hipertrigliceridemia.

Quanto aos níveis de expressão, ESTERBAUER e cols. (1999) realizaram um estudo no qual compararam construções com os alelos comuns (-482C, -455T e S*1) com construções contendo pelo menos uma das variantes e verificaram que a presença de qualquer uma delas aumenta a expressão de apo C-III, sendo que a construção com a variante S*2 foi a mais expressa.

Apolipoproteína A-IV

A alteração genética responsável pelo polimorfismo *PvuII* foi elucidada por seqüenciamento de DNA e consiste em uma substituição de G (alelo A-IV*1 ou 360Gln, presença do sítio) para T (alelo A-IV*2 ou 360His, ausência do sítio) na terceira base do códon 360 resultando na mudança de glutamina para histidina na proteína madura. Estudos físico-químicos sugerem que a substituição deste aminoácido aumenta o conteúdo de α -hélice da proteína nativa aumentando sua ação sobre a ativação da LCAT (ZAIYOU e cols., 1994; PATSCH e GOTTO, 1996).

A associação entre este polimorfismo e os níveis de lipídeos e lipoproteínas é bastante controverso. Alguns estudos mostraram que esta variação genética não exerce nenhum efeito importante nas concentrações de lipídeos e de lipoproteínas (DE KNIJFF e cols., 1988; ZAIYOU e cols., 1994; MENZEL e cols., 1995; CARREJO e cols., 1995; MALLE e cols., 1996). Entretanto em outras investigações, uma associação significativa deste polimorfismo foi observada. BOERWINKLE e SING (1986) descreveram um aumento do colesterol total e de LDL-colesterol em indivíduos com o alelo A-IV*2 enquanto que outros pesquisadores verificaram níveis aumentados de HDL-colesterol em indivíduos com o mesmo alelo (MENZEL, 1988, 1990; LEHTINEN e cols., 1998). EICHNER e cols. (1989) relataram que mulheres homozigotas A-IV 1-1 tem níveis de triglicerídeos maiores que mulheres heterozigotas (A-IV 1-2).

Com o objetivo de avaliar a influência deste RFLP sobre o perfil lipídico em resposta a alterações alimentares, dois trabalhos observaram que portadores do alelo A-IV*2 (360His) tinham níveis significativamente inferiores de HDL após algum tempo com dieta restrita (HEILBRONN e cols., 2000) e dieta pobre em gordura (JANSEN e cols., 1997). Já WEINBERG e cols. (2000) mostraram que portadores do alelo 360His têm a absorção de colesterol diminuída após dieta rica em gordura polinsaturada, mas este efeito só foi evidenciado em indivíduos homozigotos para outro polimorfismo no mesmo gene (347Thr).

Além disso, outras investigações mostraram que o polimorfismo Gln360His também pode influenciar o *status* lipêmico pós-prandial. OSTOS e cols. (2000) e HOCKEY e cols. (2001) verificaram um aumento nas concentrações de lipoproteínas ricas em triglicerídeos em portadores do alelo 360His nestas

condições, enquanto que FISHER e cols. (1999) verificaram que obesos portadores do mesmo alelo demonstravam uma lipemia pós-prandial diminuída.

Dadas as funções desempenhadas por esta proteína, trabalhos com o objetivo de verificar se a variabilidade neste gene pode estar associada a sobrepeso ou obesidade também vem sendo desenvolvidos. Uma investigação conduzida por FISHER e cols. (1999) mostrou que portadores do alelo A-IV*2 (360His) tinham o índice de massa corporal (IMC) significativamente inferiores a homozigotos 360Gln, resultado este também encontrado por LEFEVRE e cols. (2000).

Outro polimorfismo encontrado no gene da apolipoproteína A-IV é decorrente da substituição A → T na primeira base do codon 347 e resulta na troca do aminoácido treonina (Thr) por serina (Ser) na proteína madura. Investigações sobre este RFLP também são inconclusivas. Alguns trabalhos relataram ausência de associação do polimorfismo com níveis lipídicos (ZAIYOU e cols., 1994; CARREJO e cols., 1995) enquanto outros encontraram o alelo 347Ser associado a um melhor perfil lipídico, como diminuição de LDL (VON ECKARDSTEIN e cols., 1992) e hidrólise rápida de quilomícrons por maiores concentrações de apo A-IV (OSTOS e cols., 1998) ou a um pior perfil lipídico com aumento de colesterol total e triglicérides (FISHER e cols., 1999). Além disso, este RFLP também vem sendo investigado quanto a sua influência sobre o índice de massa corporal. FISHER e cols. (1999) e LEFEVRE e cols. (2000) verificaram que portadores do alelo 347Ser têm IMC significativamente maiores do que homozigotos 347Thr.

Além destes dois polimorfismos, a apolipoproteína A-IV apresenta um sítio polimórfico para a endonuclease de restrição XbaI localizado no segundo íntron do gene. Este polimorfismo ainda é pouco estudado, mas como os demais citados acima apresenta resultados controversos sobre seus efeitos sobre os níveis de lipídeos. ZAIYOU e cols. (1994) e KEE e cols. (1999), estudaram este polimorfismo e não encontraram efeitos significativos sobre os níveis de lipoproteínas, apolipoproteínas ou doenças relacionadas, enquanto que PAUL-HAYASE e cols. (1992) encontraram níveis aumentados de apolipoproteína A-IV em portadores do alelo X*2 (presença do sítio de restrição).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As complicações da aterosclerose são responsáveis por cerca da metade das mortes nos países ocidentais. Dados do SUS sobre a mortalidade no Brasil mostram que o Rio Grande do Sul apresenta um índice de mortalidade devido a problemas circulatórios, aterosclerose e doenças cardíacas maior que a média nacional (DATASUS, 1998), o que deve refletir tanto o estilo de vida como a constituição genética da população formadora do estado do Rio Grande do Sul.

De acordo com o que foi descrito na introdução deste trabalho, polimorfismos nos genes das apolipoproteínas pertencentes aos agrupamentos gênicos A-I/C-III/A-IV e E/C-I/C-II podem estar associados a níveis aumentados de lipídeos, lipoproteínas e de variáveis antropométricas, bem como às doenças relacionadas. No entanto, os estudos realizados ainda são inconclusivos, o que se deve, provavelmente, às diferentes abordagens dadas por cada autor assim como à heterogeneidade genética destas características em diferentes populações. É importante ressaltar que pouco se sabe sobre a variabilidade desses genes em populações brasileiras bem como qual a influência dessa variabilidade sobre esses parâmetros.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivos específicos:

- I. Estudar oito RFLPs (figura 1.1, introdução) nos genes das apolipoproteínas pertencentes aos agrupamentos gênicos A-I/C-III/A-IV e E/C-I/C-II em uma amostra de indivíduos caucasóides de Porto Alegre.

II. Realizar um estudo de associação entre cada RFLP e dos haplótipos derivados e os níveis de lipídeos e lipoproteínas, para verificar a contribuição destes polimorfismos para o perfil lipídico da população em questão.

III. Determinar se a variabilidade da apo A-IV está correlacionada com o IMC e a relação cintura/quadril nesta amostra.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRA

Participaram da amostra deste trabalho 391 indivíduos caucasóides da região de Porto Alegre (RS – Brasil). A coleta da amostra foi realizada junto ao laboratório de bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFRGS bem como no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Na Faculdade de Farmácia (n=309), cada indivíduo, após assinatura de um termo de consentimento informado (anexo 1), foi entrevistado quanto a história familiar ou presença de doença coronariana, hipertensão arterial ou diabetes, tabagismo, sedentarismo (avaliado como prática de esporte fora do ambiente de trabalho, conforme HAN e cols., 1998) e consumo de álcool (anexo 2). Juntamente com a entrevista os indivíduos foram pesados e medidos (altura, cintura e quadril) e tiveram seus lipídeos séricos (colesterol total, triglicerídeos e HDL), bem como glicose quantificados. No delineamento da amostra foram excluídos indivíduos que usavam medicamentos que podem alterar níveis lipídicos (tais como, hipolipemiantes, β -bloqueadores, corticosteróides, revisão em MANTEL-TEEJWISSE e cols., 2001) ou apresentavam doenças que também afetam estes parâmetros (insuficiência renal, diabetes, alcoolismo, hipotireoidismo).

No HCPA as amostras (n=82) foram obtidas junto ao laboratório de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do hospital após dosagens lipídicas. Neste caso, os pacientes não foram entrevistados, mas uma análise detalhada de cada prontuário foi realizada, visando excluir amostras de pacientes não apropriadas para o estudo com os mesmos critérios descritos anteriormente. O projeto foi previamente aprovado pelo GPPG do HCPA (anexo 3).

3.2. DOSAGENS BIOQUÍMICAS E MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Os níveis de colesterol total, HDL colesterol e triglicerídeos foram dosados nos próprios locais de coleta por métodos enzimáticos após 12 horas de jejum. Na Faculdade de Farmácia foram utilizados "kits" Labtest em um aparelho automatizado Selectra, enquanto que no HCPA, as dosagens foram realizadas no aparelho MegaMerck com "kits" Merck. A fração LDL colesterol foi calculada segundo a fórmula descrita por FRIEDEWALD e cols. (1972), que é válida somente para casos onde os níveis de triglicerídeos são inferiores a 400 mg/dl.

O índice de massa corporal (IMC) foi obtido dividindo-se o peso em quilogramas pela altura em metros elevada ao quadrado (kg/m^2). A medida da cintura foi realizada na menor circunferência entre a 12^o costela e a crista ilíaca. O quadril foi medido como a máxima circunferência dos glúteos. A proporção cintura/quadril foi obtida através da divisão da medida da cintura pela medida do quadril.

3.3. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

O DNA de cada amostra foi extraído de sangue total através das técnicas descritas por MILLER e cols. (1988) ou LAHIRI e NURNBERGER (1991).

A identificação dos RFLPs foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão com as endonucleases de restrição apropriadas para cada caso. O fragmento de interesse para cada sítio foi amplificado conforme os protocolos descritos na tabela 3.1.

Após a digestão com as respectivas endonucleases de restrição, os produtos de clivagem foram submetidos a eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e os fragmentos foram visualizados sob luz UV após exposição dos géis a solução de brometo de etídio. As condições de clivagem (tempo de incubação, temperatura e quantidade de enzima) estão especificadas na tabela 3.2.

Tabela 3.1: Descrição dos primers e condições de amplificação para cada RFLP investigado.

RFLPs	Primers	Reação de amplificação	Condições de amplificação	Referência
Sacl apo C-III	P1 5`-AGG ACA AGT TCT CTG AGT TCT-3` P2 5`- GCA GCT TCT TGT CCA GCT T-3`	1,5mM MgCl ₂ , 10mM Tris, 50mM KCl, 30 pmol de P1 e P2, 200µM dNTPs, 0,5U Taq polimerase, ~ 100ng DNA	95°C – 5` 95°C – 5` } 63°C – 1` } 30 x 72°C – 30` } 72°C – 5` }	OPPERT e cols. (1992)
FokI e MspI apo C-III	P1 5`-GTG AGA GCT CAG CCC CTG TAA-3` P2 5`-TTT CAC ACT GGA AAT TTC AGG-3`	1,5mM MgCl ₂ , 10mM Tris, 50mM KCl, 10 pmol de P1 e P2, 200µM dNTPs, 1,5U Taq polimerase, ~ 100ng DNA	94°C – 5` 94°C – 1` } 60°C – 1` } 40 x 72°C – 1` } 72°C – 5` }	HEGELE e cols. (1997)
XbaI apo A-IV	P1 5`-TAG GAT CCA CAT ATG TAA AC-3` P2 5`-GTC TTT CTG AAA CG ATT AG –3`	1,5mM MgCl ₂ , 10mM Tris, 50mM KCl, 20 pmol de P1 e P2, 200µM dNTPs, 0,5U Taq polimerase, ~ 100ng DNA	94°C – 5` 94°C – 1` } 37°C – 1` } 30 x 72°C – 2` } 72°C – 5` }	ZAIYOU e cols. (1994)
HinfI e PvuII apo A-IV	P1 5`-GCC CTG GTG CAG CAG ATG GAA CAG CTC AGG-3` P2 5`-CAT CTG CAC CTG CTC CTG CTG CTG CTC CAG -3`	1,5mM MgCl ₂ , 10mM Tris, 50mM KCl, 20 pmol de P1 e P2, 200µM dNTPs, 1,0U Taq polimerase, ~ 100ng DNA	95°C – 5` 95°C – 1` } 65°C – 1` } 35 x 70°C – 2` } 72°C – 5` }	HIXSON e POWERS (1991)
HpaI apo C-I	P1 5`-TTT GAG TCG GCT CTT GAG ACA GGA A -3` P2 5`-GGT CCC GGG CAC TTC CCT TAG CCC CA -3`	1,5mM MgCl ₂ , 10mM Tris, 50mM KCl, 10 pmol de P1 e P2, 250µM dNTPs, 1,0U Taq polimerase, ~ 100ng DNA	94°C – 5` 95°C – 50` } 58°C – 50` } 30 x 72°C – 1'30` } 72°C – 5` }	NILLESEN e cols. (1990)
Avall apo C-II	P1 5`- CCG AGT CAC ACA GCG CAG GAT CTC AGT C-3` P2 5`-AAG AAT TCA GGA CTA GCT AGA GAG TTG GGA GGA GG-3`	2,0mM MgCl ₂ , 10mM Tris, 50mM KCl, 10 pmol de P1 e P2, 250µM dNTPs, 2U Taq polimerase, ~ 100ng DNA	95°C – 5` 95°C – 15` } 60°C – 15` } 30 x 72°C – 2'30` } 72°C – 5` }	ZYSOW e cols. (1992)

Tabela 3.2: Condições de clivagem.

Gene	Enzima	Quantidade de enzima (U)	Temperatura (°C)	Tempo de incubação (h)
Apo C-I	<i>HpaI</i>	15	37	3
Apo C-II	<i>Avall</i>	2	37	2
Apo C-III	<i>FokI</i>	3	37	2
Apo C-III	<i>MspI</i>	15	37	3
Apo C-III	<i>SacI</i>	8	37	4
Apo A-IV	<i>HinfI</i>	5	37	3
Apo A-IV	<i>PvuII</i>	10	37	4
Apo A-IV	<i>XbaI</i>	10	37	4

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.4.1. Freqüências gênicas e haplotípicas, comparação de freqüências e desequilíbrio de ligação

As freqüências alélicas dos polimorfismos investigados foram calculadas pelo método de contagem gênica e os haplótipos derivados foram estimados por máxima verossimilhança para cada indivíduo (LONG e cols., 1995; LONG, 1999; PETERSON e cols., 1999). As freqüências genotípicas e haplotípicas foram comparadas pelo teste de χ^2 (GraphPad INSTAT versão 3.05) ou teste exato de Fisher em tabelas 2xk, onde $K \geq 2$ (PEPI versão 4.0, ABRAMSON e GAHLINGER, 2001). Nos casos onde alguma freqüência tinha valor 0 (zero) foi utilizado o teste de χ^2 de ROFF e BENTZEN (1989), apropriado para estas condições. O desequilíbrio de ligação entre os RFLPs foi calculado pelo programa ARLEQUIN versão 2.000 (SCHNEIDER e cols., 2000) e o D' foi estimado manualmente como descrito em LEWONTIN (1988). Os alelos serão denominados como 1 (mais freqüente) e 2 (menos freqüente), conforme a alteração de bases (C3238G) ou aminoácidos (Gln360His).

3.4.2. Fatores determinantes e ajuste das variáveis lipídicas e antropométricas

Níveis lipídicos

Os efeitos de variáveis como sexo, idade, IMC e hábitos de vida sobre os níveis lipídicos nesta amostra foram previamente investigados por DE ANDRADE e cols. (2001a). Nesta investigação verificou-se uma alta correlação do IMC com todos os níveis lipídicos. Idade e sexo, embora não significantes para todas as variáveis resposta, foram utilizados para o ajuste por serem variáveis reconhecidamente importantes para determinação de níveis lipídicos. Quanto aos hábitos de vida, observou-se que o consumo de álcool, tabagismo e sedentarismo não afetavam os níveis lipídicos. O efeito do climatério, uso de anticoncepcionais e reposição hormonal também foi testado em mulheres, mas nenhum efeito sobre os parâmetros de interesse foi observado.

Desta forma, conhecendo-se os fatores que determinam os níveis, o ajuste das variáveis foi realizado por regressão linear múltipla com o pacote estatístico SPSS® versão 8.0. Com exceção de HDL, as demais variáveis lipídicas foram transformadas em logaritmo natural (ln) para obtenção de uma distribuição normal dos dados. Após a regressão múltipla para os efeitos do sexo, idade e IMC, cada variável resposta foi corrigida (ajustada) somando-se o resíduo resultante da regressão à média dessa variável.

O número total de observações para as variáveis difere de 391 (n total) em alguns casos, pois os níveis de LDL colesterol não foram calculados para indivíduos com triglicerídeos acima de 400 mg/dl e, com a finalidade de diminuir a variância da variável triglicerídeos, indivíduos fora da faixa média ± 2 (desvios padrão) foram excluídos.

Variáveis antropométricas

O índice de massa corporal (IMC) e a relação cintura quadril (WHR) apresentaram uma distribuição normal e por este motivo não foram transformados para análise. Os efeitos do sexo, idade e hábitos de vida sobre estes parâmetros foram testados por teste t ou correlação linear, e somente variáveis que se associaram significativamente ao IMC e ao WHR foram mantidas no ajuste. No modelo de regressão linear múltipla para ajuste do IMC foram

colocados sexo e idade como variáveis de correção. Já os valores de WHR (disponíveis somente para os indivíduos coletados na Faculdade de Farmácia, n=309) foram ajustados para os efeitos do uso de anticoncepcionais, consumo de álcool e idade em mulheres e para os efeitos do consumo de álcool e idade em homens. O ajuste foi realizado da mesma forma que nos níveis lipídicos, ou seja, somando-se o resíduo resultante da regressão à média da variável. Isto foi feito separadamente para homens e mulheres e como as médias diferiram significativamente entre os sexos, a análise do efeito dos genótipos descrita a seguir também foi realizada para cada sexo em separado.

3.4.3. Análise de variância e delineamento fatorial

Para analisar a influência dos RFLPs sobre os níveis lipídicos e variáveis antropométricas, as médias dos genótipos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), realizada com o pacote estatístico SPSS 8.0. Quando o teste de Levene para homogeneidade de variâncias foi significativo ($p < 0.05$), o teste não paramétrico correspondente (Kruskal-Wallis) foi utilizado. Nos casos em que o número de observações em um determinado genótipo era pequeno, os indivíduos foram separados em dois grupos (homozigotos versus portadores do outro alelo).

Com a finalidade de verificar a interação do genótipo com outros fatores, tais como sexo e tabagismo, por exemplo, uma subsequente análise de variância com delineamento fatorial foi realizada. Neste caso, quando o sexo entrava como uma variável de interação as variáveis resposta não foram ajustadas por este fator. Nesse tipo de análise o resultado fornecido mostra os efeitos do genótipo, da outra variável que se quer testar, além da interação destes dois fatores.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DESCRITIVA DA AMOSTRA

A tabela 4.1 mostra as características gerais da amostra coletada. Podemos observar que a frequência de tabagismo e consumo de álcool é significativamente superior no sexo masculino, enquanto que o sedentarismo é mais freqüente em mulheres. A idade média da amostra é de 43.2 anos (faixa de variação 15-89 anos) e homens e mulheres não diferem quanto a este parâmetro ($p = 0.330$).

Quanto aos níveis lipídicos, o que pode ser ressaltado é que o perfil lipídico de uma forma geral na população investigada não está dentro dos valores considerados "ótimos" pela NCEP, discutidos na introdução deste trabalho. A média dos valores de colesterol cai no limite superior do considerado desejável (< 200 mg/dl) e os níveis de LDL colesterol estão acima deste (< 100 mg/dl), com a média de 128.1 mg/dl. Além disso, podemos observar que homens têm níveis significativamente menores de HDL colesterol quando comparados com mulheres ($p < 0.001$). Os níveis de triglicerídeos também estão aumentados nos homens, embora esse incremento não seja significativo ($p = 0.06$).

Nas variáveis antropométricas, o que deve ser ressaltado é a alta média do IMC nesta amostra (26.0 kg/m²). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997), as medidas de IMC são classificadas como: IMC < 25 kg/m² como normal, IMC ≥ 25 kg/m² como sobrepeso e ≥ 30 kg/m² como obesidade. Nesta amostra cerca de 17% das pessoas enquadram-se dentro desta última categoria.

Tabela 4.1: Análise descritiva da amostra.

	Total	mulheres	homens	P*
n	391	210	171	
Dados gerais				
Idade ^b , anos	43.2 (16.4)	42.5 (17.4)	44.1 (15.0)	0.33
Tabagismo, %	35.4	30.5	42.7	0.02
Consumo de álcool, %	45.3	34.1	59.6	< 0.001
Sedentarismo, %	62.2	69.8	53.0	0.001
Climatério, %	-	29.7	-	
Uso CO ^a , %	-	30.2	-	
Níveis lipídicos ^b				
CT, mg/dl	200.0 (49.2)	201.3 (53.3)	198.4 (43.4)	0.54
LDL-C, mg/dl	128.1 (41.8)	128.1 (44.5)	128.0 (40.0)	0.98
HDL-C, mg/dl	44.8 (12.2)	47.7 (12.5)	41.1 (10.7)	< 0.001
TG, mg/dl	134.2 (86.5)	126.7 (77.3)	143.9 (96.6)	0.06
Medidas antropométricas ^b				
IMC, kg/m ²	26.0 (4.8)	25.9 (5.1)	26.2 (4.2)	0.48
WHR	0.87 (0.08)	0.84 (0.07)	0.91 (0.06)	< 0.001

^a CO: contraceptivos orais, ^b valores apresentados como média (desvio padrão), * p para a comparação entre homens e mulheres.

4.2. FREQUÊNCIA DOS RFLPs

4.2.1. Freqüências na amostra total

As freqüências gênicas e genótípicas para cada RFLP investigado estão apresentadas na tabela 4.2. A soma do número observado difere do n total da amostra (n = 391) porque a amplificação do fragmento de interesse não foi possível em alguns casos. Todos os marcadores utilizados foram polimórficos na população estudada.

Tabela 4.2: Frequências genótípicas e alélicas para os RFLPs investigados.

Polimorfismo		Genótipos			Alelo 2 (%)
		11	12	22	
Apo C-I - <i>HpaI</i>	n	250	127	11	
	%	64.4	32.7	2.8	19.2
Apo C-II - <i>AvaII</i>	n	125	189	70	
	%	32.6	49.2	18.2	42.8
Apo C-III - <i>SacI</i>	n	305	80	6	
	%	78.0	20.5	1.5	11.8
Apo C-III - <i>FokI</i>	n	130	174	74	
	%	34.8	46.5	18.7	42.6
Apo C-III - <i>MspI</i>	n	171	173	40	
	%	44.5	45.1	10.4	32.9
Apo A-IV - <i>XbaI</i>	n	260	117	12	
	%	66.8	30.1	3.1	18.1
Apo A-IV - <i>HinfI</i>	n	263	109	11	
	%	68.7	28.5	2.9	17.1
Apo A-IV - <i>PvuII</i>	n	339	44	0	
	%	88.5	11.5	0.0	5.7

4.2.2. Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos

A tabela 4.3 apresenta o resultado dos cálculos para o desequilíbrio de ligação existente entre os RFLPs localizados no agrupamento gênico A-I/C-III/A-IV. Com exceção dos pares *SacI-XbaI*, *SacI/HinfI* e *SacI/PvuII*, todos os demais polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação (D' entre 47.2 e 98.6%, $p < 0.01$). Já os dois polimorfismos investigados no agrupamento gênico E/C-I/C-II não estão em desequilíbrio de ligação ($D' = 0.162$, $p = 0.206$).

Tabela 4.3: Desequilíbrio de ligação, medidos pelo D', entre os RFLPs investigados no agrupamento gênico A-I/C-III/A-IV.

	SacI	FokI	MspI	XbaI	HinfI	PvuII
SacI	-	0.954*	0.908*	0.112	0.097	0.107
FokI		-	0.938*	0.686*	0.874*	-0.697*
MspI			-	0.638*	0.614*	-0.472*
XbaI				-	0.986*	-0.984*
HinfI					-	-0.984*
PvuII						-

* D' estatisticamente significativa (p<0.01)

4.2.3. Freqüências genotípicas e haplotípicas de acordo com níveis de colesterol total (CT) e de triglicerídeos (TG)

As freqüências genotípicas e haplotípicas foram comparadas agrupando-se os indivíduos conforme as diretrizes do NECP, descritas na introdução. Assim, fez-se a comparação entre as freqüências da categoria triglicerídeos < 150 mg/dl com aquela de triglicerídeos ≥ 200 mg/dl. Isto foi repetido para os níveis de colesterol total, onde foram comparados aqueles com CT < 200 mg/dl e os de CT ≥ 240 mg/dl. As tabelas 4.4 e 4.5 resumem os resultados encontrados para as freqüências genotípicas e haplotípicas, respectivamente. Pode-se observar que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para os níveis de triglicerídeos, embora para o polimorfismo *HpaI* (apo C-I) verifica-se uma tendência de associação (p = 0.075). A freqüência de portadores do genótipo H*1/H*1 foi maior entre os indivíduos com níveis de triglicerídeos menores que 150 mg/dl.

Para os níveis de colesterol total, observa-se que as freqüências haplotípicas para os sítios *HpaI*-*Avall* das apolipoproteínas C-I e C-II diferem entre os dois grupos. O haplótipo H*2-A*1 representa 15% dos haplótipos do grupo com CT < 200 mg/dl enquanto que está representado em somente 10.8% dos haplótipos do grupo com CT ≥ 240 mg/dl. Por outro lado, o haplótipo H*1-A*2 é mais prevalente (44.6 x 39.4%) em indivíduos que se enquadram no grupo com níveis mais elevados de colesterol.

Tabela 4.4: Freqüências genotípicas de acordo com os níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT).

	TG		p	CT		p
	TG < 150	TG ≥ 200		CT < 200	CT ≥ 240	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<i>Sacl</i>						
S*1/S*1	223 (79.4)	52 (78.8)		168 (76.7)	56 (81.2)	
S*1/S*2	53 (18.9)	13 (19.7)	1.000*	47 (21.5)	11 (15.9)	0.538*
S*2/S*2	5 (1.8)	1 (1.5)		4 (1.8)	2 (2.9)	
<i>FokI (T-455C)</i>						
TT	92 (34.2)	22 (34.9)		70 (33.5)	30 (46.9)	
TC	124 (46.1)	32 (50.8)	0.592	99 (47.4)	25 (39.1)	0.146
CC	53 (19.7)	9 (14.3)		40 (19.1)	9 (14.1)	
<i>MspI (C-482T)</i>						
CC	129 (46.6)	28 (43.8)		93 (43.0)	33 (50.0)	
CT	119 (43.0)	32 (50.0)	0.489*	95 (44.0)	31 (47.0)	0.057*
TT	29 (10.5)	4 (6.3)		28 (13.0)	2 (3.0)	
<i>HinfI (Thr347Ser)</i>						
Thr/Thr	187 (68.2)	44 (66.7)		151 (70.6)	48 (69.6)	
Thr/Ser	81 (29.6)	19 (28.8)	0.534*	59 (27.6)	20 (29.0)	0.951*
Ser/Ser	6 (2.2)	3 (4.5)		4 (1.9)	1 (1.4)	
<i>XbaI</i>						
X*1/X*1	184 (65.7)	43 (66.2)		148 (67.6)	46 (67.6)	
X*1/X*2	88 (31.4)	20 (30.8)	1.000*	66 (30.1)	21 (30.9)	1.000*
X*2/X*2	8 (2.9)	2 (3.1)		5 (2.3)	1 (1.5)	
<i>PvuII (Gln360His)</i>						
Gln/Gln	241 (88.0)	30 (90.9)	0.425*	191 (89.7)	63 (91.3)	0.819*
Gln/His	33 (12.0)	6 (9.1)		22 (10.3)	6 (8.7)	
<i>HpaI</i>						
H*1/H*1	188 (67.1)	34 (53.1)		141 (64.7)	47 (70.1)	
H*1/H*2	85 (30.4)	28 (43.8)	0.075*	70 (32.1)	20 (29.9)	0.284 < p < 0.342**
H*2/H*2	7 (2.5)	2 (3.1)		7 (3.2)	0 (0.0)	
<i>Avall</i>						
A*1/A*1	88 (31.8)	19 (29.7)		72 (33.2)	19 (28.8)	
A*1/A*2	140 (50.5)	30 (46.9)	0.562	108 (49.8)	30 (45.5)	0.285
A*2/A*2	49 (17.7)	15 (23.4)		37 (17.1)	17 (25.8)	

* Teste exato de Fisher, ** χ^2 de Roff e Bentzen (1989).

Tabela 4.5: Freqüências haplotípicas de acordo com os níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT).

	TG		p	CT		p
	TG < 150 2n (%)	TG ≥ 200 2n (%)		CT < 200 2n (%)	CT ≥ 240 2n (%)	
apo A-IV (<i>XbaI-Hinfl-PvuII</i>)						
X*1-Thr-Gln	412 (75.5)	99 (76.2)	0.294 < p < 0.351**	331 (77.7)	105 (77.2)	1.000*
X*1-Ser-Gln	0 (0.0)	1 (0.8)		0 (0.0)	0 (0.0)	
X*1-Thr-His	33 (6.4)	6 (4.6)		22 (5.2)	6 (4.4)	
X*2-Thr-Gln	8 (1.5)	1 (0.8)		6 (1.4)	2 (1.5)	
X*2-Ser-Gln	93 (17.0)	23 (17.7)		67 (15.7)	21 (15.4)	
apo C-III (<i>SacI-FokI-MspI</i>)						
S*1-T-C	303 (56.3)	74 (58.7)	0.662 < p < 0.720**	234 (56.0)	81 (63.3)	0.290 < p < 0.349**
S*1-C-T	110 (20.5)	25 (19.8)		89 (21.3)	21 (16.4)	
S*1-C-C	60 (11.1)	11 (8.7)		36 (8.6)	11 (8.6)	
S*1-T-T	3 (0.6)	2 (1.6)		4 (1.0)	3 (2.3)	
S*2-C-T	59 (11.0)	13 (10.3)		53 (12.7)	10 (7.8)	
S*2-T-C	2 (0.4)	0 (0.0)		1 (0.2)	1 (0.8)	
S*2-C-C	1 (0.2)	1 (0.8)		1 (0.2)	1 (0.8)	
apo C-I/C-II (<i>HpaI-AvaII</i>)						
H*1-A*1	237 (42.9)	41 (32.5)	0.086	183 (42.4)	52 (40.0)	0.032*
H*1-A*2	222 (40.2)	54 (42.9)		170 (39.4)	58 (44.6)	
H*2-A*1	76 (13.8)	24 (19.1)		65 (15.0)	14 (10.8)	
H*2-A*2	17 (3.1)	7 (5.5)		4 (3.2)	6 (4.6)	

* Teste exato de Fisher, ** χ^2 de Roff e Bentzen (1989).

A comparação de freqüências também foi realizada para os dois sexos em separado, usando-se os mesmos critérios descritos anteriormente. As freqüências gênicas para os RFLPs das apos C-II, C-III e A-IV não diferiram para os diferentes níveis lipídicos em nenhum dos sexos. Para o polimorfismo da apo C-I, entretando, verifica-se que a freqüência dos genótipos onde o alelo H*2 está presente é maior em homens com triglicerídeos ≥ 200 mg/dl ($p = 0.014$), o que não é observado em mulheres (figura 4.1). As prevalências dos haplótipos não diferiram para os diferentes níveis lipídicos para ambos os sexos.

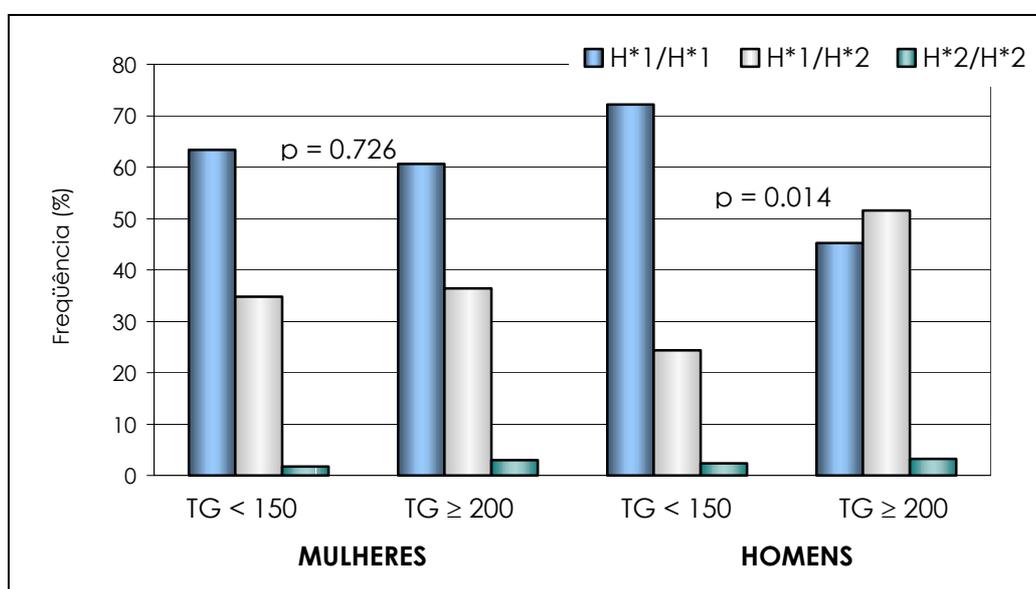


Figura 4.1: Comparação de freqüências para o polimorfismo *HpaI* da apo C-I de acordo com as categorias de triglicerídeos para os dois sexos em separado.

4.2.4. Freqüências dos marcadores de apo A-IV de acordo com as variáveis antropométricas

A tabela 4.6 apresenta os resultados de freqüências genótípicas de acordo com as categorias de IMC e os pontos de corte para relação cintura/quadril (WHR). Podemos observar que, embora as freqüências dos genótipos com os alelos X*2, 347Ser e 360His aumentem com o IMC, estas diferenças não são estatisticamente significantes.

O WHR foi analisado separadamente para cada sexo, pois os pontos de corte diferem para homens e mulheres (LEAN e cols., 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997). Os valores utilizados para este parâmetro são bastante controversos e segundo a Organização Mundial de Saúde, podem diferir de população para população. Por este motivo, os valores utilizados aqui foram retirados de uma investigação onde foram compilados resultados de várias pesquisas (LEAN e cols., 1995). Segundo este estudo os pontos de corte para a relação cintura/quadril são de 0.80 para mulheres e 0.95 para homens. Embora IMC e WHR sejam altamente correlacionados, não se observa a mesma tendência de aumento de frequência observada no IMC em nenhum dos sexos (tabela 4.6).

Tabela 4.6: Freqüências genótípicas para os polimorfismos da apo A-IV conforme as classificações de índice de massa corporal (IMC) e os pontos de corte para relação cintura/quadril.

	IMC (kg/m ²)			WHR			
	IMC < 25	25 ≤ IMC < 30	IMC ≥ 30	MULHERES		HOMENS	
				< 0.80	≥ 0.80	< 0.95	≥ 0.95
	n (%)			n (%)		n (%)	
XbaI							
X*1/X*1	129 (72.1)	88 (62.0)	43 (63.2)	41 (70.7)	79 (73.1)	60 (58.3)	24 (63.2)
X*1/X*2	46 (25.7)	48 (33.8)	23 (33.8)	14 (24.1)	28 (25.9)	37 (35.9)	13 (34.2)
X*2/X*2	4 (2.2)	6 (4.2)	2 (2.9)	3 (5.2)	1 (0.9)	6 (5.8)	1 (2.6)
P	0.314 < p < 0.372 **			0.261*		0.808*	
Thr347Ser							
Thr/Thr	130 (73.4)	91 (65.0)	42 (63.6)	40 (70.2)	78 (72.9)	61 (60.4)	24 (63.2)
Thr/Ser	43 (24.3)	44 (31.4)	22 (33.3)	14 (24.6)	29 (27.1)	34 (33.7)	12 (31.6)
Ser/Ser	4 (2.3)	5 (3.6)	2 (3.0)	3 (5.3)	0	6 (5.9)	2 (5.3)
P	0.437 < p < 0.498 **			0.057 < p < 0.074**		0.949*	
Gln360His							
Gln/Gln	160 (90.4)	125 (89.4)	54 (81.8)	50 (86.2)	93 (86.9)	88 (87.1)	35 (92.1)
Gln/His	17 (9.6)	15 (10.6)	12 (18.2)	8 (13.8)	14 (13.1)	13 (12.9)	3 (7.9)
P	0.165			1.000*		0.556*	

* teste exato de Fisher, ** χ^2 de Roff e Bentzen (1989).

As categorias de IMC também foram analisadas em relação às frequências dos haplótipos para a apo A-IV. Como na análise uni-loco foram observadas tendências de aumento de frequência dos genótipos com os alelos X*2, 347Ser e 360His, os haplótipos foram divididos em dois grupos: haplótipo X*1-347Thr-360Gln e portadores dos outros haplótipos. Quando as prevalências são comparadas observa-se um claro aumento de haplótipos contendo X*2, 347Ser ou 360His com o aumento do IMC (20% quando IMC < 25 e 30% quando IMC ≥ 30). A figura 4.2 apresenta os resultados graficamente.

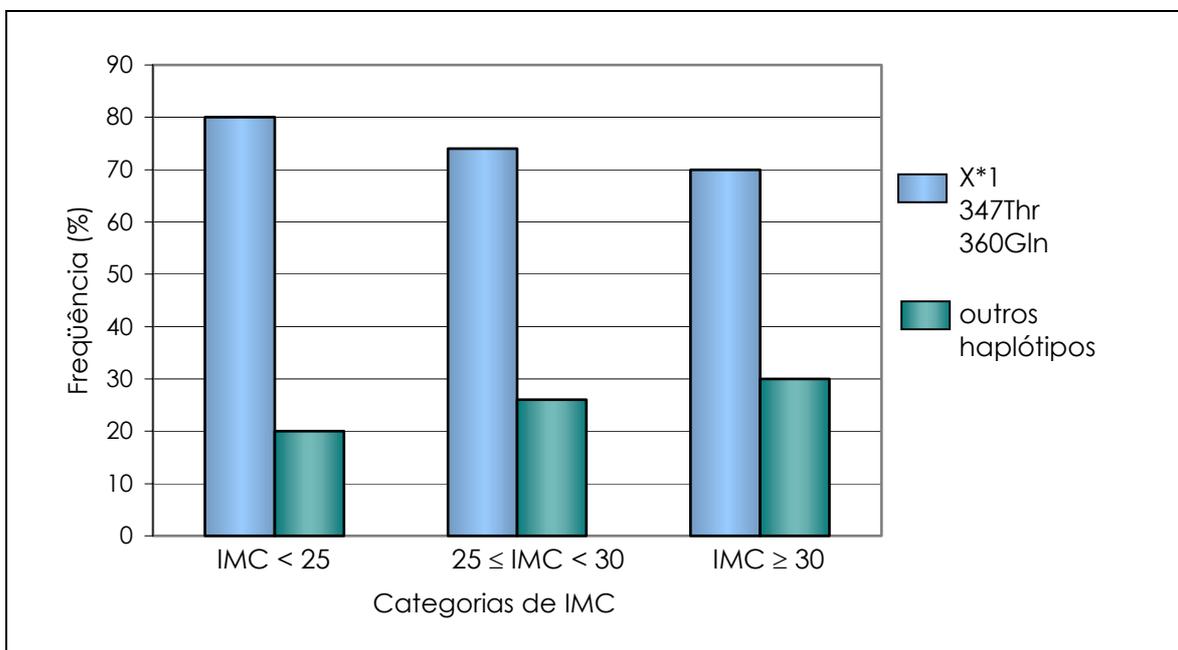


Figura 4.2: Frequências haplotípicas de acordo com as categorias de IMC. Comparação entre as frequências: $\chi^2 = 6.757$, $p = 0.034$.

4.3. INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS SOBRE OS NÍVEIS LIPÍDICOS

Apolipoproteína C-I

O polimorfismo *HpaI* criado pela inserção de 4 pares de bases na região promotora do gene da apo C-I está em forte desequilíbrio de ligação com as isoformas da apo E ($D' = 79.57\%$, $p < 0.00001$). A variabilidade da apo E já

foi investigada em nosso laboratório (DE ANDRADE e cols., 2000) e como os dados para este polimorfismo estavam disponíveis, a influência do sítio *HpaI* foi analisada de duas maneiras: uma com todos os indivíduos e a outra somente com indivíduos portadores do genótipo ϵ^3/ϵ^3 para apo E. O alelo H*1 está ligado ao alelo ϵ^3 , enquanto o alelo H*2 está ligado aos alelos ϵ^2 e ϵ^4 . O efeito do polimorfismo da apo E já foi estudado em um grande número de populações e de uma maneira geral, o alelo ϵ^4 está associado a um pior perfil lipídico, enquanto o alelo ϵ^2 está associado com diminuição dos níveis lipídicos (revisão em MAHLEY e RALL, 2000).

Na tabela 4.7 podemos observar que a presença da inserção, alelo H*2, não está associada significativamente com alterações nos níveis lipídicos quando se analisa a amostra como um todo. Contudo, quando apenas os indivíduos com genótipo ϵ^3/ϵ^3 são considerados, observamos que portadores do alelo H*2 têm níveis significativamente menores de colesterol total (-8.3%) e de LDL colesterol (-13%).

Tabela 4.7: Influência do polimorfismo *HpaI* sobre o perfil lipídico na amostra total e em portadores ϵ^3/ϵ^3 .

	<i>HpaI</i>		p
	H*1/H*1	H*2 +	
TODOS			
<i>n</i>	236	130	
CT ^a	198.9 (48.2)	195.3 (45.1)	0.53
HDL-C	45.2 (10.6)	45.6 (12.3)	0.73
LDL-C ^a	129.8 (41.6)	123.3 (39.3)	0.08
TG ^a	119.4 (61.9)	132.4 (82.4)	0.71
apo E ϵ^3/ϵ^3			
<i>n</i>	208	18	
CT ^a	201.6 (49.2)	184.8 (34.6)	0.01
HDL-C	45.7 (10.8)	46.2 (12.4)	0.84
LDL-C ^a	132.0 (42.5)	114.9 (34.4)	0.006
TG ^a	120.2 (63.6)	117.7 (52.3)	0.44

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão) ^a médias dos níveis não ajustados, variáveis analisadas na forma de ln. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

Com a finalidade de se verificar a interação sexo*genótipo, uma análise fatorial foi realizada para as variáveis não ajustadas por sexo. Quando a amostra total é analisada observamos interações significantes com sexo para colesterol total, LDL colesterol e triglicerídeos (tabela 4.8). As figuras 4.3, 4.4 e 4.5 mostram os resultados graficamente. Neste tipo de análise torna-se claro o efeito do genótipo sobre os níveis lipídicos em cada sexo. Em mulheres, observa-se que tanto os níveis de colesterol total (figura 4.4) como de LDL colesterol (figura 4.3) estão diminuídos em portadoras do alelo H*2, enquanto que os níveis de triglicerídeos parecem não ser afetados por este polimorfismo (figura 4.5). Já em homens, o efeito mais pronunciado ocorre sobre os níveis de triglicerídeos, onde portadores do alelo H*2 tem níveis cerca de 38% superiores aos homozigotos H*1/H*1 (figura 4.5).

Tabela 4.8: Análise fatorial para os efeitos do sexo e do polimorfismo *HpaI* sobre os níveis de LDL colesterol, colesterol total e triglicerídeos na amostra total.

	<i>HpaI</i>	Nível lipídico	N	Efeito	p
SEXO		LDL-C ^α			
feminino	H*1/H*1	132.9 (44.5)	135	sexo	0.694
	H*2 +	119.9 (43.8)	81	<i>HpaI</i>	0.139
masculino	H*1/H*1	126.4 (39.7)	110	Sexo* <i>HpaI</i>	0.036
	H*2 +	129.6 (31.7)	52		
		CT ^α			
feminino	H*1/H*1	205.5 (52.5)	137	sexo	0.845
	H*2 +	193.9 (54.1)	81	<i>HpaI</i>	0.756
masculino	H*1/H*1	193.8 (45.8)	113	Sexo* <i>HpaI</i>	0.012
	H*2 +	205.0 (33.7)	57		
		TG ^α			
feminino	H*1/H*1	126.3 (73.5)	136	sexo	0.025
	H*2 +	125.7 (81.6)	81	<i>HpaI</i>	0.147
masculino	H*1/H*1	127.5 (79.6)	112	Sexo* <i>HpaI</i>	0.019
	H*2 +	175.7 (118.5)	56		

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão) ^α médias dos níveis não ajustados, variáveis analisadas na forma de ln. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

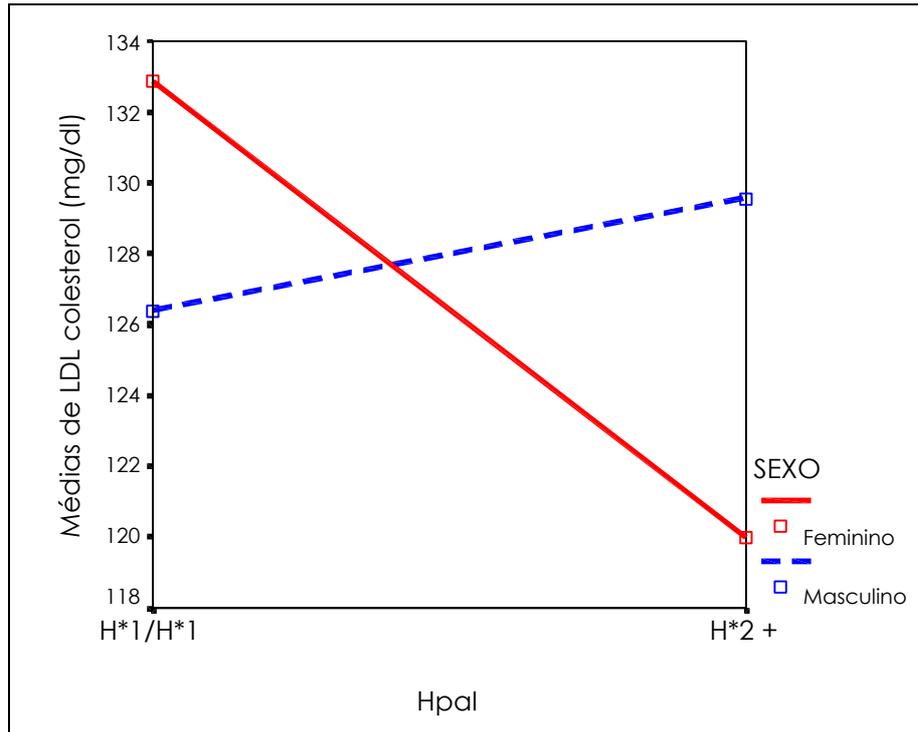


Figura 4.3: Efeito da interação sexo*genótipo (*HpaI*) sobre os níveis de LDL colesterol. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

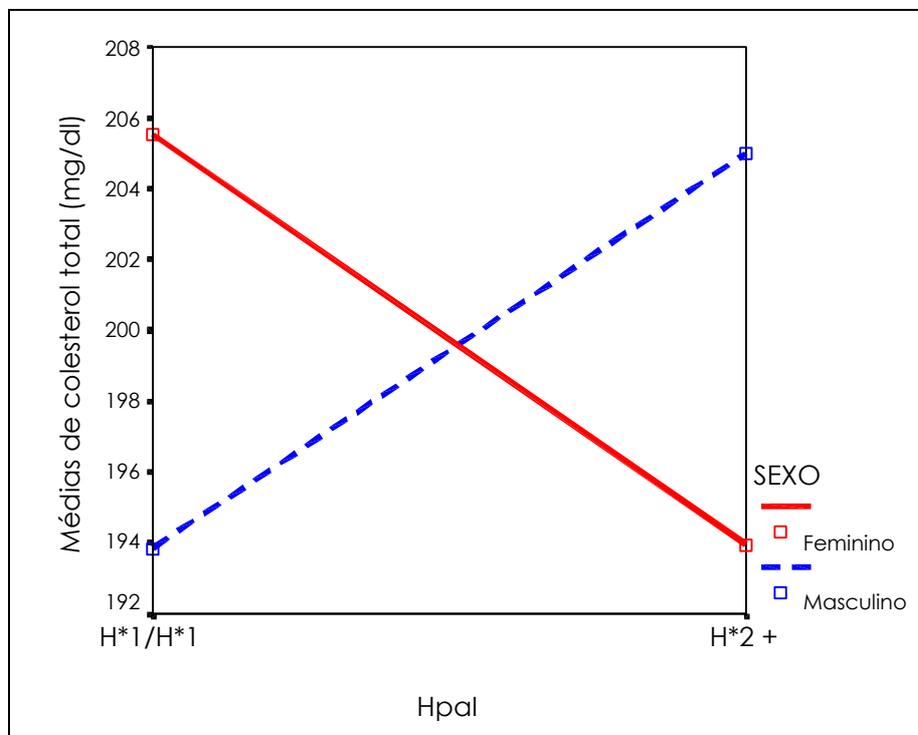


Figura 4.4: Efeito da interação sexo*genótipo (*HpaI*) sobre os níveis de colesterol total. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

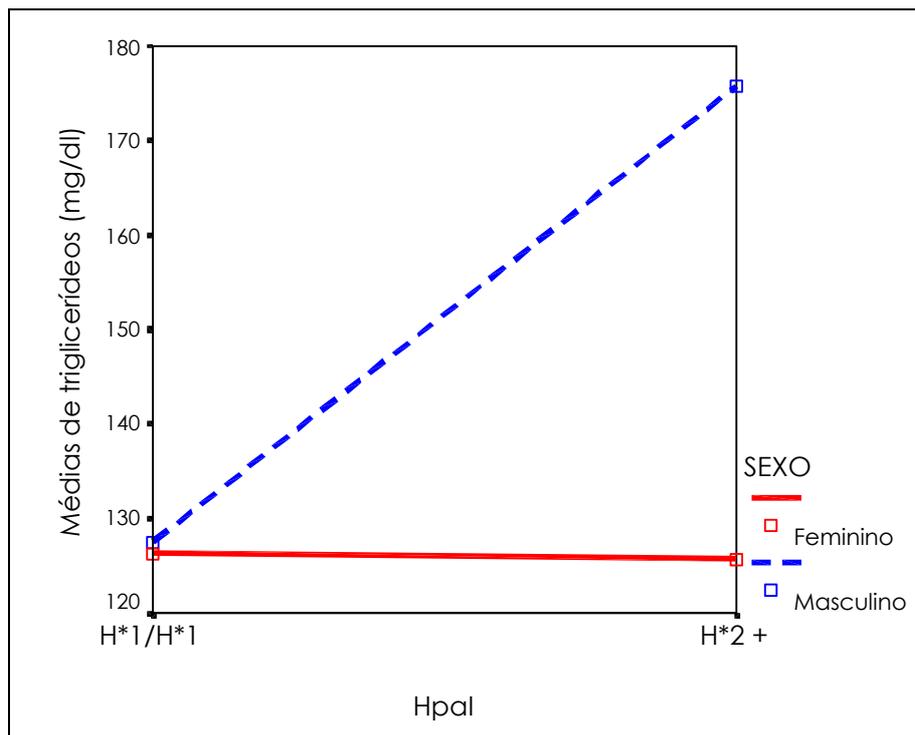


Figura 4.5: Efeito da interação sexo*genótipo (*HpaI*) sobre os níveis de triglicerídeos. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

Outro tipo de interação observado é a modulação do efeito do polimorfismo *HpaI* sobre os níveis de HDL colesterol pelo tabagismo (tabela 4.9). Mulheres fumantes portadoras do H*2 tem níveis de HDL cerca de 20% maiores que homozigotas H*1/H*1, enquanto que em mulheres não fumantes os níveis não se alteram (p interação fumo*genótipo = 0.019). Em homens a interação fumo*genótipo não foi observada (p = 0.657).

Esta interação também é observada quando são considerados somente indivíduos com genótipo ϵ^3/ϵ^3 para apo E. Embora o número de fumantes portadores do alelo H*2 seja muito pequeno ($n=3$), estes apresentam níveis de HDL colesterol cerca de 50% maiores (63.7 mg/dl x 42.3 mg/dl) quando comparados com homozigotos H*1/H*1 também fumantes (p interação fumo*genótipo = 0.001). Em não fumantes os níveis de HDL colesterol não diferem entre H*1/H*1 e portadores do alelo H*2. Neste caso, não foi possível investigar se o efeito é diferente entre os sexos, uma vez que o tamanho amostral é muito pequeno.

Tabela 4.9: Análise fatorial para os efeitos do tabagismo (em homens e mulheres) e do polimorfismo *HpaI* sobre os níveis de HDL colesterol na amostra total.

	<i>HpaI</i>	Nível lipídico	N	Efeito	p
MULHERES					
HDL-C					
TABAGISMO					
não	H*1/H*1	48.7 (11.6)	93	fumo	0.608
	H*2 +	48.2 (12.9)	59	<i>HpaI</i>	0.037
sim	H*1/H*1	43.0 (9.9)	39	fumo* <i>HpaI</i>	0.019
	H*2 +	51.8 (17.2)	21		
HOMENS					
TABAGISMO					
não	H*1/H*1	41.9 (9.7)	62	fumo	0.835
	H*2 +	40.9 (10.7)	29	<i>HpaI</i>	0.944
sim	H*1/H*1	40.7 (12.1)	38	fumo* <i>HpaI</i>	0.657
	H*2 +	41.4 (8.6)	22		

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão). H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

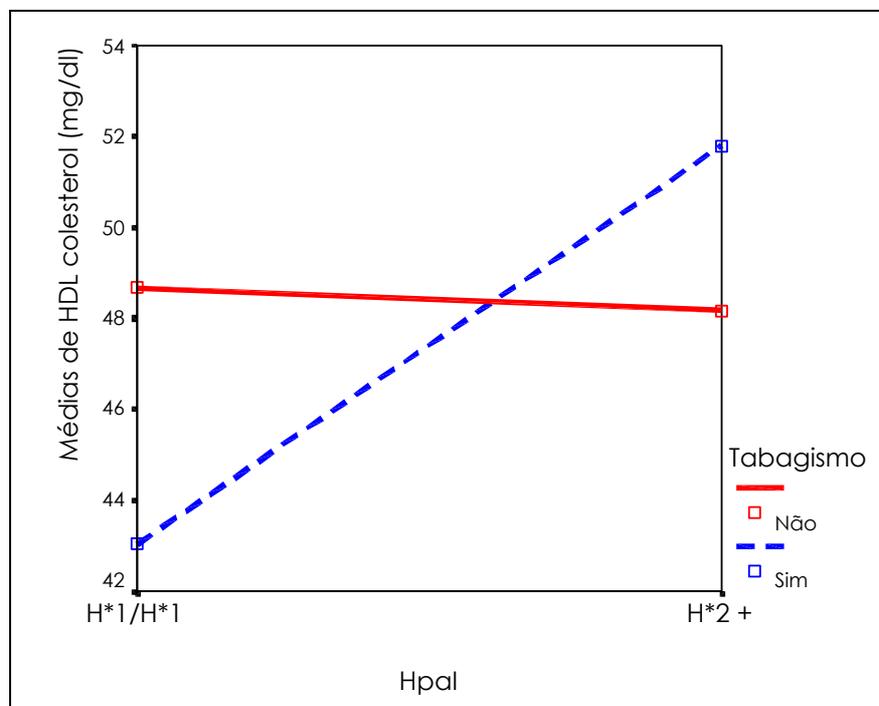


Figura 4.6: Efeito da interação fumo*genótipo (*HpaI*) sobre os níveis de HDL colesterol na amostra total. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

A tabela 4.10 apresenta o resultado da análise fatorial para interação sexo*genótipo somente com indivíduos apo ϵ^3/ϵ^3 . Em mulheres os níveis de LDL colesterol são 27% menores em portadoras do alelo H*2 enquanto que ocorre uma pequena elevação de 6% em homens com o mesmo genótipo (figura 4.7). Há uma interação sexo*genótipo altamente significativa ($p = 0.005$), onde se verifica que o efeito do genótipo ocorre no sexo feminino. Este mesmo tipo de interação é observado sobre os níveis de colesterol total, onde mulheres portadoras de H*2 têm níveis 19% menores, enquanto que em homens os níveis praticamente não se alteram (figura 4.8). Sobre os níveis de triglicerídeos não foi verificada interação sexo*genótipo significativa ($p = 0.492$) como foi observada na amostra total. Provavelmente o efeito do sítio *HpaI* sobre os níveis de triglicerídeos não sejam independentes da variabilidade da apo E.

Tabela 4.10: Análise fatorial para os efeitos do sexo e do polimorfismo *HpaI* sobre os níveis de LDL, colesterol total e triglicerídeos em indivíduos com genótipo ϵ^3/ϵ^3 para apo E.

	<i>HpaI</i>	Nível lipídico	N	Efeito	p
SEXO		LDL-C ^a			
feminino	H*1/H*1	135.0 (45.8)	121	sexo	0.038
	H*2 +	98.3 (25.3)	10	<i>HpaI</i>	0.016
masculino	H*1/H*1	127.7 (39.8)	95	Sexo* <i>HpaI</i>	0.005
	H*2 +	135.6 (34.2)	8		
		CT ^a			
feminino	H*1/H*1	207.8 (54.3)	123	sexo	0.116
	H*2 +	169.0 (28.7)	10	<i>HpaI</i>	0.021
masculino	H*1/H*1	196.0 (44.9)	98	Sexo* <i>HpaI</i>	0.009
	H*2 +	204.5 (32.4)	8		
		TG ^a			
feminino	H*1/H*1	126.1 (75.8)	122	sexo	0.401
	H*2 +	112.4 (48.0)	10	<i>HpaI</i>	0.330
masculino	H*1/H*1	129.5 (80.5)	97	Sexo* <i>HpaI</i>	0.492
	H*2 +	124.2 (59.8)	8		

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão) ^a médias dos níveis não ajustados, variáveis analisadas na forma de ln. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

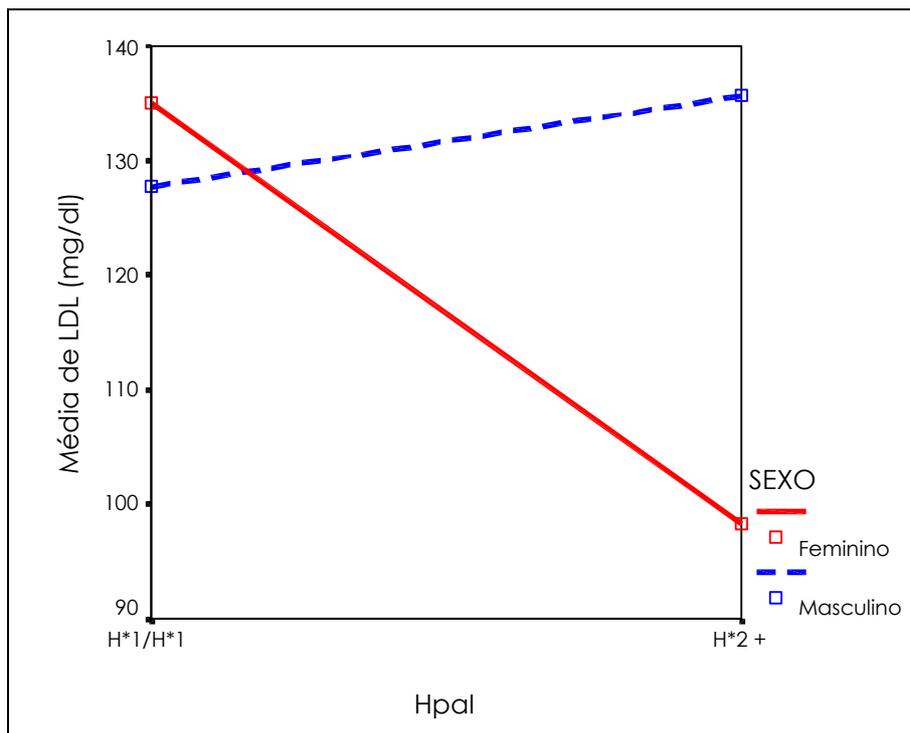


Figura 4.7: Efeito da interação sexo*genótipo (*HpaI*) sobre os níveis de LDL colesterol em indivíduos com genótipo ϵ^*3/ϵ^*3 para apo E. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

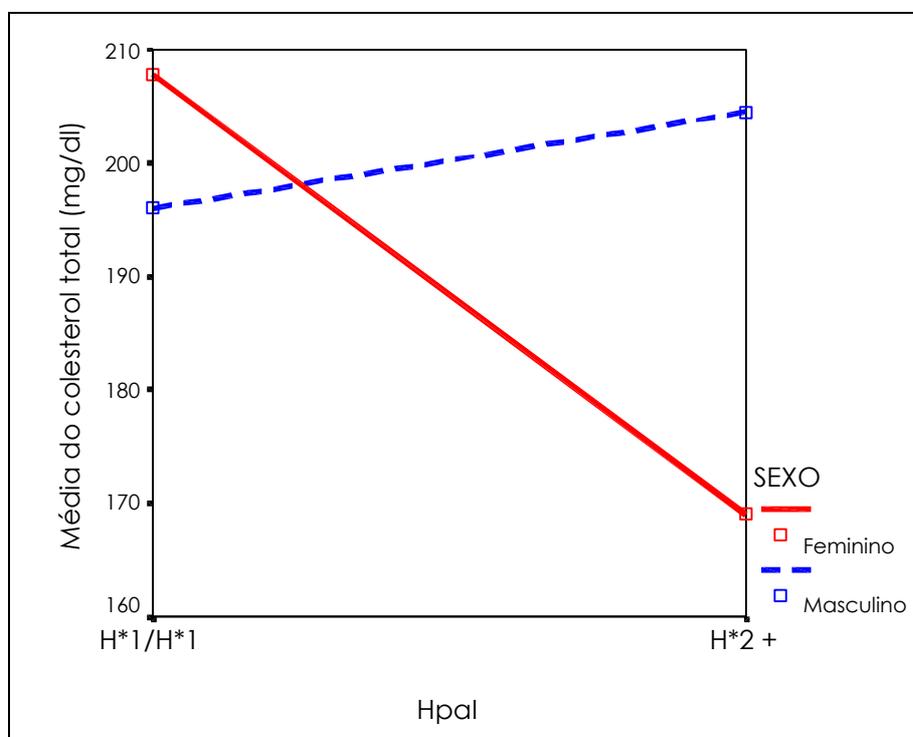


Figura 4.8: Efeito da interação sexo*genótipo (*HpaI*) sobre os níveis de colesterol total em indivíduos com genótipo ϵ^*3/ϵ^*3 para apo E. H*2 +: heterozigotos H*1/H*2 e homozigotos H*2/H*2.

Apolipoproteína C-II

Este RFLP, apesar de não estar em desequilíbrio de ligação com a apo E ($p = 0.253$), foi analisado da mesma forma que o polimorfismo *HpaI*, de forma a controlar o efeito da variabilidade em outro loco sobre os níveis lipídicos. Na amostra total, observa-se uma tendência para a redução dos níveis de triglicerídeos em portadores do alelo A*2, embora não significativa ($p = 0.07$). Já quando se analisa somente indivíduos homocigotos ϵ^*3/ϵ^*3 , esta associação se torna evidente ($p = 0.04$), apesar do número amostral menor (tabela 4.11). Portadores do alelo A*2 tem níveis de triglicerídeos 9% menores. Uma análise fatorial também foi realizada para este RFLP, mas nenhuma interação sexo*genótipo, tabagismo*genótipo ou sedentarismo*genótipo foi observada.

Tabela 4.11: Influência do polimorfismo Avall sobre o perfil lipídico.

	Avall		p
	A*1/A*1	A*2 +	
TODOS			
<i>n</i>	121	248	
CT ^a	194.4 (45.2)	199.8 (48.6)	0.44
HDL-C	45.3 (11.5)	45.3 (11.2)	0.98
LDL-C ^a	123.7 (39.5)	129.9 (41.8)	0.19
Tg ^a	127.3 (58.0)	123.2 (76.1)	0.07 ^b
apo E ϵ^*3/ϵ^*3			
<i>n</i>	68	160	
CT ^a	201.2 (45.6)	200.5 (50.4)	0.58
HDL-C	46.1 (11.2)	45.5 (10.8)	0.72
LDL-C ^a	129.7 (39.8)	131.5 (43.7)	0.98
Tg ^a	126.9 (51.1)	117.3 (67.0)	0.04 ^b

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão) ^a médias dos níveis não ajustados, variáveis analisadas na forma de ln, ^b teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A*2 +: heterocigotos A*1/A*2 e homocigotos A*2/A*2.

Apolipoproteína C-III

A comparação entre as médias das variáveis lipídicas para os três RFLPs investigados está apresentada na tabela 4.12. A presença do alelo S*2 foi associada a uma diminuição nos níveis de LDL-C, embora este resultado provavelmente seja espúrio, uma vez que este alelo está associado a aumento dos níveis lipídicos em diversas populações, como foi descrito na introdução. Esta associação não faz sentido quando consideramos o metabolismo de lipídeos e o conhecimento atual sobre este polimorfismo e provavelmente deve ser resultado do grande número de testes realizados com a amostra.

Já os dois polimorfismos investigados na região 5' do gene para apo C-III, localizados no elemento insulino responsivo (IRE), parecem não afetar os níveis de lipídeos. No entanto, quando testamos as interações com sexo e tabagismo, observamos algumas interações interessantes (tabelas 4.13 e 4.14).

Tabela 4.12: Influência dos polimorfismos da apo C-III sobre o perfil lipídico.

	n	CT ^a	HDL-C	LDL-C ^a	TG ^a
<i>Sacl</i>					
S*1/S*1	287	200.0 (47.0)	45.2 (11.1)	130.2 (40.4)	123.6 (70.4)
S*2 +	82	191.2 (49.0)	45.8 (11.8)	119.9 (42.7)	128.0 (71.8)
p		0.25	0.64	0.04	0.25
<i>FokI (T-455C)</i>					
TT	123	202.8 (52.6)	46.1 (12.7)	130.9 (44.4)	125.7 (71.4)
TC	163	196.0 (43.0)	44.4 (9.4)	126.9 (38.4)	125.5 (69.1)
CC	68	192.0 (46.7)	45.0 (12.1)	123.9 (40.3)	119.9 (74.1)
p		0.51	0.66	0.67	0.51
<i>MspI (C-482T)</i>					
CC	162	199.9 (49.7)	45.8 (11.8)	129.5 (42.2)	122.2 (69.2)
CT	161	198.6 (45.6)	44.7 (11.0)	129.0 (40.3)	126.8 (74.2)
TT	39	184.1 (41.4)	45.3 (10.2)	115.2 (37.3)	117.7 (58.8)
p		0.18	0.69	0.11	0.77

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão) ^a médias dos níveis não ajustados, variáveis analisadas na forma de ln. S*2 +: heterozigotos S*1/S*2 e homozigotos S*2/S*2.

Na análise fatorial se observa que o sexo parece influenciar o efeito do polimorfismo T-455C sobre os níveis de triglicéridos, ainda que estes efeitos sejam marginalmente significantes (tabela 4.13 e figura 4.9). Mulheres homozigotas CC tem níveis de triglicéridos 20% menores que homozigotas TT, enquanto que o efeito deste RFLP se dá de maneira inversa em homens, onde portadores do genótipo CC têm níveis 10% superiores aos TT (p para interação sexo*genótipo = 0.056). Outra tendência é vista quando comparamos os níveis de HDL colesterol em fumantes e não fumantes (tabela 4.13 e figura 4.10). Neste caso, o mesmo genótipo que aumenta os níveis de HDL em não fumantes (-455 TT), parece ter o efeito contrário em fumantes, onde diminui os níveis em 12% (p de interação fumo*genótipo = 0.05).

Este mesmo tipo de interação é observado em relação ao polimorfismo C-482T (tabela 4.14 e figura 4.11), onde os níveis de HDL colesterol em indivíduos -482CC é maior do que os de indivíduos -482TT em não fumantes e menor em fumantes (p interação fumo*genótipo = 0.015).

Tabela 4.13: Análise fatorial para os efeitos do sexo, tabagismo e do polimorfismo *FokI* sobre os níveis de triglicerídeos e HDL colesterol.

Variável	<i>FokI</i> T-455C	Nível lipídico	N	Efeito	p
SEXO		TG ^a			
feminino	TT	127.5 (75.1)	78		
	TC	136.9 (85.5)	92	sexo	0.040
	CC	102.6 (53.5)	37	<i>FokI</i>	0.563
masculino	TT	143.6 (101.8)	50	Sexo* <i>FokI</i>	0.056
	TC	136.0 (82.4)	81		
	CC	157.5 (115.3)	33		
TABAGISMO		HDL-C			
Não	TT	47.2 (13.2)	83		
	TC	44.5 (9.9)	108	fumo	0.348
	CC	44.3 (10.6)	45	<i>FokI</i>	0.652
Sim	TT	41.3 (12.4)	41	Fumo* <i>FokI</i>	0.050
	TC	43.7 (10.2)	51		
	CC	47.1 (15.1)	21		

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão) ^a médias dos níveis não ajustados, variáveis analisadas na forma de ln.

Tabela 4.14: Análise fatorial para os efeitos do tabagismo e do polimorfismo *MspI* sobre os níveis de HDL colesterol.

Variável	<i>MspI</i> C-482T	Nível lipídico	N	Efeito	p
TABAGISMO		HDL-C			
Não	CC	47.0 (12.3)	106		
	CT	44.3 (10.4)	114	fumo	0.974
	TT	43.8 (9.9)	21	<i>MspI</i>	0.578
Sim	CC	43.7 (12.3)	55	Fumo* <i>MspI</i>	0.015
	CT	44.8 (13.5)	49		
	TT	49.1 (10.0)	14		

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão).

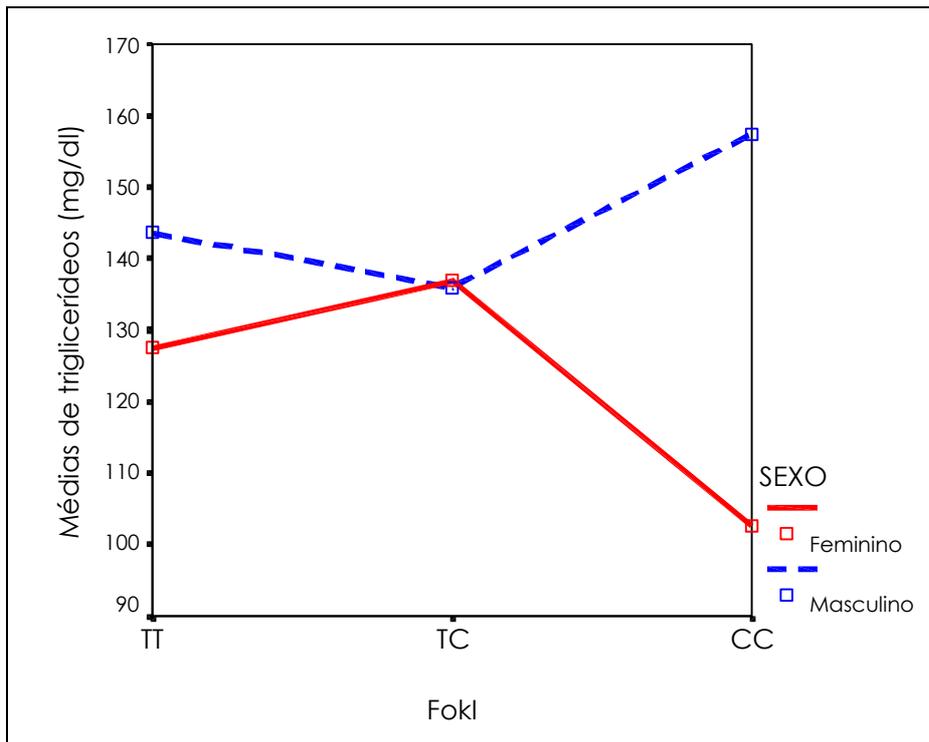


Figura 4.9: Efeito da interação sexo*genótipo (FokI) sobre os níveis de triglicerídeos.

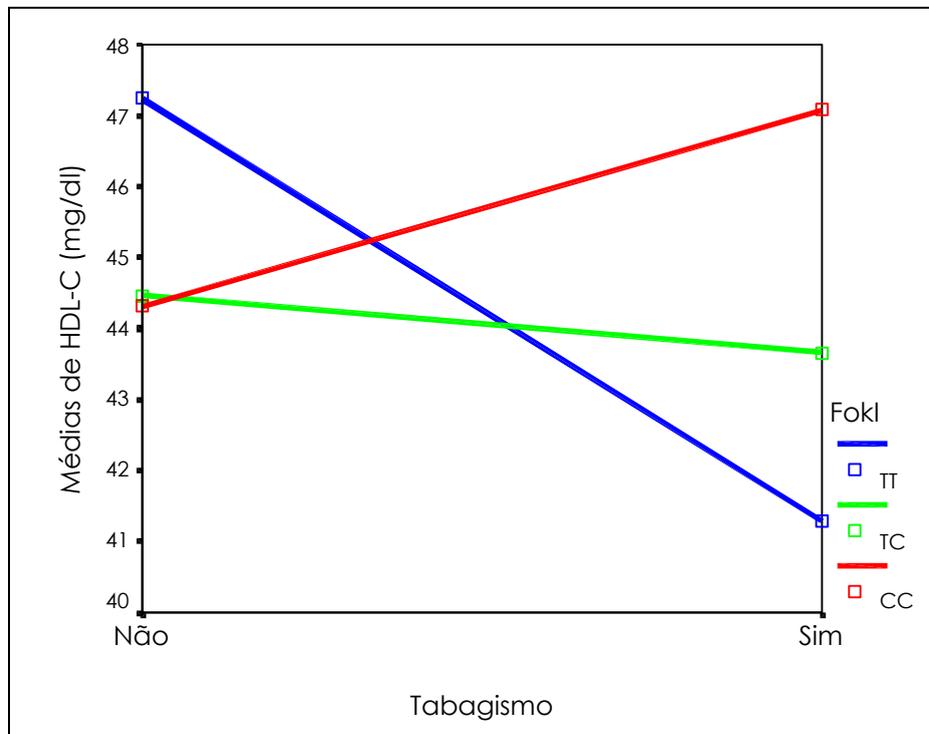


Figura 4.10: Efeito da interação fumo*genótipo (FokI) sobre os níveis de HDL colesterol.

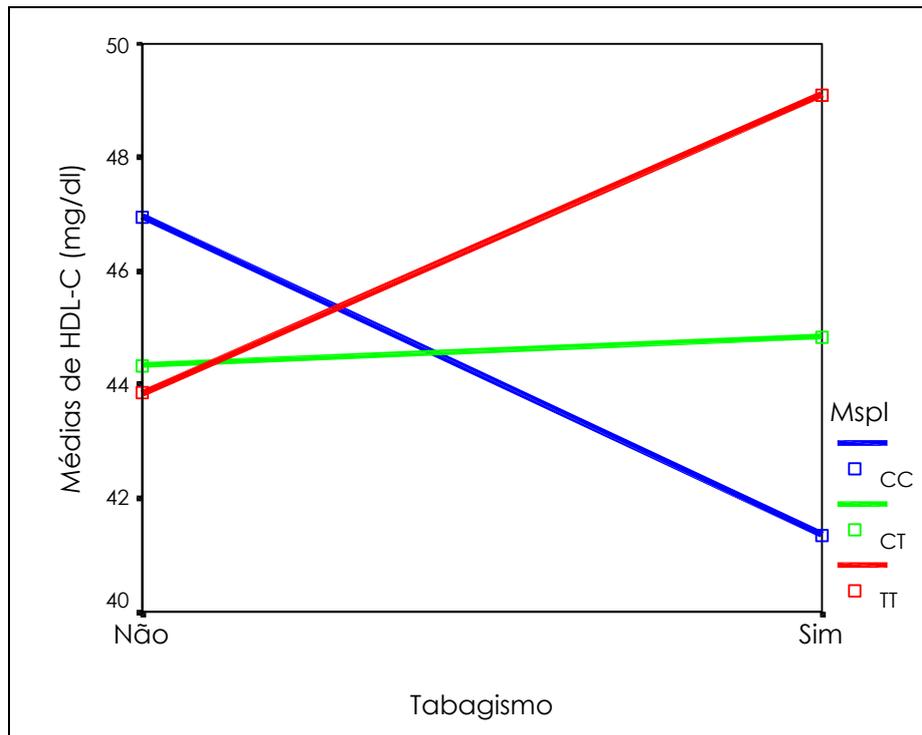


Figura 4.11: Efeito da interação fumo*genótipo (*Mspl*) sobre os níveis de HDL colesterol.

Apolipoproteína A-IV

O resultado da análise do efeito da variabilidade da apo A-IV sobre os níveis lipídicos está apresentado na tabela 4.15. Pode-se observar que os três polimorfismos parecem não influenciar de maneira significativa os níveis lipídicos quando a análise é realizada sem testar as interações. Quando testamos interações com sedentarismo, verifica-se que o efeito do polimorfismo *PvuII* é diferente em sedentários de não sedentários. Ocorre um aumento de 13.5% nos níveis de LDL colesterol em indivíduos sedentários portadores do alelo 360His, enquanto que em não sedentários portadores do mesmo alelo os níveis são cerca de 7% menores (p interação genótipo*sedentarismo = 0.038). A tabela 4.16 e a figura 4.13 mostram estes resultados. As interações sexo*genótipo e tabagismo*genótipo foram testadas para os três RFLPs mas nenhuma interação foi constatada.

Tabela 4.15: Influência dos polimorfismos da apo A-IV sobre o perfil lipídico.

	n	CT ^a	HDL-C	LDL-C ^a	TG ^a
<i>Xba</i> I					
X*1/X*1	243	195.9 (47.0)	45.4 (11.4)	125.5 (41.2)	123.4 (67.2)
X*2 +	124	201.6 (48.5)	45.2 (11.0)	132.3 (40.9)	125.4 (75.6)
p		0.30	0.90	0.14	0.26
<i>Hinf</i> I (Thr347Ser)					
Thr/Thr	247	196.3 (48.5)	45.5 (11.5)	125.6 (42.0)	123.9 (67.1)
Ser +	115	202.3 (46.5)	44.7 (10.9)	133.3 (39.6)	127.3 (79.0)
p		0.20	0.53	0.07	0.26
<i>Pvu</i> II (Gln360His)					
Gln/Gln	322	198.4 (48.1)	45.3 (44.3)	127.6 (41.4)	127.3 (73.8)
Gln/His	40	200.3 (47.7)	44.3 (9.7)	134.0 (40.7)	114.0 (52.9)
p		0.49	0.59	0.17	0.15

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão), ^a médias dos níveis não ajustados, variáveis analisadas na forma de ln. X*2 +: heterozigotos X*1/X*2 e homozigotos X*2/X*2. Ser +: heterozigotos Thr/Ser e homozigotos Ser/Ser.

Tabela 4.16: Análise fatorial para os efeitos do sedentarismo e do polimorfismo *Pvu*II sobre os níveis de LDL colesterol.

Variável	<i>Pvu</i> II Gln360His	Nível lipídico	N	Efeito	p
SEDENTARISMO		LDL-C ^a			
Não	Gln/Gln	128.0 (42.9)	99	sedentarismo	0.342
	Gln/His	120.0 (32.8)	18	<i>Pvu</i> II	0.369
Sim	Gln/Gln	120.8 (36.2)	176	sedentarismo* <i>Pvu</i> II	0.038
	Gln/His	137.1 (31.9)	22		

Níveis lipídicos apresentados como média em mg/dl (desvio padrão). ^a médias dos níveis não ajustados, variável analisada na forma de ln.

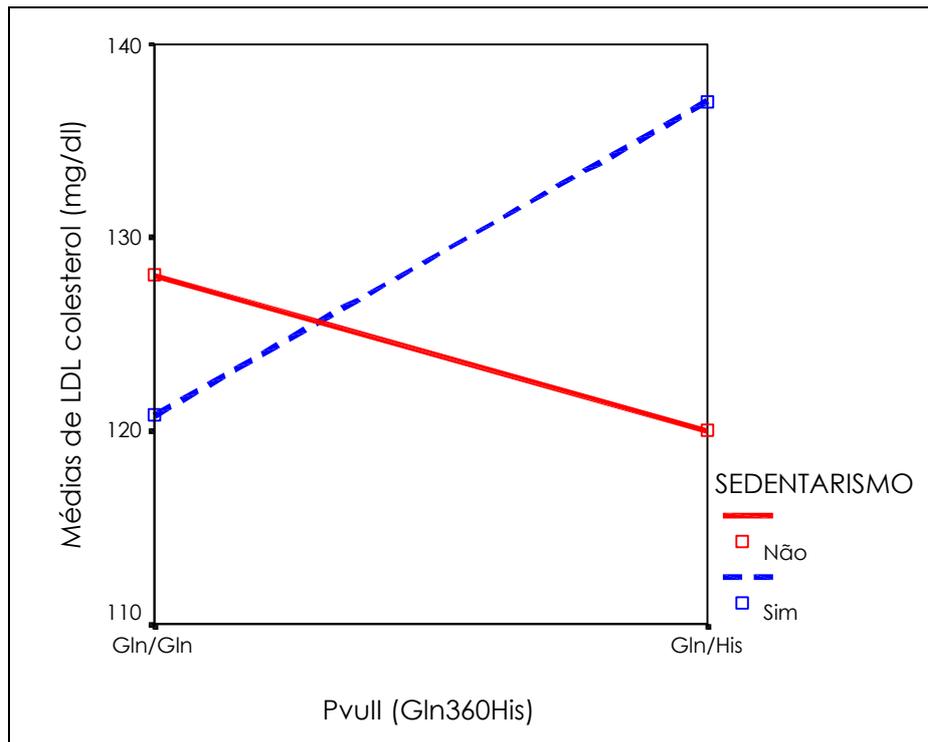


Figura 4.12: Efeito da interação sedentarismo*genótipo (PvuII) sobre os níveis de LDL colesterol.

4.4. INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE DA APO A-IV SOBRE VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS

A figura 4.13 apresenta os resultados da análise de associação entre os três RFLPs investigados no gene da apo A-IV e o índice de massa corporal (IMC). Indivíduos portadores dos alelos 347Ser e X*2 tem IMC cerca de 1kg/m² maior que indivíduos homocigotos 347Thr/Thr e X*1/X*1 (p = 0.02). Esta diferença também é observada quando se compara indivíduos portadores do alelo 360His com homocigotos 360Gln/Gln, mas esse incremento não atinge nível significativo devido ao menor número de indivíduos portadores do alelo 360His (n = 40).

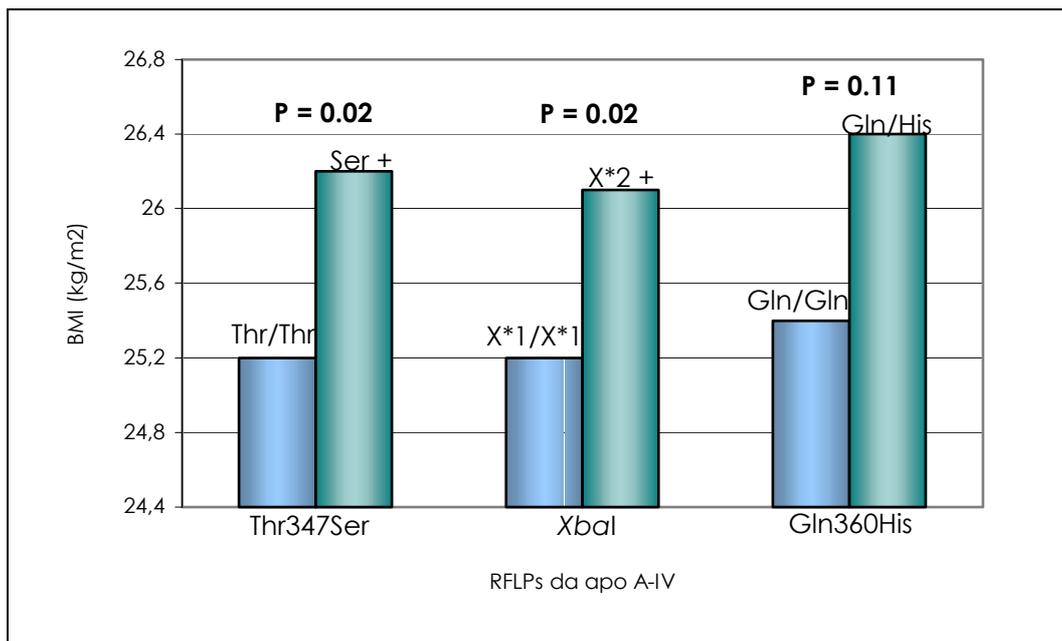


Figura 4.13: Comparação das médias de IMC para os três polimorfismos da apo A-IV investigados. X*2 +: heterozigotos X*1/X*2 e homozigotos X*2/X*2. Ser +: heterozigotos Thr/Ser e homozigotos Ser/Ser.

As médias de IMC também foram comparadas entre os haplótipos. Esta análise foi realizada da seguinte maneira: homozigotos para o haplótipo X*1-347Thr-360Gln (mais freqüente) versus haplótipos com 347Ser ou haplótipos com 360His. As presenças de serina na posição 347 e histidina na posição 360 são mutuamente exclusivas, ou seja, haplótipos com a configuração 347Ser-360His não ocorrem. Como o sítio para XbaI está em forte desequilíbrio de ligação positivo com o polimorfismo Thr347Ser, haplótipos onde X*2 e 347Ser estavam presentes foram analisados juntos.

A média de IMC em homozigotos para o haplótipo X*1-347Thr-360Gln é de 24.9 kg/m², enquanto que em haplótipos X*2-347Ser-360Gln o IMC médio é 26.2 kg/m² (p = 0.004). Da mesma forma, haplótipos onde o alelo 360His está presente o IMC é significativamente maior quando comparado com homozigotos para o haplótipo mais comum (p = 0.019). A figura 4.14 apresenta estes resultados graficamente. O que se observa é que ambos polimorfismos (Thr347Ser e Gln360His) tem influência sobre o índice de massa corporal em nossa população, e que este efeito é independente do desequilíbrio de ligação existente entre os dois sítios.

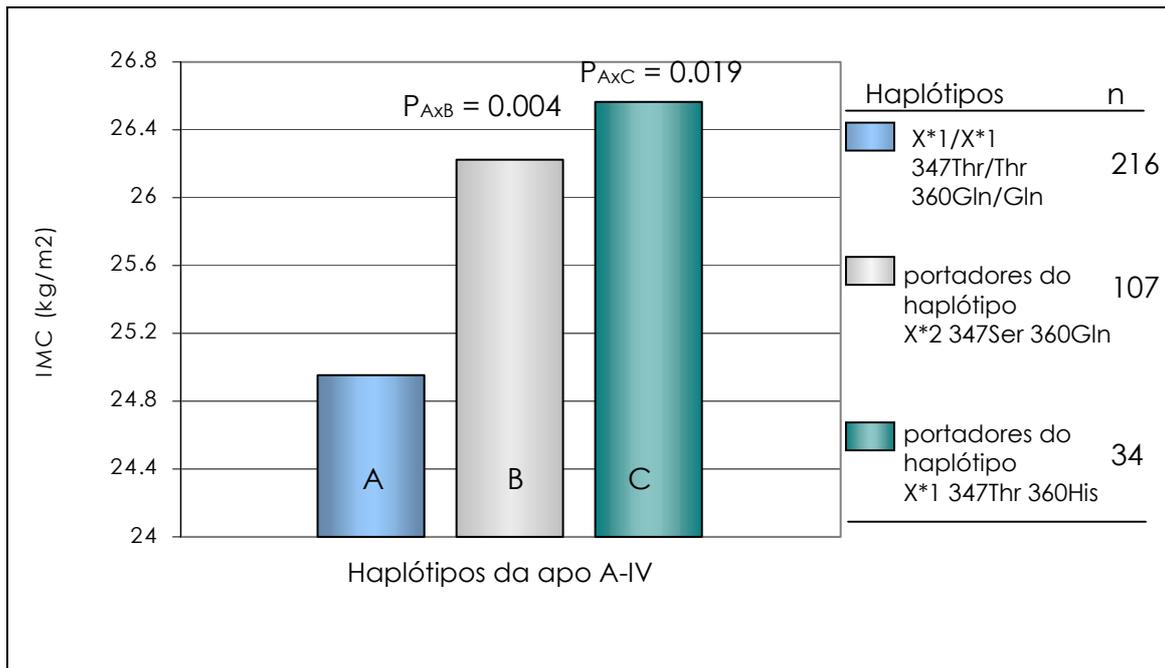


Figura 4.14: Influência dos haplótipos da apo A-IV sobre o IMC.

Assim como os níveis lipídicos, as variáveis antropométricas são influenciadas por efeitos ambientais (tabagismo e sedentarismo, por exemplo) e pelo sexo. Desta maneira, análises fatoriais para interação dos genótipos com estes fatores também foram realizadas para o IMC e o WHR. Uma interação do polimorfismo *HinfI* com tabagismo foi observada. Em não fumantes o IMC não é afetado pelo polimorfismo *HinfI*, enquanto que fumantes portadores do alelo 347Ser tem IMC maiores que homozigotos 347Thr/Thr (p interação tabagismo*genótipo = 0.015). Estes resultados também foram observados para o sítio *XbaI*, que como já foi explicado, está em forte desequilíbrio de ligação com o polimorfismo para *HinfI*. A tabela 4.17 e a figura 4.15 mostram estes resultados.

Tabela 4.17: Análise fatorial para os efeitos do tabagismo e do polimorfismo *Hinfl* sobre o IMC.

Variável	<i>Hinfl</i> Thr347Ser	IMC	N	Efeito	p
TABAGISMO					
Não	Thr/Thr	25.5 (3.7)	157	fumo	0.769
	Ser +	25.8 (3.6)	68	<i>Hinfl</i>	0.004
Sim	Thr/Thr	24.3 (3.7)	79	Fumo* <i>Hinfl</i>	0.015
	Ser +	26.8 (4.2)	35		

IMC apresentado como média em kg/m² (desvio padrão). Ser +: heterozigotos Thr/Ser e homozigotos Ser/Ser.

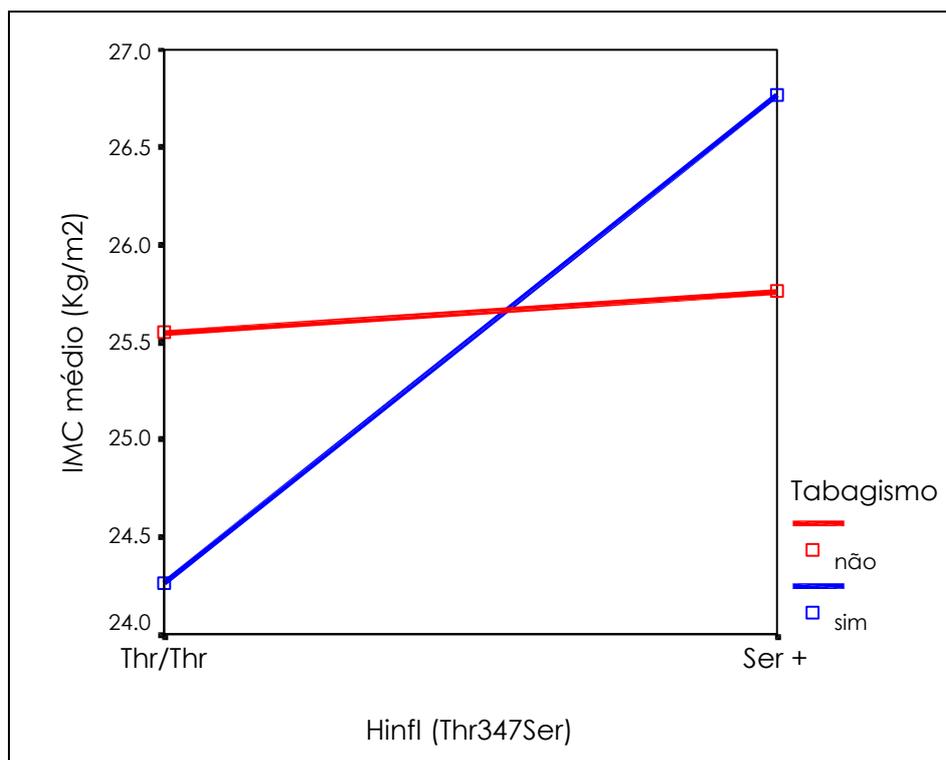


Figura 4.15: Efeito da interação tabagismo*genótipo (*Hinfl*) sobre o índice de massa corporal.

Os resultados da análise de associação dos RFLPs da apo A-IV com a relação cintura/quadril (WHR) estão apresentados na tabela 4.18, onde pode-se observar que nenhum destes polimorfismos influencia este parâmetro na

população investigada. Interações com tabagismo e sedentarismo também não foram observadas.

Tabela 4.18: Influência dos polimorfismos da apo A-IV sobre o WHR.

	Mulheres		Homens	
	n	WHR	n	WHR
<i>Xba</i> I				
X*1/X*1	118	0.84 (0.07)	84	0.92 (0.05)
X*2 +	45	0.83 (0.06)	57	0.91 (0.05)
p		0.45		0.73
<i>Hinfl</i> (Thr347Ser)				
Thr/Thr	116	0.84 (0.07)	85	0.92 (0.05)
Ser +	45	0.83 (0.06)	54	0.91 (0.05)
p		0.42		0.66
<i>Pvu</i> II (Gln360His)				
Gln/Gln	140	0.84 (0.07)	123	0.92 (0.05)
Gln/His	22	0.83 (0.06)	16	0.91 (0.05)
p		0.72		0.60

WHR apresentado como média (desvio padrão). X*2 +: heterozigotos X*1/X*2 e homozigotos X*2/X*2. Ser +: heterozigotos Thr/Ser e homozigotos Ser/Ser.

5. DISCUSSÃO

5.1. EFEITO DA VARIABILIDADE EM GENES DE APOLIPOPROTEÍNAS SOBRE VARIÁVEIS LIPÍDICAS

5.1.1. Efeito sobre os níveis de triglicerídeos

Neste estudo foram observadas associações entre a variabilidade das apolipoproteínas Cs e os níveis de triglicerídeos. Apesar de cada uma destas proteínas ter suas funções específicas no metabolismo de lipídeos elas compartilham algumas características, como diminuir a recaptção hepática de lipoproteínas por receptores e estarem amplamente distribuídas em lipoproteínas ricas em triglicerídeos (JONG e cols., 1999).

Para o polimorfismo *HpaI* localizado na região promotora da apo C-I verificou-se que a freqüência de portadores do alelo H*2 é maior em homens com triglicerídeos ≥ 200 mg/dl. Na análise fatorial com a amostra total, também se observou que portadores do mesmo alelo têm níveis de triglicerídeos cerca de 38% maiores que homozigotos H*1/H*1. Estes resultados, no entanto, parecem ser efeito do desequilíbrio de ligação entre este marcador com a variabilidade presente na apo E. A presença do alelo ϵ^*4 tem sido associada ao aumento de colesterol, LDL colesterol e triglicerídeos em várias populações. A presença do alelo ϵ^*2 , por outro lado, geralmente está associada a uma diminuição dos níveis de colesterol, mas o seu efeito sobre os níveis de triglicerídeos é controverso, estando ligado a níveis diminuídos ou aumentados em diferentes populações (revisão em DALLONGEVILLE e cols., 1992).

Por outro lado, controlar o efeito da variabilidade de outros genes pode revelar associações, como ocorre com o polimorfismo *Aval1* da apo C-II. No presente estudo verificou-se, só se verifica que portadores do alelo A^*2 têm níveis diminuídos de triglicerídeos apenas quando os homozigotos ϵ^*3/ϵ^*3 são analisados. Provavelmente o efeito sobre os níveis de triglicerídeos desta variante (A^*2) seja pequeno e pode não ser constatado quando um fator de confusão é mantido. De acordo com DE ANDRADE e cols. (2000) a variabilidade da apo E nesta mesma população influencia significativamente os níveis de triglicerídeos, o que torna claro a importância do “controle” para esta variável.

O desequilíbrio de ligação e a variabilidade de outros genes podem ser fatores de confusão nos resultados de estudos, levando a falsos positivos como a associação com triglicerídeos para o polimorfismo *Hpa1* da apo C-I e a falsos negativos como no caso da investigação da variabilidade na apo C-II. Este tipo de situação tem se tornado mais freqüente e chamado atenção de vários pesquisadores nos últimos anos. Estimativas atuais sugerem que no código genético humano ocorra uma alteração a cada 1000 pares de bases, totalizando cerca de 3.000.000 de seqüências variantes em nosso genoma. Por isso uma associação positiva não estabelece causalidade. Muitas vezes a variante investigada pode ser somente um marcador que está em desequilíbrio de ligação com a mutação causal (revisão em WINKELMAN e HAGER, 2000). Este provavelmente seja o caso da nossa associação para apo C-I com triglicerídeos, uma vez que esta não é mantida quando só homozigotos para a variante que não altera níveis lipídicos da apo E (ϵ^*3/ϵ^*3) são analisados. WATERWORTH e cols. (2000) também verificaram que o alelo H^*2 está associado a um aumento dos níveis de triglicerídeos e de lipoproteínas remanescentes, mas com efeito dependente da variabilidade da apo E.

A influência da variabilidade da apo C-III sobre os níveis de triglicerídeos vem sendo investigada em diversas populações. A variante C3238G (*SacI*), descoberta em 1983, é a mais amplamente estudada e está em desequilíbrio de ligação com as duas variantes no elemento de resposta a insulina localizado a 5' do gene. Embora o alelo S^*2 (3238G) tenha sido associado a níveis aumentados de triglicerídeos em vários estudos (revisões em GROENENDIJK e cols., 2001; SHACHTER, 2001), trabalhos como o de KEE e cols. (1999) que envolveu amostras de vários países não constatou esta associação.

Em nossa investigação esta variante também não foi associada a alterações dos níveis de triglicerídeos, assim como nenhuma interação com fatores ambientais ou sexo foi constatada.

Quando as variantes no elemento de resposta a insulina foram descobertas por DAMMERMAN e colaboradores em 1993 pensou-se ter encontrado a resposta para as associações encontradas para o polimorfismo *SacI*, que como já foi mencionado na introdução desta dissertação é não funcional. No entanto, os estudos com as duas variantes T-455C e C-482T são bastante controversos. Vários estudos que encontraram associação com o alelo S*2 não as verificaram com as variantes no IRE, sendo que o contrário também ocorreu. A perda da regulação da transcrição do gene por insulina pela presença das variantes no IRE apresentada por LI e cols. (1995) foi recentemente contestada por DALLINGA-THIE e cols. (2001). Esses autores mostraram que a expressão do gene da apo C-III é controlada por insulina, mas esse controle é independente das variantes no IRE.

Em nossa investigação, o efeito da variante T-455C sobre os níveis de triglicerídeos parece ser sexo dependente. Em mulheres os níveis de triglicerídeos diminuem em homozigotas para a variante –455CC, enquanto que em homens o efeito observado é o de aumento destes níveis em homozigotos –455CC. Em um recente estudo sobre o polimorfismo T-482C (HUBACEK e cols., 2001) os resultados são comparáveis aos encontrados por nós, só que para a outra variante. Neste trabalho, mulheres –482TT tinham níveis aumentados de insulina, enquanto que homens –482TT tinham níveis aumentados de triglicerídeos e níveis de insulina marginalmente diminuídos, mostrando também um contexto sexo dependente.

5.1.2. Efeito sobre os níveis de HDL colesterol

O efeito dos polimorfismos *HpaI* (apo C-I) e T-455C e C-482T (apo C-III) sobre os níveis de HDL colesterol mostraram que o tabagismo é uma variável de interação importante para determinação dos níveis dessa lipoproteína.

O efeito do fumo e de outros fatores sobre enzimas envolvidas no metabolismo lipídico vem sendo alvo de estudo de alguns pesquisadores. De

acordo com KARK e cols. (2000) mulheres fumantes têm a atividade da enzima CETP significativamente reduzida (-15%) quando comparadas com não fumantes. No presente estudo, mulheres fumantes portadoras do alelo H*2 da apo C-I tem níveis significativamente maiores de HDL, provavelmente devido a uma combinação de fatores, tais como inibição da CETP pelo fumo e pela apo C-I e ativação da LCAT pela apo C-I. No entanto, o efeito da variabilidade da apo C-I, isoladamente, não é suficiente para modificar os níveis séricos de HDL colesterol. A interação com um terceiro fator (tabagismo, no caso) parece ser necessária para que o fenótipo se manifeste.

Quando a amostra de homens foi testada, entretanto, esta interação tabagismo*genótipo não foi observada. A provável explicação para esta diferença é que o efeito do tabagismo sobre a atividade da CETP parece não ocorrer da mesma forma que em mulheres. Segundo ITO e cols. (1995) e KARK e cols. (2000) o hábito de fumar não tem efeito sobre a atividade desta enzima em homens, enquanto que DULLAART e cols. (1994) encontraram que a CETP é 18% mais ativa em homens fumantes.

Em nossa investigação também foram encontradas interações significantes com tabagismo para os dois RFLPs do elemento de resposta a insulina do gene da apo C-III. Os efeitos de ambos os polimorfismos parecem ocorrer de forma inversa em fumantes e não fumantes. Portadores dos genótipos -455TT e -482CC tem níveis maiores de HDL colesterol em não fumantes enquanto que entre os fumantes, estes compõem o grupo com os menores níveis de HDL colesterol. Esta interação provavelmente resulta de um complexo conjunto de modulações do fumo sobre o metabolismo lipídico. Segundo revisão em PORKKA e EHNHOLM (1996), o ato de fumar aumenta a produção de catecolaminas e conforme COPPACK e cols. (1994) a enzima lipoproteína lipase, modulada pela apo C-III, tem sua atividade regulada por catecolaminas e insulina.

5.1.3. Efeito sobre os níveis de colesterol total e LDL colesterol

Neste estudo foi observado que mulheres portadoras do alelo H*2 do RFLP *HpaI* têm níveis significativamente menores de LDL colesterol e colesterol total quando comparadas com homozigotas H*1/H*1. Este efeito foi observado

na amostra total e também em homozigotas ϵ^3/ϵ^3 para apo E, onde a diferença nos níveis foi ainda maior. Homens, por outro lado, não tem estes níveis alterados pela presença do alelo H*2, mostrando mais uma vez um contexto sexo dependente.

Biologicamente esta associação pode ser explicada pelo mesmo mecanismo que explica a modulação dos níveis de HDL colesterol discutido no item anterior, ou seja, inibição da enzima CETP que catalisa a transferência de ésteres de colesterol da HDL para LDL. Como a recaptação de lipoproteínas mediadas por apo B não é afetada por apo C-I, a retirada de partículas de LDL colesterol será normal (CLAVEY e cols., 1995) e esta via não será comprometida. Além disso, segundo MALMENDIER e cols. (1986) cerca de 80% da proteína apo C-I circula associada a HDL *in vivo*, ou seja, o seu efeito provavelmente seja mais pronunciado na rota do transporte reverso do colesterol.

Outro polimorfismo que afeta os níveis de LDL e que revela interações gene-ambiente significantes é o Gln360His localizado no terceiro éxon da apo A-IV. A presença do alelo 360His está associada ao aumento nos níveis de LDL-C em sedentários, enquanto que em não sedentários os níveis dessa lipoproteína foram mais reduzidos. Estes resultados são comparáveis aos encontrados por CAMPOS e cols. (1997). Esses investigadores concluíram que hábitos de vida associados a um ambiente mais urbano, levam a um aumento dos níveis de LDL colesterol e diminuição dos níveis de HDL colesterol em portadores do alelo 360His. Em indivíduos residentes na zona rural, o efeito deste RFLP não foi observado. Esta interação sedentarismo*genótipo, no entanto, pode estar somente refletindo uma associação deste polimorfismo com o IMC, ponto a ser discutido a seguir. A presença de sedentarismo está associada aumento de peso e conseqüentemente aumento do IMC. Para se ter certeza desta interação somente pessoas com IMC normal deveriam compor a amostra.

5.2. EFEITO DA VARIABILIDADE DA APO A-IV SOBRE VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS

Sobrepeso e obesidade são condições que aumentam os risco de morbidade e mortalidade para diversas doenças, como hipertensão, dislipidemias, diabetes tipo 2, doenças cardíacas e também alguns tipos de câncer. O que era uma doença que afetava uma parcela menor da população a anos atrás vem se tornando uma pandemia. De acordo com a OMS cerca de 55% de adultos acima dos 20 anos são obesos ou tem sobrepeso. A nossa compreensão de como e porque a obesidade se desenvolve é incompleta, mas certamente envolve a integração de fatores sociais, comportamentais, fisiológicos e genéticos.

Como foi discutido na introdução deste trabalho, a apo A-IV parece desenvolver funções também no controle do apetite. Em uma recente revisão, TSO e cols. (2001) colocaram os principais pontos da ação desta proteína como fator de saciedade e discutiram que sua ação pode ser mediada via sistema nervoso central. Embora sua síntese no SNC não seja um ponto aceito, LIU e cols. (2001) mostraram que esta proteína pode ser sintetizada no hipotálamo de ratos. De uma maneira ou de outra, a apo A-IV parece agir sobre a regulação do apetite e a longo prazo, sobre o peso.

Nesta investigação foram estudados três polimorfismos no gene da apo A-IV. Dois deles resultam em alterações de aminoácidos (Thr347Ser e Gln360His) e o terceiro se localiza no segundo íntron do gene. Os nossos resultados mostraram que as variantes 347Ser e X*2 estão significativamente associadas com aumento do IMC na população investigada. A variante X*2 provavelmente é somente um marcador do efeito da variante 347Ser sobre o IMC, uma vez que as duas estão em desequilíbrio de ligação quase completo.

O efeito da variante Gln360His sobre o IMC só é observado quando os haplótipos são analisados. Uma vez que o desequilíbrio de ligação existente entre os polimorfismos Gln360His e Thr347Ser é negativo, a influência da variante 360His é constatada quando se compara haplótipos onde o alelo 360His está presente com aqueles onde os alelos 347Ser ou X*2 não estão presentes. O haplótipo com 360His tem IMC médio cerca de 1.8 kg/m² maior que homozigotos para o haplótipo mais comum (X*2-347Thr-360His). A frequência dos haplótipos

onde os alelos 347Ser ou 360His estavam presentes também foram maiores naqueles com IMC ≥ 30 kg/m².

O efeito do polimorfismo Thr347Ser sobre o IMC parece sofrer influências do tabagismo. Apesar do tabagismo influenciar positivamente o peso, fumantes tem taxas de mortalidade maiores por outros motivos. O efeito do ato de fumar é difícil de ser quantificado por razões como as diferentes taxas de inalação dos compostos e diferentes tipos de cigarros fumados (WILLETT e cols., 1999). Apesar dos pontos negativos ao se analisar o efeito da interação do tabagismo com polimorfismos sobre o IMC, o nosso trabalho mostrou que o efeito da variante Thr347Ser é muito mais forte em fumantes e modificado pelo ato de fumar. Homozigotos 347Thr/Thr fumantes tem IMC menor que indivíduos com o mesmo genótipo mas não fumantes. Já portadores do alelo 347Ser e fumantes tem IMC maior que homozigotos Thr/Thr também fumantes e portadores 347Ser não fumantes. Segundo SUN e cols. (2000) o tabagismo não afeta os níveis da proteína apo A-IV e a interação constatada deve ser um efeito indireto decorrente da modulação de outros pontos do metabolismo.

Investigações realizadas por FISHER e cols. (1999) e LEFEVRE e cols. (2000) estudaram as variantes Thr347Ser e Gln360His em populações caucasóides com o objetivo de verificar sua influência sobre variáveis antropométricas. Os resultados de ambos os trabalhos quanto ao polimorfismo Thr347Ser são semelhantes aos observados no presente estudo. Portadores do alelo 347Ser têm IMC maiores. Já os resultados para o outro polimorfismo, Gln360His, foram na direção oposta aos nossos. O alelo 360His foi associado a uma diminuição no IMC nas investigações destes dois pesquisadores.

A compreensão de como estas duas variantes podem modular a função da apo A-IV e ter influência sobre o índice de massa corporal ainda não é conhecida. As duas mutações ocorrem no domínio carboxi-terminal da apo A-IV. Estudos funcionais da variante 360His mostraram que a proteína tem sua estrutura de α -hélice aumentada e que isto a torna mais hidrofóbica (WEINBERG e cols., 1990). No entanto, propriedades funcionais desta parte carboxi-terminal da proteína não são conhecidas e a hipótese de que estas variantes também estejam servindo de marcadores para outras alterações no gene da própria apo A-IV ou de outros genes adjacentes não está descartada.

5.3. IMPORTÂNCIA DE INTERAÇÕES GENE-AMBIENTE

Os primeiros trabalhos de associação entre marcadores genéticos e características poligênicas abrangiam somente dados como sexo, idade, grupo étnico e quantificação adequada da característica de interesse. Depois de muitos anos de resultados discrepantes, as investigações têm se voltado para coleta de dados sobre hábitos de vida e mais recentemente, em como estes fatores podem interagir com determinados genótipos.

O método onde indivíduos são genotipados para um determinado loco e então o fenótipo é comparado entre os diferentes genótipos é uma estratégia robusta, mas que pode ser confundida por interações gene-ambiente. Estas interações podem obscurecer tanto fatores ambientais (evidentes somente em pessoas suscetíveis) como fatores genéticos (evidenciados somente em indivíduos com uma história prévia de exposição). Portanto, estudar e compreender as interações gene-ambiente é de especial interesse para se conhecer melhor influências genéticas e ambientais. Conforme STALENHOEF e cols. (1997) o poder de uma determinada amostra em detectar uma associação depende crucialmente das proporções relativas dos subgrupos de indivíduos (fumantes, obesos, homens, por exemplo), uma vez que o efeito do genótipo pode ser diferente nestes grupos. Isso pode explicar as aparentes inconsistências encontradas em diferentes estudos (OTTMAN, 1996; WANG e MAHANEY, 2001).

Outra questão relevante é a interpretação de certas interações gene-ambiente por profissionais da área de saúde, que deve ser responsável e acurada. Muitas vezes os resultados dos efeitos de determinadas interações são apresentadas ao público como uma tentativa de se evidenciar que “genótipos não suscetíveis” não precisam se prevenir contra certos fatores ambientais, tais como álcool, fumo, dietas ricas em gordura. Um exemplo que ilustra uma situação destas é um estudo que mostra que portadores do alelo ϵ^*4 da apo E não tem seu perfil lipídico melhorado com exercício físico, enquanto que portadores de ϵ^*3 e ϵ^*2 são beneficiados com a atividade física (HAGBERG e cols., 2000). Isto poderia sugerir que em portadores de ϵ^*4 ser ou não sedentário não faria diferença. No entanto, a probabilidade de que um indivíduo não tenha ao menos um alelo de suscetibilidade para nenhuma doença influenciada por estes fatores é mínima.

De uma forma geral, os resultados do presente estudo revelaram que os efeitos destes polimorfismos sobre o perfil lipídico e variáveis antropométricas são altamente influenciadas por fatores ambientais e que estas interações são fatores importantes para determinação destes parâmetros na população investigada. Não podemos dizer se um determinado “perfil genético” é de suscetibilidade para altos níveis de triglicerídeos ou colesterol, sem o conhecimento do estilo de vida dos indivíduos. Muitas das interações aqui encontradas ainda não foram descritas na literatura e assim como em outros casos, precisam ser replicadas por outros pesquisadores em amostras independentes para que se conheça o seu verdadeiro significado, bem como para trazer soluções práticas para prevenção de doenças.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Apolipoproteínas constituem a parte proteica das lipoproteínas e de uma maneira geral desempenham papéis como proporcionar estabilidade estrutural, solubilizar lipídeos altamente hidrofóbicos, servir como ligantes a receptores ou agir como co-fatores para enzimas envolvidas no metabolismo. Diversos estudos têm mostrado que a variabilidade dos genes que codificam estas proteínas podem influenciar os níveis lipídicos em diversas populações. A variabilidade da apo A-IV também foi associada com variáveis antropométricas. Nesta investigação foram analisados 8 RFLPs nos genes das apolipoproteínas C-I (*HpaI*), C-II (*Avall*), C-III (*SacI*, *FokI* e *MspI*) e A-IV (*XbaI*, *HinfI* e *PvuII*). A amostra foi composta por 391 indivíduos caucasóides de Porto Alegre (RS) e dados sobre hábitos de vida, dosagens lipídicas e medidas antropométricas foram obtidas para cada indivíduo. Os fragmentos de interesse de cada gene foram amplificados por PCR e os genótipos foram identificados por eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida corados com brometo de etídio.

Os objetivos específicos deste trabalho foram: (1) estudar oito RFLPs nos genes das apolipoproteínas pertencentes aos agrupamentos gênicos A-I/C-III/A-IV e E/C-I/C-II em uma amostra de indivíduos caucasóides de Porto Alegre. (2) realizar um estudo de associação entre cada RFLP e dos haplótipos derivados e os níveis de lipídeos e lipoproteínas, para verificar a contribuição destes polimorfismos para o perfil lipídico da população em questão. (3) determinar se a variabilidade da apo A-IV está correlacionada com o índice de massa corporal (IMC) e a relação cintura/quadril nesta amostra.

Os principais resultados e conclusões deste trabalho foram:

- (1) Para apo C-I verifica-se que o alelo H*2 está associado a níveis aumentados de triglicérides em homens. Isto é observado tanto nas frequências, onde genótipos com o alelo H*2 é mais prevalente no grupo com triglicérides $\geq 200\text{mg/dl}$ ($p = 0.014$), como na comparação de médias entre os genótipos, quando portadores do alelo H*2 têm níveis de triglicérides cerca de 38% maiores. No entanto, esta associação não foi independente da variabilidade da apo E.
- (2) O efeito da variante A*2 da apo C-II sobre os níveis de triglicérides só foi observado quando apenas indivíduos homocigotos para a variante neutra (ϵ^3/ϵ^3) da apo E foram analisados. A redução dos níveis de triglicérides devido ao alelo A*2 parece não ter um efeito muito forte (diminuição de 9%, $p=0.04$) e por isso não foi constatado quando uma variável de confusão como a variabilidade em outro gene é mantida.
- (3) O efeito do polimorfismo T-455C localizado no elemento de resposta à insulina do gene da apo C-III sobre os níveis de triglicérides é gênero dependente. Mulheres homocigotas CC têm níveis de TG 20% menores que os das homocigotas TT, enquanto que o efeito em homens é inverso. Portadores do genótipo CC têm níveis de triglicérides 10% maiores do que os dos homocigotas TT. Este resultado, no entanto é marginalmente significativo (p interação sexo*genótipo = 0.056).
- (4) A influência dos polimorfismos *HpaI* da apo C-I e T-455C e C-482T da apo C-III sobre os níveis de HDL colesterol são contexto dependentes, onde o tabagismo é uma variável de interação importante para a determinação dos níveis desta lipoproteína.
- (5) Na amostra total o efeito da interação fumo*genótipo para o RFLP *HpaI* também foi gênero específica, só ocorrendo em mulheres. Em mulheres fumantes e portadoras do alelo H*2 os níveis de HDL-C são significativamente maiores, enquanto que em não fumantes os níveis não são alterados (p interação fumo*genótipo = 0.019). Em homens este efeito não foi observado.

Estas diferenças podem ser explicadas pelas ações diferenciais do fumo em enzimas envolvidas no metabolismo lipídico de acordo com os sexos. A provável rota envolvida nesta modulação sexo-específica é a do transporte reverso do colesterol e a enzima; provavelmente a ação ocorre sobre a proteína transferidora de ésteres de colesterol.

- (6) Os efeitos dos polimorfismos T-455C e C-482T sobre os níveis de HDL-C também parecem ser influenciados pelo fumo. Nestes casos os efeitos são inversos em não fumantes e fumantes. Os genótipos que têm os maiores níveis desta lipoproteína entre os não fumantes (-455TT e -482CC) formam o grupo com menores níveis de HDL-C entre os fumantes. Heterozigotos para as duas variantes do elemento de resposta à insulina não apresentaram alterações nesses níveis. Este efeito foi marginalmente significativo para o polimorfismo T-455C (p interação fumo*genótipo = 0.05) e mais pronunciado para o C-482T (p interação fumo*genótipo = 0.015). Esta interação também provavelmente resulta de um complexo conjunto de modulações do fumo sobre o metabolismo lipídico.
- (7) Os níveis de LDL colesterol e colesterol total foram modulados pelos polimorfismos *HpaI* da apo C-I e Gln360His da apo A-IV de maneira contexto dependente nos dois casos. Para o RFLP na região promotora da apo C-I o efeito sobre os níveis de LDL-C parecem ser gênero dependentes. Como a associação foi encontrada tanto na amostra total como em indivíduos com genótipo ϵ^3/ϵ^3 para apo E, onde o efeito parece ser ainda maior, estes resultados sugerem um efeito independente desta variante. A observação de uma interação sexo*genótipo significativa ($p=0.036$ para amostra total e $p = 0.005$ para indivíduos ϵ^3/ϵ^3) pode ser explicada pelo mesmo mecanismo que modula os níveis de HDL colesterol também de maneira sexo dependente. O transporte reverso do colesterol provavelmente seria a via afetada, uma vez que a maior parte (80%) desta proteína circula *in vivo* associada à partícula de HDL colesterol.
- (8) O efeito do polimorfismo Gln360His sobre os níveis de LDL colesterol é influenciado pelo sedentarismo. Ocorre uma aumento de 13.5% nos níveis

desta lipoproteína em indivíduos sedentários portadores do alelo 360His, enquanto que em não sedentários portadores do mesmo alelo os níveis são cerca de 7% menores (p interação sedentarismo*genótipo = 0.038). Esta interação, no entanto, é questionável uma vez que esta mesma variante está envolvida na determinação de parâmetros de massa corporal (medido pelo IMC), também correlacionado ao sedentarismo.

- (9) A variante Thr347Ser da apo A-IV está associada ao índice de massa corporal. Na comparação das médias, observou-se que portadores do alelo 347Ser têm, em média, o IMC aumentado em 1 kg/m² (p = 0.02). Este efeito também sofre ação de fatores ambientais e parece ocorrer de forma mais pronunciada em fumantes. Homozigotos 347Thr/Thr fumantes têm IMC menor que indivíduos com o mesmo genótipo não fumantes. Já portadores do alelo 347Ser fumantes têm IMC maior que homozigotos Thr/Thr também fumantes e portadores de 347Ser não fumantes (p interação fumo*genótipo = 0.015).
- (10) O efeito da variante Gln360His sobre o IMC só é observado ao nível haplotípico. Encontrou-se que haplótipos onde o alelo 360His estava presente tinham o IMC 1.8 kg/m² maior do que homozigotos para o haplótipo mais comum (p = 0.019). O efeito do polimorfismo Thr347Ser também foi mais pronunciado (p = 0.004) na análise haplotípica, uma vez que a “interferência” do efeito da outra variante (Gln360His) foi retirado.
- (11) Os haplótipos onde os alelos 347Ser ou 360His estavam presentes foram mais freqüentes naqueles com IMC acima de 30 Kg/m² (p = 0.034).
- (12) De uma forma geral o presente trabalho mostrou que a grande parte dos resultados discrepantes dos estudos de associação publicados podem ser explicados pela não consideração das complexas interações gene-gene, gene-ambiente e gene-gênero, ainda pouco conhecidas.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Apolipoproteins constitute the protein fraction of lipoproteins. In general, these proteins provide structural stability, solubilize hydrophobic lipids, function as receptor ligands, and act as cofactors to metabolic enzymes. Investigations providing evidences about the influence of the genetic variability of these proteins on lipid levels in different populations have been published. The apo A-IV genetic variability is also associated with anthropometric variables. In the present investigation, we have analysed 8 RFLPs in the apolipoproteins C-I (*HpaI*), C-II (*Avall*), C-III (*SacI*, *FokI*, and *MspI*), and A-IV genes (*XbaI*, *HinfII*, and *PvuII*). The sample was composed by 391 unrelated Caucasian individuals from Porto Alegre (RS). Data about lifestyle, lipid levels and anthropometric measures were obtained for each individual. The specific sequences of each gene were amplified by PCR and genotypes were identified after electrophoresis of the digested DNA fragments on agarose or polyacrylamide gels stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

The specific objectives of this study were: (1) To investigate eight RFLPs in apolipoproteins of A-I/C-III/A-IV and E/C-I/C-II gene clusters in a Caucasian sample. (2) To perform an association study for each polymorphism and for the derived haplotypes with lipid levels. (3) To determine if the apo A-IV gene variability is associated with body mass index (BMI) or waist-to-hip ratio (WHR) in this population.

The main results and conclusions of the present study were:

- (1) For the *HpaI* polymorphism, male carriers of H*2 allele had elevated triglycerides levels. This association was observed in the frequencies, where

genotypes with allele H*2 were more common in the group with triglycerides above 200 mg/dl ($p = 0.014$) and when means were compared. Men bearing allele H*2 had triglycerides levels near 38% higher than those of homozygotes H*1/H*1. This effect, however, was dependent of the apo E polymorphism.

- (2) The effect of the A*2 allele of apo C-II Avall polymorphism on triglycerides levels was observed only in homozygotes ϵ^*3/ϵ^*3 for apo E. The lowering effect on triglyceride levels of this variant is weak, therefore it is not verified in the total sample, when a confounding variable is kept in the analysis.
- (3) The T-455C polymorphism located within the insulin response element of apo C-III gene shows a gender specific association with triglyceride levels. Women bearing the CC genotype had triglyceride levels 20% lower than TT homozygotes. TT male homozygotes had the highest levels of this lipid. The interaction gender*genotype, however, is marginally significant ($p = 0.056$).
- (4) All polymorphisms associated with HDL cholesterol levels show a significant interaction with smoking status. For the *HpaI* polymorphism the effect on HDL-C levels was also gender specific. Smoker women bearing the H*2 allele had HDL cholesterol levels significant higher than H*1/H*1 homozygotes. In female no smokers the HDL-C levels were unchanged (p smoking*genotype interaction = 0.019). In men this effect was not observed. The most probable metabolic pathway involved in this sex specific modulation of HDL-C levels by smoking status and *HpaI* polymorphism is the reverse cholesterol transport pathway and the enzyme modulated by this lifestyle and genetic factors is the cholesterol ester transfer protein (CETP).
- (5) The effects of the T-455C and C-482T polymorphisms on HDL-C levels are also influenced by smoking. In this case, the effects in current smokers are in the opposite direction when compared with non smokers. Genotypes with the highest levels of this lipoprotein among the group of non smoking individuals (-455TT and -482CC) are in the group with the lower levels among current smokers. Heterozygotes for the two insulin responsive element variants had

their HDL-C unchanged. This effect was weaker for the T-455C polymorphism (p smoking*genotype interaction = 0.05) and statistically significant for C-482T polymorphism (p smoking*genotype interaction = 0.015). This interaction probably also results from a complex modulation of lipid metabolism and smoking.

- (6) LDL cholesterol levels and total cholesterol were influenced by the *HpaI* (apo C-I) and Gln360His (apo A-IV) polymorphisms. The effects were context dependent for both polymorphisms.
- (7) For the apo C-I promoter *HpaI* polymorphism, the effect on LDL-C were gender dependent. The association with the H*2 allele was found in the total sample as well as in apo E ϵ^*3/ϵ^*3 subjects, with a greater effect among the latter. These results suggest an independent effect of this variant. The significant gender*genotype interaction found ($p = 0.036$ for the total sample and $p = 0.005$ for ϵ^*3/ϵ^*3 carriers) could be explained by the same mechanism that affects the HDL-C levels, also in a gender specific manner. Most apo C-I is associated *in vivo* to HDL-C (80%) and therefore, the reverse cholesterol transport is the most probable pathway involved.
- (8) The effect of Gln360His polymorphism on LDL cholesterol levels was modulated by physical activity. Levels of this lipoprotein are 13.5% higher in physically inactive individuals carriers of the 360His allele, while in physically active carriers of the same allele LDL-C levels were about 7% lower. This interaction, in fact, could reflect just the association verified with this same polymorphism with obesity, since physical activity and obesity are correlated variables.
- (9) The apo A-IV Thr347Ser polymorphism was associated with the body mass index. When means were compared, 347Ser carriers have the average BMI 1 Kg/m² higher than Thr/Thr homozygotes ($p = 0.02$). This effect was also affected by environmental factors and seems to be more marked in smokers. 347Thr homozygote smokers had a BMI lower than non-smokers with the

same genotype. 347Ser carriers had a BMI higher than Thr/Thr smokers and 347Ser carriers non-smokers (p smoking*genotype interaction = 0.015).

- (10) The effect of the Gln360His polymorphism on BMI was observed at the haplotypic level. We found that haplotypes with the 360His allele have a BMI 1.8 kg/m² higher than homozygotes for the common haplotype (p = 0.019). The effect of the 347Ser variant was also stronger (p = 0.004) when haplotypes were analysed, since the effect of another polymorphism (Gln360His) was removed.
- (11) Haplotypes with the 347Ser or 360His allele were more frequent among individuals with a BMI above 30 kg/m² (p = 0.034).
- (12) The present investigation showed that most of the contradictory results reported in the literature could be explained if the gene-gene, gene-gender and environment-gene interactions reported herein would have been taken into account. How these interactions modulate the phenotypic expression of these genes is not yet well-known.

8. BIBLIOGRAFIA

- AALTO-SETÄLÄ, K.; FISHER, E. A.; CHEN, X.; SHAUL, T. D.; HAYEK, T.; ZECHNER, R.; WALSH, A.; RAMAKRISHNAN, R.; GINSBERG, H.; BRESLOW, J. L. (1992) Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) C-III transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo C-III and reduced apo E on the particles. **J. Clin. Invest.**, **90**: 1889-1900.
- ABRAMSON, J. H.; GAHLINGER, P. M. (2001) Computer programs for epidemiologists: PEPI. Version 4.0. Sagebrush Press, Salt Lake City.
- BALLANTYNE, C. M. (1998) Low-density lipoproteins and risk for coronary artery disease. **Am. J. Cardiol.**, **82**: 3Q-12Q.
- BARTER, P. (2000) CETP and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **20**: 2029-2031.
- BISGAIER, C. L.; SACHDEV, O. P.; LEE, E. S.; WILLIAMS, K. I.; BLUM, C. B.; GLICKMAN, R. M. (1987). Effect of lecithin: cholesterol acyltransferase on distribution of apolipoprotein A-IV among lipoproteins of human plasma. **J. Lipid Res.**, **28**: 693-703.
- BJÖRKEGREN, J.; BOQUIST, S.; SAMNEGARD, A.; LUNDMAN, P.; TORNVALL, P.; ERICSSON, C-G.; HAMSTEN, A. (2000) Accumulation of apolipoprotein C-I-rich and cholesterol-rich VLDL remnants during exaggerated postprandial triglyceridemia in normolipidemic patients with coronary artery disease. **Circulation**, **101**: 227-230.
- BOERWINKLE, E.; SING, C. F. (1986). Roles of the apolipoprotein E and A-IV polymorphism in determining plasma lipid and apolipoprotein levels. **7th International Congress of Human Genetics**. Berlin, part II, 751-752. (abstract)
- BREYER, E. D.; LE, N-A.; LI, S.; MARTINSON, D.; BROWN, W. V. (1999) Apolipoprotein C-III displacement of apolipoprotein from VLDL: effect of particle size. **J. Lipid Res.**, **40**: 1875-1882.
- BREWER, H. B. (1999) Hypertriglyceridemia: Changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.**, **83**: 3F-12F.

- BYDŁOWSKI, S. P.; NOVAK, E. M.; ISSA, J. S.; FORTI, N.; GIANNINI, S. D.; DIAMENT, J. (1996). DNA polymorphisms of apolipoprotein B and A-I/C-III/A-IV genes in a Brazilian population: preliminary report. **Braz. J. Med. Res.**, **29**: 1269-1274.
- CAMPOS, H.; LOPEZ-MIRANDA, J.; RODRIGUEZ, C.; ALBAJAR, M.; SCHAEFER, E. J.; ORDOVAS, J. M. (1997) Urbanization elicits a more atherogenic lipoprotein profile in carriers of the apolipoprotein A-IV-2 allele than in A-IV-1 homozygotes. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **17**: 1074-1081.
- CARREJO, M. H.; SHARRETT, A. R.; PATSCH, W.; BOERWINKLE, E. (1995) No association of apolipoprotein A-IV codon 347 and 360 variation with atherosclerosis and lipid transport in a sample of mixed hyperlipidemics. **Genet. Epidemiol.**, **12**: 371-380.
- CLAVEY, V.; LESTAVEL-DELATRE, S.; COPIN, C.; BARD, C. C.; FRUCHART, J. C. (1995) Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins C-I, C-II, C-III and E. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **15**:963-971.
- COHEN, R. D.; CASTELLANI, L. W.; QIAO, J-H.; VAN LENTEN, B. J.; LUSIS, A. J.; REUE, K. (1997) Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. **J. Clin. Invest.**, **99**: 1906-1916.
- COOPACK, S. W.; JENSEN, M. D.; MILES, J. M. (1994) In vivo regulation of lipolysis in humans. **J. Lipid Res.**, **35**: 177-193.
- DALLINGA-THIE, G. M.; BU, S.D.; TRIP, M. L. S.; ROTTER, J. I.; LUSIS, A. J.; BRUIN, T. W. A. (1996). Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. **J. Lipid Res.**, **37**: 136-147.
- DALLINGA-THIE, G. M.; GROENENDIJK, M.; BLOM, R. N. H. H.; BRUIN, T. W. A.; DE KANT, E. (2001) Genetic heterogeneity in the apolipoprotein C-III promoter and effects of insulin. **J. Lipid Res.**, **42**: 1450-1456.
- DALLONGEVILLE, J.; LUSSIER-CACAN, S.; DAVIGNON, J. (1992) Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. **J. Lipid Res.**, **33**: 447-454.
- DALLONGEVILLE, J.; MEIRHAEGHE, A.; COTTEL, D.; FRUCHART, J-C.; AMOUYEL, P.; HELBECQUE, N. (2000) Gender related association between genetic variations of APOC-III gene and lipid and lipoprotein variables in northern France. **Atherosclerosis**, **150**: 149-157.
- DAMMERMAN, M.; SANDKUIJL, L. A.; HALAAS, J. L.; CHUNG, W.; BRESLOW, J. L. (1993) An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 4562-4566.

- DATASUS, 1998. Informações de Saúde. Mortalidade. <http://www.datasus.gov.br>
- DE ANDRADE, F. M.; LARRANDABURU, M.; CALLEGARI-JAQUES, S. M.; GASTALDO, G.; HUTZ, M. H. (2000) Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **33**: 529-537.
- DE ANDRADE, F. M.; TREMEA, V.; SOARES, B.; PINTO, M. P. O.; ANTUNES, A. L. S. (2001a) Associação de hábitos de vida e parâmetros de gordura corporal com níveis lipídicos e diferenças entre grupos étnicos na população de Porto Alegre – RS. **RBAC.**, **33**: 21-25.
- DE ANDRADE, F. M.; EWALD, G. M.; SALZANO, F. M.; HUTZ, M. H. (2001b) Lipoprotein lipase and APOE/APOC-I/APOC-II gene cluster diversity in Native Brazilian populations. (submetido)
- DE KNIJFF, P.; ROSSENEU, M.; BEISIEGEL, U.; KEERSGIETER, W.; FRANTS, R. R.; HAVEKES, L. M. (1988) Apolipoprotein A-IV polymorphism and its effect on plasma lipid and apolipoprotein concentrations. **J. Lipid Res.**, **29**: 1621-1627.
- DE SILVA, H. V.; LAUER, S. J.; WANG, J.; SIMONET, W. S.; WEISGRABER, K. H.; MAHLEY, R. W.; TAYLOR, J. M. (1994) Overexpression of human apolipoprotein CIII in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B-48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. **J. Biol. Chem.**, **269**: 2324-2335.
- DULLAART, R. P.; HOOGENBERG, K.; DIKESCHEI, B. D.; VAN TOL, A. (1994) Higher plasma lipid transfer protein activities and unfavorable lipoprotein changes in cigarette-smoking men. **Arterioscler. Thromb.**, **14**: 1581-1585.
- EBARA, T.; RAMAKRISHNAN, R.; STEINER, G.; SHACHTER, N. (1997) Chylomicronemia due to apolipoprotein CIII overexpression in apolipoprotein E-null mice – apolipoprotein CIII-induced hypertriglyceridemia is not mediated by effects on apolipoprotein E. **J. Clin. Invest.**, **99**: 2672-2681.
- EICHNER, J. E.; KULLER, L. H.; FERRELL, R. E.; KAMBOH, M. I. (1989). Phenotypic effects of apolipoprotein structural variation on lipid profiles: II. Apolipoprotein A-IV and quantitative lipid measures in the healthy women study. **Genet. Epidemiol.**, **6**: 493-499.
- ESTERBAUER, H.; HELL, E.; KREMPLER, R.; PATSCH, W. (1999) Allele-specific differences in apolipoprotein C-III mRNA expression in human liver. **Clin. Chem.**, **45**: 331-339.
- FISHER, R. M.; BURKE, H.; NICAUD, V.; EHNHOLM, C.; HUMPHRIES, S. E. (1999) Effect of variation in the apo A-IV gene on body mass index and fasting and postprandial lipids in the European Atherosclerosis Research Study II. **J. Lipid Res.**, **40**: 287-294.
- FREDENRICH, A.; GIROUX, L-M.; TREMBLAY, M.; KRIMBOU, L.; DAVIGNON, J.; COHN, J. S. (1997) Plasma lipoprotein distribution of apo C-III in normolipidemic and

hypertriglyceridemic subjects: comparison of the apo C-III to apo E ratio in different lipoprotein fractions. **J. Lipid Res.**, **38**:1421-1432.

FREDENRICH, A. (1998) Role of apolipoprotein C-III in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. **Diabetes & Metabolism**, **24**:490-495.

FRIEDEWALD, N. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, **18**: 499-502.

GAUTIER, T.; MASSON, D.; DE BARROS, J-P. P.; ATHIAS, A.; GAMBERT, P.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUES, M-H.; LAGROST, L. (2000) Human apolipoprotein C-I accounts for the ability of plasma high density lipoproteins to inhibit the cholesteryl ester transfer protein activity. **J. Biol. Chem.**, **275**: 37504-37509.

GEISEL, J. WEISSHAAR, C.; OETTE, K. (1996) An Avall polymorphism int hte human apolipoprotein C-II gene. **Clin. Genet.**, **49**: 163.

GOLDBERG, , I. J.; SCHERALDI, C. A.; YACOUB, L. K.; SAXENA, U.; BISGAIER, C. L. (1990). Lipoprotein C-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. **J. Biol. Chem.**, **265**: 4266-4272.

GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95. (1998) GraphPad Software, San Diego, California.

GREEN, P. H. R.; GLICKMAN, R. M.; RILEY, J. W.; QUINET, E. (1980) Human apolipoprotein A-IV – instestinal origin and distribution in plasma. **J. Clin. Invest.**, **65**: 911-919.

GROENENDIJK, M. CANTOR, R. M.; BLOM, N. H. H.; ROTTER, J. I.; BRUIN, T. W. A.; DALLINGA-THIE, G. M. (1999) Association of plasma lipids and apolipoproteins with the insulin response element in the apo C-III promoter region in familial combined hyperlipidemia. **J. Lipid Res.**, **40**: 1036-1044.

GROENENDIJK, M.; CANTOR, R. M.; BRUIN, T. W. A.; DALLINGA-THIE, G. M. (2001) The apoAI-CIII-AIV gene cluster. **Atherosclerosis**, **157**: 1-11.

HAGBERG, J. M.; WILUD, K. R.; FERREL, R. E. (2000) Apo E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. **Physiol. Genomics**, **4**: 101-108.

HAN, T.S.; BIJNEN,F.C.H.; LEAN,M.E.J.; SEIDELL, J.C. (1998). Separate associations of waist and hip circumference with lifestyle factors. **International Journal of Epidemiology**, **27**:422-430.

HEGELE, R. A.; CONNELLY, P. W.; HANLEY, A. J. G.; SUN, F.; HARRIS, S. B.; ZINMAN, B. (1997) Common genomic variation in the APOC3 promoter associated with variation in plasma lipoproteins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **17**: 2753-2758.

- HEILBRONN, L. K.; NOAKES, M.; MORRIS, A. M.; KIND, K. L.; CLIFON, P. M. (2000) 360His polymorphism of the apolipoprotein A-IV gene and plasma response to energy restricted diets in overweight subjects. **Atherosclerosis**, **150**: 187-192.
- HILL, S. A.; THOMSON, C.; McQUEEN, M. J. (1998) Cholesteryl ester transfer protein mutations, protein activity and HDL-cholesterol concentration. **Clin. Chem. Lab. Med.**, **36**: 629-632.
- HIXSON, J. E.; POWERS, P. K. (1991) Restriction isotyping of human apolipoprotein A-IV: rapid typing of known isoforms and detection of a new isoform that deletes a conserved repeat. **J. Lipid Res.**, **32**: 1529-1535.
- HOCKEY, K. J.; ANDERSON, R. A.; COOK, V. R.; HANTGAN, R. R.; WEINBERG, R. B. (2001) Effect of the apolipoprotein A-IV Q360H polymorphism on postprandial plasma triglyceride clearance. **J. Lipid Res.**, **42**: 211-217.
- HOFFER, M. J. V.; SIJBRANDS, E. J. G.; DE MAN, F. H. A. F.; HAVEKES, L. M.; SMELT, A. H. M.; FRANTS, R. R. (1998) Increased risk for endogenous hypertriglyceridaemia is associated with an apolipoprotein C3 haplotype specified by the SstI polymorphism. **Eur. J. Clin. Invest.**, **28**: 807-812.
- HONG, S.H.; PARK, W. H.; LEE, C. C.; SONG, J. H.; KIM, J. Q. (1997) Association between genetic variations of apo A-I/C-III/A-IV cluster gene and hypertriglyceridemic subjects. **Clin. Chem.**, **43**: 13-17.
- HOUPPERMANS, S. B. (1994). L'apolipoprotéine A-IV humaine. **Ann. Biol. Clin.**, **52**: 701-710.
- HUBACEK, J. A.; WATERWORTH, D. M.; POLEDNE, R.; PITHA, J.; SKODOVÁ, Z.; HUMPHRIES, S. E.; TALMUD, P. J. (2001) Genetic determination of plasma lipids and insulin in the Czech population. **Clin. Biochem.**, **34**: 113-118.
- ITO, T.; NISHIWAKI, M.; ISHIKAWA, T.; NAKAMURA, H. (1995) CETP and LCAT activities are unrelated to smoking and moderate alcohol consumption in healthy normolipidemic men. **J. Jpn. Circ. J.**, **59**: 541-546. (abstract)
- JANSEN, S.; LOPEZ-MIRANDA, J.; ORDOVAS, J. M.; ZAMBRANA, J. L.; MARIN, C.; OSTOS, M. A.; CASTRO, P.; McPHERSON, R.; SEGURA, F. L.; BLANCO, A.; PEREPEREZ, J. A.; PEREZ-JIMENEZ, F. (1997) Effect of 360His mutation in apolipoprotein A-IV on plasma HDL-cholesterol response to dietary fat. **J. Lipid Res.**, **38**: 1995-2002.
- JONG, M. C.; VAN REE, J. H.; DAHLMANS, V. E. H.; FRANTS, R. R.; HOFKER, M. H.; HAVEKES, L. M. (1996a) Reduced very low density lipoprotein fractional catabolic rate in apolipoprotein C1-deficient mice. **Biochem. J.**, **321**: 445-450.
- JONG, M. C.; DAHLMANS, V. E. H. VAN GORP, P. J. J.; WILLEMS VAN DIJK, K.; KOOPMANS, S-J.; CHAN, L.; HOFKER, M. H.; HAVEKES, L. M. (1996b) The binding of VLDL to the VLDL receptor is inhibited by an excess of apo C1. **Circulation**, **94**(suppl I): I-698.

- JONG, M.C.; DAHLMANS, V. E. H.; VAN GORP, P. J. J.; VAN DIJK, K. W.; BREUER, M. L.; HOFKER, M. H. (1996c) In the absence of the low density lipoprotein receptor, human apolipoprotein C1 overexpression in transgenic mice inhibits the hepatic uptake of very low density lipoproteins via receptor-associated protein-sensitive pathway. **J. Clin. Invest.**, **98**: 2259-2267.
- JONG, M. C.; GIJBELS, M. J. J.; DAHLMANS, V. E. H.; VAN GORP, P. J. J.; KOOPMAN, S.-J.; PONEC, M.; HOFKER, M. H.; HAVEKES, L. M. (1998) Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. **J. Clin. Invest.**, **101**:145-152.
- JONG, M.; HOFKER, M. H.; HAVEKES, L. M. (1999) The role of apoCs in lipoprotein metabolism. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **19**: 472-484.
- KALOGERIS, T. J.; RODRIGUEZ, M-D.; TSO, P. (1997) Control of synthesis and secretion of intestinal apolipoprotein A-IV by lipid. **J. Nutr.**, **127**: 537S-543S.
- KALOGERIS, T. J.; QIN, X.; CHEY, W. Y.; TSO, P. (1998) PYY stimulates synthesis and secretion of intestinal apolipoprotein AIV without affecting mRNA expression. **Am. J. Physiol.**, **275**: G668-G674.
- KALOGERIS, T. J.; PAINTER, R. G. (2001) Adaptation of intestinal production of apolipoprotein A-IV during chronic feeding of lipid. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, **280**: R1155-R1161.
- KARK, J. D.; SINNREICH, R.; LEITERSDORF, E.; FRIEDLANDER, Y.; SHPITZEN, S.; LUC, G. (2000) Taq1B CETP polymorphism, plasma CETP, lipoproteins, apolipoproteins and sex differences in a Jewish population sample characterized by low HDL-cholesterol. **Atherosclerosis**, **151**: 509-518.
- KEE, F.; AMOUYEL, P. FUMERON, F.; ARVEILER, D.; CAMBOU, J. P.; EVANS, A.; CAMBIEN, F.; FRUCHART, J. C.; DUCIMETIÈRE, P.; DALLONGEVILLE, J. (1999) Lack association between genetic variations of apo A-I-C-III-A-IV gene cluster and myocardial infarction in a sample of European male: ECTIM study. **Atherosclerosis**, **145**: 187-195.
- KO, Y. L.; KO, Y. S.; WU, S. M.; TENG, M. S.; CHEN, F. R.; HSU, T. S.; CHIANG, C. W.; LEE, Y. S. (1997). Interaction between obesity and genetic polymorphisms in the apolipoprotein CIII gene and lipoprotein lipase gene on the risk of hypertriglyceridemia in Chinese. **Hum. Genet.**, **100**: 327-333.
- KORNELUK, R. G.; MACLEOD, H. L.; LEBLOND, S. C.; MONTEITH, N. L.; BARALLE, F. E.; HUNTER, A. G. (1987) A variable RFLP at the human apolipoprotein CII (APO CII) gene locus. **Nucl. Acids. Res.**, **15**: 6769.
- KOOPMANS, S. J.; JONG, M. C.; QUE, I.; DAHLMANS, V. E. H.; PIJL, H.; RADDER, J. K.; FRÖLICH, M.; HAVEKES, L. M. (2001) Hyperlipidemia is associated with increased insulin-mediated glucose metabolism, reduced fatty acid

- metabolism and normal blood pressure in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. **Diabetologia**, **44**: 437-443.
- KRIEGER, M. (1999) Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. **Annu. Rev. Biochem.**, **68**: 528-558.
- KWITEROVICH, P. O. (1998) The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. **Am. J. Cardiol.**, **82**: 13Q-21Q.
- LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucl. Ac. Res.**, **19**: 5444.
- LEAN, M. E. J.; HAN, T. S.; MORRISON, C. E. (1995) Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. **BMJ**, **311**: 158-161.
- LEFEVRE, M.; ROHEIM, P. S. (1984) Metabolism of apolipoprotein A-IV. **J. Lipid. Res.**, **25**: 1603-1610.
- LEFREVE, M.; LOVEJOY, J. C.; DeFELICE, S. M.; KEENER, J. W.; BRAY, G. A.; RYAN, D. H.; HWANG, D. H.; GREENWAY, F. L. (2000) Common apolipoprotein A-IV variants are associated with differences in body mass index levels and percentage body fat. **Int. J. Obesity**, **24**: 945-953.
- LEHTINEN, S.; LUOMA, P.; NÄYHÄ, S.; HASSI, J.; EHNHOLM, C.; NIKKARI, T.; PELTONEN, N.; JOKELA, H.; KOIVULA, T.; LEHTIMÄKI, T. (1998) Apolipoprotein A-IV polymorphism in Saami and Finns: frequency and effect on serum lipid levels. **Ann. Med.**, **30**: 218-223.
- LEWONTIN, R. C. (1988) On measures of gametic disequilibrium. **Genetics**, **120**: 849-852.
- LI, W. H.; TANIMURA, M.; LUO, C. C.; DATTA, S.; CHAN, L. (1988). The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. **J. Lipid Res.** **29**: 245-271.
- LI, W. W.; DAMMERMAN, M. M.; SMITH J. D.; METZGER, S.; BRESLOW, J. L.; LEFF, T. (1995) Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. **J. Clin. Invest.**, **96**: 2601-2605.
- LIU, M.; SHEN, L.; TSO, P. (1999) The role os enterostatin and apolipoprotein A-IV on the control of food intake. **Neuropeptides**, **33**: 425-433.
- LIU, M.; DOI, T.; SEHN, L.; WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; ZHENG, S.; JACKMAN, A.; TSO, P. (2001) Intestinal satiety protein apolipoprotein A-IV is synthesized and regulated in rat hypothalamus. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, **280**: R1382-R1387.

- LONG, J. C.; WILLIAMS, R. C.; URBANEK, M. (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. **Am. J. Hum. Genet.**, **56**: 799-810.
- LONG, J. C. (1999) **Multiple locus haplotype analysis, version 2.0**. Software and documentation distributed by the author. Section on Population Genetics and Linkage, Laboratory of Neurogenetics, NIAAA, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- LÓPEZ-MIRANDA, J.; JANSEN, S.; ORDOVAS, J. M.; SALAS, J.; MARIN, C.; CASTRO, P.; OSTOS, M. A.; CRUZ, G.; LÓPEZ-SEGURA, F.; BLANCO, A.; JIMÉNEZ-PEREPÉREZ, J.; PÉREZ-JIMÉNEZ, F. (1997) Influence of the SstI polymorphism at the apolipoprotein C-III gene locus on the plasma low-density-lipoprotein-cholesterol response to dietary monounsaturated fat. **Am. J. Clin. Nutr.**, **66**: 97-103.
- MAEDA, N.; LI, H.; LEE, D.; OLIVER, P.; QUARFORDT, S. H.; OSADA, J. (1994) Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. **J. Biol. Chem.**, **269**: 23610-23616.
- MAHLEY, R. W.; RALL, S. C. JR. (2000) Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, **1**: 507-537.
- MALLE, E.; PFEIFFER, K. P.; DUGI, K.; PFEIFFER, C.; GLAUM, M.; OEZCUERUEMEZ, M.; KLOER, H. U.; STEINMETZ, A. (1996) Polymorphisms of apolipoproteins A-IV and E in a Turkish populations living in Germany. **Hum. Genet.**, **98**: 285-290.
- MALMENDIER, C. L.; LONTIE, J-F.; GRUTMAN, G. A.; DELCROIX, C. (1986) Metabolism of apolipoprotein C-I in normolipoproteinemic human subjects. **Atherosclerosis**, **62**: 167-172.
- MANTEL-TEEUWISSE, A. K.; KLOOSTERMAN, M. E.; MAITLAND-VAN DER ZEE, A. H.; KLUNGEL, O. H.; PORSIUS, A. J.; DE BOER, A. (2001) Drug-induced lipid changes. A review of the unintended effects of some commonly used drugs on serum lipid levels. **Drug Safety**, **24**: 443-456.
- MARASCO, O.; MELINA, F.; MELE, E.; QUARESIMA, B.; ZINGONE, A.; FOCARELLI, E.; PICCIOTTI, E.; MARTINELLI, M. L.; FOTINO, L.; VIGNA, M. F.; BAUDI, F.; DOMINIJANNI, A.; ANGOTTI, E.; PUJIA, A.; PERROTTI, N.; COLONNA, A.; MATTIOLI, P. L.; PORCELLINI, A.; COSTANZO, F.; AVVEDIMENTO, V. E. (1993). Linkage disequilibrium of three polymorphic RFLP markers in the apolipoprotein A-I/C-III gene cluster on chromosome 11. **Hum. Genet.**, **91**: 169-174.
- MARÇAIS, C.; BERNARD, S.; MERLIN, M.; ULHMANN, M.; MESTRE, B.; ROCHET-MINGRET, L.; REVOL, A.; BERTHEZENE, F.; MOULIN, P. (2000) Severe hypertriglyceridaemia in Type II diabetes: involvement of apo C-III SstI polymorphism, LPL mutations and apo E3 deficiency. **Diabetologia**, **43**: 1346-1352.

- MARCOUX, C.; TREMBLAY, M.; FREDENRICH, A.; DAVIGNON, J.; COHN, J. S. (2001) Lipoprotein distribution of apolipoprotein C-III and its relationship to the presence in plasma of triglyceride-rich remnant lipoproteins. **Metabolism**, **50**: 112-119.
- MENZEL, H. J., BOERWINKLE, E.; SCHRANGL-WILL, S.; UTERMANN, G. (1988). Human apolipoprotein A-IV polymorphism: frequency and effect on lipid and lipoprotein levels. **Hum. Genet.**, **79**: 368-372.
- MENZEL, H. J.; SIGURDSSON, G.; BOERWINKLE, E. SCHRANGL-WILL. S.; DIEPLINGER, H.; UTERMANN, G. (1990). Frequency and effect of human apolipoprotein A-IV polymorphism on lipid and lipoprotein levels in an Icelandic population. **Hum. Genet.**, **84**: 344-346.
- MENZEL, H. J.; DIEPLINGER, H.; SANDHOLZER, C.; KARÁDI, I.; UTERMANN, G.; CSÁSZÁR, A. (1995). Apolipoprotein A-IV polymorphism in the Hungarian population: gene frequencies, effect on lipid levels, and sequence of two new variants. **Human Mutation**, **5**: 58-65.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucl. Ac. Res.**, **16**: 1215.
- MONTGOMERY, R.; CONWAY, T. H. SPECTOR, A. A.; CHAPPELL, D. **Biochemistry – a case oriented approach**. 6 ed. St. Louis: Mosby, 1996.
- MORTON, N. M.; EMILSSON, V.; LIU, Y-L.; CAWTHORNE, M. A. (1998) Leptin action in intestinal cells. **J. Biol. Chem.**, **273**: 26194-26201.
- NCEP (2001) Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). **JAMA**, **285**: 2486-2496.
- NILLESEN, W. M.; SMEETS, H. J. M.; VAN OOST, B. A. (1990) Human apo C1 *Hpa*I restriction site polymorphism revealed by the polymerase chain reaction. **Nucl. Ac. Res.**, **18**: 3428.
- OLIVECRONA, G.; BEISIEGEL, U. (1997) Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **17**: 1545-1549.
- OPPERT, J. M.; FUMERON, F.; MOREEL, J. F. R.; APFELBAUM, M. (1992). Association of a DNA polymorphism of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster with hypertriglyceridemia in obese people. **International Journal of Obesity**, **16**: 891-896.
- OSTOS, M. A.; LOPEZ MIRANDA, J.; ORDOVAS, J. M.; MARIN, C.; BLANCO, A.; CASTRO, P. (1998) Dietary fat clearance is modulated by genetic variation in apolipoprotein A-IV gene locus. **J. Lipid Res.**, **39**: 2493-2500.

- OSTOS, M. A.; LOPEZ-MIRANDA, J.; MARIN, C.; CASTRO, P. GOMEZ, P.; PAZ, E.; PEREPEREZ, J. A. J.; ORDOVAS, J. M.; PEREZ-JIMENEZ, F. (2000) The apolipoprotein A-IV 360His polymorphism determines the dietary fat clearance in normal subjects. **Atherosclerosis**, **153**: 209-217.
- OSTOS, M. A.; CONCONI, M.; VERGNES, L.; BAROUKH, N.; RIBALTA, J.; GIRONA, J.; CAILLAUD, J-M.; OCHOA, A.; ZAKIN, M. M. (2001) Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein A-IV in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **21**: 1023-1028.
- OTTMAN, R. (1996) Theoretical epidemiology. Gene-environment: definitions and study designs. **Preventive Medicine**, **25**: 764-770.
- PATSCH, W.; GOTTO A. M. (1996). Apolipoproteins: pathophysiology and clinical implications. **Methods in Enzymology**, **263**: 3-32.
- PAUL-HAYASE, H.; ROSSENEY, M.; ROBINSON, D.; VAN BERVLIE, J. P.; DESLYPERE, J. P.; HUMPHRIES, S. E. (1992). Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene cluster: detection of genetic variation determining plasma apo AI, apo CIII and apo AIV concentrations. **Hum. Genet.**, **88**: 439-446.
- PETERSON, R. J.; GOLDMAN, D.; LONG, J. C. (1999) Nucleotide sequence diversity in non-coding regions of ALDH2 as revealed by restriction enzyme and SSCP analysis. **Hum. Genet.**, **104**: 177-187.
- PORKKA, K. V. K.; TAIMELA, S.; KONTULA, K.; LEHTNAKI, T.; AALTO-SETALA, K.; AKERBLOM, H. K.; VIIKARI, J. S. A. (1994). Variability gene effects of DNA polymorphisms at the apo B, apo AI/CIII and apo E loci on serum lipids: the cardiovascular risk in young Finns study. **Clin. Genet.**, **45**: 113-121.
- PORKKA, K. V.; EHNHOLM, C. (1996) Smoking, alcohol and lipoprotein metabolism. **Curr. Opin. Lipidol.**, **7**: 162-166.
- QIN, X.; SWERTFEGER, D. K.; ZHENG, S.; HUI, D. Y.; TSO, P. (1998) Apolipoprotein A-IV a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. **Am. J. Physiol.**, **274**: H1836-H1840.
- ROFF, D. A.; BENTZEN, P. (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. **Molec. Biol. Evol.**, **6**: 539-545.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. (2000) Arlequin (ver. 2.000) – A software for population genetics data analysis. Universidade de Geneva, Geneva.
- SEIXAS, S.; TROVOADA, M. J.; ROCHA, J. (1999) Haplotype analysis of the apolipoprotein E and apolipoprotein C1 loci in Portugal and São Tomé e Príncipe (Gulf of Guinea): linkage disequilibrium evidence that APOE*4 is the ancestral APOE allele. **Hum. Biol.**, **71**: 1001-1008.

- SHACHTER, N. S.; EBARA, T.; RAMAKRISHMAN, R.; STEINER, G.; BRESLOW, J. L.; GINSBERG, H. N.; SMITH, J. D. (1996) Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C-I. **J. Clin. Invest.**, **98**: 846-855.
- SHACHTER, N. S. (2001) Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. **Curr. Opin. Lipidol.**, **12**: 297-304.
- SHOULDERS, C. C.; GRANTHAM, T. T.; NORTH, J. D.; GASPARDONE, A.; TOMAI, F.; FAZIO, A.; VERSACI, F.; GIOFFRE, P. A.; COX, N. J. (1996) Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein C-III gene locus: lack of association with the variant insulin response element in Italian school children. **Hum. Genet.**, **98**: 557-566.
- SONOYAMA, K.; SUZUKI, K.; KASAI, T. (2000) Peptide YY stimulates the expression of apolipoprotein A-IV gene in caco-2 intestinal cells. **PSEBM**, **223**: 270-275.
- SPRECHER, D. L. (1998) Triglycerides as a risk factor for coronary artery disease. **Am. J. Cardiol.**, **82**: 49U-56U.
- STALENHOF, A. F. H.; AALTO-SETALA, K.; ARMSTRONG, V. W.; BENLIAN, P.; DIEPLINGER, H.; HUMPRIES, S.; STEINMETZ, A. (1997) The 19th annual meeting of the European lipoprotein club. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **17**: 2316-2325.
- STEINMETZ, A.; UTERMAN, G. (1985) Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV. **J. Biol. Chem.**, **260**: 2258-2264.
- STEINMETZ, A.; BARBARAS, R.; GHALIM, N.; CLAVEY, V.; FRUCHART, A-C.; AILHAUD, G. (1990) Human apolipoprotein A-IV binds to A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. **J. Biol. Chem.**, **265**: 7859-7863.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.
- SUN, Z.; LARSON, I. A.; ORDOVAS, J. M.; BARNARD, J. R.; SCHAEFER, E. J. (2000) Effects of age, gender, and lifestyle factors on plasma apolipoprotein A-IV concentrations. **Atherosclerosis**, **151**: 381-388.
- SURGUCHOV, A. P.; PAGE, G. P.; SMITH, L.; PATSCH, W.; BOERWINKLE, E. (1996) Polymorphic markers in apolipoprotein C-III gene flanking regions and hypertriglyceridemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **16**: 941-947.
- TALMUD, P. J.; WATERWORTH, D. M. (2000) In-vivo and in-vitro nutrient-gene interactions. **Curr. Opin. Lipidol.**, **11**:31-36.
- TSO, P.; LIU, M.; KALOGERIS, T. J. (1999) The role of apolipoprotein A-IV in food intake regulation. **J. Nutr.**, **129**: 1503-1506.
- TSO, P.; LIU, M.; KALOGERIS, T. J.; THOMSON, A. B. R. (2001) The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake. **Annu. Ver. Nutr.**, **21**: 231-254.

- WANG C. S.; McCONATHY, W. J.; KLOER, H. U.; ALAUPOVIC, P. (1985). Modulation of lipoprotein lipase activity by Apolipoproteins. Effect of Apolipoprotein C-III. **J. Clin Invest.**, **75**: 384-390.
- WANG, X. L.; MAHANEY, M. C. (2001) Genotype-specific effects of smoking on risk of CHD. **Lancet**, **358**: 87-88.
- WATERWORTH, D. M.; HUBACEK, J. A.; PITHA, J.; KOVAR, J.; POLEDNE, R.; HUMPHRIES, S. E.; TALMUD, P. J. (2000) Plasma levels of remnant particles are determined in part by variation in the APOC3 gene insulin response element and the APOCI-APOE cluster. **J. Lipid Res.**, **41**: 1103-1109.
- WEINBERG, R. B.; JORDAN, M. K. (1990). Effects of phospholipid on the structure of human apolipoprotein A-IV. **J. Biol. Chem.**, **265**: 8081-8086.
- WEINBERG, R. B.; GEISSINGER, B. W.; KASALA, K.; HOCKEY, K. J.; TERRY, J. G.; EASTER, L.; CROUSE, J. R. (2000) Effect of apolipoprotein A-IV genotype and dietary fat on cholesterol absorption in humans. **J. Lipid Res.**, **41**: 2035-2041.
- WEINSTOCK, P. H.; BISGAIER, C. L.; HAYEK, T.; AALTO-SETALA, K.; SEHAYEK, E.; WU, L. ; SHEIFFELE, P.; MERKEL, M.; ESSENBERG, A. D.; BRESLOW, J. L. (1997) Decreased HDL cholesterol levels but normal lipid absorption, growth, and feeding behavior in apolipoprotein A-IV knockout mice. **J. Lipid Res.**, **38**: 1782-1794.
- WEISGRABER, K. H.; MAHLEY, R. W.; KOWALL, R. C.; HERTZ, J.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. (1990) Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with β -migrating very low density lipoproteins (β -VLDLs) and inhibits binding of β -VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. **J. Biol. Chem.**, **265**: 22453-22459.
- WEISS, K. M. **Genetic variation and human disease – principles and evolutionary approaches**. Cambridge University Press, 1993.
- WICK, U.; WITT, E.; ENGEL, W. (1995). Restriction fragment length polymorphisms at the apoprotein genes A-I, C-III and B-100 and in the 5' flanking region of the insulin gene as a possible markers of coronary heart disease. **Clin. Genet.**, **47**: 184-190.
- WILLETT, W. C.; DIETZ, W. H.; COLDITZ, G. A. (1999) Primary care: guidelines for healthy weight. **N. Eng. J. Med.**, **341**: 427-434.
- WINKELMANN, B. R.; HAGER, J. (2000) Genetic variation in coronary heart disease and myocardial infarction: methodological overview and clinical evidence. **Pharmacogenomics**, **1**: 73-94.
- WITZTUM, J. Fármacos usados no tratamento das hiperlipoproteinemias. In: GOODMAN e GILMAN (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. México: McGraw Hill, 1996.

- VON ECKARDSTEIN, A.; FUNKE, H.; SCHULTE, M.; ERREN, M.; SCHULTE, H.; ASSMAN, G. (1992). Nonsynonymous polymorphic sites in the apolipoprotein (apo) A-IV gene are associated with changes in the concentration of apo-B and apo A-I containing lipoproteins in a normal population. **Am. J. Hum. Genet.**, **50**: 1115-1128.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1997) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva.
- XU, Y.; BERGLUND, L.; RAMAKRISHNAN, R.; MAYEUX, R.; NGAI, C.; HOLLERAN, S.; TYCKO, B.; LEFF, T.; SHACHTER, N. S. (1999) A common *HpaI* RFLP of apolipoprotein C-I increases gene transcription and exhibits an ethnically distinct pattern of linkage disequilibrium with the alleles of apolipoprotein E. **J. Lipid Res.**, **40**: 50-58.
- ZAIYOU, M.; VISVIKIS, S.; GUEGUEN, R.; PARRA, H. J.; FRUCHART, J. C.; SIEST, G. (1994). DNA polymorphisms of human apolipoprotein A-IV gene: frequency and effects on lipid, lipoprotein and apolipoprotein levels in a French population. **Clin. Genet.**, **46**: 248-254.
- ZENG, Q.; DAMMERNAN, M.; TAKADA, Y.; MATSUNAGA, A.; BRESLOW, J. L.; SASAKI, J. (1995) An apolipoprotein CIII marker associated with hypertriglyceridemia in Caucasians also confers increased risk in a west Japanese population. **Hum. Genet.**, **95**: 371-375.
- ZYSOW, B. R.; PULLINGER, C. R.; KANE, J. P. (1992) A polymorphic *PstI* site in intron 2 of the apolipoprotein C-II gene detected by polymerase chain reaction. **Hum. Genet.**, **89**: 361.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO SOBRE FATORES GENÉTICOS QUE AFETAM OS NÍVEIS DE COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS NA POPULAÇÃO DE PORTO ALEGRE

Através deste documento, consinto em ser entrevistado e em doar uma quantidade de 5 (cinco) ml de sangue, a ser obtida juntamente com a retirada de sangue para os exames dos quais necessito, no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Estou ciente de que os objetivos deste estudo são conhecer um pouco mais sobre algumas das causas do aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos. Além disso, sei que os benefícios virão somente a longo prazo, quando será possível prever o risco genético de um indivíduo ter problemas cardiovasculares.

Os resultados do presente estudo estarão a minha disposição tão logo forem obtidos.

Tenho a garantia de que meus dados serão mantidos em sigilo, e que meu nome daqui para frente não será revelado.

Porto Alegre, / / . _____

Assinatura do Paciente

Pesquisadora Responsável:

Dra. Mara Helena Hutz

Departamento de Genética da UFRGS

Telefone: 316 - 6720

ANEXO 2

FICHA DO PACIENTE

IDENTIFICAÇÃO: _____

PRONTUÁRIO: _____

GRUPO ÉTNICO: C N

IDADE _____ PROFISSÃO _____

SEXO : MASCULINO

FEMININO } CLIMATÉRIO? SIM NÃO

INGERE HORMÔNIO? SIM NÃO

DADOS:

1 - Jejum? Sim Não

2 - Gravidez? Sim Não

3 - Diabete? Sim Não

4 - Complicações cardiovasculares? Sim Não

5 - História familiar de complicações cardiovasculares? Sim Não

Pai Mãe Irmão Outros _____

6 - Hipertensão arterial prévia? Sim Não

7 - Sedentarismo? Sim Não

8 - Tabagismo? Sim Maços/dia _____ anos _____

Não

9 - Consumo de álcool: Não

< 1 copo/semana 1- 5 copos/semana >5 copos

Tipo de bebida ingerida em maior quantidade: _____

10- Ingerir algum medicamento? Sim _____

Não

11 - Peso _____ Altura _____ Cintura _____ Quadril _____

EXAMES LABORATORIAIS:

CT _____mg/dl HDL _____mg/dl TRIG _____mg/dl

GLICEMIA _____mg/dl LDL _____mg/dl VLDL _____mg/dl

CT/HDL _____ LDL/HDL _____

