

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CLÁUDIA NATÁLIA FERREIRA

POLIMORFISMOS DOS GENES
APOLIPOPROTEÍNAS E E A5 E RELAÇÃO COM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
HEMOSTÁTICOS EM DISLIPIDÊMICOS

Belo Horizonte – MG
2010

CLÁUDIA NATÁLIA FERREIRA

**POLIMORFISMOS DOS GENES
APOLIPOPROTEÍNAS E E A5 E RELAÇÃO COM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
HEMOSTÁTICOS EM DISLIPIDÊMICOS**

Tese, como requisito parcial, para obter o Grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marinez de Oliveira Sousa

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria das Graças Carvalho

**Belo Horizonte – MG
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

F383p	<p>Ferreira, Cláudia Natália. Polimorfismos dos genes apolipoproteínas E e A5 e relação com parâmetros bioquímicos e hemostáticos em dislipidêmicos / Cláudia Natália Ferreira. – 2010. 174 f. : il.</p> <p>Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marinez de Oliveira Sousa. Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Carvalho.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.</p> <p>1. Sistema Cardiovascular – Teses. 2. Dislipidemia – Teses. Polimorfismo (Genética) – Teses. 3. Hemostasia – Teses. I. Sousa, Marinez de Oliveira. II. Carvalho, Maria das Graças. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD:616.1</p>
-------	--

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Às minhas queridas orientadoras Marinez de Oliveira Sousa e Maria das Graças Carvalho, por tanta dedicação, competência e profissionalismo que transcende e passa a ser generosidade; por tanta bondade e humanidade que tem como fonte o carisma, que mais do que orienta, inspira. Peço a Deus que as recompense e preserve estes dons que são próprios dos sábios.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo muito que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, deixo aqui registrada a minha sincera gratidão, enfatizando as professoras Ana Paula S. M. Fernandes, Karina B. G. Borges e Luci Maria Sant'Ana Dusse.

Aos médicos: Andréia Assis Loures-Vale, Audary Ferreira, Guilherme H. Loures-Vale, Julizar Dantas e Michelle Aparecida Ribeiro Borges que numa atitude receptiva e colaboradora, enviaram seus pacientes para documentação e execução desse trabalho.

À Dra Giovana Angélica Souza Reis e a bioquímica Míriam Celina Bruck pela divulgação do projeto de pesquisa no Hospital Prontocor e a disponibilização da estrutura do Laboratório de Análises Clínicas Prontoteste.

À nutricionista Eunice Barros, enfermeira Cristina e à professora Cenira pela boa vontade, empenho na divulgação do projeto de pesquisa e auxílio na logística para as coletas das amostras.

Aos pacientes, que em sua humildade e simplicidade se dispuseram a colaborar, numa participação efetiva e preciosa, sempre com uma vontade imensa de ajudar.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela convivência, luta e companheirismo nesses quatro anos de caminhada, especialmente a Ana Paula Batchauer, Anna Letícia, Danyelle Romana, Januária e Mirelle, amigas do dia-a-dia.

Ao Adriano Sabino e à Luciana Moreira Lima, pela amizade e disponibilidade em ajudar em todas as etapas do trabalho, especialmente na biologia molecular e bioquímica clínica, respectivamente.

Aos colegas do laboratório de Hematologia Clínica, pelo convívio harmonioso no local de trabalho. Em especial, à amiga Geralda de Fátima Guerra Lages, pelo carinho, amizade demonstrada desde a época do mestrado e excelente assistência técnica prestada durante a realização dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG, por estarem sempre dispostos a ajudar. Em especial, Daniela Brito, Jarbas e as bolsistas de iniciação científica Poliana, Izabela, Katryna, Fernanda e Nathália.

Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Ao farmacêutico Adriano Basques, do Laboratório Geraldo Lustosa, pelo auxílio nos testes bioquímicos.

À professora Ângela M. Quintão Lanna e Danilo Bastos, da Escola de Veterinária da UFMG, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e a Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, pelo apoio financeiro.

À FHEMIG que financiou parte desta pesquisa, acreditou e confiou no meu trabalho, desta forma, valorizando a pesquisa na instituição.

Agradeço à Maternidade Odete Valadares – FHEMIG e ao Laboratório Distrital Noroeste – PBH, pela redução de jornada de trabalho, dessa forma, facilitando e possibilitando a execução desse Projeto de Pesquisa e de Vida. Em especial, agradeço ao incentivo recebido pelas gerências e pelos colegas de laboratório, que sempre se mostraram receptivos e cooperativos, cujo apoio e colaboração, tornaram possível este trabalho.

Aos meus amigos, conquistados ao longo da minha jornada, que não cobraram a minha presença, por compreenderem o meu envolvimento com as tarefas que me absorviam e exigiam maior dedicação, aos quais apresento as minhas desculpas.

Ao Helton J. Reis, pelo amor, dedicação, força e apoio, o que me ajudou a superar os momentos de dificuldades, me fazendo perseverar e ir em frente. É essencial tê-lo ao meu

lado para me encorajar diante das dificuldades e para compartilhar as minhas alegrias. Sem você tudo seria muito mais difícil e sem graça.

À minha família, especialmente às minhas tias Terezinha e Júlia, ao meu irmão Heberth, minha cunhada Maria e minha prima-irmã Márcia, que foram companheiros, incentivadores de meus ideais, que acreditaram em mim e que me ajudaram a chegar até aqui, dedico toda a minha emoção, o meu coração repleto de amor por tudo que fizeram por mim.

À memória de Nátalia e Samuel, meus pais, que apesar de não estarem presentes fisicamente nessa etapa de minha vida, fazem parte da história de minha existência. Dedico esta conquista.

À Deus, elevo o meu pensamento em sentido de eterno agradecimento.

Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste.

(Sigmund Freud)

RESUMO

A aterosclerose é um processo complexo, resultante de múltiplas interações genéticas e ambientais, envolvendo não somente o metabolismo dos lípides, mas também o sistema hemostático e a resposta inflamatória. A dislipidemia é um dos fatores de risco mais importantes no desenvolvimento da aterosclerose e, conseqüentemente, das doenças cardiovasculares. O presente estudo teve como objetivo descrever as freqüências alélica e genotípica das apolipoproteínas E e A5, e correlacioná-las com o perfil lipídico e hemostático em indivíduos dislipidêmicos e normolipêmicos. O estudo incluiu 216 indivíduos, distribuídos em dois sub grupos: 109 indivíduos dislipidêmicos (41 mulheres e 68 homens, faixa etária = $48,4 \pm 6,8$ anos) e 107 indivíduos normolipêmicos saudáveis (63 mulheres e 44 homens, faixa etária = $46,7 \pm 6,6$). Os níveis de lípides foram determinados de acordo com a classificação das dislipidemias pela Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2001. As freqüências alélica e genotípica do polimorfismo *APOE* foram homogêneas entre os dois grupos. Quando se analisou o polimorfismo *APOE* em relação aos níveis de lípides entre os grupos dislipidêmico e normolipêmico, não foram observadas diferenças significativas entre os agrupamentos E2, E3 e E4 e os níveis de lípides e lipoproteínas no grupo de dislipidêmicos. Entretanto, no grupo normolipêmico, os níveis plasmáticos de colesterol total, LDLc e não-HDLc foram significativamente menores em indivíduos E2 quando comparados com E3 e E4 ($E2 < E3 = E4$, $p < 0,05$). Em indivíduos dislipidêmicos, também se observou que portadores do alelo $\epsilon 2$ apresentavam níveis aumentados de TAFI, quando comparados com portadores do alelo $\epsilon 4$. As freqüências do alelo C e genótipo TC do polimorfismo da *APOA5 -1131T>C* foram maiores em indivíduos dislipidêmicos em comparação ao grupo de normolipêmicos. O alelo C *APOA5* se associou a risco aumentado de dislipidemia na população avaliada. Quando os dados foram analisados distribuindo todos os participantes em dois agrupamentos *APOA5*: T (genótipo TT) e C (genótipos TC e CC), o alelo raro *APOA5 -1131* foi associado com níveis elevados de colesterol total, triglicérides, VLDLc e não-HDLc. Dislipidêmicos com o genótipo TT apresentaram níveis de dímero D superiores aos portadores do alelo C. Em relação aos parâmetros hemostáticos, entre os grupos e sexos, foram observados em mulheres com dislipidemia níveis aumentados de TAFI. Esses resultados indicam que os polimorfismos da *APOE* e *APOA5 -1131T>C* podem afetar os níveis plasmáticos de lípides e lipoproteínas nos grupos de indivíduos normolipêmicos e todos os participantes agrupados, respectivamente. Além disso, os níveis plasmáticos de TAFI se correlacionaram com os parâmetros do perfil lipídico, sugerindo que a dislipidemia exerce algum efeito na síntese de TAFI, possivelmente acarretando prejuízo da fibrinólise.

Palavras-chave: apolipoproteína E, apolipoproteína A5, polimorfismo, dislipidemia, sistema hemostático, TAFI.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a complex process due to multiple genetic and environmental interactions that modify not only lipid metabolism but also the coagulation system and inflammatory response. Dyslipidemia is the most important risk factor for atherosclerosis, predisposing to cardiovascular disease. The aim of this study was to describe the allelic and genotypic distribution of the *APOE* and *APOA5* -1131T>C polymorphisms and their relationship with lipid-lipoprotein plasma levels and hemostatic parameters in both dyslipidemic patients and normolipidemic subjects. The study included 216 individuals, distributed into 2 sub-groups, including 109 dyslipidemic subjects (41 women and 68 men, with a mean age of 48.4 ± 6.8 years) and 107 normolipidemic healthy volunteers (63 women and 44 men; mean age: 46.7 ± 6.6 years). Lipid levels were classified according to the Brazilian Society of Cardiology – 2001. The frequencies of alleles and genotypes for the *APOE* polymorphism were homogenous between groups. As it was analysed the effect of *APOE* polymorphism on lipid levels in dyslipidemic and normolipemic groups, no significant differences were observed among E2, E3 and E4 and plasma lipid-lipoprotein levels in the dyslipidemic group. However, in the normolipidemic group, total cholesterol, LDLc and non-HDLc plasma levels were significantly lower in E2 patients compared to E3 and E4 ($E2 < E3 = E4$, $p < 0.05$). It was also described that in dyslipidemic subjects, $\epsilon 2$ allele carriers showed increased TAFI levels when compared to $\epsilon 4$ allele carriers. The frequencies of C allele and TC genotype of the *APOA5* -1131T>C polymorphism in dyslipidemic subjects were significantly higher than those observed in normolipidemic group. When data were analyzed distributing all participants in the 2 *APOA5* sub-groups T (TT genotype) and C (TC and CC genotypes), the rare allele *APOA5* -1131 was associated with elevated plasma total cholesterol, triglycerides, VLDLc and non-HDLc. Dyslipidemic subjects with TT genotype showed D-Dimer plasma levels significantly increased compared to the C allele. Concerning to hemostatic factors, only dyslipidemic women had a significantly higher level of TAFI as compared to normolipemic women. These results indicates that both *APOE* and *APOA5* -1131T>C polymorphisms may affect plasma lipid-lipoprotein levels in normolipidemic group and in all participants, respectively. Moreover, TAFI plasma levels showed to be correlated to lipid profile variables, suggesting that dyslipidemia exerts some effect on the TAFI synthesis possibly reducing fibrinolysis activity.

Key-words: apolipoprotein E, apolipoprotein A5, polymorphism, dyslipidemia, hemostatic system, TAFI.

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
1 – Esquema das isoformas da APOE	36
2 – Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares	44
3 – Padrões de RFLP para <i>APOE</i>	65
4 – Eletroforese, em gel de poliacrilamida a 12% corado pela prata, dos produtos de PCR-RFLP do fragmento de 270pb do gene <i>APOE</i>	75
5 - Eletroforese, em gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata, dos produtos de PCR do fragmento de 187pb do gene <i>APOA5</i>	81

LISTA DE QUADROS

	Pagina
1 – Haplótipos comuns do gene <i>APOA5</i> e suas freqüências relativas em 419 indivíduos caucasianos	38
2 – Resumo da atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares	42
3 – Critérios de exclusão	57
4 – Perfil de bandas no gel para a identificação dos alelos do gene <i>APOE</i>	66
5 – Perfil de bandas no gel para a identificação dos alelos do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i>	66
6 – Antihipertensivos agrupados por classe de medicamentos	72

LISTA DE TABELAS

1 – Caracterização dos grupos de indivíduos estudados	56
2 – Caracterização dos grupos quanto aos fatores de risco	69
3 – Caracterização dos grupos de indivíduos do sexo masculino, quanto aos fatores de risco cardiovascular	70
4 – Caracterização dos grupos de indivíduos do sexo feminino, quanto aos fatores de risco cardiovascular	70
5 – Correlação de Pearson entre o IMC e os parâmetros bioquímicos e hemostáticos estudados	71
6 – Caracterização dos grupos normolipêmico e dislipidêmico quanto ao uso de antihipertensivo	72
7 – Análises dos parâmetros bioquímicos entre os grupos, sexos, faixas etárias e interações entre as variáveis	74
8 – Frequência dos alelos <i>APOE</i> nos grupos estudados	76
9 – Frequência dos alelos <i>APOE</i> nos grupos estudados para o sexo masculino	76
10 – Frequência dos alelos <i>APOE</i> nos grupos estudados para o sexo feminino	77
11 – Frequência dos genótipos <i>APOE</i> nos grupos estudados	77
12 – Frequência dos genótipos <i>APOE</i> nos grupos estudados para o sexo masculino	78
13 – Frequência dos genótipos <i>APOE</i> nos grupos estudados para o sexo feminino	78
14 – Parâmetros bioquímicos e agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo <i>APOE</i> nos grupos normolipêmico e dislipidêmico	79
15 – Parâmetros bioquímicos e agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo <i>APOE</i> entre todos os participantes estudados	80
16 – Frequência dos alelos do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> nos grupos estudados	82
17 – Frequência dos alelos do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> nos grupos estudados para o sexo masculino	82
18 – Frequência dos alelos do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> nos grupos estudados para o sexo feminino	83
19 – Frequência dos genótipos do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> nos grupos estudados	83
20 – Frequência dos genótipos do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> nos grupos estudados para o sexo masculino	84
21 – Frequência dos genótipos do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i>	

nos grupos estudados para o sexo feminino	84
22 – Parâmetros bioquímicos e agrupamentos do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> nos grupos normolipêmico e dislipidêmico	85
23 – Parâmetros bioquímicos e agrupamentos T e C do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> entre todos os participantes estudados	86
24 – Associação entre o alelo $\epsilon 2$ <i>APOE</i> e os genótipos <i>APOA5</i> nos grupos estudados	87
25 – Associação entre o alelo $\epsilon 4$ <i>APOE</i> e os genótipos <i>APOA5</i> nos grupos estudados	87
26 – Análises dos parâmetros hemostáticos entre os grupos, sexos, faixas etárias e interações	89
27 – Trombomodulina: Interações grupos <i>versus</i> sexos	90
28 – TAFI: Interações grupos <i>versus</i> sexos	90
29 – Correlação de Pearson entre os parâmetros hemostáticos	91
30 – Correlação de Pearson entre os parâmetros hemostáticos e bioquímicos	91
31 – Parâmetros hemostáticos e agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo <i>APOE</i> nos grupos normolipêmico e dislipidêmico	92
32 – Parâmetros hemostáticos e agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo <i>APOE</i> entre todos os participantes estudados	93
33 – Parâmetros hemostático e agrupamentos T e C do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> nos grupos normolipêmico e dislipidêmico	94
34 – Parâmetros hemostáticos e agrupamentos T e C do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i> entre todos os participantes do estudo	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA-1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
α 2PI	Alfa-2-antiplasmina
ANOVA	Análise de variância
AT	Antitrombina
APO	Apolipoproteína plasmática
APOA-I	Apolipoproteína A1 plasmática
<i>APOA5</i>	Gene da apolipoproteína A5
APOA5	Apolipoproteína A5 plasmática
APOB	Apolipoproteína B plasmática
<i>APOE</i>	Gene da apolipoproteína E
APOE	Apolipoproteína E plasmática
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DCC	Doença cardíaca coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
D-Di	Dímero-D
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPCR	Receptor endotelial de proteína C
FII	Fator II
FV	Fator V
FVII	Fator VII
FVIII	Fator VIII
FIX	Fator IX
FX	Fator X

FXI	Fator XI
FXII	Fator XII
FXIII	Fator XIII
FVa	Fator V ativado
FVIIa	Fator VII ativado
FVIIIa	Fator VIII ativado
FIXa	Fator IX ativado
FXa	Fator X ativado
FXIa	Fator XI ativado
FXIIa	Fator XII ativado
FXIIIa	Fator XIII ativado
FvW	Fator de von Willebrand
F1+2	Fragmento 1+2 da protrombina
FPA	Fibrinopeptídeo A
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCY	Homocisteína
HDL	<i>High density lipoprotein</i> ou lipoproteína de alta densidade
HDLc	Colesterol presente na lipoproteína de alta densidade
HL	Lipase hepática
HTG	Hipertrigliceridemia grave
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Intervalo de confiança
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i> ou lipoproteína de densidade intermediária
IFCC	Federação Internacional de Química Clínica
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> ou lipoproteína de baixa densidade
LDLc	Colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor de LDLc ou o mesmo que receptor B/E
Lp(a)	Lipoproteína(a)
LPL	Lipase lipoproteíca

LRP	<i>LDL receptor related</i> ou proteína de ligação ao receptor de LDL
MRFIT	<i>Multiple risk factor intervention trial</i>
mRNA	RNA mensageiro
NCEP	<i>(III) National Cholesterol Education Program</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofenilenodiamino
PAI-1	Inibidor do ativador tecidual do plasminogênio
pbs	Pares de bases
PC	Proteína C
PCa	Proteína C ativada
PCI	Intervenção coronariana percutânea
PCR	Proteína C reativa
PCR-us	Proteína C reativa ultra sensível
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PPAR- α	<i>Peroxisome proliferator activated receptor-alpha</i>
PPRE	<i>Peroxisome proliferator response element</i>
PS	Proteína S
Qm	Quilomícrons
rpm	Rotações por minuto
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> ou polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
SAH	S-adenosil-homocisteína
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SCA	Síndromes coronarianas agudas
SMILE	<i>Study of myocardial infarctions Leiden</i>
SNK	Student-Newman-Keuls

SNPs	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ou polimorfismo de um único nucleotídeo
SUS	Sistema Único de Saúde
TAFI	<i>Thrombin - activable fibrinolysis inhibitor</i> ; Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina
TAFIa	TAFI ativado
TAFI-AP	Peptídeo de ativação de TAFI
TAFIai	TAFI inativo
TAT	Complexo trombina-antitrombina
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TG	Triglicérides
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
t-PA	Ativador de plasminogênio tipo tecidual
u-PA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> ou lipoproteína de muito baixa densidade
VLDLc	Colesterol presente na lipoproteína de muito baixa densidade
vs	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

	Pagina
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 DISLIPIDEMIAS E ATEROSCLEROSE	26
2.1.1 – Dislipidemias	26
2.1.2 – Aterosclerose	27
2.2 LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS	29
2.3 METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS	31
2.4 MARCADORES GENÉTICOS NAS DISLIPIDEMIAS	33
2.4.1 – Gene da apolipoproteína E e polimorfismo <i>APOE Hha I</i>	34
2.4.2 – Gene da apolipoproteína A5 e polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i>	37
2.5 HEMOSTASIA E DISLIPIDEMIA	40
2.5.1 – Hemostasia	40
2.5.2 – Dislipidemia e alterações hemostáticas	47
2.5.3 – Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina – TAFI	48
2.5.4 – Homocisteína	50
2.5.5 – Lipoproteína (a)	51
3 OBJETIVOS	52
3.1 – OBJETIVO GERAL	53
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 – CASUÍSTICA	55
4.2 – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	56
4.2.1 – Dislipidêmicos	56
4.2.2 – Controles	57
4.3 – AMOSTRAS BIOLÓGICAS	57
4.4 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	58
4.5 – MÉTODOS	58
4.5.1 – Fatores de risco	58
4.5.2 – Parâmetros Bioquímicos	59
4.5.3 – Parâmetros Hemostáticos	62
4.5.4 – Análise Molecular	64
4.6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5 – RESULTADOS	68

5.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE INDIVÍDUOS QUANTO AOS FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR	69
5.2 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO AO USO DE MEDICAMENTOS	72
5.3 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	73
5.4 – ANÁLISES MOLECULARES	75
5.4.1 – Polimorfismo apolipoproteína E: freqüências alélicas, genotípicas e associações de parâmetros bioquímicos com os agrupamentos E2, E3 e E4	75
5.4.2 – Polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i>: freqüências alélicas, genotípicas e associações de parâmetros lipídicos com os agrupamentos T e C	81
5.4.3 – Associação entre os polimorfismos <i>APOE</i> e <i>APOA5 -1131T>C</i>	86
5.5 – PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS	88
5.5.1 – Correlações de Pearson	90
5.5.2 – Parâmetros hemostáticos entre os agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo <i>APOE</i>	92
5.5.3 – Parâmetros hemostáticos entre os agrupamentos T e C do polimorfismo <i>APOA5 -1131T>C</i>	93
6 DISCUSSÃO	95
6.1 – CARACTERIZAÇÃO E FATORES DE RISCO DOS GRUPOS ESTUDADOS	96
6.2 – PERFIL LIPÍDICO E APOLIPOPROTEÍNAS	98
6.3 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E APOLIPOPROTEÍNA E	100
6.3.1 – Distribuição da freqüência dos alelos e genótipos <i>APOE</i>	100
6.3.2 – Efeito do polimorfismo <i>APOE</i> no perfil lipídico	102
6.3.3 – Lipoproteína (a) e polimorfismo do gene <i>APOE</i>	106
6.3.4 – Proteína C reativa ultra-sensível e polimorfismo do gene <i>APOE</i>	107
6.4 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E POLIMORFISMO <i>-1131T>C</i> DO GENE <i>APOA5</i>	110
6.4.1 – Distribuição das freqüências dos alelos e genótipos <i>APOA5</i>	110
6.4.2 – Efeito do polimorfismo do gene <i>APOA5</i> nos parâmetros bioquímicos	113
6.5 – ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS <i>APOE</i> E <i>APOA5 -1131T>C</i>	117
6.6 – PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS E MOLECULARES	118
6.6.1 Parâmetros hemostáticos e dislipidemias	118
6.6.2 Parâmetros hemostáticos e polimorfismos dos genes <i>APOE</i> e <i>APOA5 -1131T>C</i>	127
6.7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	128
7 CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

APÊNDICE A: Termo de consentimento livre e esclarecido	160
APÊNDICE B: Ficha clínica	163
APÊNDICE C: Artigos publicados	167
APÊNDICE D: Resumos em congressos	169
ANEXO A: Comitê de Ética da UFMG	171
ANEXO B: Comitê de Ética do Hospital Socor	173

1-INTRODUÇÃO

A aterosclerose é um processo complexo, resultante de múltiplas interações genéticas e ambientais, envolvendo o metabolismo dos lípidos, bem como o sistema hemostático e a resposta inflamatória (MOZAS *et al.*, 2003). A dislipidemia é um dos fatores de risco mais importantes no desenvolvimento da aterosclerose e, conseqüentemente, das doenças cardiovasculares (WOUTERS *et al.*, 2005). Portanto, uma avaliação do perfil lipídico não convencional e dos perfis genético e hemostático de indivíduos dislipidêmicos residentes na região metropolitana de Belo Horizonte, torna-se pertinente e desejável. Este estudo poderá fornecer dados para uma melhor caracterização dos indivíduos dislipidêmicos em nosso meio bem como a possível relação entre variações genéticas e a patogênese precoce da aterosclerose. Pretende-se também obter uma melhor identificação de subgrupos, dentro de uma grande população, que possuem risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Pesquisas recentes sobre doenças cardiovasculares têm focado detalhadamente as bases moleculares da aterosclerose, tendo resultado na identificação da apolipoproteína E (*APOE*) com um papel chave no processo (BERTOLINI *et al.*, 2004; GREENOW *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2008a). O polimorfismo *APOE* está diretamente relacionado com o perfil lipídico e alguns tipos de dislipidemias que precedem o desenvolvimento da aterosclerose, tornando-se necessário uma análise profunda da associação entre o perfil lipídico e freqüência do genótipo *APOE* (SCHWANKE *et al.*, 2002). Devido ao significado clínico do polimorfismo *APOE*, torna-se importante conhecer a distribuição dos alelos *APOE* em diversos grupos étnicos para determinar se esse polimorfismo tem um efeito universal nos níveis dos lípidos ou se esse efeito é modulado por interações genético-ambientais conforme sugerido por ANDRADE *et al.* (2000), ou seja, como diferentes ambientes afetam genes idênticos produzindo fatores de riscos diferentes.

SCHWANKE *et al.* (2002) estabeleceram as freqüências dos alelos e genótipos relacionados ao polimorfismo *APOE* e a associação dos genótipos com fatores de risco cardiovasculares, em pacientes com mais de 80 anos de idade, no município de Veranópolis, Rio Grande do Sul, Brasil. As freqüências dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ foram de 5%, 84% e 11%, respectivamente. FRANÇA *et al.* (2004) determinaram a freqüência dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, em crianças brasileiras do norte do Brasil, de 6%, 77% e 17%, respectivamente. Considerando que as informações sobre as freqüências dos alelos *APOE* na população brasileira são restritas e que as diferentes regiões do Brasil apresentam grandes variações na etnia seria importante estabelecer uma comparação entre as freqüências obtidas entre estas regiões. Portanto, investigações adicionais sobre o impacto do polimorfismo *APOE* sobre os tradicionais fatores de risco no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, especialmente sobre os lípidos e lipoproteínas ainda são necessários (FORTI *et al.*, 2003).

Recentemente, PENNACCHIO *et al.* (2001) identificaram o gene da apolipoproteína A5 (*APOA5*), um novo componente do conjunto gênico das apolipoproteínas *APOA1/APOC3/APOA4*, cujos estudos, demonstraram uma grande influência nos níveis dos parâmetros do perfil lipídico e susceptibilidade a aterosclerose. Para estudos de associação foram identificados 4 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) no *locus APOA5*, cuja presença do alelo raro foi associada a níveis aumentados de triglicérides (TG) (PENNACCHIO *et al.*, 2001; PENNACCHIO *et al.*, 2002; TALMUD *et al.*, 2002; PENNACCHIO & RUBIN, 2003) e resultados controversos em relação aos níveis plasmáticos de colesterol total (CT) e HDLc (ENDO *et al.*, 2002; TALMUD *et al.*, 2002; BAUM *et al.*, 2003).

Desde o relato inicial da associação do polimorfismo *APOA5* -1131T>C com os níveis de lípidos, numerosos estudos têm sido realizados em diversas populações e diferentes doenças com o objetivo de se determinar a sua frequência alélica e genotípica, e sua influência nos parâmetros do perfil lipídico. Estudos sobre o polimorfismo *APOA5* -1131T>C são inexistentes na população brasileira. Portanto, investigações abordando o seu comportamento em relação a outros estudos, envolvendo populações de diferentes origens geográficas e/ou de doenças distintas, poderão impactar favoravelmente o conhecimento disponível até o momento sobre o assunto.

É amplamente sabido que a atividade do sistema hemostático contribui de maneira importante para os eventos coronarianos agudos. Vários estudos sugerem que marcadores de atividade hemostática, de hipofibrinólise ou de ativação endotelial possuem valor preditivo importante para risco aumentado de eventos cardiovasculares agudos, especialmente em indivíduos com idade inferior a 60 anos (IZAR *et al.*, 2003; GEORGIEVA *et al.*, 2004).

Vários estudos demonstraram a importância do Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) na regulação da fibrinólise. Níveis altos de TAFI foram correlacionados com trombose de veia profunda (MARTINI *et al.*, 2006), doença arterial coronariana (DAC) e com o desenvolvimento de angina de peito entre homens aparentemente saudáveis (EICHINGER *et al.*, 2004; CERESA *et al.*, 2006). A avaliação dos níveis de TAFI em pacientes com dislipidemias e sua correlação com parâmetros bioquímicos, genéticos e hemostáticos serão de grande importância para a sua validação como biomarcador para risco de eventos cardiovasculares. Paradoxalmente, o TAFI tem sido reconhecido como potente regulador da inflamação (MYLES *et al.*, 2003; BAJZAR *et al.*, 2004). Cumpre ressaltar que até o presente momento, não foram conduzidos estudos sobre o TAFI com a população brasileira.

Diante do exposto, surgiram algumas indagações que nortearam esse estudo, a saber:

- As frequências dos alelos e dos genótipos *APOE* e *APOA5* da população atendida em Belo Horizonte seriam semelhantes às frequências encontradas em outras regiões brasileiras e outras populações do mundo?
- Como se comportam as distribuições dos alelos *APOE* e *APOA5* em indivíduos dislipidêmicos em relação a indivíduos normolipêmicos?
- Como os alelos e os genótipos *APOE* e *APOA5* influenciam o perfil lipídico e alguns parâmetros bioquímicos nos grupos de indivíduos estudados?
- Como os genótipos *APOE* e *APOA5* podem influenciar os níveis de marcadores inflamatórios?
- Podem os parâmetros hemostáticos serem influenciados pelos polimorfismos *APOE* e *APOA5*?

Desta forma, acredita-se que o presente estudo poderá contribuir para:

- Ampliação do conhecimento das frequências dos alelos e dos genótipos *APOE* e *APOA5* da região brasileira em estudo.
- Um melhor entendimento sobre a influência exercida pelos polimorfismos *APOE* e *APOA5* no metabolismo dos lípidos e lipoproteínas.
- Um maior conhecimento das possíveis interações entre os genótipos *APOE*, *APOA5*, perfil lipídico, parâmetros inflamatórios e fatores de risco cardiovascular na população residente na região metropolitana de Belo Horizonte.
- Um maior entendimento entre as relações dos polimorfismos *APOE*, *APOA5*, perfil lipídico, cascata da coagulação e sistema fibrinolítico em indivíduos dislipidêmicos e normolipêmicos.

2-REVISÃO DA LITERATURA

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo a principal causa de mortalidade no Brasil (GIULIANO *et al.*, 2005; INEU *et al.*, 2006). Essa doença é multifatorial e sua prevenção passa pela identificação de um conjunto de fatores de risco associados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC – 2001). Estes se dividem em modificáveis e não modificáveis. Os fatores não modificáveis incluem a idade, o sexo e a história familiar para doença arterial coronariana (DAC) precoce. Entre os modificáveis estão a dislipidemia, o diabetes mellitus, o tabagismo, o sedentarismo, a hipertensão arterial e a obesidade. A prevenção da aterosclerose tem sido baseada no conhecimento dos fatores de risco modificáveis (CANTOS *et al.*, 2004). A lesão aterosclerótica é, em geral, responsável pelas síndromes coronarianas agudas, cujo espectro clínico abrange a angina instável, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a morte súbita (PINHEIRO *et al.*, 2005).

Apesar da redução da mortalidade por doenças cardiovasculares, a partir da metade da década de 60 nos países mais desenvolvidos, como Japão e Estados Unidos, e só mais recentemente nos países em desenvolvimento como o Brasil, essas doenças ainda constituem a principal causa de morte em todo o mundo, com taxas de mortalidade de elevada magnitude (HANSSON, 2005). Esse cenário não deve se modificar nos próximos anos. Estima-se que em 2020, em decorrência do crescimento da população idosa e do aumento da longevidade associada a mudanças nos padrões alimentares e no estilo de vida, as doenças do aparelho cardiocirculatório continuarão a liderar as estatísticas de letalidade, seguidas por outros distúrbios crônicos, como as doenças do aparelho respiratório, câncer e diabetes (BARRETO *et al.*, 2003; RASSI Jr, 2004).

As doenças cardiovasculares, no Brasil, são responsáveis pela morte de 300 mil pessoas/ano e correspondem a 16% dos gastos em assistência médica pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (NEVES *et al.*, 2004, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Em todos os estados brasileiros, considerando-se o conjunto de todas as faixas etárias, as doenças cardiocirculatórias são responsáveis pelo maior contingente de óbitos, decorrentes de DAC, doenças cerebrovasculares e insuficiência cardíaca (SILVA *et al.*, 2005).

2.1 – DISLIPIDEMIAS E ATEROSCLEROSE

2.1.1 – Dislipidemias

As dislipidemias constituem uns dos problemas clínicos mais comuns encontrados pelos profissionais de saúde, sendo consideradas distúrbios do metabolismo lipídico com repercussões sobre os níveis das lipoproteínas na circulação sanguínea, bem como sobre as concentrações de diferentes componentes envolvidos neste processo metabólico. Mais especificamente, as dislipidemias estão correlacionadas com níveis anormais de colesterol total (CT), triglicérides (TG), colesterol presente na lipoproteína da alta densidade (HDLc),

colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade (LDLc) e lipoproteína (a) [Lp(a)], que estão diretamente associados à gênese e evolução da aterosclerose (PRADO & DANTAS, 2002). As alterações dos lípidos e lipoproteínas têm sido exaustivamente estudadas devido a sua forte correlação com a manifestação de doenças cardiovasculares e, no caso das hipertrigliceridemias graves, a quadros clínicos de pancreatite aguda (MARTINEZ, 2003). As concentrações elevadas de LDLc e Lp(a), assim como a redução dos níveis plasmáticos de HDLc, têm sido considerados como fatores de risco independentes para o desenvolvimento da aterosclerose, principal causa de morte nos países industrializados (FORTI & DIAMENT, 2006; FRANCA & ALVES, 2006). Resultados dos estudos de Framingham e MRFIT (*Multiple Risk Factor Intervention Trial*) mostraram que o aumento do risco de doença cardíaca coronariana é diretamente proporcional à elevação dos níveis de colesterol no plasma (CHOY *et al.*, 2004).

As dislipidemias podem ser primárias ou secundárias. As dislipidemias primárias na classificação genotípica se dividem em monogênicas, causadas por mutação de um só gene, e poligênicas, causadas por associações de múltiplas mutações, que isoladamente não seriam de grande repercussão (SBC, 2007).

As formas secundárias de dislipidemias representam a conseqüência de outras condições, como diabetes mellitus, alcoolismo, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, hepatopatia e administração de fármacos, como, por exemplo, uso de inibidores de proteases utilizados no tratamento de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (RANG *et al.*, 2004). Cumpre também ressaltar a influência de outros fatores que podem estar relacionados ao estilo de vida e ao comportamento como, por exemplo, dieta enriquecida em gordura saturada e sedentarismo, (LAUER & FONTANAROSA, 2001; NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM – NCEP – 2001; PACE, 2001; HARDMAN & LIMBRID, 2003).

As dislipidemias têm sido citadas, talvez, como o principal fator de risco para a aterosclerose e suas complicações (VAPAATALO & MERVAALA, 2001). Com etiologia multifatorial, seu desenvolvimento e evolução não dependem apenas de alterações genéticas, mas também das influências dos hábitos de vida, ou seja, há necessidade de uma interação entre fatores genéticos e ambientais (WOUTERS, *et al.*, 2005). A inter-relação entre os diferentes fatores de risco representam um novo desafio no estudo da patogênese da aterosclerose (CHOY *et al.*, 2004).

2.1.2 – Aterosclerose

A aterosclerose é a maior causa de doenças cardiovasculares (WOUTERS *et al.*, 2005), atingindo artérias de grande calibre e de calibre intermediário caracterizada pelo desenvolvimento de lesões gordurosas, denominadas placas ateromatosas na superfície

interna da parede arterial (GUYTON & HALA, 2002). Atualmente, estudos demonstram que a aterosclerose é um processo dinâmico, inflamatório e modificável, envolvendo vários mecanismos patológicos. O processo se inicia com a disfunção endotelial (VAPAATALO & MERVAALA, 2001; MARTINEZ, 2004; GREENOW *et al.*, 2005) e envolve a interação entre vários elementos do sangue e alteração do fluxo sangüíneo (MARTINEZ, 2003; CHOY *et al.*, 2004). A lesão endotelial constitui o evento inicial do processo de formação da placa aterosclerótica, portanto, a aterogênese pode ser considerada uma resposta inflamatória protetora contra a agressão ao endotélio (FRANÇOSO & COATES, 2002).

Na presença de fatores de risco, como dislipidemias, hipertensão arterial, diabetes mellitus e tabagismo, o processo aterogênico evolui (VAPAATALO & MERVAALA, 2001; CHOY *et al.*, 2004; MARTINEZ, 2004). A partir do dano vascular, ocorre a expressão de moléculas de adesão que mediarão a entrada de monócitos em direção ao espaço intimal, que, por sua vez, englobarão lipoproteínas modificadas (predominantemente LDL oxidada) originando as células espumosas (CHOY *et al.*, 2004; FOLEY, 2005; STÜHLINGER & STANGER, 2005). A LDL oxidada é altamente aterogênica, tendo a capacidade de prejudicar o relaxamento endotelial estimulando as células endoteliais a secretarem citocinas aterogênicas (SOUFI *et al.*, 2002; CHOY *et al.*, 2004). Diferentes mediadores inflamatórios são liberados no espaço intimal, perpetuando e amplificando o processo, levando finalmente à formação da placa aterosclerótica (FOLEY, 2005). A placa de ateroma tem núcleo lipídico com componente primário de LDLc, além de elementos celulares e componentes da matriz extracelular (SBC, 2001; FOLEY, 2005). Neste processo, ocorre também síntese de mediadores que causam a degeneração da matriz, provocando a ruptura da placa e ativação do sistema trombogênico (MARTINEZ, 2004).

A ruptura da placa aterosclerótica, com conseqüente instalação de um trombo no local, é a principal causa das síndromes coronarianas agudas (SCA) (GREENOW *et al.*, 2005). A composição da placa, mais do que o seu volume, é determinante importante para o desenvolvimento das síndromes agudas, sendo as placas moles, ricas em lípidos, de maior risco do que as rígidas e ricas em colágenos, por serem as primeiras mais instáveis e altamente trombogênicas (MARTINEZ 2004; GREENOW *et al.*, 2005).

Os macrófagos e linfócitos T possuem papel central na formação da placa vulnerável, pois estas células liberam citocinas que causam inflamação na parede do vaso (FILHO *et al.*, 2005). As citocinas amplificam a resposta imunológica e alteram a função endotelial favorecendo o processo pró-trombótico. A interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) têm papel de destaque, verificando-se associação entre seus níveis plasmáticos e o aparecimento de eventos coronarianos. A IL-6 é um estímulo importante para a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, induzindo

aumento dos níveis circulantes de proteína C reativa (PCR) e fibrinogênio (SANTOS *et al.*, 2003; MARTINEZ, 2004; GREENOW *et al.*, 2005).

Tem sido proposto que altos níveis de proteínas de fase aguda podem ser um indicador indireto de aterogênese e trombose com valor prognóstico para doença isquêmica do coração e para doenças vasculares inflamatórias e periféricas (VAPAATALO & MERVAALA, 2001; HANSSON, 2005). Ficou evidenciado que os marcadores de inflamação podem identificar indivíduos de alto risco para uma evolução adversa, que não pode ser previsível apenas pela análise de fatores de risco ou perfil lipídico (SANTOS *et al.*, 2003).

Níveis elevados de PCR ultra sensível (PCRus) foram associados a eventos cardiovasculares futuros (MÄRZ *et al.*, 2004), além de ser considerado um fator de risco independente de redução da capacidade de vasodilatação na DAC (VAPAATALO & MERVAALA, 2001; HANSSON, 2005). Níveis elevados de PCRus foram preditores de mortalidade precoce e tardia em pacientes com SCA (DUARTE *et al.*, 2005).

Sendo o fibrinogênio uma proteína inflamatória de fase aguda, vários estudos clínicos e epidemiológicos têm associado os seus níveis com doenças cardiovasculares (JAEGER *et al.*, 2006). A presença de níveis moderados e altos de fibrinogênio acentuou o risco cardiovascular em indivíduos hipercolesterolêmicos, enquanto baixos níveis de fibrinogênio identificaram pacientes sob menor risco de eventos, mesmo na presença de concentrações elevadas de colesterol (DUARTE *et al.*, 2005).

Agentes infecciosos, como a *Chlamydia pneumoniae*, são freqüentemente encontrados em placas ateroscleróticas humanas, principalmente naquelas vulneráveis, acentuando o processo inflamatório e, conseqüentemente, a aterogênese (SANTOS *et al.*, 2003; MARTINEZ, 2004; HANSSON, 2005).

2.2 – LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS

Os lípidos são substâncias insolúveis em água, transportados na forma de lipoproteínas, as quais podem ser divididas em cinco classes, de acordo com sua densidade: quilomícrons (Qm), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). A função principal das partículas lipoproteicas é o transporte de TG e do colesterol dos órgãos de origem para os sítios de armazenamento e utilização (SCHIAVO *et al.*, 2003).

Diversas apolipoproteínas (APOs), proteínas que estão em associação com lípidos nas partículas de lipoproteínas, desempenham funções importantes no metabolismo lipoprotéico, como transporte destas moléculas hidrofóbicas no meio aquoso plasmático, ligação aos receptores específicos na superfície celular para direcionar corretamente os lípidos para os órgãos-alvo e tecidos do organismo, e ativação ou inibição de enzimas

envolvidas no metabolismo lipídico (MARTINEZ, 2003; LIMA *et al.*, 2007a). Várias apolipoproteínas foram identificadas, sendo que o percentual e o tipo divergem nas classes de lipoproteínas. Dentre as APOs identificadas, a apolipoproteína A-I (APOA-I) e a apolipoproteína B (APOB) têm sido alvo de um grande número de estudos (WALLDIUS & JUNGNER, 2007; HOLME *et al.*, 2008; SCHMIDT & FAGERBERG, 2008), e são determinadas no laboratório clínico em algumas situações especiais.

A APOA-I sintetizada no fígado e intestino (DULLENS *et al.*, 2007), é o maior componente da partícula de HDL, representando cerca de 50% de sua massa molecular (RASHID & GENEST, 2007). Esta apolipoproteína age como cofator para lecitina colesterol-aciltransferase, é ligante para o ABCA-1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), transportador que promove o fluxo de colesterol livre e fosfolípidos das células e, portanto, está envolvido no transporte reverso do colesterol (FORTI & DIAMENT, 2007). O método para a determinação da APOA-I na prática laboratorial já está padronizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) e não requer jejum. A APOA-I, como a principal proteína constituinte do HDLc, reflete o número absoluto dessa lipoproteína, e correlaciona-se inversamente com o risco cardiovascular (SHAROBEEEM *et al.*, 2007; WALLDIUS & JUNGNER, 2007).

A APOB apresenta-se sob duas formas: B-48 e B-100, diferenciadas pela massa molecular. A APOB-48, sintetizada no intestino, é constituinte dos quilomicrons (Qm) e seus remanescentes (com potencial aterogênico) e é metabolizada na circulação e no fígado. A APOB-100 é sintetizada no fígado, faz parte das principais frações lipoprotéicas consideradas aterogênicas [VLDL, IDL, LDL e Lp(a)], cujo conteúdo de colesterol é variável. Somente uma molécula de APOB-100 está presente em cada uma dessas frações. A LDL é a partícula aterogênica mais importante, contém mais que 90% das partículas de APOB no plasma e assim o número de partículas de LDL é o principal determinante do número de partículas aterogênicas (SNIDERMAN & ROSENBLOOM, 2005; MUDD *et al.*, 2007). A APOB-100 é essencial para ligação das partículas de LDL aos receptores celulares, permitindo a entrada de LDL nas células; logo um excesso de APOB representa um fator desencadeante para o processo aterogênico. A IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SBC, 2007) admite a importância da fração não-HDLc na aterogênese. Os valores desta fração, determinados indiretamente, correlacionam-se significativamente aos níveis de APOB. Se forem considerados os valores dessa correlação, as variações de colesterol nas partículas constituintes de não-HDLc, a possibilidade de determinação direta da concentração sanguínea de APOB e o conteúdo de APOB em LDL, é possível inferir que a dosagem de APOB poderia representar uma alternativa para as determinações das frações de LDLc e não-HDLc (MUDD *et al.*, 2007). Além disso, a

determinação da APOB representa vantagens metodológicas em relação às dosagens dos lípidos e menor variabilidade pré-analítica. As metodologias mais utilizadas na rotina laboratorial são imunoturbidimetria e nefelometria, por método automatizado, com padronização pela OMS e pela IFCC (FORTI & DIAMENT, 2007; WALLDIUS & JUNGNER, 2007).

Vários trabalhos demonstraram a superioridade das determinações dos níveis plasmáticos das apolipoproteínas A-I e B, como melhores preditores de doenças ateroscleróticas do que as concentrações de lípidos e lipoproteínas. Por isso, tem sido proposto que o índice APOB/APOA-I represente um parâmetro superior para predição de risco cardiovascular do que outros índices lipídicos, como colesterol total/HDLc, LDLc/HDLc e colesterol não-HDL/HDLc (SNIDERMAN & ROSENBLOOM, 2005; LIMA *et al.*, 2007b; SHAROBEEEM *et al.*, 2007). O índice APOB/APOA-I representa o equilíbrio entre lipoproteínas aterogênicas e as lipoproteínas antiaterogênicas no plasma (SNIDERMAN *et al.*, 2007).

O valor preditivo das apolipoproteínas A-I e B para DAC está bem estabelecido e documentado na literatura. Níveis elevados de APOB, diminuição dos níveis de APOA-I e aumento do índice APOB/APOA-I são consistentemente associados ao risco de doenças cardiovasculares (SCHMIDT & FAGERBERG, 2008). Foi sugerido pontos de corte para o índice APOB/APOA-I de 0,9 e 0,8 para homens e mulheres, respectivamente, e foi demonstrado que valores superiores a estes representariam risco aumentado para doenças cardiovasculares (WALLDIUS *et al.*, 2004).

2.3 – METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS

O metabolismo das lipoproteínas pode ser dividido em três partes distintas, mas que estão interrelacionadas. A primeira parte, denominada metabolismo exógeno, se relaciona com o transporte dos lípidos derivados da dieta através da formação de quilomícrons no intestino, até o fígado e tecidos periféricos. A segunda parte se relaciona com o metabolismo endógeno, que envolve o transporte dos lípidos sintetizados pelo fígado e incorporados nas partículas de VLDL e LDL, até os tecidos periféricos. A terceira parte envolve o transporte reverso do colesterol, no qual a HDL transporta o colesterol dos tecidos periféricos de volta para o fígado para excreção (FOLEY, 2005). Os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides são resultantes do equilíbrio dinâmico entre os aspectos anabólicos e catabólicos do metabolismo das lipoproteínas. Os mecanismos pelos quais os lípidos são utilizados, transportados e removidos pelo organismo são bastante complexos. Muitos receptores específicos, proteínas transportadoras, enzimas e vias de transporte estão envolvidas e desempenham papéis importantes neste processo (MARTINEZ, 2004).

Na via exógena, o colesterol e os TG absorvidos pelas células epiteliais do trato gastrointestinal são incorporados aos quilomícrons. As apolipoproteínas dos quilomícrons incluem algumas (APOB-48, APOA-I e APOA-IV) que são sintetizadas pelas células epiteliais intestinais e outras (APOE e APOC) adquiridas do HDL após os quilomícrons terem sido secretados na linfa e alcançarem o plasma (HARDMAN & LIMBRID, 2003). Após atingirem a circulação via ducto-torácico, os quilomícrons são metabolizados inicialmente na superfície dos tecidos que sintetizam a lipase lipoproteica, onde os TG são hidrolizados, tendo como cofator a APOC-II. Os ácidos graxos livres resultantes são captados pelos tecidos muscular e adiposo, onde serão armazenados após reesterificação (ISBIR *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2004; SEPETIBA *et al.*, 2007), e o glicerol circula no plasma.

Após a remoção de TG, mediada pela lipase lipoproteica, os quilomícrons remanescentes, que ainda contêm todo o colesterol dietético, liberam-se da superfície capilar e dentro de poucos minutos são removidos da circulação pelo fígado em um processo de várias etapas mediado pela apolipoproteína E (APOE) (FOLEY, 2005). Primeiramente, as partículas remanescentes são seqüestradas pela interação da APOE com proteoglicanos de sulfato de heparan na superfície dos hepatócitos onde são processados pela lipase hepática (HL), promovendo a redução do conteúdo de TG restante. Em seguida, a APOE atua como mediador da captação dos remanescentes através da interação com o receptor LDL hepático (LDLR) ou com a proteína de ligação ao receptor LDL (LRP) (SOUFI *et al.*, 2002; HARDMAN & LIMBRID, 2003; ALVES *et al.*, 2004). No interior das células, os quilomícrons são fragmentados e parte do material lipídico é reutilizado, sendo o excedente, reorganizado em outro tipo de lipoproteína, juntamente com a parte sintetizada pelo fígado (MARTINEZ, 2003).

Os remanescentes de quilomícrons são considerados lipoproteínas aterogênicas e sua remoção mais lenta está diretamente relacionada com a DAC. A avaliação desta etapa metabólica é importante para o completo entendimento do metabolismo lipídico em indivíduos com hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (ALVES *et al.*, 2004).

Na via endógena, as VLDL são produzidas no fígado e são sintetizadas quando a produção de TG é estimulada por um fluxo aumentado de ácidos graxos livres ou por síntese *de novo* aumentada de ácidos graxos pelo fígado (CHOY *et al.*, 2004). A VLDL nascente incorpora pequenas quantidades de apoproteínas C e E dentro do fígado antes da secreção, mas a maioria dessas é adquirida a partir do HDL plasmático após as VLDL atingirem a circulação (HARDMAN & LIMBRID, 2003).

As VLDL plasmáticas são então catabolizadas nos leitos capilares em um processo semelhante ao processo lipolítico descrito para os quilomícrons (ISBIR *et al.*, 2003; SEPETIBA *et al.*, 2007). Quando a hidrólise de TG está quase completa, os remanescentes de VLDL, em geral chamados de IDL, são liberados do endotélio capilar e entram

novamente na circulação. As VLDL pequenas que contêm APOB-100 e IDL, cuja meia vida é de menos de 30 minutos, apresentam dois destinos potenciais. Cerca de 40 a 60% dessas partículas se ligam a receptores LDL ou pelo LRP, que reconhecem ligantes (APOB-100 e APOE) nos remanescentes sendo então depurada a partir do plasma, essencialmente pelo fígado. O restante da IDL é depois delipidado pela lipase lipoproteica (LPL) e pela lipase hepática que removem TG adicionais, apolipoproteínas C (APOC) e E (APOE) e são convertidos em LDL plasmáticas (HARDMAN & LIMBRID, 2003).

As partículas de LDL, que transportam o colesterol do fígado até os tecidos periféricos, são capazes de interagir através de ligações mediadas pela APOB100, com receptores de LDL de alta afinidade, localizados na superfície celular. Após a ligação com o receptor, a LDL sofre endocitose e a vesícula endocítica se funde a lisossomas, ocorrendo a degradação da lipoproteína, com liberação do colesterol livre, que pode tanto ser armazenado na forma de gotículas lipídicas citoplasmáticas quanto seguir na direção de outras vias metabólicas (CHOY *et al.*, 2004). O número e função dos receptores controlam os níveis de LDL na circulação, uma vez que a síntese intracelular de colesterol e dos receptores de LDL varia na razão inversa da captação do colesterol plasmático (SOUFI *et al.*, 2002).

A terceira parte do metabolismo das lipoproteínas envolve as partículas de HDL, sintetizadas no fígado e intestino que são responsáveis pelo transporte reverso do colesterol. Neste processo, o HDL interage com o ABCA-1, ocorrendo então a transferência do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado para ser removido, ou para órgãos esteroidogênicos, onde será utilizado na síntese de alguns hormônios (SOUFI *et al.*, 2002; CHOY *et al.*, 2004; MARTINEZ, 2004).

2.4 – MARCADORES GENÉTICOS NAS DISLIPIDEMIAS

Os grandes avanços no conhecimento do metabolismo lipídico e da biologia molecular têm permitido uma compreensão cada vez maior das influências genéticas nas interações entre lipoproteínas e receptores, na expressão de enzimas, de componentes estruturais dessas partículas, bem como das complexas interações genéticas e gene-ambiente. Além disso, a biologia molecular incorporou novos procedimentos, tornando-se mais acessível à prática clínica, não apenas no diagnóstico e prevenção de doenças, mas também, no futuro, como uma forma de terapia (SBC, 2001).

Sabe-se que o perfil lipídico sofre influência de fatores genéticos, mas também de fatores relativos à idade, sexo, hábitos de vida, uso de medicamentos e a presença de determinadas doenças. Dentre os fatores genéticos, destacam-se as mutações e os polimorfismos que envolvem alterações em um único ou múltiplos nucleotídeos, os quais podem levar a modificações na estrutura e função de proteínas envolvidas na síntese,

homeostase e no metabolismo dos lípidos, como apoproteínas, receptores e enzimas (FORTI *et al.*, 2003). Diversos polimorfismos de genes de apolipoproteínas têm sido estudados nos últimos anos, devido à influência que os mesmos exercem no perfil lipídico de humanos e camundongos. Alterações nos níveis e/ou estruturas de apolipoproteínas precedem níveis de lípidos anormais e susceptibilidade à aterosclerose (PENNACHIO *et al.*, 2001; VAN DER VLIET *et al.*, 2001; GREENOW *et al.*, 2005).

2.4.1 – Gene da apolipoproteína E e polimorfismo *APOE Hha I*

O gene da apolipoproteína E (*APOE*) localiza-se no cromossomo 19 e codifica uma proteína polimórfica de 34 k-Da com 299 aminoácidos (SOUFI *et al.*, 2002; FORTI *et al.*, 2003; GIASSAKIS *et al.*, 2007; SAIDI *et al.*, 2007). A *APOE* desempenha um importante papel no metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides (remanescentes de quilomícrons e de VLDL) apresentando várias funções importantes relacionadas à ligação e captação de lipoproteínas plasmáticas, à redistribuição dos lípidos de maneira localizada nas células. Além disso, a *APOE* parece atuar sobre a absorção e excreção biliar do colesterol (MEIR & LEITERSDORF, 2004), absorção entérica do colesterol e também influencia a atividade da lipase lipoprotéica (MENDES-LANA *et al.*, 2007). Cerca de metade da *APOE* no plasma de indivíduos em jejum está associado às lipoproteínas ricas em triglicérides e a outra metade é componente da HDL (MOOIJAART *et al.*, 2006; STENGARD *et al.*, 2006). A *APOE* controla o catabolismo das lipoproteínas mediando sua ligação aos proteoglicanos do sulfato de heparan na superfície da célula (especialmente no fígado) e ao receptor LDL hepático ou com a LRP (MOZAS *et al.*, 2003; MENDES-LANA *et al.*, 2007).

Cerca de 60 a 80% da *APOE* no plasma é sintetizada pelo fígado, sendo o cérebro o segundo local com maior abundância de síntese de mRNA de *APOE*, e que ocorre essencialmente nos astrócitos. A *APOE* também é sintetizada pelos macrófagos, onde parece desempenhar um papel na modulação do acúmulo de colesterol nas artérias (MINIHANE *et al.*, 2007; GRANÉR *et al.*, 2008). Em camundongos transgênicos, a superexpressão de *APOE* por macrófagos inibe a aterogênese induzida por hipercolesterolemia (MEIR & LEITERSDORF, 2004). O restante da síntese da *APOE* ocorre no baço, rim, pulmão (GREENOW *et al.*, 2005), pele, células do músculo liso (HOŘEJŠÍ & ČEŠKA, 2000), além dos órgãos esteroideogênicos, tais como as glândulas adrenais, testículos e ovários (FOLEY, 2005).

Existem três alelos do gene da *APOE* que ocorrem mais comumente, designados $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ que codificam as três principais isoformas de *APOE*: E2, E3 e E4, respectivamente (ANDRADE *et al.*, 2000; SOUFI *et al.*, 2002; FOLEY, 2005; SEPETIBA *et al.*, 2007). Conseqüentemente, há três fenótipos *APOE* homozigotos (E2/E2, E3/E3 e E4/E4) e três

fenótipos heterozigotos (E2/E3, E2/E4 e E3/E4) (MEDINA-URRUTIA *et al.*, 2004; GREENOW *et al.*, 2005; GRÖNROOS *et al.*, 2007; TOPIC *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstraram a heterogeneidade dos alelos *APOE* entre as populações. A frequência dos alelos na população de adolescentes da cidade do México foi de 89,5%, 7,5% e 3,0% para os alelos ϵ 3, ϵ 4 e ϵ 2, respectivamente (MEDINA-URRUTIA *et al.*, 2004). A alta frequência do alelo ϵ 3 (84,5%) e ausência do alelo ϵ 2 em indivíduos de várias cidades da Arábia Saudita foram similares às aquelas encontradas em americanos nativos, Maias da Península de Yucatan no México (Al-KHEDHAIRY, 2004; MEDINA-URRUTIA *et al.*, 2004). Estudo realizado em quatro cidades da Espanha demonstraram uma variação da frequência dos alelos ϵ 2 (5,5 – 7,3%), ϵ 3 (80,5 – 86,2%) e ϵ 4 (8,3 – 13,2%) (GARCÉS *et al.*, 2004). A frequência diferente dos alelos mostra que variações geográficas podem desempenhar um importante papel no entendimento da influência da *APOE* nos níveis lipídicos.

Devido à substituição de uma única base nitrogenada (timina por citosina) em duas posições relevantes da região que codifica a *APOE* (SOUZA *et al.*, 2005), ocorre as substituições únicas de aminoácidos resultando em polimorfismos genéticos no gene *APOE*. A *APOE*2, com uma cisteína no resíduo 158, difere da *APOE*3, que tem a arginina no local. A *APOE*3, com uma cisteína no resíduo 112, difere da *APOE*4, que tem arginina no local, ou seja, as três isoformas têm a seguinte composição: E2: Cys 112, Cys 158; E3: Cys 112, Arg 158 e E4: Arg 112, Arg 158 (FOLEY, 2005; GREENOW *et al.*, 2005; HEEREN *et al.*, 2006) (**Figura 1**). Essas únicas diferenças nos aminoácidos das três isoformas *APOE* conferem diferentes afinidades de ligação aos receptores específicos. Tanto a *APOE*3 quanto a *APOE*4 podem se ligar com alta afinidade ao receptor LDL, enquanto a *APOE*2 liga-se muito menos efetivamente (ZHANG *et al.*, 2007). A *APOE*2 tem menos de 99% de capacidade de ligação ao receptor quando comparada a isoforma comum *APOE*3 (MALVAZI *et al.*, 2004), em consequência, o genótipo ϵ 2 ϵ 2 está associado a hiperlipoproteinemia tipo III (GREENOW *et al.*, 2005; ARAI *et al.*, 2007) também denominada de disbetalipoproteinemia (WOUTERS *et al.*, 2005), a qual é caracterizada pelo acúmulo dos remanescentes das partículas de quilomícrons e de VLDL (MURDOCH *et al.*, 2007). O perfil lipídico característico é uma elevação de TG e do colesterol total (SOUFI *et al.*, 2002; VRABLÍK *et al.*, 2003; GREENOW *et al.*, 2005). HOPKINS *et al.* (2005) demonstraram um risco prematuro aumentado de DAC familiar em pacientes com hiperlipidemia tipo III, com níveis plasmáticos elevados de TG.

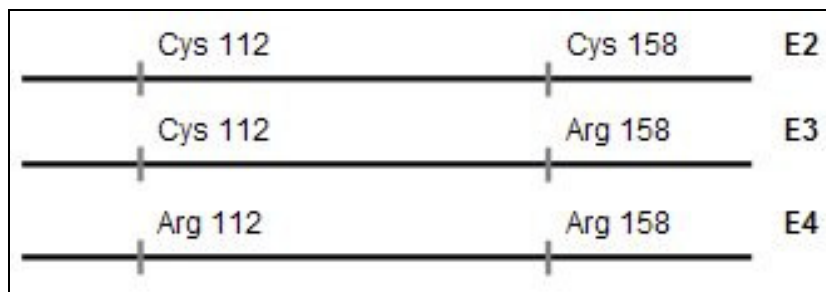


Figura 1 – Esquema das isoformas da APOE

O acúmulo dos remanescentes ricos em colesterol acaba levando à sua fagocitose pelos macrófagos com a formação de células espumosas que se depositam na pele, tendões e parede íntima das artérias, levando a aterosclerose e conseqüente manifestações clínicas da doença (SOUFI *et al.*, 2002; MARTINEZ, 2004). As isoformas APOE2 e a APOE3 ligam-se preferencialmente aos fosfolípidos da HDL, enquanto a APOE4 liga-se preferencialmente a TG do VLDL (GREENOW *et al.*, 2005).

A substituição de uma cisteína pela arginina no resíduo 112 da isoforma APOE4, induz uma mudança conformacional na sua estrutura, conferindo a isoforma uma alta afinidade de ligação aos receptores de LDL, maior até que aquela observada com a isoforma E3 (SOUZA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Como as partículas de VLDL, IDL e quilomícrons são removidos muito rapidamente do plasma, há um mecanismo de *feedback* que ativa uma resposta hepática de diminuição de expressão de receptores de LDL-colesterol, o que resulta no aumento dos níveis plasmáticos de LDLc (GREENOW *et al.*, 2005; TOPIC *et al.*, 2008) e configura um quadro de hiperlipoproteinemia do tipo II. Assim, os indivíduos com genótipos $\epsilon 4\epsilon 4$ e $\epsilon 3\epsilon 4$ apresentam níveis mais altos de LDLc, colesterol total, triglicérides e baixos níveis de HDLc em relação a indivíduos homocigotos $\epsilon 3\epsilon 3$, sendo particularmente susceptíveis ao desenvolvimento precoce de DAC (MARTINEZ, 2003; HEEREN *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007).

Além das doenças cardiovasculares, o polimorfismo da APOE tem sido investigado como fator de risco em outras condições patológicas, incluindo doença de Alzheimer, (AZAD *et al.*, 2007; ALTAMURA *et al.*, 2007), doença de Parkinson, diabetes mellitus, nefropatia diabética, doença renal, esquizofrenia e câncer (GREENOW *et al.*, 2005; KWON *et al.*, 2007; LEIVA *et al.*, 2007). Pacientes com doença de Alzheimer apresentam acentuada concentração de APOE e o alelo $\epsilon 4$ tem sido particularmente associado à doença, uma vez que estes pacientes apresentam freqüências duas a quatro vezes maiores de $\epsilon 4$ quando comparadas à população geral (Al-KHEDHAIRY, 2004; CAÇÃO *et al.*, 2007).

Várias linhas de evidências têm relacionado a APOE com um potente papel antiaterogênico. Assim, o bloqueio da expressão de APOE em camundongos foi associado com um perfil de lipoproteína pro aterogênico e doença aterosclerótica difusa (DAVIGNON, 2005). O papel central da APOE na regulação de todo o metabolismo de lipídico é claramente a maior contribuição para a função antiaterogênica (MOZAS *et al.*, 2003). Primeiramente, a captação e degradação de lipoproteínas são mediadas pela APOE através de sua capacidade de se ligar, com alta afinidade, ao receptor de LDL nas células do parênquima do fígado. Em segundo lugar, a APOE também se liga a outro receptor hepático, LRP, que tem sido relacionado à depuração de quilomícrons remanescentes. Além disso, a APOE estimula o transporte reverso do colesterol, em que o excesso de colesterol nos tecidos periféricos é transportado para o fígado, via um processo envolvendo o HDL, para a excreção pela bile. Finalmente, a APOE ativa enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas como a lipase hepática e outras (GREENOW *et al.*, 2005).

2.4.2 – Gene da apolipoproteína A5 e polimorfismo *APOA5 -1131T>C*

No ano de 2001, dois grupos independentes, PENNACHIO *et al.* e VAN DER VLIET *et al.* identificaram um novo membro da família das apolipoproteínas, o gene da apolipoproteína A5 (*APOA5*) identificado como o quarto membro do conjunto gênico das apolipoproteínas *APOA1/APOC3/APOA4*. O gene *APOA5* está localizado a 27 pbs abaixo do conjunto gênico, no braço longo do cromossomo 11q23 que codifica uma proteína polimórfica de 366 aminoácidos (PENACCHIO *et al.*, 2002; YAMADA *et al.*, 2007a). Como este conjunto gênico é uma região bem conhecida por sua influência sobre os níveis plasmáticos de lípidos, lipoproteínas e susceptibilidade a DCV, desde então, vários estudos têm sido desenvolvidos para verificar a associação entre perfil lipídico e polimorfismo nesta região do gene *APOA5* (PENACCHIO *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2008b).

Uma alteração significativa nos níveis de TG em camundongos transgênicos com superexpressão e nocaute (*knock-out*) de *APOA5* estimulou o desenvolvimento de estudos para avaliar a associação entre polimorfismo no gene *APOA5* e os níveis plasmáticos de lípidos em humanos. Vários polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) através e ao redor do *locus APOA5* humano foram identificados como marcadores genéticos para estudos de associações gênicas. Quatro marcadores com, relativamente, alta frequência do alelo menor (>8%) foram encontrados. Três dos SNPs estão separados por três pares de bases (pbs) no gene *APOA5* (SNP1, SNP2 e SNP3), sendo o quarto SNP (SNP4) localizado aproximadamente a 11 pbs abaixo do gene. Além disso, foram observadas associações significativas entre os níveis plasmáticos de TG, massa de VLDL e os três polimorfismos vizinhos no gene *APOA5* (SNPs 1, 2 e 3), mas não com o SNP4 localizado distante do gene. Especificamente, indivíduos portadores do alelo menor de cada um desses SNPs (SNPs 1,

2 e 3) apresentaram níveis de triglicérides plasmáticos de 20 a 30% mais elevados comparados com indivíduos homocigotos para o alelo maior. Análises das frequências alélicas dos quatro SNPs revelaram que os três SNPs no gene *APOA5* estão em desequilíbrio de ligação, pressupondo-se assim, a existência de um haplótipo comum na região do gene *APOA5* que influenciaria os níveis plasmáticos de TG (PENNACHIO *et al.*, 2001).

Em 2002, PENNACHIO *et al.* identificaram, em 419 indivíduos caucasianos, cinco polimorfismos para definir três haplótipos denominados *APOA5*1*, *APOA5*2* e *APOA5*3*, representando 82%, 8% e 8%, respectivamente, do cromossomo do gene *APOA5* examinado (**Quadro 1**). Esses haplótipos compreendem aproximadamente 98% dos haplótipos *APOA5* na população. O haplótipo selvagem é *APOA5*1*, definido pela presença de alelos comuns nos cinco sítios polimórficos; *APOA5*2* é diferenciado do haplótipo comum (*APOA5*1*) por quatro substituições de nucleotídeo (-1131T>C, c.-3A>G, IVS3 + 476G>A e c.1259T>C), sendo associado com níveis elevados de TG. *APOA5*3* é diferenciado do haplótipo comum pela substituição de C por G no nucleotídeo c.56 (codon 19 na seqüência de aminoácidos). Atualmente, o haplótipo menor da *APOA5* (*APOA5*2*) é definido por três polimorfismos c. 1259T>C, IVS3 + 476G>A e -1131T>C, anteriormente designados SNP1, SNP2 e SNP3, respectivamente (**Quadro 1**). O haplótipo *APOA5*3* é definido pelo polimorfismo SW19 que apresenta um alelo raro (56C>G) que resulta na substituição de serina por triptofano no resíduo 19 (**Quadro 1**) (PENACCHIO *et al.*, 2002; PENNACCHIO & RUBIN, 2003).

Quadro 1 – Haplótipos comuns do gene *APOA5* e suas frequências relativas em 419 indivíduos caucasianos

Haplótipo	Frequência	-1131T>C (SNP3)	c.-3A>G	c.56C>G (S19W)	IVS3+476G>A (SNP2)	c.1259T>C (SNP1)
<i>APOA5*1</i>	81,6%	T	A	C	G	T
<i>APOA5*2</i>	8,0%	C	G	C	A	C
<i>APOA5*3</i>	8,0%	T	A	G	G	T

O alelo menor que define o haplótipo está em negrito. Adaptado de PENNACHIO *et al.*, 2002.

A *APOA5* é encontrada nas partículas de VLDL, HDL e quilomícrons, mas não nas lipoproteínas LDL (RIBALTA *et al.*, 2002; VAN DER VLIET *et al.*, 2002). Seu gene é preferencialmente expresso no fígado, mas a função biológica da *APOA5* ainda não está totalmente definida (HOŘÍNEK *et al.*, 2003). Entretanto, alguns estudos demonstraram a

superregulação do gene *APOA5* durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial de ratos, sugerindo uma participação da *APOA5* no controle da secreção de TG (VAN DER VLIET *et al.*, 2001). Outros estudos sugeriram que o gene *APOA5* poderia modular a síntese hepática intracelular e/ou a secreção de VLDL (LI *et al.*, 2004; TALMUD *et al.*, 2004) e que os níveis de *APOA5* se relacionam inversamente com os níveis de TG em humanos (JANG *et al.*, 2009). Foi descrito que camundongos transgênicos com superexpressão de *APOA5* apresentavam níveis de TG abaixo de 1/3 do grupo controle e não apresentavam alterações nos níveis de CT, enquanto camundongos nocaute (*knock-out*) para o mesmo gene apresentavam, aproximadamente, quatro vezes os níveis de TG em relação aos controles (PENACCHIO *et al.*, 2001). Em 2002, VAN DER VLIET *et al.* utilizando um modelo de camundongos com superexpressão de *APOA5* observaram uma pronunciada redução de VLDL, TG e níveis mais baixos de CT em todas as frações de lipoproteínas, resultando em 40% de redução dos níveis de CT plasmático. Assim, os autores sugeriram que a *APOA5* esteja envolvida nos processos de regulação dos níveis plasmáticos de TG e CT. A partir desses resultados, estudos envolvendo o haplótipo *APOA5**2 (*APOA5* -1131T>C, SNP3) se tornaram de particular interesse. A associação entre o polimorfismo -1131T>C (rs662799) e níveis elevados de TG foi descrita em diferentes populações, como em caucasianos saudáveis (PENACCHIO *et al.*, 2001; PENACCHIO *et al.*, 2002; TALMUD *et al.*, 2002; PENACCHIO & RUBIN, 2003), em afro-americanos e hispânicos (PENACCHIO *et al.*, 2002) e em indivíduos portadores de dislipidemias (RIBALTA *et al.*, 2002; HOŘÍNEK *et al.*, 2003). Em relação ao efeito deste polimorfismo sobre a fração HDLc, os resultados são controversos, sendo que, alguns autores descreveram níveis diminuídos de HDLc em portadores do alelo raro do gene *APOA5* (ENDO *et al.*, 2002; BAUM *et al.*, 2003), enquanto outros, não observaram diferenças significativas (TALMUD *et al.*, 2002).

Além disso, vários estudos foram realizados com o objetivo de se determinar as freqüências genótípicas e alélicas do polimorfismo *APOA5* -1131T>C em diferentes populações (BAUM *et al.*, 2003). Em 2002, PENACCHIO *et al.* determinaram a freqüência genotípica do polimorfismo -1131T>C em caucasianos, encontrando 86,6% e 13,4% para os genótipos TT e TC, respectivamente. Para o mesmo polimorfismo, BAUM *et al.* (2003) avaliando uma população de 82 chineses do sexo masculino com altos níveis de TG descreveram as freqüências dos genótipos TT (33%), TC (54%) e CC (13%), enquanto que, em 85 homens chineses com baixos níveis de TG as freqüências genótípicas encontradas foram de 52%, 44% e 4%, respectivamente. O estudo prospectivo *Northwick Park Heart Study* encontrou uma freqüência genotípica de 88,3%, 11,1% e 0,6% para TT, TC e CC, respectivamente, em 2556 homens saudáveis do Reino Unido (TALMUD *et al.*, 2002). As freqüências alélicas e genótípicas observadas, do polimorfismo -1131T>C do gene *APOA5*, são variadas entre as diversas populações e entre portadores de patologias distintas.

O polimorfismo *-1131T>C* presente na região promotora do gene *APOA5*, tem um forte desequilíbrio de ligação e, conseqüentemente, exerce uma influência direta na sua expressão, desempenhando um importante papel na variação dos níveis plasmáticos de TG (EICHENBAUM-VOLINE *et al.*, 2004). Dessa forma, o polimorfismo *APOA5 -1131T>C* tem sido alvo de grandes estudos correlacionando o perfil lipídico e eventos cardiovasculares (ENDO *et al.*, 2002). TALMUD *et al.*, 2002 avaliaram homens saudáveis de meia-idade (faixa de 50 a 61 anos de idade) no Reino Unido e observaram que os indivíduos homocigotos para o alelo raro (C) apresentavam níveis de TG 40% mais elevados do que os indivíduos homocigotos para o alelo comum (T). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com crianças japonesas (ENDO *et al.*, 2002), em homens chineses (BAUM *et al.*, 2003) e em indivíduos dislipidêmicos alemães (EVANS *et al.*, 2003). As variantes alélicas do gene *APOA5* também vêm sendo associadas ao desenvolvimento de doenças coronarianas (LI *et al.*, 2004; JANG *et al.*, 2009). O estudo realizado por JANG *et al.*, (2009) demonstrou que o polimorfismo *-1131T>C* foi associado ao aumento de risco de DAC tanto para homens quanto para mulheres coreanas, independentemente dos níveis plasmáticos de *APOA5*. Da mesma forma, este polimorfismo foi associado ao aumento de susceptibilidade de desenvolvimento de DAC na população chinesa (LI *et al.*, 2004).

Finalmente, estudos de análises combinadas entre os polimorfismos *APOA5 -1131T>C* e *APOE* (alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$) demonstraram que suas associações induzem ao aumento da susceptibilidade à hipertrigliceridemia grave em pacientes espanhóis (SOUSA *et al.*, 2008b) e alemães (EVANS *et al.*, 2003).

2.5 – HEMOSTASIA E DISLIPIDEMIA

2.5.1 – Hemostasia

Em condições normais, a fluidez sangüínea é mantida pelo equilíbrio entre os constituintes procoagulantes e anticoagulantes (TRIPODI & MANNUCCI, 1996). A partir de um desequilíbrio entre os mecanismos procoagulante e anticoagulante, há um desencadeamento de reações culminando com a formação do trombo e o estancamento da hemorragia (LOURENÇO, 1997). Neste processo há formação inicial de um tampão plaquetário e, em seguida, é formado um coágulo estável de fibrina. A formação deste coágulo envolve a interação seqüencial de uma série de proteínas plasmáticas (fatores da coagulação) de uma maneira altamente ordenada e complexa, bem como a interação destes fatores com as plaquetas sangüíneas e com substâncias liberadas dos tecidos.

A clássica cascata da coagulação, proposta em 1964, por MACFARLANE, DAVIE & RATNOFF está documentada em numerosos artigos e compêndios. Apesar deste modelo possuir limitações e não conseguir explicar satisfatoriamente todos os fenômenos ligados à hemostasia *in vivo*, foi aceito por quase 50 anos. Este modelo convencional referido como

“cascata” foi proposto para explicar a fisiologia da coagulação do sangue, segundo o qual a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica seqüencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, quebra a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina. Tal proposta divide a coagulação em uma via extrínseca (envolvendo elementos do sangue, e também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) e uma via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular), que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X (FX). Na via extrínseca, o fator VII (FVII) plasmático é ativado na presença de seu cofator, o fator tecidual (FT), formando o complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT) responsável pela ativação do fator X. Na via intrínseca, a ativação do fator XII (FXII) ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado “ativação por contato” e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII ativado (FXIIa) ativa o fator XI (FXI) que, por sua vez, ativa o fator IX (FIX). O fator IX ativado (FIXa), na presença de fator VIII ativado (FVIIIa) por traços de trombina e, em presença de íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e, subseqüentemente, formação de fibrina (LOTSPEICH-STEININGER, 1992; HANDIN *et al.*, 2003; ZAGO *et al.*, 2004).

Embora o conceito da “cascata” da coagulação tenha representado um modelo bem sucedido e um avanço significativo no entendimento da coagulação, observações experimentais e clínicas mais recentes demonstram que a hipótese da cascata não reflete completamente os eventos da hemostasia *in vivo* (HOFFMAN, 2003a). Nos últimos anos, deficiências neste esquema clássico têm se tornado evidentes, surgindo a necessidade de uma revisão do modelo clássico da coagulação, já que o mesmo não conseguia responder várias importantes indagações relacionadas à clínica de pacientes portadores de certos distúrbios hemostáticos. Por exemplo, o modelo da “cascata” não explica porque a ativação do fator X pela via extrínseca não é capaz de compensar o comprometimento da via intrínseca pela falta de fator VIII (FVIII) (hemofilia A) ou fator IX (hemofilia B) (HOFFMAN, 2003a). Dessa forma, foi desenvolvido um modelo para a hemostasia baseado em superfícies celulares que substitui o modelo clássico da cascata da coagulação. Esse modelo enfatiza a interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas e parece ser capaz de explicar muitas questões até então não entendidas valendo-se apenas da tradicional cascata da coagulação.

Modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares

Recentemente, foi proposto o modelo baseado em superfícies celulares, no qual a hemostasia requer substâncias procoagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina neste local. Neste novo modelo, o processo de coagulação sangüínea é iniciado pela exposição de FT na corrente sangüínea. O FT não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, mas está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular, como células do músculo liso e fibroblastos. Dessa forma, o FT é exposto na circulação sangüínea pela lesão endotelial e de células vizinhas ou pela ativação de células endoteliais ou monócitos (NEMERSON, 1988). Muitas evidências sugerem que o FT está também presente no sangue em micropartículas celulares provenientes de membranas fragmentadas de vários tipos de células, como leucócitos e células endoteliais, bem como de plaquetas. Estas micropartículas podem desempenhar importante papel nos processos trombóticos. Sabe-se que o complexo FVIIa / FT ativa não somente o fator X, mas também o fator IX. Além disso, estudos mostram que esse complexo é fundamental para iniciar a coagulação *in vivo* (RIDDEL *et al.*, 2007).

O entendimento atual do processo hemostático considera a interrelação dos processos físicos, celulares e bioquímicos que atuam em uma série de estágios ou fases, e não em duas vias (intrínseca e extrínseca) como antes. As fases de iniciação, amplificação, propagação e finalização ilustram o intrigante processo que garante a circulação do sangue na forma líquida, restrita ao leito vascular. Estas quatro fases, resumidas no **Quadro 2**, compreendem a atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares.

Quadro 2 – Resumo da atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares

Fases da Coagulação			
Iniciação	Amplificação	Propagação	Finalização
Endotélio vascular e células sangüíneas circulantes são perturbados; Interação do FVIIa derivado do plasma com o FT	Trombina ativa plaquetas, cofatores V e VIII, e fator XI na superfície das plaquetas	Produção de grande quantidade de trombina, formação de um tampão estável no sítio da lesão e interrupção da perda sangüínea	Processo da coagulação é limitado para evitar oclusão trombótica ao redor das áreas íntegras dos vasos

Fase de iniciação

A fase de iniciação do processo da coagulação ocorre quando células que expressam o FT em sua superfície são expostas aos componentes do sangue no sítio da lesão (HANDIN *et al.*, 2003; VINE, 2009). O FT, uma vez ligado ao FVII presente no sangue, rapidamente o ativa em FVIIa formando o complexo FVIIa/FT, responsável pela ativação de pequenas quantidades de FIX e FX (PÉREZ-GÓMEZ & BOVER, 2007; MONROE & HOFFMAN, 2009). O FXa associado com o seu cofator, fator V ativado (FVa), forma um complexo denominado protrombinase na superfície da célula que expressa o FT. O fator V (FV) pode ser ativado pelo FXa ou por proteases não coagulantes, resultando em FVa necessário para o complexo protrombinase. Esse complexo transforma pequenas quantidades de protrombina (fator II) em trombina, que são insuficientes para completar o processo de formação do coágulo de fibrina, mas são de fundamental importância para a fase de amplificação da coagulação (**Figura 2**) (HOFFMAN, 2003a; PÉREZ-GÓMEZ & BOVER, 2007; VINE, 2009).

Acredita-se que as reações responsáveis pela iniciação da coagulação ocorram constantemente fora do espaço vascular em indivíduos saudáveis. Atualmente, está comprovado que fatores da coagulação, incluindo FVII, FX e protrombina são capazes de percorrer espaços entre os tecidos, ou seja, podem deixar o espaço vascular. Estes fatores foram detectados na linfa e a quantidade desses fora dos vasos depende especialmente do tamanho da molécula (HOFFMAN, 2003a). Com base nestas observações foi proposto que a via de iniciação permanece continuamente ativa, gerando pequenas quantidades de fatores ativados no estado basal. Assim, pequenas quantidades de trombina são produzidas continuamente fora do espaço vascular, independente de lesão vascular (MONROE & HOFFMAN, 2009). Portanto, admite-se que pequena atividade da via do FT ocorre todo o tempo no espaço extravascular. O processo da coagulação segue para a fase de amplificação somente quando há dano vascular, permitindo que plaquetas e FVIII (ligado ao fator de von Willebrand) entrem em contato com o tecido extravascular onde se aderem às células que expressam FT (HOFFMAN, 2003b; RIDDEL *et al.*, 2007). O atual modelo da coagulação do sangue baseado em superfícies celulares pode ser visto na **Figura 2**.

Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares

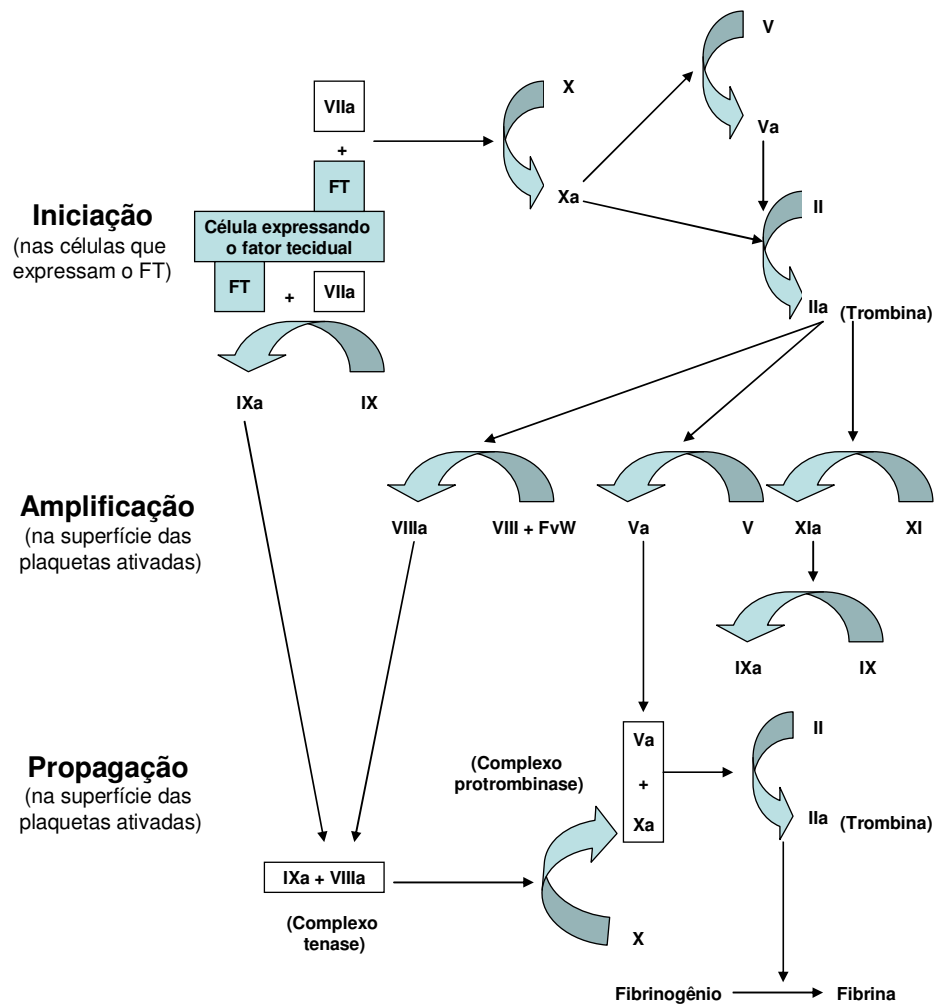


Figura 2: Representação do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação. Fator tecidual (FT), ativado (a). Adaptado de VINE, 2009.

Fase de amplificação

Devido ao grande tamanho das plaquetas e do FVIII ligado ao fator de von Willebrand (FvW), esses somente passam para o compartimento extravascular quando há lesão vascular. Quando um vaso é lesado, plaquetas escapam de dentro dos vasos, se ligam ao colágeno e a outros componentes da matrix extracelular no sítio da lesão, onde são parcialmente ativadas, resultando em um tampão plaquetário responsável pela hemostasia primária (ZAGO *et al.*, 2004; BOUCHER & TRAUB, 2009). Neste ponto, pequenas quantidades de trombina produzidas pelas células que expressam o FT podem interagir com as plaquetas e o complexo FVIII/FvW. Dessa forma, inicia-se o processo hemostático culminando na formação de fibrina estável que consolida o tampão plaquetário inicial. Este processo resulta na hemostasia secundária (HANDIN *et al.*, 2003; BOUCHER & TRAUB, 2009; MONROE & HOFFMAN, 2009).

Esta pequena quantidade de trombina gerada pelas células que expressam o FT possui várias funções importantes, sendo a principal a ativação máxima de plaquetas, que expõem receptores e sítios de ligação para os fatores da coagulação ativados. Como resultado dessa ativação, as plaquetas alteram a permeabilidade de suas membranas, permitindo a entrada de íons cálcio e saída de substâncias quimiotáticas que atraem os fatores da coagulação para sua superfície, além de liberarem FV parcialmente ativados (HANDIN *et al.*, 2003; PÉREZ-GÓMEZ & BOVER, 2007). Outra função da trombina formada durante a fase de iniciação é a ativação de cofatores FV e FVIII na superfície das plaquetas ativadas. O complexo FVIII/FvW é dissociado, permitindo o FvW mediar a adesão e agregação plaquetárias no sítio da lesão. Além disso, pequenas quantidades de trombina ativam o FXI a fator XI ativado (FXIa) na superfície da plaqueta durante essa fase. Simultaneamente, por mecanismos quimiotáticos, os fatores mencionados são atraídos à superfície das plaquetas onde se inicia rapidamente a fase de propagação (**Figura 2**) (HOFFMAN, 2003b; PÉREZ-GÓMEZ & BOVER, 2007; MONROE & HOFFMAN, 2009; VINE, 2009).

Fase de propagação

A fase de propagação é caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas (VINE, 2009). Primeiramente, o FIXa ativado durante a fase de iniciação, pode agora se ligar ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Uma quantidade adicional de FIXa pode também ser produzida pelo FXIa ligado às plaquetas. Como o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para a plaqueta ativada, maior quantidade de FXa deve ser produzida diretamente na superfície da plaqueta pelo complexo FIXa/FVIIIa (HOFFMAN, 2003b).

Finalmente, o FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em trombina. Esta é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário inicial (**Figura 2**) (RIDDEL *et al.*, 2007). A trombina produzida na fase de iniciação, também, ativa o fator XIII (FXIII), responsável pela estabilização do coágulo de fibrina, e o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), que modula a fibrinólise (GREEN, 2006).

Durante o processo de formação de fibrina são gerados peptídeos no plasma, os quais constituem marcadores de hipercoagulabilidade. Estes são constituídos por: fragmento 1+2 da protrombina (F1+2), resultante da ação do complexo protrombinase sobre a protrombina; complexo trombina-antitrombina (TAT), resultante da ação neutralizadora da antitrombina sobre a trombina e o fibrinopeptídeo A (FPA) resultante da ação da trombina sobre o fibrinogênio (CARR, 2001). Esses marcadores são estáveis no plasma e podem ser quantificados imunologicamente. O F1+2 é um importante marcador de geração de trombina e o FPA é um importante indicador de atividade da trombina. São usados como marcadores moleculares da ativação *in vivo*, especialmente na caracterização de estados pré-trombóticos (TRIPODI & MANNUCCI, 1996).

Fase de finalização

Uma vez formado o coágulo de fibrina sobre a área lesada, o processo de coagulação deve se limitar ao sítio da lesão para se evitar a oclusão trombótica do vaso (HOFFMAN, 2003b). Para controlar a disseminação da ativação da coagulação, intervêm quatro anticoagulantes naturais, o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS), e a antitrombina (AT).

O TFPI é uma proteína secretada pelo endotélio, que forma um complexo quaternário FT/FVIIa/FXa/TFPI inativando os fatores ativados e, portanto, limitando a coagulação (MALÝ *et al.*, 2007). As proteínas C e S são dois outros anticoagulantes naturais, vitamina K dependentes, com capacidade de inativar os cofatores procoagulantes FVa e FVIIIa (SHEARER, 1995; VALEN *et al.*, 1996). A PC quando ligada ao receptor endotelial de proteína C (EPCR) é ativada pela trombina ligada à proteína transmembrânica trombomodulina (TM) na superfície das células endoteliais intactas (ÖHLIN *et al.*, 1996). A PC ativada (PCa) se dissocia do EPCR tendo sua atividade aumentada pela interação com outro cofator inibidor, a PS (NESHEIM, 2003). No plasma humano, aproximadamente 30% da PS circula como proteína livre, consistindo na fração que funciona como cofator da PC ativada (DAHLBÄCK, 1991; GEMMATI *et al.*, 1997). Um outro anticoagulante natural é a AT a qual inibe a atividade da trombina e outras serino proteases, tais como FIXa, FXa, FXIa e FXIIa (ELIAS *et al.*, 1993) As células endoteliais produzem uma variedade de

glicosaminoglicanos, que funcionam como sítios de ligação, de alta afinidade, para a AT, que são cruciais para uma rápida inativação da trombina (FRANCO, 2001a; VINE, 2009).

Ativação do sistema fibrinolítico

Com a formação do coágulo de fibrina, este deve ser removido para que o fluxo sanguíneo seja restabelecido, o que depende da dissolução do coágulo pelo sistema fibrinolítico do qual faz parte o plasminogênio.

Para ocorrer a ativação do sistema fibrinolítico, as células endoteliais dos vasos sanguíneos, liberam dois ativadores específicos: o ativador de plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) que convertem rapidamente o plasminogênio em plasmina (FRANCO, 2001a). Esta cliva seqüencialmente uma série de ligações das moléculas de fibrina, liberando produtos de degradação da fibrina (PDF) e peptídeos que promovem a lise do coágulo (SCAZZIOTA & ALTMAN, 1995). O principal PDF é o dímero-D (D-Di), considerado um marcador de hipercoagulabilidade, cujos níveis geralmente aumentam junto com o aparecimento dos complexos TAT e do F1+2, embora em pacientes distintos as elevações dos níveis desses marcadores possam variar consideravelmente (SPRONK *et al.*, 2004).

A inibição do sistema fibrinolítico pode ocorrer em dois níveis: da ativação do plasminogênio, principalmente pelo inibidor do ativador tecidual do plasminogênio (PAI-1), que pode ligar-se a qualquer ativador de plasminogênio livre e pelo inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI); ao nível da plasmina, a alfa-2-antiplasmina (α 2PI) se liga a qualquer plasmina livre neutralizando rapidamente sua atividade proteolítica (RIJKEN & LIJNEN *et al.*, 2009). Na hemostasia normal, a fibrinólise é ativada logo após a formação do trombo e auxilia na desobstrução do vaso e na restauração do fluxo sanguíneo normal (HANDIN & LOSCALZO, 1996).

2.5.2 – Dislipidemia e alterações hemostáticas

O papel da hiperlipidemia é bem conhecido na gênese da doença aterosclerótica, assim como a participação dos mecanismos da hemostasia na formação da placa de ateroma (EITZMAN *et al.*, 2000). A hiperlipidemia aumenta a formação da placa aterosclerótica e induz a formação de trombos que vão ocluir as artérias. Uma vez estabelecida a lesão aterosclerótica, plaquetas e fatores da coagulação atuam para produzir o trombo, que obstrui a artéria e interrompe o fluxo sanguíneo, causando morte tecidual (MARTINEZ, 2003).

Vários estudos epidemiológicos permitiram correlacionar o efeito da hiperlipidemia na hemostasia implicado no processo de formação da placa de ateroma. Estes incluem

geração de atividade procoagulante na célula endotelial, hipercoagulabilidade e inibição da fibrinólise.

Normalmente o endotélio constitui uma superfície não trombogênica, mas sob estímulo adequado este pode exibir propriedades procoagulantes. Estudos em cultura de células sugerem que a hiperlipidemia pode alterar as funções da célula endotelial, ativando-a e fazendo-a recrutar monócitos e produzir trombina. Os monócitos recrutados secretam interleucina 1, que promove a expressão do fator tecidual, levando a ativação da via extrínseca da coagulação e produção de trombina (LOWE *et al.*, 2004; MARTINEZ 2003).

A fase inicial da aterogênese está também relacionada à ativação das plaquetas. A descontinuidade do endotélio e/ou a modificação das características normais das células endoteliais provoca adesão das plaquetas às estruturas sub-endoteliais e uma hiperagregabilidade causada pela hiperlipidemia (GEORGIEVA *et al.*, 2004), além de um aumento na exposição de receptores para o fibrinogênio (MARTINEZ, 2003).

A presença de fibrina no ateroma decorre dos efeitos graduais da ativação da coagulação, das plaquetas e da redução da fibrinólise durante a formação da placa aterosclerótica nas hiperlipidemias.

A atividade fibrinolítica prejudicada tem sido associada com tromboembolismo venoso e complicações trombóticas agudas da aterosclerose (SANTAMARÍA *et al.*, 2003). Distúrbios metabólicos como diabetes mellitus e dislipidemias são fatores de risco muito importantes nas doenças tromboembólicas arteriais e estão relacionados aos distúrbios fibrinolíticos. A disfunção endotelial é considerada o principal mecanismo envolvido na redução da atividade fibrinolítica devido ao aumento do PAI-1. Entre as dislipidemias, a hipertrigliceridemia tem sido associada ao aumento dos níveis de PAI-1 e comprometimento da fibrinólise, entretanto, uma correlação direta entre hipercolesterolemia e redução da fibrinólise ainda não é clara. A ativação da cascata da coagulação e o aumento da geração de trombina dependentes de plaquetas são dados comuns neste grupo de pacientes (PUCETTI *et al.*, 2002).

2.5.3 – Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina – TAFI

Recentemente, um novo componente do sistema fibrinolítico foi identificado e designado TAFI (*thrombin – activable fibrinolysis inhibitor*), inibidor da fibrinólise ativado pela trombina, também denominado carboxipeptidase B plasmática, pró-carboxipeptidase U ou pró-carboxipeptidase R (BAJZAR, 2000; WILLEMSE & HENDRIKS., 2006). O TAFI é uma proenzima plasmática que ocupa papel importante na hemostasia funcionando como um potente inibidor da fibrinólise (FRANCO *et al.*, 2001b; NESHEIM, 2003; SANTAMARÍA *et al.*, 2004; DUSSE *et al.*, 2007). O TAFI é ativado pela trombina e na sua forma ativada é capaz de inibir a fibrinólise por remover resíduos de lisina da molécula de fibrina durante o

processo de lise do coágulo, suprimindo assim as propriedades de cofator da fibrina parcialmente degradada na ativação do plasminogênio (FRANCO *et al.*, 2001b; NESHEIM, 2003; DO *et al.*, 2005). Os resíduos C-terminal de lisina na fibrina constituem a chave para a fibrinólise mediada pelo ativador tecidual do plasminogênio, pois aumentam a sua afinidade pela fibrina. A clivagem proteolítica dos resíduos C-terminal da lisina pelo TAFI resultam em fibrinólise atenuada (DO *et al.*, 2005). Curiosamente, a principal via de ativação do TAFI é dependente da ligação da trombina à trombosmodulina (WALKER & BAJZAR, 2004; BOFFA & KOSCHINSKY, 2007). Desta forma, a molécula de TAFI representa um ponto de conexão entre o sistema da coagulação e o fibrinolítico (NESHEIM, 2003; EICHINGER *et al.*, 2004; ZAGO *et al.*, 2004; DO *et al.*, 2005; NESHEIM & BAJZAR, 2005).

Níveis aumentados de TAFI foram encontrados em mulheres com hipercolesterolemia (SANTAMARÍA *et al.*, 2004), indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (ALACACIOGLU *et al.*, 2004), e em pacientes com infarto agudo do miocárdio (FRERE *et al.*, 2005). Esses níveis elevados de TAFI conferem ao indivíduo um risco quatro vezes maior de doenças arteriais coronarianas agudas, portanto, tem sido proposto como fator de risco para trombose por inibir a fibrinólise (NESHEIM, 2003; ALACACIOGLU *et al.*, 2004; COLUCCI *et al.*, 2004; SEGEV *et al.*, 2004; DO *et al.*, 2005). Pesquisas recentes correlacionaram níveis elevados de TAFI com a idade, principalmente em mulheres, além de correlacionar com o uso de contraceptivo oral (MARTINI *et al.*, 2006).

Sugere-se que a maior incidência de trombose em indivíduos com fator XI elevado ou com resistência à proteína C ativada deve-se, ao menos em parte, a um aumento da ativação de TAFI causado pelo aumento da geração de trombina (COLUCCI *et al.*, 2004). EICHINGER *et al.*, (2004) relataram que para a ativação de TAFI uma grande quantidade de trombina é necessária e o fator XI tem papel importante. Assim a ativação de TAFI pode ser considerada como consequência do fator XI ativado, reforçando o conceito da conexão entre coagulação e fibrinólise. Pacientes com altos níveis de TAFI e de fator XI tem um risco três vezes maior de recorrência de tromboembolismo venoso profundo.

Vários estudos têm proposto que TAFI ativado pode desempenhar um papel na regulação da inflamação e sua função pode não ser restrita à inibição da fibrinólise (MYLES *et al.*, 2003). TAFI ativado pode promover a inativação de cininas e anafilatoxinas através da atividade carboxipeptidase específica, clivando os resíduos C-terminal da arginina ou lisina de numerosos peptídeos biologicamente ativos em processos inflamatórios (MYLES *et al.*, 2003; REINER *et al.*, 2005). Além disso, o TAFI foi correlacionado como um inibidor efetivo de C3a e C5a, promovendo proteção contra lesão microvascular em doenças infecciosas (ESMON, 2003; BAJZAR *et al.*, 2004).

2.5.4 – Homocisteína

A homocisteína (HCY) é um aminoácido sulfurado formado durante a conversão da metionina à cisteína, considerada atualmente um fator de risco emergente para doenças cardiovasculares (VAPAATALO & MERVAALA, 2001; CHOY *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2007, DI MINNO *et al.*, 2010). A síntese e metabolismo da homocisteína envolvem duas vias principais: transulfuração e remetilação, que são dependentes de várias enzimas e cofatores. Quando uma ou mais vias do metabolismo da homocisteína estão prejudicadas por causa de defeitos enzimáticos, como as deficiências da cistationa β sintase ou metilenotetrahidrofolato redutase ou deficiência de vitaminas B6, B12 ou ácido fólico, a homocisteína se acumula levando a um aumento do nível total de homocisteína no plasma (CHOY *et al.*, 2004; NEVES *et al.*, 2004; STÜHLINGER & STANGER, 2005; LIMA *et al.*, 2007c). Alguns estudos demonstraram que até 10% dos eventos coronarianos podem ser atribuídos ao aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína (GARCIA *et al.*, 2007).

A hiperhomocisteinemia altera a função endotelial e induz a dano celular, proliferação de músculo liso e promove a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade. Também favorece a trombogênese aumentando a adesão plaquetária, inibindo a ativação da proteína C e diminuindo a atividade do ativador tecidual do plasminogênio (VAPAATALO & MERVAALA, 2001; CHOY *et al.*, 2004; MONTAÑO-LOZA *et al.*, 2004). Entretanto, ainda não está claro qual o mecanismo fisiopatológico da homocisteína na aterotrombose (NEVES *et al.*, 2004; UNDAS *et al.*, 2006).

Estudos retrospectivos mostram correlação entre homocistinúria, aterosclerose, tromboembolismo arterial e venoso e hiperhomocisteinemia em pacientes com doenças cardiovasculares (NEVES *et al.*, 2004). A hiperhomocisteinemia tem se mostrado um fator de risco importante e independente para o desenvolvimento de aterosclerose (UEHARA *et al.*, 2005) e talvez, demência e doença de Alzheimer, possivelmente por estar associado à disfunção endotelial em pequenos vasos sanguíneos (AZAD *et al.*, 2007). Um aumento do nível plasmático de homocisteína tem sido associado a outros fatores de risco cardiovasculares que estão freqüentemente interrelacionados e agem sinergicamente. Vários estudos revelam uma correlação entre os níveis plasmáticos de homocisteína e LDLc (CHOY *et al.*, 2004). Portanto, a determinação da homocisteína plasmática contribui para a identificação de pacientes com elevado risco cardiovascular em grupos de indivíduos hipertensos, diabéticos, dislipidêmicos, tabagistas e obesos.

2.5.5 – Lipoproteína (a)

Uma variante genética que tem recebido atenção nos últimos anos é a lipoproteína (a) [Lp (a)]. Descoberta em 1963, o interesse sobre esta lipoproteína decorre de diversos estudos clínicos, que estabeleceram uma correlação significativa entre seus níveis elevados e desenvolvimento de doenças coronariana e cerebrovascular (BACH-NGOHOU *et al.*, 2001; SBC, 2001; HOLANDA *et al.*, 2004).

A Lp (a) é semelhante a LDL, mas contém uma glicoproteína adicional, denominada apolipoproteína (a) [apo (a)], acoplada à apolipoproteína B por pontes de dissulfeto (BOFFA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2006; LIPPI *et al.*, 2007). A apo (a) é uma glicoproteína polimórfica, tem variado número de repetições de seqüência de aminoácidos, homólogos à região do *Kringle 4* do plasminogênio. Mais de 30 diferentes isoformas de apo (a) já foram descritas em humanos, variando de tamanho de 300 a 800 kDa (CAIN *et al.*, 2005). Tal glicoproteína pertence à família do plasminogênio e atua como um inibidor competitivo do ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) inibindo a geração de plasmina e a fibrinólise, características que conferem à Lp (a) propriedades pró-aterogênicas (SBC, 2001). Além disso, a Lp (a) é fagocitada por macrófagos, que precede a formação das células espumosas seguindo caminho semelhante ao LDLc na formação da placa aterosclerótica, mas seu depósito subendotelial é maior por ter maior afinidade pela fibrina (HOLANDA *et al.*, 2004; TERRA, 2004).

Embora a triagem de indivíduos com risco de doença coronariana realizada por dosagens de lípidos e avaliações tradicionais de fatores de risco seja vantajosa do ponto de vista econômico, as relações descritas entre o maior risco de doença coronariana devido a presença de Lp (a) e outros marcadores genéticos destacam a importância de sua determinação em grupos especiais de pacientes, como complementação do perfil lipídico convencional.

3-OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral identificar a frequência dos alelos dos genes codificadores das apolipoproteínas E e A5, e correlacioná-los com os perfis lipídico e hemostático de indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil genético individual em relação aos alelos dos genes codificadores das apolipoproteínas E e A5.
- Caracterizar o perfil lipídico, incluindo os níveis plasmáticos da lipoproteína (a) e apolipoproteínas A-I e B.
- Avaliar os níveis plasmáticos da proteína C reativa como marcador de processo inflamatório.
- Avaliar os níveis plasmáticos da homocisteína e trombomodulina como marcadores de lesão endotelial.
- Avaliar os marcadores de hipercoagulabilidade, por meio da dosagem do fragmento 1 + 2 da protrombina e dímero D.
- Avaliar o sistema fibrinolítico, através do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina e inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1.
- Correlacionar o grau de atividade da cascata da coagulação e do sistema fibrinolítico, além da associação com os polimorfismos *APOE*, *APOA5* e o perfil lipídico.
- Correlacionar os parâmetros avaliados entre si e com os fatores de risco convencionais para doenças cardiovasculares.

4-MATERIAL E MÉTODOS

Sob o ponto de vista ético, o projeto em questão recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisas da UFMG (COEP-UFMG) (**Anexo 1**), da Comissão de Ética do Hospital Socor (**Anexo 2**), como parte integrante de um projeto maior intitulado “Análise da frequência de mutação e tipificação de genótipos clinicamente relacionados à hipercolesterolemia em indivíduos em Minas Gerais”. O estudo, também, foi aprovado pelo Gerente Geral da Refinaria Gabriel Passos, Sr. João Ricardo Baruso Lafraia. Aos indivíduos selecionados, foi feito o esclarecimento dos objetivos da pesquisa e, aqueles que estiveram de acordo em participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice 1**), bem como responderam a uma Ficha Clínica com perguntas de interesse médico e da pesquisa (**Apêndice 2**).

4.1 – CASUÍSTICA

Os indivíduos dislipidêmicos foram selecionados na seqüência de atendimento por médicos a partir da rotina nos consultórios e ambulatórios, até a obtenção da amostra determinada por cálculos estatísticos. Os participantes buscaram atendimento médico por diversas razões, motivados pela vontade de realizar uma consulta de rotina ou em busca de solução para algum sintoma recente ou mesmo para acompanhamento de distúrbios previamente diagnosticados, além de realização de consultas médicas ocupacionais. Os indivíduos do grupo controle, com características similares aos indivíduos dislipidêmicos, também foram selecionados pela equipe médica envolvida no projeto. A ficha clínica (**Apêndice 2**), dos indivíduos selecionados, foi cuidadosamente preenchida pelo médico competente, quando se obteve o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado pelo participante, após esclarecimento dos objetivos do estudo. Após essa etapa, aqueles indivíduos que atendiam os critérios de inclusão/exclusão, conforme descritos abaixo, foram agendados para a coleta de amostra de sangue, realizada em local adequado, por um profissional farmacêutico, com habilidade técnica e experiência para a realização do procedimento.

Para minimizar as variações pré-analíticas, na determinação do perfil lipídico, foram feitas algumas recomendações aos indivíduos selecionados:

- Realizar jejum prévio de 12h a 14h; sendo permitido a ingestão de medicamentos, quando necessário.
- Não praticar atividade física vigorosa nas 24h que antecedem a coleta de sangue.
- Evitar ingestão de álcool nas 72h que antecedem a coleta de sangue.

Um total de 216 indivíduos adultos foram incluídos, compreendendo indivíduos dislipidêmicos (n = 109) e indivíduos normolipêmicos (controles) (n = 107) avaliados por exames clínico e laboratoriais. Na **Tabela 1** são apresentados os grupos de indivíduos

estudados com os respectivos tamanhos das amostras e dados relacionados à idade e ao sexo dos indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos.

Tabela 1 – Caracterização dos grupos de indivíduos estudados

	NORMOLIPÊMICO	DISLIPIDÊMICO	TOTAL
n	107	109	216
Sexo M/F	44/63	68/41	112/104
Idade (anos) M/F	46,7 ± 6,6	48,4 ± 6,8	---
IMC (Kg/m²)	25,2 ± 4,7	27,5 ± 3,8	---

Caracterização quanto ao n (tamanho), M (sexo masculino), F (sexo feminino), idade e IMC (índice de massa corporal) sendo os valores desses parâmetros expressos como média e desvios padrão.

4.2 – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

4.2.1 – Dislipidêmicos

Critérios de inclusão

1. Faixa etária: 30 a 60 anos.
2. Indivíduos, de ambos os sexos, com diagnóstico clínico prévio de dislipidemia, comprovada em exame laboratorial e não em uso de drogas hipolipemiantes. Os valores de corte utilizados foram de acordo com a classificação laboratorial das dislipidemias da Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2001.

Hipercolesterolemia isolada: CT ≥ 240 mg/dL e ou LDLc ≥ 160 mg/dL

Hipertrigliceridemia isolada: TG ≥ 200 mg/dL

Hiperlipidemia mista: CT ≥ 240 mg/dL e/ou LDLc ≥ 160 mg/dL, além de TG ≥ 200 mg/dL.

Diminuição isolada do HDLc ou associada a aumento de TG ou LDLc: HDLc ≤ 40 mg/dL.

Foram incluídos indivíduos que se enquadraram nos critérios acima, independente ou não de estarem realizando atividade física e/ou dieta alimentar.

Critérios de exclusão

A existência de dislipidemias secundárias ou de qualquer uma das situações listadas, no **Quadro 3**, resultou na exclusão do indivíduo.

Quadro 3 – Critérios de exclusão

CLÍNICOS	MEDICAMENTOSOS
Diabetes mellitus	Corticóides
Hipotireoidismo	Anabolizantes
Síndrome nefrótica	Isotretinoína
Insuficiência renal crônica	Ciclosporina
Doença hepática	Antiretrovirais
Doença autoimune	Antiinflamatórios não esteróides
Câncer	Anticoagulante oral
Gravidez	Estatinas
Intolerância à glicose	Fibratos

4.2.2 – Controles

Critérios de inclusão

- 1 Faixa etária: 30 a 60 anos.
- 2 Indivíduos, de ambos os sexos, sem diagnóstico clínico prévio de dislipidemia, comprovado através de exames laboratoriais recentes. Tendo como base a classificação laboratorial das dislipidemias da Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2001, foram incluídos no estudo os indivíduos que apresentavam valores de CT inferior a 200 mg/dL, LDLc inferior 130 mg/dL, TG inferior a 150 mg/dL e HDLc superior a 40 mg/dL.

A princípio buscou-se homogeneidade entre os grupos quanto as variáveis sedentarismo, etilismo, tabagismo, IMC e a presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS). Além disso, os indivíduos selecionados para o grupo controle apresentavam a mesma situação sócio econômica dos indivíduos dislipidêmicos, embora houvesse deficiência na abordagem da ficha clínica, em relação as questões sócio econômicas.

Critérios de exclusão

A existência de gravidez, dislipidemias e doenças como: *diabetes mellitus*, hipotireoidismo, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, doença hepática, doença autoimune, câncer, determinaram a exclusão do indivíduo, além do uso de medicamentos relacionados no **Quadro 3**.

4.3 – AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletadas amostras de 22 mL de sangue venoso dos pacientes (10 mL em citrato de sódio, 10 mL sem anticoagulante e 2 mL em EDTA), após jejum de 12h, diretamente em tubos do Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson). As amostras de sangue foram rapidamente centrifugadas a 2.500 rpm por 20 minutos para separação das amostras de plasma e de soro, as quais foram divididas em várias alíquotas que foram rapidamente

estocadas a -80°C. As amostras colhidas em anticoagulante EDTA foram utilizadas para a extração do DNA, que ficou armazenado a -20°C até a realização das análises genéticas.

4.4 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os parâmetros avaliados neste estudo foram:

1. Triglicérides (TG)
2. Colesterol total (CT) e frações
3. Lipoproteína (a) [Lp (a)]
4. Apolipoproteínas A-I e B
5. Índice APOB/APOA-I
6. Proteína C Reativa
7. Homocisteína total (HCY)
8. Trombomodulina (TM)
9. Fragmento 1+2 da protrombina (F1+2)
10. Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)
11. Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI)
12. Dímero D (D-Di)
13. Identificação dos alelos do gene da apolipoproteína E (*APOE*)
14. Identificação dos alelos do gene da apolipoproteína A5 (*APOA5*)

4.5 – MÉTODOS

4.5.1 – Fatores de risco

A presença das variáveis sedentarismo, tabagismo, etilismo e hipertensão arterial, foi constatada com base nas recomendações das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2001). A obesidade foi avaliada pelo índice de massa corpórea (IMC) preconizado pela OMS (REZENDE *et al.*, 2006). Os critérios seguem abaixo:

Sedentarismo: foram considerados sedentários os indivíduos que não praticavam exercícios físicos regularmente, com frequência mínima de 40 minutos pelo menos três vezes por semana.

Tabagismo: foram considerados tabagistas os indivíduos com consumo regular de qualquer quantidade de cigarros, por um período superior a seis meses até o mês anterior ao preenchimento da ficha clínica.

Etilismo: foram considerados etilistas os participantes que consumiam um volume superior a 30 mL de álcool/dia, ou seja, uma quantidade superior a 350 mL de cerveja, 30 mL de bebidas destiladas ou 100 mL de vinho por dia.

Hipertensos: foram considerados hipertensos os participantes que apresentaram pressão sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão diastólica ≥ 90 mmHg no momento da seleção

médica ou indivíduos sabidamente hipertensos que estivessem em uso regular de medicação anti-hipertensiva, cujos níveis pressóricos estivessem elevados ou não no momento da entrevista.

Obesidade: O IMC foi obtido dividindo-se o peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros. Os pontos de corte adotados foram os preconizados pela OMS: IMC < 18,5 kg/m² (baixo peso); IMC de 18,5-24,9 kg/m² (normal); IMC de 25-29,9 kg/m² (sobre peso) e IMC ≥ 30 kg/m² (obesidade) (REZENDE *et al.*, 2006).

4.5.2 – Parâmetros Bioquímicos

a) Triglicérides

A determinação dos níveis plasmáticos de TG foi realizada através do uso do conjunto diagnóstico BIOCLIN® TRIGLICÉRIDES LÍQUIDO ESTÁVEL cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico.

Valor de referência: Ótimo < 150 mg/dL
 Limítrofe 150 – 200 mg/dL
 Alto 200 – 499 mg/dL
 Muito alto ≥ 500 mg/dL

b) Colesterol total

A determinação do CT plasmático foi realizada através do uso do conjunto diagnóstico BIOCLIN® COLESTEROL MONOREAGENTE cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico – COD – PAP.

Valor de referência: Desejável < 200 mg/dL
 Aceitável: 200 – 239 mg/dL
 Elevado > 240 mg/dL

c) HDL-colesterol

A determinação do HDLc plasmático foi realizada através do uso do conjunto diagnóstico BIOCLIN® COLESTEROL HDL DIRETO cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico.

Valor de referência:

Mulheres (mg/dL):	Desejável > 65	Médio Risco: 45-65	Alto Risco < 45
Homens (mg/dL):	Desejável > 55	Médio Risco: 35-55	Alto Risco < 35

d) LDL-colesterol

A concentração do LDLc plasmático foi estimada utilizando-se um procedimento simplificado descrito por FRIEDEWALD *et al.* (1972). Neste método, os níveis de CT, TG e HDLc são previamente determinados e as concentrações obtidas são expressas em mg/dL. O VLDLc é estimado como o valor de TG plasmático dividido por cinco (TG/5), e o LDLc pode ser calculado usando-se a seguinte equação:

$$\text{LDLc} = \text{colesterol total} - [\text{HDLc} + (\text{TG}/5)]$$

Esta equação não é apropriada para ser usada com amostras nas quais as concentrações de TG excedam 400mg/dL, bem como em presença de quilomícrons e, ainda, na disbetalipoproteinemia (aumento de IDLc).

Valor de referência: Ótimo < 100 mg/dL

Desejável 100 – 129 mg/dL

Limítrofe 130 – 159 mg/dL

Alto 160 – 189 mg/dL

Muito alto \geq 190 mg/dL

e) Lipoproteína(a)

A determinação plasmática da Lp(a) foi realizada através do uso do conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA® LIPOPROTEÍNA (a) TURBIDIMETRIA cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado.

Valor de referência: até 30mg/dL.

f) Apolipoproteína A-I

A determinação plasmática da APOA-I foi realizada através do uso do conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA® APOLIPOPROTEÍNA A-I TURBIDIMETRIA cujo princípio analítico é o imunoensaio turbidimétrico.

Valor de referência: 110 a 210mg/dL.

g) Apolipoproteína B

A determinação plasmática da APOB foi realizada através do uso do conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA® APOLIPOPROTEÍNA B TURBIDIMETRIA cujo princípio analítico é o imunoensaio turbidimétrico.

Valor de referência: 60 a 155mg/dL

h) Índice APOB/APOA-I

O índice APOB/APOA-I foi calculado para cada indivíduo em particular, dividindo-se o valor plasmático da APOB pelo valor plasmático da APOA-I.

i) Colesterol não HDL

O colesterol não HDL foi calculado para cada participante, subtraindo-se o valor do CT plasmático pelo valor plasmático do HDLc.

j) Proteína C Reativa ultra sensível

A determinação quantitativa da PCRus foi realizada no soro através do uso do conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA® PCR – ULTRA SENSÍVEL TURBIDIMETRIA, cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado.

Valor de referência: até 3mg/dL

Todas as dosagens bioquímicas citadas anteriormente foram realizadas utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus (Roche®) em sistema completamente automatizado, utilizando o procedimento técnico recomendado pelo fabricante. As amostras foram acondicionadas no aparelho e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foram utilizados soros-controle específicos para verificar o desempenho dos ensaios.

k) Homocisteína total

A determinação quantitativa da homocisteína foi realizada no soro, através do uso do conjunto diagnóstico ADVIA Centaur® HCY (Homocisteína) (Bayer HealthCare LLC/ Bayer Corp. Tarrytown, NY, EUA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho ADVIA Centaur® em sistema automatizado.

O teste HCY ADVIA Centaur é um imunoenensaio competitivo que utiliza tecnologia quimioluminescente direta. As diferentes formas de homocisteína na amostra do paciente são reduzidas a HCY livre pelo reagente redutor. A homocisteína livre é então convertida em S-adenosil-homocisteína (SAH) pelo reagente enzimático. A SAH convertida da amostra do paciente compete com a SAH covalentemente ligada a partículas paramagnéticas na fase sólida por uma quantidade limitada de anti-SAH marcado com éster de acridina no reagente lite. Existe uma relação inversa entre a quantidade de HCY presente na amostra do paciente e a quantidade de unidades relativas de luz detectadas pelo sistema.

A calibração foi realizada utilizando-se o cartão da curva mestra, fornecido pelo fabricante. Dois níveis de material de controle de qualidade, também fornecido pelo fabricante, foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 3,7 a 13,9 $\mu\text{mol/L}$

OBS: o fabricante recomenda que cada laboratório determine a faixa de valor de referência para a HCY.

4.5.3 – Parâmetros Hemostáticos

a) Trombomodulina

A determinação quantitativa da TM plasmática foi realizada no plasma citratado, através do conjunto diagnóstico IMUBIND[®] Thrombomodulin (American Diagnostica[®] Inc., Stamford, USA), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O teste de ELISA se baseia na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. Os antígenos presentes na amostra (no caso, TM) se ligam a anticorpos monoclonais específicos (anticorpos que reconhecem os domínios EGF1 e EGF2 da TM) fixados à superfície da placa. Após incubação, os antígenos não capturados são retirados por lavagens sucessivas. Em seguida, adicionam-se anticorpos monoclonais conjugados com peroxidase, que vão se ligar a determinantes antigênicos da TM (capturados na etapa anterior), distintos daqueles ligados aos primeiros anticorpos (domínios EGF5 e EGF6 da TM). Os anticorpos conjugados com peroxidase (*horseradish* peroxidase – HRP) que não se ligaram à TM são, posteriormente, retirados por lavagens sucessivas. A revelação dos antígenos capturados na primeira etapa é feita pela determinação da reação da enzima peroxidase (HRP) ligada ao segundo anticorpo, com o substrato TMB (perborato 3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina), gerando um produto de coloração azul. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico, tornando-se a cor amarela. A intensidade da cor produzida (determinada fotometricamente) é diretamente proporcional à concentração de TM na amostra plasmática.

Valor de referência: ainda não estabelecido.

OBS: o fabricante informa que homens apresentam valores entre 4,00 - 5,35 ng/mL, mulheres jovens apresentam valor médio de 2,73 ng/mL e que mulheres acima de 60 anos apresentam valor médio de 4,79 ng/mL.

b) Fragmento 1 + 2 da protrombina

A determinação quantitativa do F1+2 plasmática foi realizada no plasma citratado, através do conjunto diagnóstico ENZYGNOST F1+2 (monoclonal) (DADE BEHRING® Marburg GmbH, Germany), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O teste de ELISA para a determinação do F1+2 se baseia no mesmo princípio já descrito para a TM.

Valor de referência: 69 a 229 pmol/L

c) Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1

A determinação do PAI-1 plasmático foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA (American Diagnostica® Inc., Stamford, USA), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O teste de ELISA para a determinação do PAI-1 se baseia no mesmo princípio já descrito para a TM. Porém, a captura dos antígenos PAI-1 presentes nos plasmas testados, é feita por anticorpos monoclonais (anti – PAI-1 de rato) e a revelação dos antígenos capturados na primeira etapa é feita através da determinação da reação da enzima peroxidase (ligada ao segundo anticorpo policlonal de cabra) com o substrato orto-fenilenodiamina (OPD), na presença de peróxido de hidrogênio, gerando um produto de coloração amarela. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se laranja.

Valor de referência: 2 a 47 ng/mL

OBS: o fabricante recomenda que cada laboratório determine a faixa de valor de referência para PAI-1.

d) Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina

A determinação quantitativa do TAFI plasmático foi realizada no plasma citratado através do uso do conjunto diagnóstico VISULIZE™ TAFI ANTIGEN KIT (AFFINITY BIOLOGICALS INCORPORATED®, Canada), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O teste de ELISA para a determinação do TAFI se baseia no mesmo princípio já descrito para a TM. Porém, a captura dos antígenos TAFI presentes nos plasmas testados, é feita por anticorpos policlonais humanos.

Valor de referência: 5,8 a 10,0 µg/mL

OBS: o fabricante recomenda que cada laboratório determine a faixa de valor de referência para o TAFI.

e) Dímero – D

A determinação do D-Di plasmático foi realizada no plasma citratado, através do uso do conjunto diagnóstico IMUBIND® D-Dimer ELISA (American Diagnostica® Inc., Stamford, USA), cujo princípio analítico é ELISA de captura, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante

O teste de ELISA para a determinação do D-Di se baseia no mesmo princípio já descrito para a TM.

Valor de referência: inferior a 400 ng/mL

A leitura de todos os testes hemostáticos realizados por ELISA e citados anteriormente foi realizada utilizando-se o leitor de microplacas Spectra Max-340 e VersaMax *microplate reader* (Molecular Devices® USA). Todas as curvas de calibração foram construídas utilizando-se os calibradores, fornecidos pelos fabricantes. Amostras de plasmas-controle específicos para cada teste, também fornecidos pelos fabricantes, foram utilizados para verificar o desempenho dos ensaios. As concentrações dos parâmetros analisados foram obtidas interpolando-se as leituras das amostras em uma curva padrão.

4.5.4 – Análises moleculares

As amostras de DNA foram obtidas a partir de 300µL de sangue total colhido em EDTA, submetido ao processo de precipitação com acetato de amônio (segundo o protocolo e os reagentes do “Wizard Genomic DNA Purification Kit” – Promega®). Nas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), foram utilizados desoxirribonucleotídeos fornecidos pela GIBCO BRL®, tampão (15 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de Triton-100) e Taq polimerase fornecidos pela Phoeutria®. As reações de PCR foram realizadas no termociclador PT100® PCR Thermocycler (MJ Reserch, Waltham, USA).

a) Identificação dos alelos do gene da apolipoproteína E

A análise do gene *APOE* foi realizada pela técnica de PCR seguida pela análise dos fragmentos polimórficos, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando-se metodologia descrita por TSUKAMOTO *et al.* (1992) conforme descrito abaixo:

Após a extração de DNA total, uma região de 270 pares de bases do gene codificador de *APOE* foi amplificada, utilizando-se o oligonucleotídeo senso 5' GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGC 3' e o oligonucleotídeo antisenso 5' GGCGCTCGCGGATGGCGCTGAG 3'. Após a detecção da amplificação do fragmento específico em gel de poliacrilamida a 6%, o produto de PCR foi então submetido à digestão por 18 horas, utilizando-se a endonuclease de restrição *Cfo I*. Esta enzima reconhece 8 sítios de clivagem no alelo $\epsilon 2$, 9 sítios no alelo $\epsilon 3$ e 10 sítios no alelo $\epsilon 4$, de acordo com a **Figura 3**.

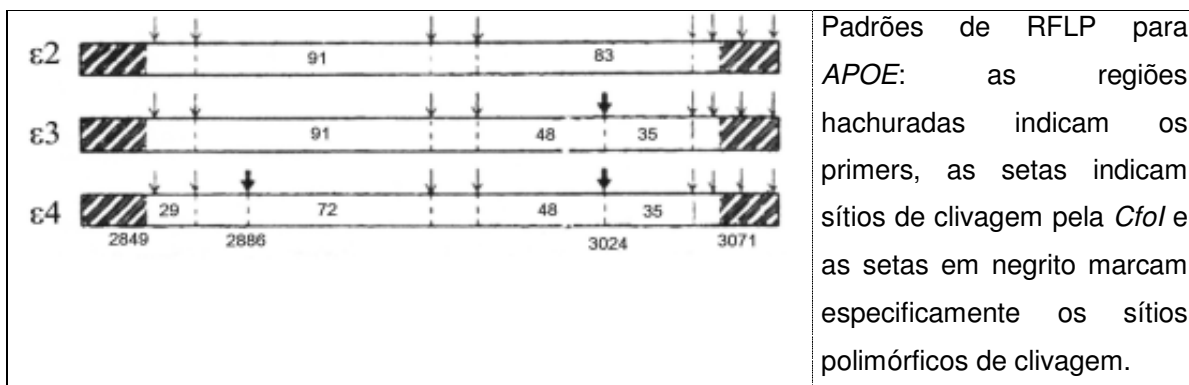


Figura – 3: Padrões de RFLP para *APOE*

O produto da digestão foi posteriormente visualizado em gel de acrilamida, e o perfil das bandas no gel forneceu a base para a identificação do perfil genético, de acordo com o **Quadro 4**.

Quadro 4 – Perfil de bandas no gel para a identificação dos alelos do gene *APOE*

Genótipos – <i>APOE</i>		Fragmentos gerados pela digestão
Homozigotos	ε2ε2	91 e 83 pb
	ε3ε3	91, 48 e 35 pb
	ε4ε4	72, 48, 35 e 29 pb
Heterozigotos	ε2ε3	91, 83, 48 e 35 pb
	ε2ε4	91, 83, 72, 48, 35 e 29 pb
	ε3ε4	91, 72, 48, 35 e 29 pb

b) Identificação dos alelos do gene da apolipoproteína A5 (*APOA5*)

A análise do gene *APOA5* foi realizada pela técnica de PCR-RFLP, de acordo com a metodologia descrita por PENNACHIO *et al.* (2001), modificada. Após a extração de DNA total, uma região de 187pbs da região promotora do gene da *APOA5* foi amplificada utilizando-se o oligonucleotídeo sentido 5' GATTGATTCAAGATGCATTTAGGAC 3' e o oligonucleotídeo antisense 5' CCCCAGGAACTGGAGCGAAATT 3' conforme descrito por SOUSA *et al.* (2008b). Após a detecção da amplificação do fragmento específico em gel de poliácridamida a 6%, uma alíquota da reação de amplificação foi submetida à digestão por 18 horas, com a endonuclease de restrição *MseI*.

O produto da digestão foi posteriormente visualizado em gel de poliácridamida a 8%, corado pela prata, e o perfil das bandas forneceu a base para a identificação do perfil genético, de acordo com o **Quadro 5**.

Quadro 5 – Perfil de bandas no gel para a identificação dos alelos do polimorfismo *APOA5* - 1131T>C

Genótipos – <i>APOA5</i>		Fragmentos gerados pela digestão
Homozigotos	TT	165, 22 pb
	CC	187 pb
Heterozigotos	TC	187, 165, 22 pb

4.6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi realizada uma análise estatística descritiva das variáveis estudadas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas, sendo que os valores dos parâmetros CT, TG, VLDLc, Lp (a), TM, F1+2, PAI-1 e D-Di tiveram transformação logarítmica e o valor de PCRus teve transformação final pela raiz quadrada. Para a comparação entre os grupos, foi realizado um delineamento inteiramente casualizado em sistema fatorial 2x2x2 com oito tratamentos, sendo dois grupos, dois sexos e duas faixas etárias utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK).

As variáveis categóricas (fatores de risco e mutações) foram analisadas pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado.

Foi utilizado um modelo de regressão logística multivariada para analisar a associação entre as variáveis categóricas e os níveis plasmáticos dos parâmetros estudados (variáveis contínuas).

Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado o teste de qui-quadrado.

O tamanho mínimo da amostra foi definido usando-se a fórmula $t_{5\%.gl} \times \sqrt{SD^2/n}$ e os coeficientes de variação descritos previamente na literatura, considerando-se, no máximo, dez por cento de variação em torno da média, para que fossem demonstradas as possíveis diferenças estatísticas com um nível de significância de 5%. Para as variáveis TG, PCRus e Lp (a) foram consideradas variações em torno da média de 15%, 20% e 20%, respectivamente.

Os programas SAS versão 9.0, SAEG versão 8.1 e Sigma STAT versão 2.0 foram utilizados para realizar as análises estatísticas.

5-RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse trabalho estão apresentados nas Tabelas 2 a 34, referentes aos dois grupos estudados a saber: indivíduos hígidos representados por NORMOLIPÊMICO (controle) e indivíduos dislipidêmicos representados por DISLIPIDÊMICO. Quando necessário, são apresentadas tabelas separando os grupos por sexos, ou seja, MASCULINO e FEMININO e por faixas etárias: INFERIOR OU IGUAL A 45 ANOS e SUPERIOR A 45 ANOS.

5.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE INDIVÍDUOS QUANTO AOS FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

Os dados referentes à presença de fatores de risco cardiovascular associados às dislipidemias são apresentados nas **Tabelas 2, 3 e 4**, como número de indivíduos (n) e porcentagem de determinada variável presente nos componentes dos grupos normolipêmico e dislipidêmico.

Tabela 2 – Caracterização dos grupos quanto aos fatores de risco

	NORMOLIPÊMICO	DISLIPIDÊMICO	
	(n=107)	(n=109)	p
Idade (anos)	46,7 ± 6,6	48,4 ± 6,8	ns
IMC (kg/m²)	25,2 ± 4,6	27,5 ± 3,8	0,0003
Sedentarismo	52 (48,6%)	55 (50,5%)	ns
Tabagismo	18 (16,8%)	20 (18,4%)	ns
Etilismo	02 (1,9%)	07 (6,4%)	ns
Hipertensão arterial	10 (9,4%)	30 (27,5%)	0,001

(n) Número de participantes e porcentagem da presença do fator de risco nos grupos estudados; idade e IMC (índice de massa corporal), sendo os valores dessas variáveis expressos como média e desvios padrão. Foram observadas diferenças significativas para IMC e hipertensão arterial entre os grupos; ns = não significativo.

Tabela 3 – Caracterização dos grupos de indivíduos do sexo masculino, quanto aos fatores de risco cardiovascular

	NORMOLIPÊMICO	DISLIPIDÊMICO	
	(n=44)	(n=68)	p
Idade (anos)	46,7 ± 6,1	47,3 ± 6,6	ns
IMC (kg/m²)	24,9 ± 5,4	27,5 ± 3,2	0,0024
Sedentarismo	24 (54,5%)	34 (50,0%)	ns
Tabagismo	12 (27,3%)	12 (17,7%)	ns
Etilismo	01 (2,3%)	07 (10,3%)	ns
Hipertensão arterial	04 (9,1%)	17 (25,0%)	0,047

(n) Número de participantes do sexo masculino e porcentagem da presença do fator de risco nos grupos estudados; idade e IMC (índice de massa corporal), sendo os valores dessas variáveis expressos como média e desvios padrão. Foram observadas diferenças significativas para as variáveis IMC e hipertensão arterial entre os grupos; ns = não significativo.

Tabela 4 – Caracterização dos grupos de indivíduos do sexo feminino, quanto aos fatores de risco cardiovascular

	NORMOLIPÊMICO	DISLIPIDÊMICO	
	(n=63)	(n=41)	p
Idade (anos)	46,7 ± 6,4	49,9 ± 6,9	ns
IMC (kg/m²)	25,5 ± 4,1	27,5 ± 4,7	0,016
Sedentarismo	28 (44,4%)	21 (51,2%)	ns
Tabagismo	06 (9,5%)	08 (19,5%)	ns
Etilismo	01 (1,6%)	0	ns
Hipertensão arterial	06 (9,5%)	13 (31,7%)	0,009
Uso de anticoncepcional oral	08 (12,7%)	01 (2,4%)	ns
Menopausa	14 (22,2%)	22 (53,7%)	0,001
Terapia hormonal	06 (9,5%)	04 (9,8%)	ns

(n) Número de participantes do sexo feminino e porcentagem da presença do fator de risco nos grupos estudados; idade e IMC (índice de massa corporal), sendo os valores dessas variáveis expressos como média e desvios padrão. Foram observadas diferenças significativas para as variáveis IMC, hipertensão arterial, menopausa entre os grupos; ns = não significativo.

A **Tabela 5** apresenta a correlação de Pearson entre o IMC e todas as variáveis bioquímicas e hemostáticas estudadas.

Tabela 5 – Correlação de Pearson entre o IMC e os parâmetros bioquímicos e hemostáticos estudados

PARÂMETROS	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)
IMC x CT	0,141 *
IMC x HDLc	-0,249 **
IMC x LDLc	0,132
IMC x TG	0,286 ***
IMC x VLDLc	0,286 ***
IMC x Não-HDLc	0,222 **
IMC x APOA-I	-0,234 **
IMC x APOB	0,017
IMC x APOB/APOA-I	0,235 **
IMC x Lp(a)	0,015
IMC x PCRus	0,173 *
IMC x HCY	-0,081
IMC x TM	0,029
IMC x F1 + 2	0,050
IMC x PAI-1	0,194 **
IMC x TAFI	0,104
IMC x D-Di	0,030

Número de participantes = 216. Coeficiente de correlação de Pearson seguido de teste t de Student.

* $p < 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

5.2 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO AO USO DE MEDICAMENTOS

Os dados referentes aos antihipertensivos em uso pelos participantes durante a triagem são apresentados na **Tabela 6**, como número de indivíduos (n) e porcentagem do uso de determinado medicamento nos componentes dos grupos normolipêmico e dislipidêmico. Foram considerados os medicamentos usados com maior frequência, apresentados no **Quadro 6**.

Tabela 6 – Caracterização dos grupos normolipêmico e dislipidêmico quanto ao uso de antihipertensivos

	NORMOLIPÊMICO	DISLIPIDÊMICO	
	(n=107)	(n=109)	p
Beta-bloqueadores	01 (0,9%)	09 (8,3%)	0,019
Bloqueadores de canais de cálcio	01 (0,9%)	4 (3,7%)	ns
Diuréticos tiazídicos	01 (0,9%)	10 (9,2%)	0,010
Inibidores da ECA	04 (3,7%)	16 (14,7%)	0,008

(n) Número de participantes e porcentagem dos participantes em uso de antihipertensivos nos grupos estudados. Foram observadas diferenças significativas para o uso de beta-bloqueadores, diuréticos tiazídicos e inibidores da ECA entre os grupos; ns = não significativo. ECA = Enzima conversora da angiotensina.

Quadro 6 – Antihipertensivos agrupados por classe de medicamentos

GRUPOS	MEDICAMENTOS
Beta-bloqueadores	Atenolol, Propanolol
Bloqueadores de canais de cálcio	Anlodipino, Nifedipina
Diuréticos tiazídicos	Hidroclorotiazida
Inibidores da ECA	Captopril, Enalapril, Lisinopril, Losartan

ECA = enzima conversora da angiotensina

5.3 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os resultados das análises dos parâmetros bioquímicos encontram-se na **Tabela 7**, onde os resultados da análise de variância (ANOVA) estão representados nas colunas por: grupos (normolipêmico e dislipidêmico), sexos (feminino e masculino), faixas etárias (inferior ou igual a 45 anos e superior a 45 anos) e interações entre os mesmos. As interações analisadas foram: grupos *versus* (vs) sexos, grupos vs faixas etárias, sexos vs faixas etárias e grupos vs sexos vs faixas etárias. Quando houveram diferenças significativas entre as interações, os dados foram apresentados em tabelas separadamente, onde somente as interações foram discutidas.

Tabela 7 – Análises dos parâmetros bioquímicos entre os grupos, sexos, faixas etárias e interações entre as variáveis

	Grupo		Sexo		Faixa etária		Interações
	Normolipêmico	Dislipidêmico	Feminino	Masculino	≤ 45 anos	> 45 anos	
	(n=107)	(n=109)	(n=104)	(n=112)	(n= 68)	(n=148)	
CT	180 ± 21,7	228 ± 42,7***	204 ± 42,5	205 ± 40,5	197 ± 40,2	208 ± 41,6	ns
HDLc	57 ± 13,5	46 ± 14,0***	56 ± 14,3	47 ± 13,9**	51 ± 15,9	52 ± 14,3	ns
LDLc	103 ± 18,8	145 ± 40,1***	124 ± 39,9	123 ± 34,5	118 ± 38,2	126 ± 36,6	ns
TG	100 ± 39,7	218 ± 140,4***	130 ± 102,2	187 ± 127,1**	150 ± 117,9	164 ± 119,7	ns
VLDLc	20 ± 7,9	38 ± 20,1***	23 ± 13,8	33 ± 19,0**	25 ± 14,8	30 ± 18,3	ns
Não-HDLc	123 ± 21,1	182 ± 38,7***	148 ± 44,8	157 ± 40,2	145 ± 44,5	156 ± 41,5	ns
APOA-I	166 ± 26,1	130 ± 35,5***	155 ± 34,9	141 ± 35,7*	144 ± 36,5	149 ± 35,6	ns
APOB	74 ± 12,9	72 ± 18,7	69 ± 14,1	76 ± 17,2**	71 ± 15,8	74 ± 16,2	ns
APOB/APOA-I	0,46 ± 0,10	0,57 ± 0,14***	0,46 ± 0,11	0,56 ± 0,14***	0,52 ± 0,17	0,51 ± 0,12	ns
Lp(a)	20 ± 20,4	23 ± 24,0	24 ± 25,4	19 ± 18,7	19 ± 20,7	23 ± 22,9	ns
PCRus	2,9 ± 2,8	2,8 ± 3,1	3,1 ± 3,4	2,7 ± 2,5	2,7 ± 3,2	2,9 ± 2,8	ns

Os parâmetros bioquímicos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. LDLc e VLDLc (dislipidêmico n=99; feminino n=101 e masculino n=105; faixa etária inferior ou igual a 45 anos n=64 e superior a 45 n=142). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. ns = não significativo. * p < 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 entre grupos, sexos, faixas etárias e interações. Interações: Grupo (G), Sexo (S) e Faixa etária (F).

5.4 – ANÁLISES MOLECULARES

5.4.1 – Polimorfismo apolipoproteína E: freqüências alélicas, genotípicas e associações de parâmetros bioquímicos com os agrupamentos E2, E3 e E4

A **Figura 4**, apresenta o gel de eletroforese com os fragmentos diagnósticos utilizados para a identificação genotípica do polimorfismo *APOE*.

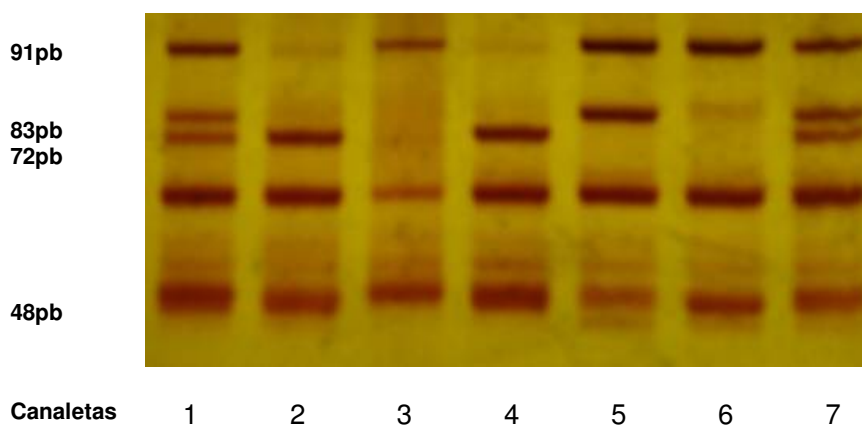


Figura 4 - Eletroforese, em gel de poliacrilamida a 12% corado pela prata, dos produtos de PCR-RFLP do fragmento de 270pb do gene *APOE*. Canaletas: 1 - genótipo $\epsilon 2\epsilon 4$; canaleta 2 - genótipo $\epsilon 4\epsilon 4$; canaleta 3 - genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$; canaleta 4 - genótipo $\epsilon 4\epsilon 4$; canaleta 5 - genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$; 6 - genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$; canaleta 7 - genótipo $\epsilon 2\epsilon 4$.

Os dados referentes aos resultados das análises moleculares são apresentados nas **Tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13** como número de indivíduos (n) e porcentagens das freqüências dos alelos e dos genótipos *APOE* observadas nos componentes dos grupos normolipêmico e dislipidêmico. Todas as distribuições genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 8 – Frequência dos alelos *APOE* nos grupos estudados

Alelo	Normolipêmico (n=107)		Dislipidêmico (n=109)		p	OR	IC 95%
	n	Frequência	n	Frequência			
$\epsilon 2$	9	0,042	10	0,046	0,847	1,095	0,448-2,678
$\epsilon 3$	178	0,832	182	0,835	0,931	1,022	0,618-1,691
$\epsilon 4$	27	0,126	26	0,119	0,827	0,938	0,531-1,658
Total	214		218				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, e $\epsilon 4$. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$. OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 9 – Frequência dos alelos *APOE* nos grupos estudados para o sexo masculino

Alelo	Normolipêmico Sexo Masculino (n=44)		Dislipidêmico Sexo Masculino (n=68)		p	OR	IC 95%
	n	Frequência	n	Frequência			
$\epsilon 2$	4	0,046	7	0,051	1,000*	1,140	0,344-3,757
$\epsilon 3$	72	0,818	113	0,831	0,807	1,092	0,545-2,188
$\epsilon 4$	12	0,136	16	0,118	0,679	0,844	0,384-1,855
Total	88		136				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, e $\epsilon 4$. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$; (*) p corrigido de acordo com o teste de Fisher ($n < 15$). OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 10 – Freqüência dos alelos *APOE* nos grupos estudados para o sexo feminino

Alelo	Normolipêmico		Dislipidêmico		p	OR	IC 95%
	Sexo Feminino		Sexo Feminino				
	(n=63)		(n=41)				
n	Freqüência	n	Freqüência				
$\epsilon 2$	5	0,040	3	0,037	1,000*	0,919	0,236-3,593
$\epsilon 3$	106	0,841	69	0,841	0,997	1,001	0,473-2,119
$\epsilon 4$	15	0,119	10	0,122	0,950	1,028	0,446-2,373
Total	126		82				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, e $\epsilon 4$. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$, (*) p corrigido de acordo com o teste de Fisher ($n < 15$). OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 11 – Freqüência dos genótipos *APOE* nos grupos estudados

Genótipos	Normolipêmico		Dislipidêmico		p	OR	IC 95%
	(n=107)		(n=109)				
	n	Freqüência	n	Freqüência			
$\epsilon 2 \epsilon 3$	9	8,4	10	9,2	0,843	1,100	0,439-2,753
$\epsilon 3 \epsilon 3$	72	67,3	77	70,6	0,594	1,170	0,659-2,077
$\epsilon 3 \epsilon 4$	25	23,4	18	16,5	0,207	0,649	0,333-1,266
$\epsilon 4 \epsilon 4$	1	0,9	4	3,7	0,369*	4,038	0,593-27,213
Total	107		109				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os genótipos. Os genótipos $\epsilon 2 \epsilon 2$ e $\epsilon 2 \epsilon 4$ não foram detectados entre os indivíduos estudados. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$; (*) p corrigido de acordo com o teste de Fisher ($n < 15$). OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 12 – Frequência dos genótipos *APOE* nos grupos estudados para o sexo masculino

Genótipos	Normolipêmico		Dislipidêmico		p	OR	IC 95%
	Sexo Masculino		Sexo Masculino				
	n	Freqüência	n	Freqüência			
$\epsilon 2 \epsilon 3$	4	9,1	7	10,3	1,000 [*]	1,148	0,334-3,912
$\epsilon 3 \epsilon 3$	28	63,6	47	69,1	0,547	1,279	0,579-2,830
$\epsilon 3 \epsilon 4$	12	27,3	12	17,7	0,225	0,571	0,233-1,399
$\epsilon 4 \epsilon 4$	0	0	2	2,9	-	-	-
Total	44		68				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os genótipos. Os genótipos $\epsilon 2 \epsilon 2$ e $\epsilon 2 \epsilon 4$ não foram detectados entre os indivíduos estudados. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$; (*) p corrigido de acordo com o teste de Fisher ($n < 15$). OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 13 – Frequência dos genótipos *APOE* nos grupos estudados para o sexo feminino

Genótipos	Normolipêmico		Dislipidêmico		p	OR	IC 95%
	Sexo Feminino		Sexo Feminino				
	n	Freqüência	n	Freqüência			
$\epsilon 2 \epsilon 3$	5	7,9	3	7,3	1,000 [*]	0,916	0,228-3,705
$\epsilon 3 \epsilon 3$	44	69,9	30	73,2	0,714	1,178	0,496-2,790
$\epsilon 3 \epsilon 4$	13	20,6	6	14,6	0,439	0,659	0,236-1,853
$\epsilon 4 \epsilon 4$	1	1,6	2	4,9	0,560 [*]	3,179	0,400-24,966
Total	63		41				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os genótipos. Os genótipos $\epsilon 2 \epsilon 2$ e $\epsilon 2 \epsilon 4$ não foram detectados entre os indivíduos estudados. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$; (*) p corrigido de acordo com o teste de Fisher ($n < 15$). OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

As **Tabelas 14 e 15** apresentam os dados dos parâmetros bioquímicos e os agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo *APOE* nos grupos normolipêmico e dislipidêmico e entre todos os participantes estudados, respectivamente.

Tabela 14 – Parâmetros bioquímicos e agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo *APOE* nos grupos normolipêmico e dislipidêmico

		Agrupamentos <i>APOE</i>			
	Grupos	E2 (n=19)	E3 (n=149)	E4 (n=48)	p
CT	Normolipêmico	164 ^a ± 16,0	183 ^b ± 21,4	180 ^b ± 22,2	p<0,05
	Dislipidêmico	229 ± 53,8	230 ± 44,3	217 ± 29,8	0,549
HDLc	Normolipêmico	56 ± 13,4	58 ± 14,2	55 ± 11,8	0,613
	Dislipidêmico	45 ± 10,8	47 ± 14,7	43 ± 12,4	0,448
LDLc	Normolipêmico	88 ^a ± 11,4	105 ^b ± 19,2	104 ^b ± 17,7	p<0,05
	Dislipidêmico	140 ± 49,4	145 ± 42,6	144 ± 25,7	0,937
TG	Normolipêmico	98 ± 38,1	100 ± 40,6	103 ± 39,3	0,923
	Dislipidêmico	240 ± 144,4	223 ± 144,6	189 ± 124,7	0,404
VLDLc	Normolipêmico	20 ± 7,6	20 ± 8,1	21 ± 7,9	0,925
	Dislipidêmico	42 ± 23,3	38 ± 19,6	33 ± 20,7	0,363
Não-HDLc	Normolipêmico	108 ^a ± 17,1	125 ^b ± 21,1	125 ^b ± 20,6	p<0,05
	Dislipidêmico	184 ± 52,6	183 ± 39,1	174 ± 30,5	0,614
APOA-I	Normolipêmico	176 ± 20,2	166 ± 27,2	162 ± 24,3	0,389
	Dislipidêmico	130 ± 32,7	133 ± 36,0	122 ± 35,2	0,459
APOB	Normolipêmico	71 ± 15,1	74 ± 12,6	74 ± 13,4	0,838
	Dislipidêmico	77 ± 24,2	72 ± 17,8	70 ± 19,5	0,596
APOB/APOA-I	Normolipêmico	0,41 ± 0,12	0,46 ± 0,10	0,46 ± 0,08	0,443
	Dislipidêmico	0,59 ± 0,12	0,56 ± 0,13	0,61 ± 0,20	0,344
Lp(a)	Normolipêmico	17 ± 8,0	22 ± 22,3	16 ± 17,1	0,328
	Dislipidêmico	21 ± 16,7	24 ± 25,5	21 ± 21,7	0,760
PCRus	Normolipêmico	4,4 ± 3,6	2,8 ± 2,8	2,7 ± 2,4	0,277
	Dislipidêmico	2,5 ± 1,7	3,1 ± 3,5	1,9 ± 1,5	0,324

Os parâmetros bioquímicos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. Grupos normolipêmico (n = 107) e dislipidêmico (n = 109). Agrupamento E2 (genótipo ε2ε3) (normolipêmico, n = 9 e dislipidêmico, n = 10). Agrupamento E3 (genótipo ε3ε3) (normolipêmico, n = 72 e dislipidêmico, n = 77). Agrupamento E4 (genótipos ε3ε4 e ε4ε4) (normolipêmico, n = 26 e dislipidêmico, n = 22). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. p = diferença entre os grupos E2, E3 e E4. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si significativamente ao nível de p < 0,05 pelo teste de SNK.

Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos e agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo *APOE* entre todos os participantes estudados

	E2 (n=19)	E3 (n=149)	E4 (n=48)	p
CT	198 ± 51,8	207 ± 42,5	197 ± 31,9	0,244
HDLc	50 ± 13,0	52 ± 15,4	50 ± 13,4	0,488
LDLc	114 ± 43,9	125 ± 38,6	122 ± 29,4	0,497
TG	173 ± 127,8	164 ± 124,0	142 ± 98,4	0,541
VLDLc	31 ± 20,4	29 ± 17,4	26 ± 16,0	0,566
Não-HDLc	148 ± 55,1	155 ± 43,1	147 ± 35,5	0,488
APOA-I	152 ± 35,7	149 ± 36,0	144 ± 35,8	0,623
APOB	74 ± 20,1	73 ± 15,5	72 ± 16,4	0,854
APOB/APOA-I	0,51 ± 0,15	0,51 ± 0,12	0,53 ± 0,16	0,763
Lp(a)	19 ± 13,1	23 ± 24,0	18 ± 19,3	0,288
PCRus	3,4 ± 2,9	3,0 ± 3,2	2,4 ± 2,0	0,308

Os parâmetros bioquímicos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. Grupo E2 (genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$). Grupo E3 (genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$). Grupo E4 (genótipos $\epsilon 3\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. p = diferenças entre os agrupamentos E2, E3 e E4.

5.4.2 – Polimorfismo *APOA5* -1131T>C: freqüências alélicas, genótípicas e associações de parâmetros lipídicos com os agrupamentos T e C

A **Figura 5** apresenta o gel de eletroforese com os fragmentos diagnósticos utilizados para a identificação genotípica do polimorfismo *APOA5* -1131T>C.

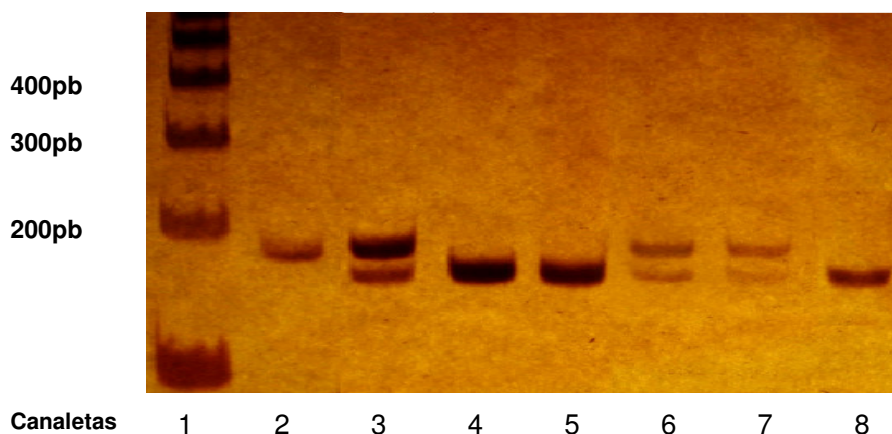


Figura 5 - Eletroforese, em gel de poliacrilamida a 8% corado pela prata, dos produtos de PCR do fragmento de 187pb do gene *APOA5*. Canaleta 1 - padrão de peso molecular (1kb); canaleta 2 - genótipo CC; canaletas 3, 6 e 7 - genótipo TC; canaletas 4, 5 e 8 - genótipo TT.

Para todos os participantes, reunidos em um único grupo, foram calculadas as freqüências alélicas e genótípicas para o polimorfismo *APOA5*. As freqüências dos alelos T e C foram de 0,770 e 0,230, respectivamente. Em relação aos genótipos TT, TC e CC as freqüências encontradas foram de 57,2%, 39,5% e 3,3%, respectivamente.

Os outros dados referentes aos resultados das análises moleculares são apresentados nas **Tabelas 16, 17, 18, 19, 20 e 21** como número de indivíduos (n) e porcentagens das freqüências dos alelos e dos genótipos *APOA5* observadas nos indivíduos dos grupos normolipêmico e dislipidêmico. Uma participante do grupo dislipidêmico não foi genotipada devido a problemas inerentes à amostra de DNA. Todas as distribuições genótípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 16 – Freqüência dos alelos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos estudados

Alelo	Normolipêmico (n=107)		Dislipidêmico (n=108)		p	OR	IC 95%
	n	Freqüência	n	Freqüência			
T	175	0,818	156	0,722	0,019	0,579	0,368-0,914
C	39	0,182	60	0,278	0,019	1,726	1,095-2,721
Total	214		216				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os alelos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$. OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 17 – Freqüência dos alelos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos estudados para o sexo masculino

Alelo	Normolipêmico Sexo Masculino (n=44)		Dislipidêmico Sexo Masculino (n=68)		p	OR	IC 95%
	n	Freqüência	n	Freqüência			
T	74	0,841	98	0,721	0,037	0,488	0,249-0,959
C	14	0,159	38	0,279	0,037	2,050	1,042-4,023
Total	88		136				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os alelos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$. OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 18 – Frequência dos alelos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos estudados para o sexo feminino

Alelo	Normolipêmico		Dislipidêmico		p	OR	IC 95%
	Sexo Feminino		Sexo Feminino				
	n	Frequência	n	Frequência			
T	101	0,802	58	0,725	0,202	0,653	0,340-1,253
C	25	0,198	22	0,275	0,202	1,532	0,798-2,943
Total	126		80				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os alelos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$. OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 19 – Frequência dos genótipos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos estudados

Genótipos	Normolipêmico		Dislipidêmico		p	OR	IC 95%
	(n=107)		(n=108)				
	n	Frequência	n	Frequência			
TT	71	66,4	52	48,2	0,007	0,471	0,272-0,815
TC	33	30,8	52	48,2	0,009	2,082	1,195-3,628
CC	3	2,8	4	3,6	1,0*	1,333	0,325-5,458
Total	107		108				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os genótipos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$. OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%. (*) p corrigido de acordo com o teste de Fisher (n<15).

Tabela 20 – Frequência dos genótipos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos estudados para o sexo masculino

Genótipos	Normolipêmico		Dislipidêmico		p	OR	IC 95%
	Sexo Masculino		Sexo Masculino				
	n	Freqüência	n	Freqüência			
TT	30	68,2	32	47,1	0,028	0,415	0,189-0,911
TC	14	31,8	34	50,0	0,058	2,143	0,976-4,698
CC	0	0	02	2,9	-	-	-
Total	44		68				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os genótipos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$. OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 21 – Frequência dos genótipos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos estudados para o sexo feminino

Genótipos	Normolipêmico		Dislipidêmico		p	OR	IC 95%
	Sexo Feminino		Sexo Feminino				
	n	Freqüência	n	Freqüência			
TT	41	65,1	20	50,0	0,129	0,537	0,241-1,196
TC	19	30,2	18	45,0	0,126	1,895	0,838-4,287
CC	03	4,7	02	5,0	1,000*	10,53	0,201-5,554
Total	63		40				

Os dados estão representados como número de participantes e a porcentagem de indivíduos que apresentaram os genótipos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$. OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%. (*) p corrigido de acordo com o teste de Fisher ($n < 15$).

As **Tabelas 22** e **23** apresentam os dados dos parâmetros bioquímicos e os agrupamentos T (composto pelo genótipo TT) e C (constituído pelos genótipos TC e CC) do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos normolipêmico e dislipidêmico e entre todos os participantes estudados, respectivamente.

Tabela 22 – Parâmetros bioquímicos e agrupamentos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos normolipêmico e dislipidêmico

<i>APOA5 -1131T>C</i>				
	Grupos	Agrupamento T	Agrupamento C	p
CT	Normolipêmico	181 ± 20,7	178 ± 23,7	0,447
	Dislipidêmico	223 ± 42,2	232 ± 43,4	0,256
HDLc	Normolipêmico	57 ± 12,5	57 ± 15,5	0,893
	Dislipidêmico	46 ± 14,1	46 ± 14,1	0,873
LDLc	Normolipêmico	104 ± 18,7	101 ± 18,9	0,413
	Dislipidêmico	144 ± 39,3	146 ± 41,5	0,785
TG	Normolipêmico	101 ± 39,9	99 ± 39,9	0,789
	Dislipidêmico	212 ± 144,7	226 ± 137,5	0,383
VLDLc	Normolipêmico	20 ± 8,0	20 ± 8,0	0,789
	Dislipidêmico	35 ± 18,7	40 ± 21,1	0,141
Não-HDLc	Normolipêmico	125 ± 21,1	121 ± 21,1	0,420
	Dislipidêmico	177 ± 37,6	186 ± 39,8	0,241
APOA-I	Normolipêmico	166 ± 28,0	165 ± 22,1	0,778
	Dislipidêmico	128 ± 36,4	132 ± 35,2	0,547
APOB	Normolipêmico	74 ± 12,1	73 ± 14,5	0,488
	Dislipidêmico	69 ± 18,1	74 ± 19,0	0,168
APOB/APOA-I	Normolipêmico	0,46 ± 0,10	0,44 ± 0,09	0,468
	Dislipidêmico	0,56 ± 0,13	0,58 ± 0,15	0,393
Lp(a)	Normolipêmico	22 ± 22,4	17 ± 15,4	0,394
	Dislipidêmico	25 ± 28,8	22 ± 18,6	0,685
PCRus	Normolipêmico	2,8 ± 2,7	3,2 ± 3,0	0,456
	Dislipidêmico	3,0 ± 3,4	2,7 ± 2,9	0,789

Os parâmetros bioquímicos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. Os grupos normolipêmico (n = 107) e dislipidêmico (n = 108) compostos pelos agrupamentos T (normolipêmico, n = 71 e dislipidêmico, n = 52), e C (normolipêmico, n = 36 e dislipidêmico, n = 56). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. p = diferenças entre os agrupamentos T e C.

Tabela 23 – Parâmetros bioquímicos e agrupamentos T e C do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* entre todos os participantes estudados

	Agrupamento T (n=123)	Agrupamento C (n=92)	p
CT	199 ± 37,6	211 ± 45,4	0,046
HDLc	52 ± 14,2	51 ± 15,5	0,425
LDLc	120 ± 34,4	128 ± 40,5	0,138
TG	148 ± 112,8	176 ± 126,1	0,049
VLDLc	26 ± 15,0	32 ± 19,7	0,022
Não-HDLc	147 ± 39,1	161 ± 46,3	0,019
APOA-I	150 ± 36,9	145 ± 34,5	0,296
APOB	72 ± 15,1	74 ± 17,3	0,543
APOB/APOA-I	0,50 ± 0,12	0,53 ± 0,15	0,150
Lp(a)	23 ± 25,2	20 ± 17,5	0,882
PCRus	2,9 ± 3,0	2,9 ± 2,9	0,822

Os parâmetros bioquímicos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. O grupo contendo todos os participantes (n = 215) composto pelos agrupamentos T (genótipo TT) e C (genótipos TC e CC). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. p = diferenças entre os agrupamentos T e C.

5.4.3 – Associação entre os polimorfismos *APOE* e *APOA5 -1131T>C*

Para a avaliação da associação entre os polimorfismos *APOE* e *APOA5 -1131T>C* foram consideradas as combinações entre os agrupamentos E2 (genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$) e E4 (genótipos $\epsilon 3\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$) *APOE* e os genótipos TT, TC e CC *APOA5*, nos grupos normolipêmico e dislipidêmico. As seguintes combinações entre os dois polimorfismos foram avaliadas: E2+TT, E2+TC e E2+CC (**Tabela 24**); agrupamentos E4+TT, E4+TC e E4+CC (**Tabela 25**).

Tabela 24 – Associação entre o alelo $\epsilon 2$ *APOE* e os genótipos *APOA5* nos grupos estudados

Grupos	Normolipêmico	Dislipidêmico	p	OR	IC 95%
	(n=9)	(n=10)			
E2+TT	04	04	1,000*	0,833	0,143-4,838
E2+TC	03	05	0,650*	2,000	0,333-11,865
E2+CC	02	01	0,582*	0,389	0,043-3,779
Total	9	10			

Os dados estão representados pelo número de participantes no agrupamento E2 (genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$) associado aos genótipos TT, TC e CC nos grupos estudados. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$, (*) p corrigido de acordo com o teste de Fisher ($n < 15$). OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

Tabela 25 – Associação entre o alelo $\epsilon 4$ *APOE* e os genótipos *APOA5* nos grupos estudados

Grupos	Normolipêmico	Dislipidêmico	p	OR	IC 95%
	(n=26)	(n=22)			
E4+TT	18	10	0,096	0,370	0,116-1,187
E4+TC	08	12	0,096	2,700	0,843-8,652
E4+CC	0	0	-	-	-
Total	26	22			

Os dados estão representados com o número de participantes no agrupamento E4 (genótipos $\epsilon 3\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$) associado aos genótipos TT, TC e CC nos grupos estudados. Valor de p calculado por teste qui-quadrado e considerado significativo quando $< 0,05$. OR = *Odds ratio*; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%.

5.5 – PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS

Os resultados das análises dos parâmetros hemostáticos encontram-se na **Tabela 26**, onde os dados da análise de variância (ANOVA) estão representados nas colunas por: grupos (normolipêmico e dislipidêmico), sexos (feminino e masculino), faixas etárias (inferior ou igual a 45 anos e superior a 45 anos) e interações entre os mesmos. As interações analisadas foram: grupos vs sexos, grupos vs faixas etárias, sexos vs faixas etárias e grupos vs sexos vs faixas etárias. Quando houveram diferenças significativas entre as interações, os dados foram apresentados em tabelas separadamente, onde somente as interações foram discutidas. As variáveis, estão apresentadas com os valores das médias e dos desvios padrão.

Tabela 26 – Análises dos parâmetros hemostáticos entre os grupos, sexos, faixas etárias e interações

	Grupo		Sexo		Faixa etária		Interações
	Normolipêmico	Dislipidêmico	Feminino	Masculino	≤ 45 anos	> 45 anos	
	(n=107)	(n=109)	(n=104)	(n=112)	(n= 68)	(n=148)	
HCY	11,1 ± 2,5	11,3 ± 3,2	9,9 ± 2,2	12,5 ± 2,9***	10,6 ± 3,3	11,5 ± 2,6**	ns
TM	3,1 ± 1,0	3,2 ± 0,8	3,2 ± 0,9	3,1 ± 0,9	3,1 ± 0,8	3,2 ± 0,9	G vs S*
F1 + 2	207,9 ± 106,1	215,5 ± 85,7	234,5 ± 108,5	190,6 ± 77,9**	177,3 ± 70,5	227,6 ± 102,3**	ns
D-Di	263,4 ± 129,6	231,2 ± 119,4	280,3 ± 111,5	216,4 ± 129,9**	239,9 ± 135,9	250,5 ± 120,4	ns
PAI-1	55,0 ± 25,8	68,6 ± 105,2	54,8 ± 27,0	68,5 ± 103,6	72,6 ± 131,9	56,9 ± 26,0	ns
TAFI	7,4 ± 1,5	8,9 ± 1,6***	7,9 ± 1,8	8,4 ± 1,6	8,0 ± 1,9	8,2 ± 1,6	G vs S**

Os parâmetros hemostáticos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. ns = não significativo, * p < 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 entre grupos, sexos, faixas etárias e interações. Interações: Grupo (G), Sexo (S) e Faixa etária (F). *Versus* = vs.

Tabela 27 – Trombomodulina: Interações grupos *versus* sexos

Trombomodulina	Feminino (n=104)	Masculino (n=112)
Normolipêmico (n=107)	3,0 ^{aA}	3,2 ^{aA}
Dislipidêmico (n=112)	3,5 ^{aB}	3,1 ^{aA}

Os valores representados são as médias de trombomodulina entre os grupos e sexos estudados. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si significativamente ao nível de $p < 0,05$ pelo teste de SNK. Letras minúsculas referem-se à comparação em colunas. Letras maiúsculas referem-se à comparação em linha.

Tabela 28 – TAFI: Interações grupos *versus* sexos

TAFI	Feminino (n=104)	Masculino (n=112)
Normolipêmico (n=107)	7,0 ^{aA}	8,1 ^{bA}
Dislipidêmico (n=109)	9,0 ^{aB}	8,6 ^{aA}

Os valores representados são as médias do TAFI entre os grupos e sexos estudados. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si significativamente ao nível de $p < 0,05$ pelo teste de SNK. Letras minúsculas referem-se à comparação em colunas. Letras maiúsculas referem-se à comparação em linha.

5.5.1 – Correlações de Pearson

As **Tabelas 29** e **30** apresentam a correlação de Pearson entre os parâmetros hemostáticos entre si e entre estes e os parâmetros bioquímicos, respectivamente.

Tabela 29 – Correlação de Pearson entre os parâmetros hemostáticos

	HCY	F1+2	PAI-1	TAFI	D-Di	TM
HCY	-	-0,015	-0,059	0,018	-0,051	0,069
F1+2	-0,015	-	-0,007	0,129	0,212**	0,077
PAI-1	-0,059	-0,007	-	0,002	0,013	0,010
TAFI	0,018	0,129	0,002	-	0,075	0,178**
D-Di	-0,051	0,212**	0,013	0,075	-	0,123
TM	0,069	0,077	-0,010	0,178**	0,123	-

n = 216. Coeficiente de correlação e * p < 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 entre os parâmetros hemostáticos

Tabela 30 – Correlação de Pearson entre os parâmetros hemostáticos e bioquímicos

	CT	HDLc	LDLc	TG	VLDLc	Não-HDLc	APOA-I	APOB	APOB/APOA	Lp(a)	PCR-us
HCY	0,143*	-0,092	0,090	0,104	0,192	0,170	0,009	0,319***	0,242**	-0,040	0,003
F1+2	0,078	0,058	0,048	0,093	0,056	0,056	-0,001	-0,008	0,016	0,069	0,033
PAI-1	-0,007	-0,138*	-0,047	0,163*	0,206**	0,041	-0,105	0,001	0,103	-0,072	0,141*
TAFI	0,199**	-0,278***	0,199**	0,346***	0,267**	0,289***	-0,491***	0,246**	0,282***	0,076	0,070
D-Di	-0,109	0,019	-0,033	-0,171*	-0,170*	-0,112	-0,065	-0,158*	-0,073	0,017	0,154
TM	0,029	-0,140*	0,079	0,054	0,043	0,076	-0,102	0,010	0,107	-0,025	-0,010

n = 216. Coeficiente de correlação e * p < 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 entre os parâmetros hemostáticos e bioquímicos

5.5.2 – Parâmetros hemostáticos entre os agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo *APOE*

As Tabelas 31 e 32 apresentam os dados dos parâmetros hemostáticos e os agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo *APOE* nos grupos normolipêmico e dislipidêmico e entre todos os participantes do estudo, respectivamente.

Tabela 31 – Parâmetros hemostáticos e agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo *APOE* nos grupos normolipêmico e dislipidêmico

		Agrupamentos <i>APOE</i>			
	Grupos	E2 (n=19)	E3 (n=149)	E4 (n=48)	p
HCY	Normolipêmico	11,3 ± 2,9	11,1 ± 2,5	11,3 ± 2,5	0,929
	Dislipidêmico	11,5 ± 2,3	11,5 ± 3,5	10,6 ± 2,6	0,477
TM	Normolipêmico	3,1 ± 0,8	3,2 ± 1,0	2,8 ± 0,8	0,103
	Dislipidêmico	3,2 ± 0,7	3,2 ± 0,8	3,2 ± 0,8	0,990
F1 + 2	Normolipêmico	211,0±129,5	218,6±114,2	176,9 ±63,5	0,123
	Dislipidêmico	188,5 ±63,4	222,5 ± 87,2	203,4 ±88,5	0,387
D-Di	Normolipêmico	263,9±128,6	262,5±106,1	265,8±184,1	0,814
	Dislipidêmico	232,3±152,3	235,6±118,0	215,0±112,1	0,870
PAI-1	Normolipêmico	67,4 ± 16,9	54,9 ± 26,8	50,9 ± 25,0	0,154
	Dislipidêmico	50,3 ± 23,9	73,9 ± 123,8	58,4 ± 28,1	0,614
TAFI	Normolipêmico	7,3 ± 1,3	7,5 ± 1,5	7,2 ± 1,6	0,646
	Dislipidêmico	9,5 ^a ± 2,1	9,0 ^{ab} ± 1,6	8,3 ^b ± 1,0	p<0,05

Os parâmetros hemostáticos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. Os grupos normolipêmico (n = 107) e dislipidêmico (n = 109). Agrupamento E2 (genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$) (normolipêmico, n = 9 e dislipidêmico, n = 10). Agrupamento E3 (genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$) (normolipêmico, n = 72 e dislipidêmico, n = 77). Agrupamento E4 (genótipos $\epsilon 3\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$) (normolipêmico, n = 26 e dislipidêmico, n = 22). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. p = diferença entre os agrupamentos E2, E3 e E4. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si significativamente ao nível de $p < 0,05$ pelo teste de SNK.

Tabela 32 – Parâmetros hemostáticos e agrupamentos E2, E3 e E4 do polimorfismo *APOE* entre todos os participantes do estudo

	E2 (n=19)	E3 (n=149)	E4 (n=48)	p
HCY	11,4 ± 2,5	11,3 ± 3,0	11,0 ± 2,5	0,740
TM	3,2 ± 0,8	3,2 ± 0,9	3,0 ± 0,8	0,188
F1 + 2	199,2 ± 97,9	220,6 ± 100,8	189,1 ± 76,3	0,059
D-Di	247,3 ± 138,6	248,6 ± 112,9	242,5 ± 155,9	0,779
PAI-1	58,4 ± 22,2	64,7 ± 91,2	54,4 ± 26,4	0,669
TAFI	8,5 ± 2,1	8,3 ± 1,7	7,7 ± 1,5	0,094

Os parâmetros hemostáticos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. Agrupamento E2 (genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$). Agrupamento E3 (genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$). Agrupamento E4 (genótipos $\epsilon 3\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. p = diferenças entre os agrupamentos E2, E3 e E4.

5.5.3 – Parâmetros hemostáticos entre os agrupamentos T e C do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*

As Tabelas 33 e 34 apresentam os dados dos parâmetros hemostáticos e os agrupamentos T (genótipo TT) e C (genótipos TC e CC) do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos grupos normolipêmico e dislipidêmico e entre todos os participantes do estudo, respectivamente.

Tabela 33 – Parâmetros hemostático e agrupamentos T e C do polimorfismo *APOA5 - 1131T>C* nos grupos normolipêmico e dislipidêmico

<i>APOA5 - 1131T>C</i>				
	Grupos	Agrupamento T	Agrupamento C	p
HCY	Normolipêmico	11,2 ± 2,5	11,0 ± 2,4	0,642
	Dislipidêmico	11,7 ± 3,7	11,0 ± 2,7	0,256
TM	Normolipêmico	3,2 ± 1,1	3,0 ± 0,7	0,499
	Dislipidêmico	3,2 ± 0,8	3,3 ± 0,8	0,665
F1 + 2	Normolipêmico	203,4 ± 87,5	216,6 ± 136,6	0,688
	Dislipidêmico	226,0 ± 99,9	205,4 ± 70,3	0,440
D-Di	Normolipêmico	249,5 ± 112,4	290,8 ± 156,2	0,142
	Dislipidêmico	254,6 ± 128,9	205,1 ± 101,6	0,016
PAI-1	Normolipêmico	55,0 ± 23,8	55,1 ± 29,9	0,634
	Dislipidêmico	78,3 ± 149,7	59,9 ± 27,8	0,951
TAFI	Normolipêmico	7,5 ± 1,4	7,2 ± 1,7	0,302
	Dislipidêmico	9,0 ± 1,6	8,7 ± 1,6	0,375

Os parâmetros hemostáticos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. Os grupos normolipêmico (n = 107) e dislipidêmico (n = 108) compostos pelos agrupamentos T (normolipêmico, n = 71 e dislipidêmico, n = 52), e C (normolipêmico, n = 36 e dislipidêmico, n = 56). Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. p = diferenças entre os agrupamentos T e C.

Tabela 34 – Parâmetros hemostáticos e agrupamentos T e C do polimorfismo *APOA5 - 1131T>C* entre todos os participantes do estudo

	Agrupamento T (n=123)	Agrupamento C (n=92)	p
HCY	11,4 ± 3,1	11,0 ± 2,6	0,273
TM	3,2 ± 1,0	3,2 ± 0,8	0,970
F1 + 2	213,0 ± 93,2	209,8 ± 101,0	0,909
D-Di	251,7 ± 119,2	238,7 ± 131,9	0,188
PAI-1	64,9 ± 99,1	58,0 ± 28,7	0,887
TAFI	8,2 ± 1,6	8,1 ± 1,8	0,961

Os parâmetros hemostáticos estão representados pelas médias e pelos desvios padrão. O grupo contendo todos os participantes (n = 215) composto pelos agrupamentos T e C. Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste Student-Newman-Keuls. p = diferenças entre os agrupamentos T e C.

6-DISCUSSÃO

6.1 – CARACTERIZAÇÃO E FATORES DE RISCO DOS GRUPOS ESTUDADOS

O presente estudo envolvendo indivíduos dislipidêmicos de ambos os sexos, e não em uso de tratamento hipolipemiante, e indivíduos normolipêmicos, avaliou a presença de fatores de risco cardiovascular e o efeito dos polimorfismos *APOE* e *APOA5* nas concentrações de lípides e lipoproteínas e nos níveis dos parâmetros hemostáticos. A caracterização dos grupos normolipêmico e dislipidêmico, quanto aos fatores de risco cardiovascular, demonstrou diferença significativa apenas para o IMC e hipertensão arterial entre os dois grupos. A hipertensão arterial e o sobrepeso foram mais freqüentes entre os pacientes dislipidêmicos (**Tabela 2**). Da mesma forma, quando os participantes dos dois grupos foram distribuídos por sexo (**Tabelas 3 e 4**) observou-se maior IMC, na faixa de sobrepeso, e pressão arterial mais elevada tanto em mulheres quanto em homens dislipidêmicos, comparados aos normolipêmicos do mesmo sexo. Para verificar a correlação do IMC com os parâmetros estudados, foi realizada a correlação de Pearson que mostrou alguns coeficientes significativos, porém, todos de baixa magnitude (**Tabela 5**).

O excesso de peso e a dislipidemia aumentam o risco de doenças cardiovasculares ateroscleróticas. Os mecanismos pelos quais o aumento de peso contribui para a elevação da incidência de doenças cardiovasculares são múltiplos, entre estes, as alterações do metabolismo de glicose e lípidos (ARAÚJO *et al.*, 2005).

A importância da hipertensão arterial sistêmica (HAS) como fator de risco cardiovascular, sua prevalência mundial aumentada e o aumento da probabilidade de desfechos circulatórios fatais ou não fatais, quando este fator está associado à dislipidemia, atestam a necessidade do conhecimento de sua ocorrência, assim como, sua correlação com outros possíveis fatores potencialmente desencadeantes de eventos cardiocirculatórios (JARDIM *et al.*, 2007). No presente estudo, além de um significativo aumento de HAS entre os grupos normolipêmico e dislipidêmico, neste último grupo, foi observada uma prevalência de HAS de 25% em homens (**Tabela 3**) e 31,7% em mulheres (**Tabela 4**). Vale a pena ressaltar que desde a década de 1990, em diversos estudos regionais com a população geral, baseando-se como ponto de corte os valores de 140/90 mmHg, a prevalência da HAS vem se mantendo em torno desse percentual (MATOS *et al.*, 2004; JARDIM *et al.*, 2007; NUNES FILHO *et al.*, 2007). Os medicamentos mais utilizados pelos participantes do presente estudo foram os anti-hipertensivos, em reflexo da importante prevalência de hipertensão, especialmente no grupo dislipidêmico. Neste grupo, o uso de beta-bloqueadores, diuréticos tiazídicos e inibidores da enzima conversora de angiotensina foi significativamente mais elevado quando comparado ao grupo normolipêmico (**Tabela 6**). Em pacientes com hipertensão moderada ou grave, é freqüentemente possível controlar a pressão sem produzir efeitos colaterais, como alterações do metabolismo de lípidos, através da combinação de doses reduzidas de diferentes fármacos com mecanismos de ação

complementares, em lugar de aumentar a dose de um único agente, cuja eficácia é freqüentemente limitada pelos mecanismos hemostáticos (RANG *et al.*, 2004). Como a dislipidemia está freqüentemente associada à HAS e também é um forte preditor de risco para DAC, é válido assumir que fármacos anti-hipertensivos não devam trazer efeitos indesejáveis ao perfil lipídico (ALVES *et al.*, 2004).

Neste estudo observou-se, também, que cerca de 50% dos participantes praticavam exercícios físicos pelo menos três vezes por semana durante 40 minutos. A prática de exercício foi similar nos grupos normolipêmico e dislipidêmico, inclusive quando os participantes são agrupados por sexo. Sabe-se que o estilo de vida sedentário é um fator de risco que concorre para o desenvolvimento da placa aterosclerótica (PRADO & DANTAS, 2002). Atualmente, o exercício físico é considerado um grande aliado no combate às dislipidemias, por promover um melhor funcionamento dos processos enzimáticos envolvidos no metabolismo lipídico (PRADO & DANTAS, 2002).

Quanto à variável tabagismo, foi observado neste estudo prevalência similar de comportamento quanto ao uso de cigarros entre normolipêmicos e dislipidêmicos (**Tabela 2**), inclusive quando estes foram separados com relação ao sexo (**Tabelas 3 e 4**).

O consumo de cigarros constitui um fator de risco independente bem estabelecido, tanto em homens quanto em mulheres, no que se refere às doenças cardiovasculares. A prevalência de tabagismo nos grupos avaliados foi semelhante àquelas descritas em outros estudos realizados em áreas urbanas do Brasil (MATOS *et al.*, 2004; VIEBIG *et al.*, 2006; NUNES FILHO *et al.*, 2007). O tabagismo na formação e na evolução da placa aterosclerótica é capaz de produzir lesões endoteliais de forma direta, induzindo a uma maior oxidação da LDL, com redução da produção de HDL (VAPAATALO & MERVAALA, 2001; CANTOS *et al.*, 2004).

Estudos prévios já demonstraram que a ingestão de álcool pode afetar o metabolismo lipoprotéico em diferentes vias metabólicas (SIMONSSON *et al.*, 2007). Embora o consumo leve ou moderado de álcool, tenha sido relacionado à proteção contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e mortalidade, o risco dessas doenças é maior quando o consumo de álcool é alto. O efeito cardioprotetor atribuído ao consumo regular de álcool em doses moderadas tem sido devido à elevação dos níveis de HDLc e APOA-I, bem como à capacidade de reduzir a agregação plaquetária ou ao papel antioxidante de substâncias contidas em bebidas alcoólicas. O efeito maléfico do alto consumo de álcool no perfil lipídico pode ser atribuído ao aumento nos níveis de TG plasmáticos (RUIXING *et al.*, 2007; SIMONSSON *et al.*, 2007).

A maioria dos participantes avaliados neste trabalho relatou não consumir bebidas alcoólicas habitualmente. A distribuição de etilismo foi semelhante nos dois grupos (**Tabela 2**), bem como entre homens normolipêmicos e dislipidêmicos (**Tabela 3**). Foi observado um

menor consumo de bebidas alcoólicas entre as mulheres, especialmente quando se avalia os indivíduos dislipidêmicos agrupados por sexo (**Tabelas 3 e 4**). Um problema com relação ao consumo de álcool foi calcular as doses ingeridas diariamente ou semanalmente (gramas de álcool), devido à dificuldade de quantificação por parte dos participantes. Dessa forma, embora tenha sido encontrado 10,3% de consumidores diários de álcool entre os indivíduos dislipidêmicos do sexo masculino (**Tabela 3**), é possível que o consumo de bebidas alcoólicas esteja subestimado. Além disso, não foi possível o acesso a maioria dos resultados das provas de função hepática dos participantes, para referendar o alcoolismo.

No presente estudo, quando as mulheres foram avaliadas com relação à menopausa foi observado que mais da metade daquelas do grupo com dislipidemia (53,7%) se encontravam nessa condição, número significativamente maior em relação ao grupo normolipêmico. Quanto ao uso de anticoncepcionais e terapia hormonal, os dados foram similares entre as mulheres dos grupos normolipêmico e dislipidêmico.

Sabe-se, que mulheres na fase pré-menopausa apresentam menor incidência de eventos ateroscleróticos em comparação aos homens. Essa diferença é reduzida depois da menopausa, a qual é decorrente de alterações hormonais que acompanham a menopausa, particularmente por diminuição dos níveis plasmáticos do hormônio estrogênio, o qual exerce um grande impacto fisiológico (MATURANA *et al.*, 2007).

Apesar da análise de alguns fatores de risco clássicos para as doenças cardiovasculares, outras variáveis sabidamente importantes não foram consideradas nesta discussão, devido à falta de informações completas e confiáveis nas fichas clínicas dos pacientes. Dentre outros fatores importantes podem-se citar o tipo de dieta, a circunferência abdominal e a medida da gordura corporal, a qual é considerada atualmente como avaliação mais adequada da morfologia corporal do que a medida do IMC.

6.2 – PERFIL LIPÍDICO E APOLIPOPROTEÍNAS

A análise da **Tabela 7** mostra que as concentrações dos parâmetros do perfil lipídico convencional (CT, HDLc, LDLc e TG) foram diferentes entre os grupos normolipêmico e dislipidêmico. Esses resultados eram esperados em virtude do próprio desenho do estudo, onde foram considerados dislipidêmicos os indivíduos que apresentaram níveis aumentados de CT, LDLc e TG e níveis diminuídos de HDLc, de acordo com as recomendações das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2001).

Os dados apresentados na **Tabela 7** demonstram diferenças em alguns parâmetros bioquímicos estudados, quando avaliados por sexo. Os níveis de HDLc e APOA-I foram maiores em indivíduos do sexo feminino, enquanto os parâmetros TG, VLDLc, APOB e índice APOB/APOA-I, se apresentaram mais elevados nos indivíduos do sexo masculino. Dados semelhantes foram obtidos por BARBAGALLO *et al.*, (2001) e FIEGENBAUM *et al.*,

(2007), os quais justificaram estes resultados pela influência de hormônios esteróides, uso de contraceptivo oral e terapia de reposição hormonal no metabolismo das lipoproteínas além do estilo de vida e hábito de fumar.

A determinação da concentração de LDLc desempenha um importante papel na avaliação do risco cardiovascular e no controle clínico de pacientes (TREMBLAY *et al.*, 2005). Recentemente várias pesquisas foram realizadas, na tentativa de adicionar às avaliações tradicionais do perfil lipídico as determinações de APOB, APOA-I e cálculo do índice APOB/APOA-I, que foram destacados como eficientes marcadores de eventos cardiovasculares futuros (SCHMIDT & FAGERBERG, 2008).

Vários trabalhos demonstraram a superioridade da determinação da APOB como preditor de probabilidade de eventos cardiovasculares (SNIDERMAN & ROSENBLOOM, 2005). Curiosamente, o presente estudo, apesar de detectar diferentes níveis de LDLc e TG entre os grupos estudados, não observou diferenças nas concentrações de APOB. Como a determinação da APOB está associada ao número de partículas lipoproteicas aterogênicas que contêm a molécula de APOB em sua estrutura, seria de se esperar diferentes valores das médias entre indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos. Foi atribuído a APOA-I a capacidade de avaliar o número de partículas antiaterogênicas, por ser a principal apolipoproteína constituinte da HDLc. Uma forte correlação inversa entre as concentrações de HDLc, APOA-I e risco de doenças cardiovasculares foram relatadas na literatura (DULLENS *et al.*, 2007; WALLDIUS & JUNGNER, 2007) Nos resultados ora apresentados, os níveis HDLc e APOA-I foram mais elevados no grupo normolipêmico, bem como nas mulheres (**Tablela 7**).

Quando se considera apenas as concentrações de APOB e APOA-I em relação à discriminação de indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos, não foi observado nenhum benefício adicional em comparação às determinações do perfil lipídico tradicional, apesar do metabolismo das apolipoproteínas estar intimamente associado com o desenvolvimento da aterosclerose. Por outro lado, foi observado que o índice APOB/APOA-I foi mais elevado no grupo dislipidêmico (0,57) (**Tabela 7**), porém com valor inferior aos índices sugeridos em outros estudos em relação ao risco cardiovascular (WALLDIUS *et al.*, 2006; SCHMIDT & FAGERBERG 2008).

O índice APOB/APOA-I tem se apresentado como um parâmetro adicional e importante na predição de eventos cardiovasculares e prognóstico, sendo atualmente considerado superior aos lípides, lipoproteínas e índices lipídicos convencionais (WALLDIUS & JUNGNER, 2007; HOLME *et al.*, 2008). Vários autores têm sugerido pontos de corte para o índice APOB/APOA-I (WALLDIUS *et al.*, 2004; MEISINGER *et al.*, 2005; WALLDIUS *et al.*, 2006). Recentemente, SCHMIDT & FAGERBERG (2008) sugeriram que indivíduos com índice APOB/APOA-I superiores a 0,63 têm o risco aumentado de

desenvolvimento de placas ateroscleróticas nas artérias carótidas e femoral. Como o processo aterosclerótico é insidioso e se inicia na infância, havendo a necessidade de maior conhecimento sobre o mecanismo relacionado a sua longa fase silenciosa que precede o aparecimento dos eventos clínicos (SCHMIDT & FAGERBERG, 2008), torna-se necessário estudos adicionais para ampliar o uso do índice APOB/APOA-I em diferentes populações e nas várias patologias ateroscleróticas. Estes novos dados sobre o índice APOB/APOA-I poderão contribuir para maior padronização e melhor interpretação desse parâmetro como marcador de risco cardiovascular, podendo assim ampliar sua determinação nas condutas de prevenção da aterosclerose.

Finalmente, a análise dos parâmetros bioquímicos em relação às faixas etárias, inferior ou igual a 45 anos e superior a 45 anos, demonstrou dados semelhantes para todos os parâmetros lipídicos, bem como para a PCRus. Além disso, também não foram observadas interações significativas entre grupos, sexos e faixas etárias em relação às variáveis estudadas (**Tabela 7**).

6.3 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E APOLIPOPROTEÍNA E

6.3.1 – Distribuição da frequência dos alelos e genótipos *APOE*

A frequência dos alelos *APOE* é altamente heterogênea entre as diversas populações estudadas (FUZIKAWA *et al.*, 2007). Sob o ponto de vista clínico, a identificação da presença do alelo $\epsilon 4$ é importante devido a sua associação com elevados níveis de LDLc (BERTOLINI *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2008a), com o risco de doenças cardiovasculares (COUDERC *et al.*, 1998) e doença de Alzheimer (IRIE *et al.*, 2008). A ocorrência do alelo $\epsilon 4$ pode, portanto, contribuir para a variação de risco dessas doenças entre as diferentes populações (BARBAGALLO *et al.*, 2001; SVOBODOVÁ *et al.*, 2007).

No presente estudo, a distribuição dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ foi homogênea entre os grupos (**Tabela 8**), e não variou entre os indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos avaliados por sexo (**Tabelas 9 e 10**). Não foram observadas associações entre a presença dos alelos *APOE* e risco de desenvolvimento de dislipidemias (**Tabela 8**), inclusive quando avaliado por sexo (**Tabelas 9 e 10**). O alelo $\epsilon 3$ foi detectado com maior frequência na população avaliada, o que está de acordo com estudos prévios que revelam que este alelo é o mais comum em todo o mundo (BARBAGALLO *et al.*, 2001; PITSAVOS *et al.*, 2005; FUZIKAWA *et al.*, 2007; GIASSAKIS *et al.*, 2007; GRÖNROOS *et al.*, 2007; GRANÉR *et al.*, 2008).

Em relação aos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$, a literatura mostra diferenças na sua distribuição em populações distintas. Estudos realizados na Europa, correlacionam a região norte com uma alta frequência do alelo $\epsilon 4$ e a região sul com uma baixa frequência (BARBAGALLO *et al.*, 2001; PITSAVOS *et al.*, 2005; GRÖNROOS *et al.*, 2007; GRANÉR *et al.*, 2008), apontando

o efeito da menor frequência do alelo $\epsilon 4$ como fator cardioprotetor na população mediterrânea. As frequências mais elevadas do alelo $\epsilon 4$ foram descritas na Finlândia (GRÖNROOS *et al.*, 2007; GRANÉR *et al.*, 2008; GRÖNROOS *et al.*, 2008), Tunísia (SAIDI *et al.*, 2007), Mongólia (SVOBODOVÁ *et al.*, 2007) e nativos da América do Sul (ANDRADE *et al.*, 2000). O alelo $\epsilon 2$ é o menos freqüente (MALAVAZI *et al.*, 2004; RAYGANI *et al.*, 2006; LEIVA *et al.*, 2007), sendo completamente ausente em certas populações, particularmente em várias tribos indígenas da América do Sul (ANDRADE *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados em várias regiões do Brasil, demonstrando uma distribuição similar entre os alelos *APOE*, comparados aos dados da literatura para diferentes populações. Na região sul, FIEGENBAUM *et al.* (2007) avaliaram 673 indivíduos saudáveis descendentes de europeus no Rio Grande do Sul. As frequências encontradas para os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ foram de 0,052, 0,808 e 0,140, respectivamente. Na região sudeste, FUZIKAWA *et al.* (2007) determinaram a frequência dos alelos *APOE* em 1.408 idosos (idade ≥ 60 anos) na cidade de Bambuí – MG. O alelo mais freqüente foi $\epsilon 3$ (0,800), seguidos pelos alelos $\epsilon 4$ (0,135) e $\epsilon 2$ (0,065). FRANÇA *et al.* (2004) avaliaram 414 crianças saudáveis entre 5 e 15 anos de idade do Hospital Pediátrico de Recife – PE. As frequências dos alelos observadas foram $\epsilon 2$ (0,066), $\epsilon 3$ (0,770) e $\epsilon 4$ (0,170). ANDRADE *et al.* (2000) estudaram o polimorfismo *APOE* em algumas tribos da América do Sul, encontrando uma distribuição altamente heterogênea dos alelos *APOE* com um predomínio do alelo $\epsilon 3$ (0,51 a 0,98), seguida dos alelos $\epsilon 4$ (0 a 0,47) e $\epsilon 2$ (0 a 0,04).

No presente estudo, quando foram analisadas as frequências dos genótipos *APOE* entre os grupos e sexos, observou-se que o genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ foi o mais freqüente, seguido dos genótipos $\epsilon 3\epsilon 4$, $\epsilon 2\epsilon 3$ e $\epsilon 4\epsilon 4$. Os genótipos $\epsilon 2\epsilon 2$ e $\epsilon 2\epsilon 4$ não foram detectados entre os participantes (**Tabela 11, 12 e 13**).

Resultados similares foram descritos por MALAVAZI *et al.* (2004) que avaliaram 86 indivíduos infectados pelo HIV-1 atendidos em Araraquara-SP e em outro estudo envolvendo pacientes com acidente vascular cerebral realizado em São José do Rio Preto-SP (SOUZA *et al.*, 2003). A frequência do genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ em indivíduos não portadores de DAC, no estudo realizado também em São José do Rio Preto-SP foi de 2% e de 1% para $\epsilon 4\epsilon 4$ (SOUZA *et al.*, 2007). Em indivíduos dislipidêmicos residentes em Ouro Preto-MG a frequência dos genótipos $\epsilon 2\epsilon 2$ e $\epsilon 4\epsilon 4$ no grupo de pacientes foi de 0% e 1,9%, respectivamente, enquanto no grupo controle $\epsilon 2\epsilon 2$ foi 5,1% e $\epsilon 4\epsilon 4$ foi 3,8% (MENDES-LANA *et al.*, 2007).

Dessa forma, os resultados ora apresentados para a distribuição dos alelos e genótipos *APOE* na população residente na região sudeste do Brasil, se distribuíram de modo semelhante àquelas observadas nas diversas regiões brasileiras e em algumas populações ocidentais, apesar da miscigenação e das diferentes taxas de mortalidade por

doenças cardiovasculares. Levando-se em consideração apenas a presença do alelo $\epsilon 4$ e sua associação com o risco aumentado para aterosclerose e eventos cardiovasculares, os dados do presente estudo não sugerem uma predisposição genética da população residente na região metropolitana de Belo Horizonte-MG, para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em comparação a outras regiões do Brasil.

6.3.2 – Efeito do polimorfismo *APOE* no perfil lipídico

Estudos prévios têm documentado uma associação entre a variação dos níveis de lípidos, lipoproteínas e o polimorfismo *APOE*, em indivíduos normolipêmicos, dislipidêmicos e em portadores de DAC (PEI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007). As variações do gene *APOE* geram substituições dos resíduos de cisteína ou arginina em dois sítios da seqüência de aminoácidos da *APOE3* (posições 112 e 158, respectivamente), formando as isoformas E4 e E2, respectivamente (LUTHRA *et al.*, 2002). Assim, as alterações estruturais na proteína conferem as três isoformas da *APOE* diferentes afinidades pela família dos receptores de LDL, resultando em variações dos níveis de lípidos e lipoproteínas relacionados a um determinado fenótipo *APOE* (BALCERZYK *et al.*, 2007). As isoformas E3 e E4 apresentam uma afinidade alta e similar, enquanto E2 apresenta somente 2% desta afinidade (HATTERS *et al.*, 2006).

O papel das variantes alélicas do gene *APOE* e seus diferentes efeitos no metabolismo das lipoproteínas foi investigado em várias populações, devido a sua correlação com a aterosclerose e o desenvolvimento de eventos cardiovasculares (MENDES-LANA *et al.*, 2007). Estudos epidemiológicos descreveram que o polimorfismo *APOE* determina as concentrações plasmáticas de LDLc influenciando em cerca de 8% a 11% as variações nos níveis de LDLc na população em geral (MOZAS *et al.*, 2003; PITSAVOS *et al.*, 2005) e aproximadamente 7% das variações nos níveis de CT (SOUZA *et al.*, 2007).

Estudos recentes com indivíduos dislipidêmicos têm demonstrado que o polimorfismo *APOE* constitui um fator genético determinante nas variações das concentrações de LDLc em diversas populações (PEI *et al.*, 2006; MENDES-LANNA *et al.*, 2007). O alelo $\epsilon 2$ têm sido associado a concentrações menores de CT e LDLc quando comparado aos alelos $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ (MENDES-LANNA *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2007), enquanto que os portadores do alelo $\epsilon 4$ expressam uma tendência para concentrações mais altas de CT e LDLc do que indivíduos homocigotos $\epsilon 3\epsilon 3$. Além disso, níveis elevados de TG estão associados à presença dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ em diferentes populações (MOOIJAART *et al.*, 2006; BALCERZYK *et al.*, 2007; MENDES-LANA *et al.*, 2007; TOPIC *et al.*, 2008).

Vários mecanismos têm sido propostos para justificar a influência do polimorfismo da *APOE* nas variações dos níveis lipídicos. A presença do alelo $\epsilon 2$, com menor afinidade de

ligação aos receptores de LDL, induziria uma redução da captação hepática de partículas remanescentes de VLDL e quilomícrons, com menor aporte de colesterol para o fígado, gerando uma supra regulação dos receptores específicos. Com o aumento da expressão destes receptores, haveria uma maior captação intracelular de LDL mediada pela ligação da APOB-100 aos receptores de LDL (MINIHANE *et al.*, 2007; MURDOCH *et al.*, 2007). Além de uma maior expressão dos receptores hepáticos de LDL, é atribuída ao alelo $\epsilon 2$ a baixa taxa de conversão de VLDL para LDL e diminuição da absorção intestinal de colesterol (GRÖNROOS *et al.*, 2007; MINIHANE *et al.*, 2007). Neste contexto, indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentariam níveis aumentados de LDLc devido a sua alta afinidade ao receptor de LDL, levando a uma competição entre as partículas ricas em TG contendo a isoforma APOE4 e o LDLc, precedendo o aumento dos níveis de LDLc na circulação devido a sub regulação hepática dos receptores de LDL. Além disso, a presença do alelo $\epsilon 4$ está associada a uma maior eficiência na absorção intestinal do colesterol (GRÖNROOS *et al.*, 2007; MINIHANE *et al.*, 2007; TAVINTHARAN *et al.*, 2007; GRANÉR *et al.*, 2008).

No presente estudo, foram observados níveis significativamente menores de CT, LDLc e da fração não-HDLc no grupo normolipidêmico, associados à presença do alelo $\epsilon 2$. Para os demais parâmetros não foram observados efeitos dos alelos *APOE* nos grupos normolipidêmico e dislipidêmico (**Tabela 14**). Da mesma forma, nos agrupamentos E2, E3 e E4, também não foram observadas associações entre o polimorfismo *APOE* e níveis dos parâmetros bioquímicos avaliados (**Tabela 15**).

De modo semelhante aos dados ora apresentados, AKANJI *et al.* (2007) avaliando indivíduos com DAC e controles saudáveis, observaram que a presença do alelo $\epsilon 2$ exerce um efeito significativo nos níveis de lípides e lipoproteínas circulantes em controles saudáveis, mas não em pacientes com DAC. Embora na literatura já tenha sido descrita a relação do alelo $\epsilon 2$ e risco aterogênico diminuído (GIASSAKIS *et al.*, 2007), este benefício não foi detectado no estudo de AKANJI *et al.* (2007), o que poderia ser justificado, segundo os autores, pela presença de maior quantidade de partículas de LDL pequenas e densas em pacientes com DAC, sugerindo risco aterogênico aumentado comparado com indivíduos saudáveis.

O efeito da presença do alelo $\epsilon 2$, a qual poderia conferir aos seus portadores um perfil lipídico não aterogênico, têm sido descrito em diversos grupos e populações. Em um estudo de acompanhamento de estudantes jovens durante 21 anos, GRÖNROOS *et al.*, (2007) observaram diferenças significativas nos níveis de HDLc, APOA-I e LDLc de acordo com os alelos *APOE*. Jovens portadores do alelo $\epsilon 2$ apresentavam níveis mais elevados de HDLc e APOA-I, em ambos os sexos, e menores níveis de LDLc. Resultados semelhantes também foram encontrados por ARAI *et al.* (2007) que avaliaram 2.267 indivíduos japoneses

saudáveis. Além disso, os autores observaram uma tendência de elevação nos níveis de TG nos indivíduos com o genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ apesar desse valor não ter alcançado diferença significativa, provavelmente pelos níveis de TG serem altamente variáveis.

Como relatado anteriormente, no presente estudo, não foi observada influência do alelo $\epsilon 4$ *APOE* nos níveis dos parâmetros lipídicos avaliados, tanto no grupo normolipidêmico quanto no dislipidêmico (**Tabela 14**), bem como entre todos os indivíduos dos agrupamentos E2, E3 e E4 da *APOE* (**Tabela 15**). Resultados semelhantes foram descritos por PITSAVOS *et al.* (2005), os quais avaliaram a associação dos níveis de lípidos e DAC em pacientes gregos com hipercolesterolemia familiar, não tendo sido observado nenhum efeito significativo do alelo $\epsilon 4$ nas concentrações das variáveis lipídicas nestes indivíduos. A influência do alelo $\epsilon 4$ no perfil lipídico, poderia estar relacionada não somente à variação quantitativa dos níveis lipídicos, mas também à natureza das lipoproteínas. Além disso, se poderia atribuir esta influência às alterações estruturais da isoforma E4 da *APOE*, a qual não possui um grupamento sulfidril, fator de proteção de oxidação e, dessa forma, são depuradas pelos receptores específicos com maior facilidade que lipoproteínas com as isoformas E3 e E2, as quais apresentam um e dois grupos sulfidril, respectivamente (HUMPHRIES *et al.*, 2001; PITSAVOS *et al.*, 2005).

Além de estudos conduzidos com indivíduos dislipidêmicos e pacientes portadores de DAC, grupos de indivíduos saudáveis e de pacientes portadores de outros eventos ateroscleróticos têm sido avaliados com relação aos alelos *APOE*. Em trabalho realizado com 1.176 mulheres dinamarquesas saudáveis, na pós menopausa, foram observados níveis mais elevados de CT, TG, LDLc e APOB entre as portadoras do alelo $\epsilon 4$, além da associação com menor concentração de HDLc (BAGGER *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram descritos em estudo realizado com pacientes da Tunísia que sofreram ataque cardíaco (SAIDI *et al.*, 2007).

SOUZA *et al.* (2007) avaliaram a presença de fatores de risco cardiovascular e o efeito do gene *APOE* no perfil lipídico de indivíduos brasileiros com e sem DAC. Os autores observaram que a presença do alelo $\epsilon 4$ não influenciou significativamente os níveis lipídicos no grupo com DAC, embora esses pacientes apresentassem um perfil aterogênico com níveis reduzidos de HDLc e concentrações mais elevadas de CT, TG e LDLc. Também foi observada nos pacientes com DAC, uma alta frequência de fatores de risco, os quais poderiam ter exercido influência nos valores de lípidos e lipoproteínas neste grupo. Por outro lado, o grupo sem DAC, com frequência reduzida de hipertensão arterial, tabagismo comparado com o grupo com DAC, apresentou níveis de LDLc elevados associados à presença do alelo $\epsilon 4$ comparando se com o alelo $\epsilon 3$.

O presente trabalho com indivíduos dislipidêmicos brasileiros também considerou alguns fatores de risco cardiovascular na avaliação dos resultados. A análise de regressão logística multivariada utilizando-se como variáveis independentes os alelos *APOE* e os fatores de risco cardiovasculares avaliados demonstrou que nenhuma dessas variáveis foi associada independentemente às dislipidemias.

Quando se busca na literatura dados sobre o efeito dos genótipos *APOE* no perfil lipídico, observa-se que apesar do alto grau de heterogeneidade observado entre trabalhos com pequeno número de participantes, principalmente relacionados a diferentes localizações geográficas, desenho do estudo e tipo de publicação, pode-se observar um resultado semelhante. BENNET *et al.* (2007) demonstraram através de metanálise uma relação linear dos genótipos *APOE*, quando ordenados em $\epsilon 2\epsilon 2$, $\epsilon 2\epsilon 3$, $\epsilon 2\epsilon 4$, $\epsilon 3\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 4$, $\epsilon 4\epsilon 4$, com elevações dos níveis de LDLc e risco coronariano. Os valores de LDLc foram aproximadamente 30% menores em indivíduos com o genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ em relação ao genótipo $\epsilon 4\epsilon 4$, uma diferença comparável com o benefício obtido pelo uso de estatinas. Os autores também descreveram que em comparação com o genótipo mais comum descrito em todas as populações, $\epsilon 3\epsilon 3$, os portadores do alelo $\epsilon 2$ apresentavam uma redução de 20% do risco coronariano, ao contrário de estimativas prévias que reportaram que os portadores do alelo $\epsilon 2$ são neutros para o risco coronariano.

Devido à baixa frequência dos genótipos $\epsilon 2\epsilon 3$ e $\epsilon 4\epsilon 4$ detectada no presente estudo, além da ausência de detecção dos genótipos $\epsilon 2\epsilon 2$ e $\epsilon 2\epsilon 4$, não foi possível correlacionar estes diferentes genótipos com o perfil lipídico dos participantes.

Uma avaliação global da literatura referente ao alelo $\epsilon 2$, permite constatar em diversas populações o efeito cardioprotetor da presença deste alelo, embora o mecanismo exato para conferir benefícios ao perfil lipídico seja entendido apenas parcialmente. Pode-se atribuir ao alelo $\epsilon 2$ uma ligação mais eficiente com a heparina, com ativação do metabolismo das lipoproteínas remanescentes através dos receptores proteoglicanos de sulfato de heparan no fígado e também uma maior ligação a partículas de HDLc enriquecidas com fosfolípidos, proporcionando aumento do transporte reverso do colesterol (BENNET *et al.*, 2007). Apesar da menor afinidade por receptores específicos o alelo $\epsilon 2$ confere vantagens ao perfil lipídico e a redução do risco coronariano, devido provavelmente a uma supra regulação compensatória dos receptores de LDL. Os diferentes efeitos dos genótipos *APOE* no risco coronariano podem também ser explicados pela influência adicional de outras variáveis como os níveis plasmáticos de *APOE*, *APOA-I* e *APOB* (BENNET *et al.*, 2007).

MOOIJAART *et al.* (2006) avaliaram os níveis plasmáticos da *APOE* e o risco de mortalidade cardiovascular em indivíduos idosos. Foi proposto por estes autores que o efeito do polimorfismo do gene *APOE* no perfil lipídico seria ajustado pelas concentrações de *APOE*, e assim, poderia ter mascarado esta influência, justificando em parte, os dados

contraditórios descritos na literatura, quando se avalia alelos *APOE* e suas associações com o perfil lipídico. Um outro fator importante neste contexto, seria a heterogeneidade dos grupos étnicos estudados, associadas a complexas interações genes-genes e gene-ambiente, que requerem cuidadosas considerações quanto ao entendimento do papel das variantes genéticas *APOE* nas dislipidemias e ao cálculo de risco cardiovascular.

6.3.3 – Lipoproteína (a) e polimorfismo do gene *APOE*

Desde a descoberta do sistema da Lp (a) por BERG em 1963, essa lipoproteína tem atraído muita atenção como um fator de risco potencial para doenças cardiovasculares ateroscleróticas (MURASE *et al.*, 2007).

Embora numerosos estudos de caso-controle e outros prospectivos tenham indicado uma associação entre concentrações elevadas de Lp (a) e risco de doenças cardiovasculares, outros têm demonstrado resultados discrepantes (BOFFA *et al.*, 2004; BOGAVAC-STANOJEVIĆ *et al.*, 2007). No grupo de indivíduos avaliados no presente estudo, a Lp(a) não foi capaz de distinguir indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos, inclusive quando estes foram distribuídos de acordo com os sexos e faixas etárias (**Tabela 7**). Este resultado está em concordância com os dados obtidos por LUKÁŠ *et al.* (2007), os quais estudaram 3.915 indivíduos portadores de dislipidemias e com presença de outros fatores de risco cardiovascular. Da mesma forma, entre indivíduos com e sem diabetes mellitus tipo 2 que sofreram ataque cardíaco, a concentração média de Lp (a) não variou de modo significativo embora os níveis de Lp (a) tenham sido altamente convergentes em direção ao limite superior dos valores de referência da Lp (a) (HOLANDA *et al.*, 2004). Entretanto, LIMA *et al.* (2006) estudando pacientes com DAC, demonstraram que os níveis de Lp(a) se apresentaram como um marcador capaz de distinguir pacientes portadores de ateromatose grave, identificada por angiografia coronariana, e não portadores de ateromatose, além de discriminar pacientes com diferentes graus de ateromatose. A associação importante entre Lp (a) e ateromatose coronariana reforça a preocupação dos consensos americano, europeu e brasileiro em classificá-la, como marcador de risco emergente e independente para DAC. SOFI *et al.* (2007) através de metanálise, demonstraram uma associação entre níveis elevados de Lp (a) e a ocorrência de doenças cardiovasculares ateroscleróticas, bem como enfatizaram a importância de sua determinação laboratorial como fator de risco emergente para os eventos cardiovasculares.

A associação entre o polimorfismo *APOE* e os níveis plasmáticos de Lp (a) não estão claramente definidos. Nenhuma influência do polimorfismo *APOE* sobre os níveis de Lp (a) foi observada no presente estudo, tanto no grupo normolipidêmico, quanto no grupo dislipidêmico, bem como na avaliação por agrupamentos E2, E3 e E4 (**Tabelas 14 e 15**). Resultados semelhantes foram encontrados em pacientes com DAC no norte da Índia

(LUTHRA *et al.*, 2002) e em grupo de 160 indivíduos gêmeos holandeses e seus pais (BOOMSMA *et al.*, 2000). Os últimos autores observaram que somente 4% da variação nos níveis plasmáticos de Lp (a) pode ser atribuída ao *locus APOE*, sugerindo que outros polimorfismos, como o da APO(a), também possam interferir nesta variação. Por outro lado, uma forte associação entre o genótipo *APOE* e os níveis plasmáticos de Lp (a) foi descrita em uma população feminina de Copenhague na Dinamarca, entretanto este efeito não foi observado em homens. Foi sugerido que a variação dos níveis de Lp (a) associada com o polimorfismo do gene *APOE* é sexo específica e dependente do contexto (FRIKKE-SCHMIDT *et al.*, 2000). GRANÉR *et al.* (2008) destacaram que alguns dos efeitos da variação genética *APOE* na aterosclerose das artérias carótidas e coronárias podem ser mediados pela Lp (a), visto que a concentração de Lp (a) foi significativamente mais alta no grupo de portadores do alelo $\epsilon 4$ do que no grupo com o alelo $\epsilon 3$.

Uma extensa análise da literatura sustenta a hipótese de que no presente estudo os níveis de Lp(a) não variaram em função dos alelos *APOE*, possivelmente, por influência de diversos fatores como, desenho do estudo, coleta e estocagem das amostras e grande variabilidade étnica da população brasileira com impacto na distribuição dos níveis de Lp (a) e tamanho das isoformas da APO(a). Entretanto, muitos estudos prospectivos da última década demonstraram que a elevação dos níveis de Lp (a) constitui um preditor de eventos cardiovasculares (LIMA *et al.*, 2006; MURASE *et al.*, 2007). Acredita-se que estudos adicionais sejam importantes para trazer à luz novos conhecimentos para fundamentar melhor a discussão sobre a inclusão da Lp (a) como uma ferramenta potencial no auxílio à clínica médica no acompanhamento de pacientes dislipidêmicos e na avaliação de desenvolvimento da aterosclerose.

6.3.4 – Proteína C reativa ultra-sensível e polimorfismo do gene *APOE*

Recentes pesquisas com os componentes celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose têm demonstrado que esta doença crônica das artérias é de origem multifatorial e se trata de um processo dinâmico e inflamatório (VILLACORTA *et al.*, 2007). A PCRus, considerada um marcador de inflamação sistêmica, tem sido consistentemente associada ao risco cardiovascular e sua determinação tem se mostrado útil na estratificação do risco de eventos cardiovasculares (LIMA *et al.*, 2007d). Na classificação de risco para evento cardiovascular futuro, os níveis de PCRus são considerados baixos quando inferiores a 1,0 mg/L, moderados, quando entre 1,0 e 3,0 mg/L e elevados quando superiores a 3,0 mg/L (SBC, 2007).

A associação entre *APOE*, resposta inflamatória e PCRus foi recentemente descrita, tendo sido demonstrado que a variação genética no *locus* do gene *APOE* influencia os níveis de PCRus em pacientes com DAC (TZIAKAS *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi observado homogeneidade nos valores da PCRus entre os dois grupos, entre os sexos e faixas etárias (**Tabela 7**). Na grande maioria dos indivíduos participantes, os níveis de PCRus se encontram dentro da faixa de risco considerada como moderada. É importante ressaltar que os participantes foram rigorosamente avaliados quanto à presença de processos inflamatórios ou estados infecciosos que são responsáveis pela elevação dos níveis basais da PCR (SANTOS *et al.*, 2003; DUARTE *et al.*, 2005). Quando foi avaliada a relação entre a PCRus e a presença dos alelos *APOE* não foram encontradas diferenças nos valores desta variável de acordo com os alelos, nos grupos normolipidêmico e dislipidêmico, bem como, quando se comparou os agrupamentos E2, E3 e E4 (**Tabelas 14 e 15**). Entretanto, foi observada tendência a níveis mais baixos de PCRus em indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$ entre normolipêmicos e dislipidêmicos e nos agrupamento da *APOE*.

Vários autores já descreveram em diferentes populações a associação entre níveis mais baixos de PCRus e a presença do alelo $\epsilon 4$, em relação aos portadores dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$ (TZIAKAS *et al.*, 2006; CAÇÃO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2007). Esse fato é inesperado devido à conhecida associação entre o alelo $\epsilon 4$, altos níveis de LDLc e aumento de risco para eventos cardiovasculares. Por outro lado, este dado é importante e evidencia a complexidade do cálculo de risco cardiovascular e destaca a relevância de uma interpretação baseada na análise conjunta dos vários fatores genéticos e ambientais envolvidos nesta avaliação de risco.

RONTU *et al.* (2006) observaram em grupo de nonagenárias, que as mulheres portadoras do alelo $\epsilon 4$, apresentavam menor nível de PCRus comparadas às não portadoras deste alelo. Uma associação similar foi encontrada em familiares de pacientes com baixos níveis de HDLc e em indivíduos normolipêmicos da Finlândia (KAHRI *et al.*, 2006). Outro estudo, envolvendo 562 americanos descendentes de japoneses demonstrou uma relação significativa entre níveis de PCR e os alelos *APOE*, tendo sido observado níveis mais elevados de PCRus entre os portadores do alelo $\epsilon 2$ e valores semelhantes de PCR entre os indivíduos homozigotos $\epsilon 3\epsilon 3$ e os portadores do alelo $\epsilon 4$ (AUSTIN *et al.*, 2004a). Embora, no presente estudo, não tenha sido encontrado valores mais altos de PCRus nos portadores do alelo $\epsilon 2$, pode-se observar uma tendência a valores mais elevados entre os indivíduos do grupo normolipidêmico (**Tabela 14**) e entre os participantes do agrupamento E2 em relação a E3 e E4 (**Tabela 15**), inclusive com valores acima dos preconizados para a PCRus para a identificação de risco para evento cardiovascular futuro (SBC 2007).

Os mecanismos pelos quais o polimorfismo genético *APOE* poderia influenciar os níveis plasmáticos de PCR não estão claramente definidos na literatura. MÄRZ *et al.* (2004) sugeriram uma teoria não inflamatória em estudo com indivíduos portadores e não portadores de DAC, devido a não correlação observada entre os níveis de fibrinogênio e a

contagem global de leucócitos com o polimorfismo *APOE*. Um mecanismo proposto pelos autores se baseia nos processos de produção, liberação e catabolismo da PCR, os quais estariam relacionados com a via do mevalonato no fígado. Por outro lado, é conhecido que os portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentam maior eficiência no processo de absorção intestinal do colesterol do que indivíduos portadores dos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$. Além dessa característica, a presença da isoforma *APOE4* nas lipoproteínas ricas em TG confere a estas partículas maior afinidade aos receptores de LDL, levando a aumento do fluxo de colesterol nos hepatócitos. Como consequência, a biossíntese hepática do colesterol e dos receptores de LDL são sub-reguladas. Como a via do mevalonato que produz o colesterol *in vivo* está sub-regulada em portadores do alelo $\epsilon 4$, haveria a diminuição da produção de PCR. Efeito similar foi observado em estudos que demonstraram que as estatinas afetam a via do mevalonato reduzindo a biossíntese de colesterol e também diminuindo os níveis de PCR (RONTU *et al.*, 2006).

Outros autores também têm especulado sobre as possíveis associações entre PCR e presença do alelo $\epsilon 4$. BACH-NGOHOU *et al.* (2001) e JUDSON *et al.* (2004) sugeriram que o efeito protetor antiinflamatório poderia ser sobreposto pelo efeito deletério do alelo $\epsilon 4$ nos níveis dos parâmetros lipídicos. KAHRI *et al.* (2006) propuseram que as alterações nos níveis das lipoproteínas que antecedem as mudanças inflamatórias poderiam explicar a aterogenicidade do alelo $\epsilon 4$. AUSTIN *et al.* (2004a) especularam que a PCR poderia se ligar a fosfolípidos presentes nas partículas de VLDL e, em menor grau, nas partículas de LDL. Indivíduos com a isoforma *APOE2* apresentam níveis mais elevados de VLDL do que indivíduos com a isoforma *APOE4*, decorrente da influência da isoforma da *APOE* no metabolismo das lipoproteínas. A PCR plasmática tem uma meia vida de 19 horas e se a lipoproteína ligada a PCR apresentar uma rápida depuração, conseqüentemente seria menor o seu nível plasmático. Isso explica, em parte, a influência do polimorfismo *APOE* nos níveis da PCR, ou seja, indivíduos com a isoforma *E4* apresentam níveis de PCR menores, provavelmente, devido à rápida metabolização das partículas de VLDL.

Embora a determinação da PCRus não seja utilizada como marcador diagnóstico de eventos cardiovasculares, pela sua baixa sensibilidade e seu pequeno poder preditivo positivo (30% e 61%, respectivamente), seu valor normal praticamente exclui esse diagnóstico, pois apresenta uma boa sensibilidade e um excelente valor preditivo negativo (80,4% e 96,7%, respectivamente) (DUARTE *et al.*, 2005). Uma análise minuciosa da literatura, permite concluir que a determinação da PCRus não agregou valor preditivo às dosagens do CT e suas frações no cálculo de risco cardiovascular entre indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos e sua associação com o polimorfismo *APOE* requer estudos adicionais.

6.4 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E POLIMORFISMO -1131T>C DO GENE APOA5

6.4.1 – Distribuição das freqüências dos alelos e genótipos APOA5

A dislipidemia consiste em um distúrbio causado pela interação de fatores genéticos e ambientais. Devido às diferenças entre as diversas populações em estilo de vida como dietas calóricas, inatividade física, tabagismo, bem como as informações genéticas, torna-se importante examinar os polimorfismos genéticos em cada grupo étnico (YAMADA *et al.*, 2007a).

As freqüências dos alelos e genótipos descritas para o polimorfismo APOA5 -1131T>C são restritas e heterogêneas entre as diversas populações. Nos últimos anos, a presença do alelo raro C vem sendo correlacionada com alterações nas concentrações de lípides, principalmente com níveis elevados de TG e diminuídos de HDLc. Assim, torna-se de grande importância a sua identificação em diferentes populações para a determinação da susceptibilidade para a aterosclerose e DCV (VAN DER VLIET *et al.*, 2002).

No presente estudo, pioneiro na investigação do polimorfismo APOA5 -1131T>C na população brasileira, as freqüências dos alelos T e C entre todos os participantes estudados foram de 0,770 e 0,230, respectivamente. Entre os grupos normolipêmico e dislipidêmico a freqüência do alelo C foi maior no grupo dislipidêmico ($p=0,019$) (**Tabela 16**). Resultado similar foi observado entre os pacientes dislipidêmicos do sexo masculino (**Tabela 17**). No entanto, entre as participantes do sexo feminino, tanto normolipêmicas quanto dislipidêmicas, observou-se freqüência similar do alelo C (**Tabela 18**). Resultados semelhantes foram obtidos por PENNACCHIO *et al.* (2001), que reportaram uma freqüência aumentada do alelo C (0,16) em homens com níveis de TG acima do 90º percentil, comparado com uma freqüência de 0,02 para homens com níveis de TG abaixo do 10º percentil.

Outro dado interessante do presente estudo foi a identificação de associação entre o alelo C e aumento de cerca de duas vezes a susceptibilidade à dislipidemia na população avaliada (OR=1,726, IC 95%: 1,095-2,721) (**Tabela 16**), efeito observado também entre os participantes do sexo masculino (OR= 2,050, IC 95%: 1,042-4,023) (**Tabela 17**).

Esta associação entre a presença do alelo C do gene APOA5 e susceptibilidade à dislipidemia foi descrita em pacientes espanhóis portadores de hipertrigliceridemia grave (HTG) (SOUSA *et al.*, 2008b). Os autores observaram que a presença do alelo C confere elevado risco de HTG grave (OR= 4,079; IC 95% 2,019-8,241) nesta população.

As freqüências dos genótipos TT, TC e CC, para todos os participantes reunidos em um único grupo, foram de 57,2%, 39,5% e 3,3%, respectivamente. Quando foram analisadas as freqüências dos genótipos APOA5 no presente estudo observaram-se diferentes distribuições para os genótipos TT e TC entre os dois grupos. O genótipo TT foi mais freqüente no grupo normolipêmico e o genótipo TC entre os pacientes dislipidêmicos

(**Tabela 19**). Na avaliação por sexo, observou-se distribuição similar dos genótipos TC e CC entre os indivíduos do sexo masculino (**Tabela 20**) e feminino (**Tabela 21**). PENNACCHIO *et al.* (2001) encontraram em indivíduos do sexo masculino, com altos níveis de TG, uma pronunciada expressão do genótipo TC quando comparados com participantes com baixos níveis de TG (29,9% *versus* 4,2%, respectivamente).

Vários trabalhos têm sido realizados em diferentes etnias e em grupos de pacientes portadores de diversas patologias, para a determinação das freqüências alélicas e genóticas, do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*, sendo as populações asiáticas as mais estudadas e aquelas que apresentaram maior freqüência do alelo C, entre as diferentes populações (ENDO *et al.*, 2002; AUSTIN *et al.*, 2004b; BI *et al.* 2004, CHIEN *et al.*, 2008; JANG *et al.*, 2009). ENDO *et al.* (2002) determinaram as freqüências dos três genótipos *APOA5*, TT, TC e CC, em 552 crianças japonesas entre 9 e 13 anos de idade, tendo encontrado 40,8%, 47,6% e 11,6%, respectivamente, e freqüências dos alelos T e C de 0,646 e 0,354, respectivamente. AUSTIN *et al.* (2004b) descreveram as freqüências dos genótipos em descendentes japoneses de 39,4%, 46,6% e 14,0% para os genótipos TT, TC e CC, respectivamente. BI *et al.* (2004) avaliaram 312 chineses (209 homens e 103 mulheres) com DAC, e descreveram, neste grupo, distribuições dos genótipos TT (34,62%), TC (50,96%) e CC (14,42%) e freqüências de 42,90%, 47,63% e 9,47%, respectivamente, no grupo controle. Os autores demonstraram que a freqüência do alelo C foi significativamente maior no grupo com DAC em relação ao grupo controle ($p=0,04$), sendo que, o genótipo CC foi associado com o risco duas vezes maior para desenvolvimento de DAC. LI *et al.* (2004) determinaram as freqüências dos alelos e genótipos *APOA5* em 470 chineses voluntários (236 sexo masculino e 234 sexo feminino), sendo encontradas freqüências alélicas T e C de 0,349 e 0,651, respectivamente, enquanto que, as freqüências dos genótipos foram TT (40,4%), TC (49,4%) e CC (10,2%). CHIEN *et al.* (2008) avaliaram 293 indivíduos com hipertrigliceridemia no Taiwan, descrevendo freqüências dos genótipos TT, TC e CC de 19,1%, 43,0% e 37,9%, respectivamente, significativamente diferentes das freqüências dos genótipos TT (57,8%), TC (37,6%) e CC (4,6%) no grupo controle ($p<0,001$). A presença do alelo raro C foi associada com níveis elevados de TG ($p<0,0001$), além de ter sido detectada uma associação de risco de hipertrigliceridemia seis vezes maior em portadores do alelo C (OR= 6,37; IC= 4,08-9,95; $p<0,0001$). Como descrito anteriormente no presente estudo com a população brasileira, a associação entre o alelo C e o genótipo TC em dislipidêmicos promoveu um aumento cerca de duas vezes à susceptibilidade à dislipidemia (OR= 1,726, IC 95%: 1,095-2,721; OR= 2,082, IC 95%: 1,195-3,628; respectivamente) (**Tabelas 16 e 19**).

Como relatado, anteriormente, vários estudos têm determinado as freqüências dos alelos e genótipos do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* em caucasianos, africanos, hispânicos

e em japoneses (PENNACCHIO *et al.*, 2001; ENDO *et al.*, 2002; NABIKA *et al.*, 2002; RIBALTA *et al.*, 2002; TALMUD *et al.*, 2002; KLOS *et al.*, 2005; YAMADA *et al.*, 2007b). Na população européia, um estudo envolvendo 2559 indivíduos normolipêmicos (grupo controle), correspondendo a 1% da população de Praga – República Tcheca, as freqüências dos genótipos TT, TC e CC foram de 84,6%, 13,8% e 1,6%, respectivamente. Nesse estudo, quando foram determinadas as freqüências dos genótipos TC e CC em um grupo constituído por 83 indivíduos com hipertrigliceridemia, foram encontradas freqüências muito elevadas de TC (27,7%) e CC (4,8%), em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Esses dados demonstraram uma forte associação entre o polimorfismo *APOA5 -1131T>C* e níveis elevados de TG nesta população (HOŘÍNEK *et al.*, 2003). CHARRIERE *et al.* (2008), na França, trabalharam com 400 pacientes com diabetes mellitus tipo 2 divididos em dois grupos: 130 pacientes com níveis desejáveis de TG e 270 com níveis aumentados de TG. No grupo com níveis desejáveis de TG a freqüência do genótipo TT foi de 90% e TC de 10%. O grupo com hipertrigliceridemia, as freqüências dos genótipos TT, TC e CC foram de 81,1%, 18,1% e 0,7%, respectivamente ($p = 0,001$).

Quando foram feitas comparações das freqüências alélicas e genotípicas entre indivíduos normolipidêmicos do presente estudo, com outros grupos normolipidêmicos de diversas populações descritas na literatura, foram observados resultados bastante heterogêneos (HOŘÍNEK *et al.*, 2003; AUSTIN *et al.*, 2004b). A análise da distribuição das freqüências genotípicas entre os pacientes dislipidêmicos mostra que o genótipo TC, apresentou maior similaridade de dados obtidos com a população asiática (AUSTIN *et al.*, 2004b; BI *et al.* 2004, JANG *et al.*, 2009). Semelhantemente, às freqüências do genótipo TC apresentadas no presente estudo, JANG *et al.*, (2009) avaliaram 741 coreanos com DAC e 741 indivíduos não portadores de DAC (controles). As freqüências genotípicas para o grupo de indivíduos sem DAC foram de 51,6%, 39,8% e 8,6 para os genótipos TT, TC e CC, respectivamente e para o grupo com DAC foram encontradas freqüências de 43,2%, 46,3% e 10,5, respectivamente. Em relação a baixa freqüência do genótipo CC em indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos brasileiros, foram encontrados resultados similares em indivíduos hipertrigliceridêmicos de Praga na República Tcheca (HOŘÍNEK *et al.*, 2003) e em chineses do sexo masculino (BAUM *et al.*, 2003).

Enfim, o presente estudo revelou que os participantes heterozigotos para o alelo raro C do polimorfismo estudado são mais comuns em indivíduos dislipidêmicos, sendo que, as freqüências mais semelhantes àquelas ora apresentadas foram encontradas na população asiática (AUSTIN *et al.*, 2004b; BI *et al.* 2004, JANG *et al.*, 2009). Até o momento, não existem na literatura dados sobre o polimorfismo *APOA5 -1131T>C* na população brasileira, para que sejam estabelecidas comparações entre as freqüências alélicas e genotípicas, entre as diferentes regiões do país. Assim, o presente e, pioneiro, estudo torna-se de

fundamental importância por apresentar resultados sobre o gene *APOA5*, o qual se encontra associado com dislipidemia, aterosclerose e DCV, em vários grupos étnicos.

6.4.2 – Efeito do polimorfismo do gene *APOA5* nos parâmetros bioquímicos

Fatores genéticos e ambientais contribuem para a variabilidade dos níveis de lípides plasmáticos, sendo um importante fator de risco para a aterosclerose (LI *et al.*, 2004). Além das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *APOA5 -1131T>C*, vários estudos descreveram também a associação entre a presença do alelo C e níveis elevados de TG em diferentes populações.

No estudo apresentado, foi investigado possível efeito do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos parâmetros bioquímicos nos dois grupos estudados, bem como nos agrupamentos T e C, dentro de cada grupo, não tendo sido observada influência do polimorfismo em nenhum parâmetro avaliado (**Tabela 22**). Quando esta análise foi realizada para todos os participantes nos agrupamentos T e C, observou-se associação entre a presença do alelo C e níveis mais elevados de CT, TG, VLDc e fração não-HDL, os quais variaram cerca de 6%, 20%, 23% e 10% %, respectivamente (**Tabela 23**). Estes resultados estão de acordo com a literatura, na qual tem sido descrita a associação entre o alelo C e níveis aumentados de TG, independente da origem geográfica ou doença da população examinada (TALMUD *et al.*, 2004).

ENDO *et al.* (2002) em estudo com crianças japonesas, encontraram níveis de TG e de HDLc maiores e menores, respectivamente, nas crianças portadoras dos genótipos TC e CC ($p=0,0001$), quando comparados com as crianças com genótipo TT. Resultado similar foi observado por CHARRIERE *et al.* (2008), em estudo realizado com 400 franceses portadores de diabetes mellitus tipo 2 (TG, $p=0,034$; HDLc, $p<0,004$). A associação entre o alelo C e níveis elevados de TG também foi descrita para a população húngara (MAASZ *et al.*, 2008), para homens chineses (BAUM *et al.*, 2003) e para 5213 japoneses dislipidêmicos (YAMADA *et al.*, 2007b).

EVANS *et al.* (2003) observaram que pacientes alemães com hiperlipidemia portadores do alelo C e com IMC acima de 25 kg/m^2 apresentavam níveis elevados de TG. Esses resultados sugerem que o sobrepeso talvez atuasse como um fator de risco envolvido na manifestação da influência do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nos níveis de TG. Interações entre sobrepeso e variantes genéticas na determinação dos níveis de TG têm sido demonstradas para outros genes, por exemplo, da proteína de transferência do éster de colesterol (CETP-TAQ1B) e no gene da lipoproteína lipase (S447X) (CHARRIERE *et al.*, 2008; SMART *et al.*, 2010).

Quando foram analisados, no presente estudo, os fatores de risco cardiovascular pela análise de regressão logística multivariada, tendo como variáveis independentes os

alelos *APOA5* e os fatores de risco avaliados neste estudo, foi demonstrado que nenhuma dessas variáveis foi associada independentemente às dislipidemias.

Como comentado anteriormente, no presente estudo não foi observado nenhum efeito dos genótipos *APOA5* nos níveis de HDLc. Resultados semelhantes foram descritos por RIBALTA *et al.* (2002) em indivíduos espanhóis com hiperlipidemia, PENNACCHIO *et al.* (2001) em caucasianos e por AOUIZERAT *et al.* (2003) para a população norteamericana. Os últimos autores demonstraram a associação apenas entre o alelo C e níveis elevados TG e VLDLc. Por outro lado, estudos realizados com homens britânicos (TALMUD *et al.*, 2002) e crianças japonesas (ENDO *et al.*, 2002), descreveram associações entre níveis diminuídos de HDLc e o polimorfismo *APOA5 -1131T>C*. Esta controvérsia na literatura pode estar relacionada à diferença de sexos na expressão dessa associação (JANG *et al.*, 2009). A esse respeito, EVANS *et al.* (2003) relataram que o efeito do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* na redução do HDLc é menos acentuado em homens do que em mulheres. Portanto, uma maior proporção de homens em alguns estudos poderia explicar a ausência de associação entre este polimorfismo e níveis de HDLc.

Em relação a influência do alelo C nos níveis plasmáticos de CT, os dados também são controversos. Esta associação foi descrita para a população japonesa por NABIKA *et al.* (2002). Por outro lado, também para a população japonesa (ENDO *et al.*, 2002) e para hiperlipidêmicos alemães (EVANS *et al.*, 2003) nenhum efeito do alelo C foi observado nos níveis de CT. Outros estudos serão necessários para se obter melhor compreensão sobre a influência do alelo C nos níveis plasmáticos de HDLc e CT.

A partir dos dados obtidos por PENNACCHIO *et al.* (2001) que observaram que camundongos com super expressão de *APOA5* apresentavam níveis diminuídos de TG e camundongos nocaute níveis aumentados de TG e, assumindo-se que o polimorfismo *APOA5 -1131T>C* está associado com a perda de função dessa apolipoproteína, vários mecanismos específicos têm sido sugeridos, para elucidar a função da *APOA5* (LAI *et al.*, 2004).

Primeiramente, estudos demonstraram a supra regulação da *APOA5* durante a regeneração do fígado de camundongos, após a hepatectomia parcial, sugerindo um papel no controle da secreção de TG (VAN DER VLIET *et al.*, 2001). Posteriormente, estudos sugeriram que a *APOA5* poderia modular a síntese hepática intracelular e/ou a secreção de VLDLc (LI *et al.*, 2004). Além disso, TALMUD *et al.* (2004) descreveram sobre a diminuição do catabolismo de TG e VLDLc associados a redução dos níveis da *APOA5*.

Acredita-se que a *APOA5* esteja envolvida na regulação da atividade da lipase lipoproteica ligada a proteoglicanos, dessa forma, facilitando a interação entre a enzima e as lipoproteínas ricas em TG. Assim, na presença de proteoglicanos, a *APOA5* induz a um aumento significativo e dose dependente da hidrólise mediada pela lipase lipoproteica de

partículas ricas em TG (YOUNG & NICHOLLS, 2007; CHARRIERE *et al.*, 2008; CHIEN *et al.*, 2008). Recentemente foi demonstrado que a APOA5 pode, também, interagir com dois membros da família do receptor de LDL (LRP1 e SrLa), com um suposto aumento da recaptura de lipoproteínas pelo fígado (CHARRIERE *et al.*, 2008; KLUGER *et al.*, 2008).

BI *et al.* (2004) demonstraram que a APOA5 exibe alta afinidade, baixa elasticidade e uma lenta cinética de ligação a interfaces hidrofóbicas, que podem retardar o agrupamento de partículas ricas em TG. Além disso, em camundongos com APOA5 humana transgênica, foi observada uma pronunciada diminuição de VLDL. Pesquisas, *in vitro*, demonstraram que a APOA5 recombinante pode interagir com a lipase lipoprotéica, aumentando significativamente sua atividade. Dessa forma, pode haver uma redução dos níveis de TG por diminuição da síntese hepática e aumento da depuração de VLDLc (BI *et al.*, 2004; YAMADA *et al.*, 2007b).

Vários mecanismos de ação estão descritos na literatura para explicar a associação entre o polimorfismo *APOA5 -1131T>C* e os níveis de lípidos, lipoproteínas plasmáticas e DCV. LI *et al.* (2004) descreveram que este polimorfismo presente na região do promotor proximal, não realiza a transcrição no sítio do fator de ligação, sugerindo que este sítio pode não ser funcional devido ao seu desequilíbrio de ligação em relação a outros sítios funcionais. Isto poderia explicar parcialmente a relação entre lípidos, lipoproteínas e o polimorfismo *APOA5 -1131T>C*. Além disso, as diferenças de informações genéticas entre vários grupos étnicos fazem com que muitos SNPs tenham diferentes efeitos, sugerindo que as discrepâncias entre os estudos sejam justificadas pelas diferenças nas populações estudadas e nas metodologias empregadas (LI *et al.*, 2004).

BI *et al.* (2004) relataram que como o polimorfismo *-1131T>C* está localizado dentro da região promotora do gene *APOA5*, uma possibilidade é que essa localização pode gerar um efeito na regulação da transcrição do gene, conseqüentemente afetando os níveis plasmáticos de TG (SOUSA *et al.*, 2008b), ou seja, este polimorfismo poderia ter um efeito na sub regulação da transcrição, gerando concentrações plasmáticas diminuídas de APOA5 e níveis aumentados de TG. A partir do conhecimento de que o uso de fibratos atua reduzindo os níveis de TG, recentemente, foi identificado na região promotora do gene *APOA5* um fator de transcrição nuclear denominado PPAR- α (*peroxisome proliferator activated receptor-alpha*), responsável pela regulação da transcrição da *APOA5*, cuja transmissão do sinal requer a participação do PPRE (*Peroxisome Proliferator Response Element*). Os fibratos são agonistas do PPAR- α (BI *et al.*, 2004; LAI *et al.*, 2004; O'BRIEN *et al.*, 2005; HEGELE & POLLEX, 2007; YAMADA *et al.*, 2007a; SOUSA *et al.*, 2008b). Considerando-se, assim e, hipotetizando-se que o polimorfismo *APOA5 -1131T>C* poderia mudar a afinidade desse ou de outro elemento regulatório, este polimorfismo estaria assim, precedendo a redução da expressão do gene (BI *et al.*, 2004). Outra proposição seria que

este polimorfismo se ligaria a uma variante funcional de um gene próximo, cujo produto estaria envolvido na aterogênese, dessa forma, agindo como marcador para esse gene. O polimorfismo *APOC3 - 482C/T* localizado dentro do elemento responsivo da insulina na região promotora do gene *APOC3*, tem sido considerado um candidato (CHARRIERE *et al.*, 2008; KISFALI *et al.*, 2008). Estudos anteriores mostram que os polimorfismos *APOA5 - 1131T>C* e *APOC3 - 482C/T* estão em forte desequilíbrio de ligação e o indivíduo portador de ambos os haplótipos apresenta elevações significativas dos níveis de TG (BI *et al.*, 2004).

Embora a exata função fisiológica da *APOA5* permaneça indeterminada, há explicações plausíveis de informações acumuladas do metabolismo dos lípides plasmáticos para a sua associação independente, com os níveis de TG, relacionada ao seu forte desequilíbrio de ligação.

O presente estudo avaliou também a possível influência do polimorfismo *APOA5 - 1131T>C* nos níveis de Lp(a). Nenhuma associação entre este polimorfismo e níveis de Lp(a) foi observada nos grupos normolipêmico e dislipidêmico (**Tabela 22**), bem como entre todos os participantes (**Tabela 23**), quando analisados pelos agrupamentos T e C. Após extensa busca de dados na literatura sobre o polimorfismo *APOA5 - 1131T>C* e níveis de Lp(a), verificou-se a ausência de estudos. Mesmo assim, é interessante ressaltar a importância de estudos envolvendo a Lp(a) e o polimorfismo *APOA5 - 1131T>C* devido ao seu potencial aterogênico de ambos os fatores (MURASE *et al.*, 2007).

Níveis elevados de PCRus têm sido reconhecidos como marcadores inflamatórios de doença vascular aterotrombótica (JANG *et al.*, 2004). Em 2004, JANG *et al.*, avaliando 158 homens não obesos, detectaram níveis elevados de PCRus em portadores do alelo C, em comparação com indivíduos homocigotos TT, sugerindo uma ligação entre o gene *APOA5*, inflamação e risco de DCV. Contrariamente, os dados ora apresentados para indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos não demonstraram associação entre o alelo C e os níveis de PCRus (**Tabelas 22 e 23**). Resultados semelhantes foram descritos por HUBÁČEK *et al.* (2005) em estudo envolvendo 1.100 indivíduos caucasianos de Praga na República Tcheca.

Recentemente, HUANG *et al.* (2009) realizaram estudo com a população chinesa, o qual demonstrou associação entre as concentrações plasmáticas de *APOA5* e o perfil lipídico em pacientes com síndromes coronarianas agudas (SCA). Estes autores observaram uma correlação negativa entre os níveis de *APOA5* e TG ($r = -0,683$; $p < 0,0001$) e nenhuma associação entre *APOA5* e PCRus ($r = 0,069$; $p = 0,79$) no grupo controle. Entretanto, no grupo de pacientes com SCA, observaram-se correlações positivas entre níveis de *APOA5* e de TG ($r = 0,642$; $p < 0,0001$) e entre níveis de *APOA5* e de PCRus ($r = 0,594$; $p < 0,001$). Esses resultados sugerem uma possível associação entre inflamação, metabolismo da *APOA5* e níveis de TG em pacientes com SCA. Como os dados são

escassos, a associação APOA5 e PCRus deverá ser melhor explorada em estudos futuros, os quais poderiam investigar a possível participação da APOA5 nos processos inflamatórios.

O impacto da presença de uma variante genética em um indivíduo como fator de risco na saúde pública, depende não somente de seu efeito isolado, mas também da frequência do alelo na população estudada. Assim, os polimorfismos APOA5 poderiam ser importantes fatores na determinação dos níveis de TG, VLDLc, CT e fração não-HDLc e de doenças vasculares, especialmente no Brasil, onde o presente estudo descreveu alta frequência do genótipo TC em indivíduos dislipidêmicos, e a associação do alelo C com dislipidemia, como apresentado anteriormente. Esses primeiros dados obtidos para o polimorfismo APOA5 -1131T>C na população brasileira, sinalizam para a necessidade de realização de estudos complementares envolvendo este e outros polimorfismos do gene APOA5 para investigar melhor a possível utilização destes marcadores genéticos na avaliação da susceptibilidade à dislipidemia, bem como na avaliação de seu potencial nas estratégias e condutas de prevenção de DCV (PENNACCHIO *et al.*, 2001). Estudos futuros, desenvolvidos em diferentes populações, certamente, delinearão a exata contribuição de cada polimorfismo dentro do conjunto gênico das apoproteínas APOA1/APOC3/APOA4/APOA5.

6.5 – ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES APOE E APOA5 - 1131T>C

As dislipidemias são consideradas distúrbios metabólicos de caráter multifatorial, estando seu desenvolvimento geralmente associado a interações entre fatores ambientais e genéticos, e em alguns casos, através de interações entre genes. Vários estudos têm avaliado as interações gene-gene envolvendo o polimorfismo APOA5 -1131T>C. Por exemplo, a proximidade do gene APOA5 e o conjunto gênico APOA4/APOC3/APOA1 no cromossomo 11 levanta a questão de que os efeitos hipertrigliceridêmicos da APOA5 seriam reflexo do desequilíbrio de ligação com outras variantes funcionais do gene APOC3, também envolvido na elevação dos níveis de TG, ou seriam independentes deste (TALMUD *et al.*, 2002). A variante -482C>T da região promotora do gene APOC3 está associada à perda de regulação à resposta insulínica e ao conseqüente aumento dos níveis de TG. Análises haplotípicas demonstraram forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos APOA5 -1131T>C e APOC3 -482C>T, sugerindo que o haplótipo APOA5*2 não seria o causador em si da hipertrigliceridemia observada, mas seria provavelmente um marcador para o verdadeiro responsável, a variante APOC3 -482C>T (BI *et al.*, 2004; CHARRIERE *et al.*, 2008; KISFALI *et al.*, 2008). Além disso, tem sido estudada a associação entre os genótipos APOE e o polimorfismo APOA5 -1131T>C no desenvolvimento da hipertrigliceridemia (EVANS *et al.*, 2003).

Baseado na possibilidade de interações gene-gene para o desenvolvimento das dislipidemias, o presente estudo realizou uma análise conjunta para o risco de desenvolvimento de dislipidemia associado aos diferentes alelos da *APOE* e os genótipos da *APOA5*. A proposta desta análise foi verificar se algum tipo das combinações possíveis entre os alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ da *APOE* e os genótipos TT, TC e CC da *APOA5* resultaria em maior predisposição ao desenvolvimento de dislipidemia entre os grupos estudados. Pode-se observar nas Tabelas 24 e 25, que as combinações entre $\epsilon 2$ e os três genótipos *APOA5*, bem como as combinações $\epsilon 4$ e os genótipos *APOA5*, respectivamente, não se associaram com risco de dislipidemia. Acredita-se, que um número maior de participantes no estudo poderia gerar um contingente amostral mais apropriado para estudos de interações entre polimorfismos.

Poucos estudos exploraram a associação entre os genótipos *APOE* e *APOA5*. Dentre estes, destacam-se dois trabalhos que avaliaram as combinações entre *APOE* e as variantes *APOA5* -1131T>C (EVANS *et al.*, 2003) e *APOA5* SW19 (SCHAEFER *et al.* 2004) em indivíduos hiperlipidêmicos. Os autores concluíram que os polimorfismos S19W e -1131T>C do gene *APOA5* são cofatores cruciais para o desenvolvimento de hiperlipoproteïnemia do tipo III em indivíduos com o genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$. Recentemente, em estudo realizado na população espanhola (SOUSA *et al.*, 2008b), descreveu uma forte associação entre os alelos $\epsilon 2$ *APOE* e C *APOA5*, que conferiu aumento de sete vezes na susceptibilidade ao desenvolvimento de hipertrigliceridemia grave, em relação à combinação do alelo $\epsilon 4$ com o alelo C.

Diante do pequeno número de publicações envolvendo as interações entre os polimorfismos *APOE* e *APOA5* -1131T>C e sua relação com as dislipidemias seria interessante uma maior caracterização da população brasileira, bem como em outras populações.

6.6 – PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS E MOLECULARES

6.6.1 Parâmetros hemostáticos e dislipidemias

A dislipidemia é um fator de risco bem estabelecido para a aterosclerose, bem como, para o desenvolvimento de suas complicações. As alterações dos níveis de lípides têm sido relacionadas à trombose pela modificação da atividade do endotélio, das plaquetas, das proteínas da coagulação e fatores fibrinolíticos (EITZMAN *et al.*, 2000).

A atividade do sistema da coagulação sangüínea tem uma contribuição importante na manifestação de eventos coronarianos agudos. Relatos de vários estudos sugerem que marcadores de ativação endotelial, atividade da coagulação sangüínea e/ou fibrinólise prejudicada desempenham um importante papel como indicadores de doenças

cardiovasculares e são preditores de um risco aumentado de eventos agudos, especialmente em indivíduos abaixo de 60 anos de idade (GEORGIEVA *et al.*, 2004).

Marcadores de atividade endotelial

A disfunção endotelial é considerada um passo precoce no desenvolvimento da aterosclerose. É caracterizada pelo aumento da permeabilidade do endotélio, tendência para vasoespasmo e trombose. As células endoteliais sintetizam e liberam moléculas com impacto hemostático tais como FvW, TM, PAI-1 e t-PA. Embora nenhuma dessas moléculas seja específica das células endoteliais, seus níveis plasmáticos têm se mostrado aumentados com o prejuízo endotelial e alguns autores sugerem que seus níveis plasmáticos sejam considerados marcadores de disfunção endotelial (KARÁSEK *et al.*, 2009). Além desses marcadores, a hiperhomocisteinemia tem sido associada à lesão de células endoteliais, apesar de não estar claro qual o mecanismo fisiopatológico na aterotrombose (NEVES *et al.*, 2004). Apesar disso, acredita-se que a hiperhomocisteinemia desempenhe um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose. Esta também tem sido mencionada como um fator de risco para trombose venosa, DAC e ataque cardíaco (STÜHLINGER & STANGER, 2005). Níveis elevados de HCY podem ser de caráter genético, devido a polimorfismos ou mutações de enzimas envolvidas nessa via metabólica (RAHEMULLAH & COTT, 2007) ou por fatores adquiridos, conseqüente à deficiência de vitamina B6, B12 ou ácido fólico, além de fatores como idade, sexo, estilo de vida e ação de alguns fármacos (GRAVINA-TADDEI *et al.*, 2005).

Em relação aos níveis plasmáticos de HCY no presente estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos normolipêmicos e dislipidêmicos. Entretanto, as análises entre os sexos e entre as duas faixas etárias avaliadas demonstraram níveis mais elevados de HCY em indivíduos do sexo masculino e entre participantes com idade superior a 45 anos (**Tabela 26**). Estes resultados estão em concordância com vários estudos prospectivos realizados entre homens e mulheres de diferentes faixas etárias e patologias (NEVES *et al.*, 2004; GRAVINA-TADDEI *et al.*, 2005). HARBOE-GONÇALVES *et al.* (2005) estudaram pacientes com acidente vascular isquêmico, tendo sido encontrado níveis plasmáticos de HCY mais elevados em homens e em pacientes com idade superior a 40 anos. Esses resultados foram justificados pelas diferenças das taxas de formação de HCY associada à maior síntese de creatina e a maior massa muscular encontrada em homens. Também é possível que o estrogênio proporcione uma diminuição dos níveis de HCY plasmáticos (HARBOE-GONÇALVES *et al.*, 2005; PIOVESAN *et al.*, 2007).

No presente estudo, apesar da determinação de HCY plasmática não ter contribuído para distinguir indivíduos dislipidêmicos de participantes normolipêmicos, alguns estudos envolvendo outras patologias foram capazes. BAHRI *et al.*, (2008) descreveram níveis de

HCY 28,4% maiores em pacientes da Tunísia com DAC do que em controles, além de uma relação linear com a gravidade da DAC. Ao contrário, MONTAÑO-LOZA *et al.*, (2004) não encontraram diferenças significativas entre os níveis de HCY de pacientes com DAC e o grupo controle.

PIOVESAN *et al.*, (2007) demonstraram, em pacientes transplantados renais com hipercolesterolemia, níveis elevados de HCY, em relação aos transplantados sem hipercolesterolemia. Além disso, encontraram uma correlação positiva e significativa entre HCY e LDLc. No presente trabalho, foi encontrada uma correlação positiva, de média magnitude, entre a HCY e APOB, principal constituinte das partículas de LDLc (**Tabela 30**). GARCIA *et al.*, (2007) não encontraram correlação entre os níveis de HCY e os parâmetros lipídicos, em indivíduos com SCA, justificando as diferenças entre os estudos pela composição étnica, defeitos genéticos não avaliados e/ou fatores ambientais que poderiam influenciar no metabolismo da HCY.

Dessa forma, os resultados encontrados no presente estudo não permitem inferir sobre possível associação entre dislipidemia e níveis de homocisteína. Uma discussão mais ampla, baseada nos níveis de HCY e possível correlação com parâmetros lipídicos, poderia estar melhor fundamentada com o conhecimento de dados sobre importantes fatores que contribuem para o aumento dos níveis de homocisteína e que estão associados a risco cardiovascular e trombótico. Fatores como, diferenças nas características das populações estudadas, hábitos alimentares, uso de suplementos vitamínicos ou diferenças étnicas, que, certamente, comprometem a avaliação dos níveis de HCY e, portanto, leva a resultados controversos (GARCIA *et al.*, 2007), justificam a realização de pesquisas adicionais envolvendo o assunto.

No presente estudo, foi demonstrada uma interação entre os grupos e sexos em relação à TM (**Tabela 26**), ou seja, entre as participantes femininas, as dislipidêmicas têm níveis de TM superiores às normolipêmicas (**Tabela 27**).

Vários estudos também não detectaram elevações de TM em grupos de indivíduos com hiperlipidemias (PUCETTI *et al.*, 2002; KARÁSEK *et al.*, 2009) e grupo de indivíduos hipercolesterolêmicos (JOHN *et al.*, 1999; VAYÁ *et al.*, 1999). SCHUMACHER *et al.*, (2002) estudando pacientes com doenças cardíacas coronarianas (DCC) e controles saudáveis, observaram que os níveis plasmáticos de TM não foram capazes de discriminar os grupos estudados, entretanto, foram encontrados níveis de TM aumentados em homens. Em estudo realizado em pacientes com HAS, os níveis de TM foram maiores nestes indivíduos quando comparados com o grupo controle (MATYSZKO & TYMCIO, 2008).

Há vários resultados conflitantes envolvendo os níveis de TM, sendo que, alguns estudos reportam uma associação positiva entre altas concentrações de TM e diferentes manifestações de aterosclerose, tais como, DCC e doença arterial oclusiva periférica

(TONSTAD *et al.*, 2007). Por outro lado, outros estudos não demonstraram associação entre elevação de TM e DCC ou doença vascular periférica (PUCETTI *et al.*, 2002; SCHUMACHER *et al.*, 2002). Uma explicação possível é que os níveis plasmáticos de TM podem refletir não somente a lesão endotelial, mas também a sua síntese aumentada, portanto, podendo aumentar a sua propriedade anticoagulante da superfície das células endoteliais. Então, altas concentrações de TM em indivíduos saudáveis poderiam estar associadas com um risco diminuído de DCC, por isso, alguns autores sugerem a TM como um marcador de prejuízo microvascular, mas não de macrovascular (KARÁSEK *et al.*, 2009).

Marcadores de hipercoagulabilidade

As determinações de fragmentos gerados quando zimogénos da coagulação são ativados, a partir de enzimas ativas ou de inibidores plasmáticos que ocorram naturalmente, têm sido alvo de diversos estudos que investigam a patogênese e o possível valor preditivo do sistema hemostático na progressão da aterosclerose. Os marcadores de ativação são bastante estáveis, circulam no plasma normal em baixas concentrações e podem ser usados como marcadores de ativação da coagulação ou de fibrinólise, em condições clínicas em que há suspeita de estado de hipercoagulabilidade, como nas dislipidemias, e para se estudar o mecanismo regulador da hemostasia (LIMA *et al.*, 2005).

No presente estudo, quando foram avaliados os marcadores de hipercoagulabilidade F1+2 e D-Di entre os indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos, observou-se homogeneidade dos dados para ambos os parâmetros (**Tabela 26**). No entanto, a avaliação por sexo demonstrou valores mais elevados de ambos os parâmetros entre as mulheres (**Tabela 26**). Entre as faixas etárias observaram-se níveis mais altos de F1+2 entre os participantes com idade superior a 45 anos (**Tabela 26**). Além disso, observou-se também uma correlação positiva, porém de baixa magnitude, entre F1+2 e D-Di (**Tabela 29**), similar àquela descrita por PUCETTI *et al.*, (2002) para grupo de indivíduos hiperlipidêmicos.

Semelhantemente aos resultados apresentados, DANGAS *et al.* (1999) descreveram níveis mais elevados de F1+2 em mulheres hiperlipidêmicas, justificados pelo status hormonal. Em trabalho realizado por PUCETTI *et al.* (2002) com indivíduos hiperlipidêmicos e por MATYSZKO & TYMCIO (2008) com indivíduos com HAS, o F1+2 foi capaz de discriminar os pacientes em relação aos seus respectivos controles.

Uma maior atividade do sistema fibrinolítico através da determinação do D-Di foi observada em pacientes com eventos cardiovasculares (TREGOUET *et al.*, 2009) e DAC (IZAR *et al.*, 2003). Similarmente, aos resultados do presente estudo, foram encontrados valores homogêneos de D-Di em indivíduos hiperlipidêmicos (DANGAS *et al.*, 1999), hipertensos (MATYSZKO & TYMCIO, 2008), pacientes com acromegalia (EREM *et al.*,

2008) e mulheres grávidas com pré-eclâmpsia (ALACACIOĞLU *et al.*, 2004), e seus respectivos controles.

Um grande número de estudos clínicos, com diversos grupos de pacientes com doenças ateroscleróticas, tem mostrado níveis plasmáticos aumentados de F1+2 e D-Di associados à gravidade da aterosclerose e risco aumentado de complicações vasculares. Os níveis de F1+2 e D-Di têm aumentado com a idade e são mais elevados em mulheres (SPRONK *et al.*, 2004).

Neste contexto, o fato de não ter sido observadas elevações de F1+2 e D-Di no grupo dislipidêmico no presente estudo, mostra que, provavelmente, estes pacientes não possuem ainda, um grande comprometimento aterosclerótico, justificando dessa maneira a falta de poder discriminatório dos marcadores de hipercoagulabilidade. O fato de mulheres terem apresentado níveis mais elevados dos dois parâmetros em relação aos homens, independente do perfil lipídico, poderia ser explicado, em parte, pelo possível uso de terapia hormonal, já que é amplamente sabido que o uso de hormônios favorece o estado de hipercoagulabilidade (MATURANA *et al.*; 2007).

Marcadores de hipofibrinólise

A manutenção da integridade vascular é um desafio crítico para o organismo multicelular. O sistema da coagulação está envolvido na prevenção da catástrofe da perda de sangue seguida da lesão vascular, enquanto o sistema fibrinolítico está envolvido na remoção do produto final do sistema da coagulação, o coágulo de fibrina, resultando na reparação do tecido lesado. O equilíbrio entre a atividade da coagulação e o sistema fibrinolítico, permite o desenvolvimento de uma resposta hemostática no sítio da lesão. O equilíbrio entre essas atividades é estabelecido por mecanismos próprios de controle para o respectivo sistema, tornando-se aparentemente aumentado pela comunicação entre os sistemas. O desequilíbrio pode preceder à tendência para a trombose ou a sangramentos (BOFFA & KOSCHINSKY, 2007). Dentre as anormalidades hemostáticas envolvendo o prejuízo da fibrinólise destacam-se as determinações dos níveis plasmáticos de PAI-1 e o TAFI que fornece uma comunicação explícita entre os sistemas da coagulação e fibrinólise.

Vários estudos associam níveis aumentados de PAI-1 com o avanço da aterosclerose, novos eventos cardiovasculares, risco aumentado de aterotrombose, bem como preditor de recorrência de IAM (ASO *et al.*, 2005; EREM *et al.*, 2008). No presente trabalho a determinação do inibidor direto da fibrinólise, PAI-1, não foi capaz de discriminar indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos, sexos e faixa etária, e de estabelecer interações entre estes (**Tabela 26**). Resultados semelhantes foram encontrados para grupo de indivíduos em prevenção primária para DCV e seus controles, embora neste estudo os níveis de PAI-1 tenham sido superiores em homens, provavelmente devido à terapia

hormonal de mulheres na pós menopausa (JUHAN-VAGUE *et al.*, 2000). Níveis elevados de PAI-1 foram encontrados em pacientes com acromegalia (EREM *et al.*, 2008), indivíduos com hipertrigliceridemia (PUCCETTI *et al.*, 2002; BROUWERS *et al.*, 2008), hiperlipidemias (KARÁSEK *et al.*, 2009), obesos (DARVALL *et al.*, 2007), pacientes com síndrome metabólica (ASO *et al.*, 2005) e sepse (ZEERLEDER *et al.*, 2006).

Para o marcador TAFI, no presente trabalho foram observadas interações significativas entre grupos e sexos (**Tabela 26**). Dentro do grupo de normolipêmicos, os indivíduos masculinos têm os níveis superiores de TAFI. Entre as participantes femininas, o grupo de dislipidêmicas tem os níveis mais elevados de TAFI (**Tabela 28**). Esse resultado pode estar relacionado ao status hormonal das mulheres e o impacto sobre os níveis das lipoproteínas (SANTAMARÍA *et al.*, 2003). As concentrações de TAFI parecem ser controladas por hormônios esteróides. Resultados similares foram demonstrados em mulheres na pós menopausa, as quais exibem altos níveis de antígeno TAFI, reforçando as questões dos efeitos do estrogênio no controle de seus níveis circulantes (JUHAN-VAGUE *et al.*, 2000; BOFFA & KOSCHINSKY, 2007).

Os resultados da análise de correlação entre os parâmetros hemostáticos e bioquímicos apresentados na **Tabela 30**, demonstram que o TAFI se correlacionou com todos os parâmetros do perfil lipídico, destacando-se as correlações de média magnitude com o TG ($r= 0,346$; $p<0,001$) e uma correlação negativa com a APOA-I ($r= -0,491$; $p<0,001$). Correlações semelhantes foram encontradas em estudos com pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 (ASO *et al.*, 2005), hiperlipidemia (PUCCETTI *et al.*, 2002; CERESA *et al.*, 2006), HAS (MATYSZKO & TYMCIO, 2008) e DAC (TREGOUET *et al.*, 2009). Outros estudos também avaliaram as correlações entre TAFI e parâmetros lipídicos. Assim, em 2004, SANTAMARÍA *et al.* observaram um grupo de indivíduos espanhóis, com diversos fatores de risco para eventos cardiovasculares, que somente as mulheres hipercolesterolêmicas apresentavam níveis de TAFI significativamente maiores, quando comparados com mulheres sem esse fator de risco cardiovascular. MONASTERIO *et al.* (2003/2004) determinaram os níveis plasmáticos de TAFI em indivíduos saudáveis e em pacientes com doenças vasculares, sendo que, entre os indivíduos saudáveis não foram encontradas diferenças entre sexos e idades nos níveis de TAFI. Entretanto, os pacientes da unidade de terapia intensiva com sepse tinham níveis aumentados de TAFI, quando comparados com o grupo sem sepse. Ao contrário, em alguns estudos, não foram observados níveis elevados de TAFI, como em mulheres grávidas com pré-eclâmpsia (ALACACIOĞLU *et al.*, 2004), pacientes com lupus eritematoso sistêmico (RINGWALD *et al.*, 2007) e pacientes com sepse (ZEERLEDER *et al.*, 2006).

Vários estudos clínicos têm investigado a possível relação entre TAFI e eventos cardiovasculares. Uma correlação positiva foi encontrada entre os níveis de TAFI e risco de

DAC (JUHAN-VAGUE *et al.*, 2000), trombose venosa (VAN TILBURG *et al.*, 2000), angina de peito (SEGEV *et al.*, 2004), ataque isquêmico (SANTAMARÍA *et al.*, 2003) e trombose arterial (CHEN *et al.*, 2005). Entretanto, um estudo realizado por MELTZER *et al.* (2009) revelou que níveis elevados de TAFI podem proteger contra IAM. Uma possível explicação para esses resultados contraditórios é que os vários estudos usaram métodos diferentes para a determinação de TAFI, dessa forma dificultando as comparações entre os diversos estudos. Atualmente, para a avaliação dos níveis do antígeno TAFI, como suposto marcador de eventos cardiovasculares, tem sido empregadas duas metodologias diferentes: testes funcionais, que envolvem a conversão quantitativa de TAFI para a forma ativa, seguido da determinação da atividade enzimática com um substrato específico; e por ensaio de imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) que é baseado no reconhecimento do antígeno TAFI por anticorpos (MORANGE *et al.*, 2005; CERESA *et al.*, 2006; MELTZER *et al.*, 2009).

No presente trabalho, realizou-se a determinação dos níveis plasmáticos do antígeno TAFI através do kit de ELISA VISULIZE™ (Affinity Biological) para medida quantitativa. Este método também foi empregado por ALACACIOĞLU *et al.* (2004) na avaliação de pacientes com pré-eclâmpsia e por MATYSZKO & TYMCIO (2008) em pacientes com HAS. Por outro lado, outros autores utilizaram diferentes metodologias para a determinação do TAFI. Assim, PUCETTI *et al.* (2002) e SANTAMARÍA *et al.* (2003), baseado na ativação de TAFI pelo complexo trombina-trombomodulina, mediram a atividade de TAFI com o substrato hipuril-arginina. VAN TILBURG *et al.* (2000) avaliaram os níveis plasmáticos de TAFI por eletroimunoensaio. Um conjunto de reagentes comercial (Milan Analytica), baseado na afinidade de anti-TAFI IgG de carneiro purificado, foi usada em estudos realizados por JUHAN-VAGUE *et al.* (2000) e ZEERLEDER *et al.* (2006). MONASTERIO *et al.*, (2003/2004) obtiveram resultados com outro conjunto de reagentes comercial (Zymutest TAFI antigen) da Hyphen Biomed. SEGEV *et al.* (2004) e CHEN *et al.* (2005) determinaram o antígeno TAFI através de ELISA com um conjunto de reagentes comercial da America Diagnostica.

Além disso, deve ser salientado que em muitos desses estudos foram empregados testes imunológicos que não foram validados para a suposta reatividade diferencial entre as diversas isoformas e fragmentos de TAFI. Portanto, não pode ser excluído que níveis de TAFI aparentemente aumentados ou diminuídos, associados com estados de doenças particulares podem não ser induzidos por diferenças nos níveis da proteína TAFI total, mas para diferenças nas isoformas ou diferentes graus de ativação (CERESA *et al.*, 2006). A esse respeito, estudos recentes revelaram um fenômeno sugerindo que não é a quantidade total de proteína TAFI, mas a quantidade de TAFI ativado que pode desempenhar o papel crítico interferindo na fibrinólise (CERESA *et al.*, 2006; TREGOUET *et al.*, 2009). Dessa forma, é essencial que a comparação dos dados dos diferentes estudos, com posterior interpretação, seja feita à luz de resultados obtidos por métodos equivalentes.

Alguns estudos demonstraram que a reatividade da maioria dos ensaios disponíveis é parcialmente dependente do polimorfismo 1040C/T Thr 325 Ile, destacando dessa forma a necessidade de maior atenção na interpretação dos níveis de antígeno TAFI (MELTZER *et al.*, 2009). Baseado em estudos recentes sobre o polimorfismo do gene do TAFI, a mutação de ponto desse gene poderia gerar mudanças estruturais na molécula de TAFI, dificultando seu reconhecimento pelos anticorpos de diferentes reagentes, e alterando as propriedades antifibrinolíticas (MONASTERIO *et al.*, 2003/2004). MORANGE *et al.* (2005) determinaram os níveis plasmáticos de TAFI através de dois conjuntos de reagentes por metodologia de ELISA, sendo um destes sensível ao polimorfismo Thr 325 Ile (Milan, analytica, La Roche, Switzerland) e o outro, insensível à isoforma de TAFI Thr 325 Ile (TAFI 1B, Diagnostica Stago, Asnière, France). Os autores observaram uma fraca correlação entre os níveis de TAFI medidos pelos diferentes reagentes ($r = 0,40$; $p < 0,001$). É possível que diferentes genótipos tenham maior influência sobre os testes imunoenzimáticos e de atividade do que sobre os indivíduos e as patologias (BOFFA & KOSCHINSKY, 2007). Além disso, a caracterização dos ensaios imunológicos é também muito ambígua por que o TAFI pode ocorrer em diferentes formas. *In vivo*, a ativação da proenzima TAFI de 56 kDa para TAFI ativado (TAFIa) de 36 kDa pelo complexo trombina-trombomodulina promove a liberação de um peptídeo de ativação de 20 kDa (TAFI-AP) do domínio catalítico. Subsequentemente, TAFIa é inativado através de uma mudança de conformação para a forma inativa (TAFIai), seguida de uma clivagem proteolítica resultando em fragmentos de 25 kDa e 11 kDa (TREGOUET *et al.*, 2009). Portanto, há necessidade de melhor caracterização de métodos por imunoenaios para a avaliação dos níveis de diferentes formas de TAFI (CERESA *et al.*, 2006).

CERESA *et al.* (2006) empregando testes que avaliaram várias frações de TAFI, observaram altos níveis plasmáticos de TAFI-AP e TAFIa em indivíduos com hiperlipidemia, comparados com indivíduos normolipêmicos. Além disso, não houve associação entre os níveis de antígeno TAFI e hiperlipidemia, sugerindo que há um estado de ativação aumentada em hiperlipidêmicos. Esses resultados evidenciam a necessidade de medidas do grau de ativação de TAFI, como um parâmetro mais relevante na pesquisa envolvendo a associação dos níveis plasmáticos de TAFI e risco para DCV. Em outro estudo, foram observados em pacientes com trombose arterial prematura, níveis mais elevados de TAFIai, e níveis similares de antígeno TAFI, TAFI-AP e TAFIa comparados ao grupo controle (BRUIJNE *et al.*, 2009).

Vários polimorfismos do gene do TAFI têm sido descritos, com forte desequilíbrio de ligação, associados aos níveis de antígeno TAFI, sugerindo que os níveis plasmáticos de antígeno TAFI teriam forte controle genético. O SNP 1040C/T Thr 325 Ile é de interesse particular por estar associado com uma maior estabilidade e maior potencial antifibrinolítico

(GUIMARÃES *et al.*, 2005). SEGEV *et al.*, (2004) avaliando pacientes com angina de peito estável, submetidos à intervenção coronariana percutânea (PCI), observaram que os portadores do genótipo TT (Ile/Ile) estavam associados a níveis mais baixos de antígeno TAFI e menores taxas de restenose após a PCI, enquanto, os portadores do genótipo CC foram associados a maiores níveis de antígeno TAFI e um aumento de 60% do efeito antifibrinolítico.

Além das possibilidades mencionadas anteriormente, os resultados contraditórios em relação ao TAFI podem ser explicados por seus dois efeitos opostos no desenvolvimento de eventos cardiovasculares. Enquanto a associação de altos níveis de TAFI e DCV pode ser resultado do estado hipofibrinolítico, a associação entre baixos níveis de TAFI e DCV pode ser explicada pelo defeito na regulação da inflamação (SUCKER *et al.*, 2006; MELTZER *et al.*, 2009).

O estudo de caso-controle SMILE (Study of Myocardial Infarctions Leiden), demonstrou que indivíduos com baixos níveis de TAFI, medidos por um teste funcional, apresentavam risco aumentado do primeiro IAM comparado com aqueles que tinham níveis altos de TAFI. Esses resultados não são esperados devido ao papel do TAFI na fibrinólise. Entretanto, como a inflamação desempenha um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose e trombose arterial, não é improvável que níveis aumentados de TAFI possa diminuir o risco de infarto do miocárdio, pela diminuição da resposta inflamatória. Esses dois efeitos opostos podem também justificar os resultados conflitantes de TAFI e trombose venosa. Considerando que o processo inflamatório é menos importante em doenças venosas, há consistente relação entre altos níveis de TAFI e risco de trombose venosa (MELTZER *et al.*, 2009).

No presente estudo foi observada correlação entre níveis de TAFI e os parâmetros do perfil lipídico, à exceção da LP(a), sugerindo que a dislipidemia exerce algum efeito na síntese de TAFI, o que poderia ter algum impacto sobre o status hemostático.

Cumprе ressaltar que, no futuro, a determinação dos níveis de TAFI poderá contribuir na otimização de tratamentos em pacientes com doenças vasculares, através da inibição farmacológica da via do TAFI, constituindo uma nova estratégia de prevenção de trombose, ou aumentando a eficácia da terapia trombolítica (MONASTERIO *et al.*, 2003/2004). Contrariamente, a estimulação da via do TAFI poderia ser um meio para limitar as complicações da hemofilia (BOFFA & KOSCHINSKY, 2007).

6.6.2 Parâmetros hemostáticos e polimorfismos dos genes *APOE* e *APOA5*

A dislipidemia tem uma participação importante na gênese das DCV, assim como participação de mecanismos hemostáticos na formação da placa aterosclerótica e de trombos. Como os polimorfismos das apoproteínas influenciam o metabolismo de

lipoproteínas, alguns estudos têm correlacionado os níveis plasmáticos de marcadores hemostáticos com estes polimorfismos. Infelizmente, após extensa pesquisa na literatura, observou-se que estudos sobre os polimorfismos da *APOE* e parâmetros hemostáticos são escassos e, com relação a *APOA5*, não foi encontrado qualquer estudo. Portanto, a influência dos diferentes genótipos da *APOE* e do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* nesse processo permanece ainda desconhecida.

No presente trabalho, a análise da **Tabela 31** demonstra que os alelos *APOE* distribuídos nos agrupamentos E2, E3 e E4, não influenciaram os níveis dos parâmetros hemostáticos avaliados, nos grupos normolipêmico e dislipidêmico, à exceção do efeito do alelo $\epsilon 2$ sobre os níveis de TAFI no grupo dislipidêmico, mais elevados em relação ao alelo $\epsilon 4$. Da mesma forma, nenhuma associação entre alelos *APOE* e parâmetros hemostáticos foi observada quando todos os participantes foram divididos nos agrupamentos E2, E3 e E4 (**Tabela 32**). Com relação à análise dos parâmetros hemostáticos nos agrupamentos T e C do polimorfismo *APOA5*, nos grupos normolipêmico e dislipidêmico, não se observaram efeitos do polimorfismo nos níveis dos parâmetros avaliados, à exceção da associação entre a presença do alelo T e níveis mais elevados de D-DI no grupo dislipidêmico (**Tabela 33**). A mesma avaliação, porém entre todos os participantes, por agrupamentos T e C, demonstra que não houve efeito do polimorfismo *APOA5* nos níveis dos parâmetros hemostáticos (**Tabela 34**).

Em relação aos níveis de PAI-1, em trabalho realizado por BROUWERS *et al.* (2008) com pacientes hipertrigliceridêmicos, foi descrito associação entre a presença do genótipo *APOE* $\epsilon 2\epsilon 2$ e níveis mais baixos deste marcador. Segundo os autores, isto se justifica pelo fato de que as partículas de VLDLc podem estimular a secreção de PAI-1 pelas células endoteliais, sendo esse processo dependente da interação das partículas de VLDL com o receptor de LDL. Portanto, como os pacientes com o genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ apresentam baixa afinidade de ligação ao receptor de LDL, os níveis de PAI-1 se encontram 20% menores nos pacientes com hipertrigliceridemia. Com justificativa similar, ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA *et al.* (2003) demonstraram níveis plasmáticos de PAI-1 mais elevados em pacientes transplantados renais, portadores do genótipo $\epsilon 3\epsilon 4$ em comparação aos pacientes homocigotos $\epsilon 3\epsilon 3$.

Uma extensa busca na literatura de estudos sobre os polimorfismos das apolipoproteínas associados aos parâmetros hemostáticos mostra a escassez de dados e, assim, pouco se conhece sobre a influência de marcadores genéticos de dislipidemias na hemostasia. Neste contexto, um maior conhecimento sobre os genes *APOE* e *APOA5* e seus efeitos na hemostasia poderia ser trazido à luz, através de estudos prospectivos conduzidos em indivíduos dislipidêmicos, bem como em outras patologias, para elucidar o

impacto dessas variantes genéticas sobre os parâmetros hemostáticos associados ao desenvolvimento das DCV.

6.7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Atualmente, são inúmeras as linhas de pesquisas internacionais sobre risco cardiovascular. Numerosos estudos estão sendo realizados em todo o mundo, na busca das bases moleculares das doenças cardiovasculares, de novos fatores de risco e de seus papéis específicos no desenvolvimento da aterosclerose, para identificação desta, em fase pré-clínica. Estudos epidemiológico-clínicos estão sendo conduzidos na busca de identificação de variantes genéticas associadas às dislipidemias, diabetes mellitus, HAS, estados de hipercoagulabilidade, entre outras condições. Dessa forma, é importante considerar a evolução de estudos ao longo das últimas décadas, para se obter maior entendimento das características individuais e ambientais relacionadas com maior probabilidade de doença cardiovascular. Neste contexto, é importante a identificação de fatores de risco clássicos, como histórico familiar, dislipidemias, tabagismo, HAS, obesidade, sedentarismo, diabetes mellitus, dentre outros, e também de outras situações importantes como etilismo, gordura abdominal, os quais estão fortemente relacionados com a aterosclerose e suas manifestações clínicas. Nas condutas de prevenção, evolução e tratamento de doenças ateroscleróticas é importante destacar, a necessidade de melhorias no controle dos fatores de risco modificáveis, com intervenção severa nos hábitos de vida e adoção de medidas terapêuticas adequadas para se obter um declínio do número de casos de DCV.

Finalmente, o presente estudo envolvendo a identificação dos polimorfismos *APOE* e *APOA5 -1131T>C* em indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos, e suas associações com parâmetros lipídicos e hemostáticos, se propôs a ampliar o conhecimento sobre o gene *APOE*, bem como apresentar de forma inédita dados sobre o gene *APOA5*, em nosso meio. Espera-se que este estudo suscite o espírito investigador de estudiosos da área e traga oportunidades de interações entre pesquisadores, para o desenvolvimento de outros projetos envolvendo o metabolismo lipídico e as múltiplas associações entre os diversos marcadores bioquímicos, hemostáticos e genéticos envolvidos na aterosclerose.

A partir do presente trabalho, o grupo de estudos dos Laboratórios de Hematologia Clínica, Bioquímica Clínica e Biologia Molecular pretende ampliar a genotipagem para outros polimorfismos *APOA5* e *APOC3*, sendo que o polimorfismo *APOA5 SW19*, já está sendo estudado em pacientes diabéticos. Além disso, está prevista para breve a determinação de marcadores de inflamação através de parcerias com outros pesquisadores e a

implementação de técnicas para a investigação das frequências dos polimorfismos de TAFI, dando seguimento aos estudos com pacientes dislipidêmicos e outras doenças.

7-CONCLUSÕES

Após a análise, discussão e interpretação dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- As concentrações de APOB, APOA-I e o índice APOB/APOA-I não foram capazes de discriminar indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos, não trazendo qualquer benefício adicional em comparação as determinações do perfil lipídico tradicional.
- As freqüências dos alelos e genótipos *APOE* na região metropolitana de Belo Horizonte-MG são similares entre indivíduos normolipêmicos e dislipidêmicos, e também semelhantes às freqüências observadas em outras regiões brasileiras, bem como em algumas populações ocidentais.
- O polimorfismo *APOE* exerceu influência sobre os parâmetros bioquímicos CT, LDLc e fração não-HDLc, somente entre os indivíduos normolipêmicos. Os alelos *APOE* não se associaram ao aumento de susceptibilidade às dislipidemias na população avaliada.
- As freqüências do alelo raro (C) e do genótipo heterozigoto TC do polimorfismo *APOA5 -1131T>C* são superiores em indivíduos dislipidêmicos, além de similares às populações asiáticas.
- O polimorfismo *APOA5 -1131T>C* não teve efeito sobre os níveis dos parâmetros lipídicos entre os grupos normolipêmico e dislipidêmico. Quando todos os participantes foram avaliados, os níveis de CT, TG, VLDLc e fração não-HDL foram maiores entre os portadores do alelo C.
- O alelo C e o genótipo TC *APOA5* se associaram a risco aumentado de dislipidemias na população avaliada.
- Os polimorfismos *APOE* e *APOA5 -1131T>C* não exerceram influências nos níveis dos parâmetros bioquímicos Lp (a) e PCRus.
- Os níveis plasmáticos de homocisteína foram significativamente mais elevados em indivíduos do sexo masculino e naqueles com mais de 45 anos.
- Em relação à trombomodulina, as mulheres dislipidêmicas apresentaram níveis aumentados em relação às normolipêmicas.

- A dislipidemia não afetou os níveis plasmáticos dos marcadores de hipercoagulabilidade F1+2 e dímero-D, bem como os níveis do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1).
- Os níveis plasmáticos de TAFI se correlacionaram com os parâmetros do perfil lipídico, sugerindo que a dislipidemia exerce algum efeito na síntese de TAFI, o que poderá ter algum impacto sobre o status hemostático.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

AKANJI, A.O.; SURESH, C.G.; FATANIA, H.R.; AL-RADWAN, R.; ZUBAID, M. Associations of apolipoprotein E polymorphism with low-density lipoprotein size and subfraction profiles in Arab patients with coronary heart disease. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 56, p. 484-490, 2007.

ALACACIOGLU, I.; ÖZCAN, M.A.; ALACACIOGLU, A.; POLAT, M.; YÜKSEL, F.; DEMIRKAN, F.; PISKIN, O.; ÖZGENÇ, Y.; ÖZSAN, H.G.; UNLAR, B. Plasma levels of thrombin activable fibrinolysis inhibitor in normal and preeclamptic pregnant women. *Thrombosis Research*, v. 114, p. 155-159, 2004.

ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA L.; SANJURJO, P.; VALLO, A.; AGUIRRE, M.; PÉREZ-NANCLARES, G.; GIMENO, P.; RUEDA, M.; RUIZ, J.I.; RODRÍGUES-SORIANO, J. Genetic and metabolic determinants of increase plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity in children with renal transplants. *Pediatr Nephrol*, v. 18, p. 749-755, 2003.

AI-KHEDHAIRY, A.A. Apolipoprotein E polymorphism in Saudis. *Molecular Biology Reports*, v. 31, p. 257-260, 2004.

ALTAMURA, C.; SQUITTI, R.; PASQUALETTI, P.; TIBUZZI, F.; SILVESTRINI, M.; VENTRIGLIA, M.C.; CASSETTA, E.; ROSSINI, M.; VERNIERI, F. What is the relationship among atherosclerosis markers, apolipoprotein E polymorphism and dementia? *European Journal of Neurology*, v. 14, p. 679-682, 2007.

ALVES, R.J.; DIAMENT, J.; AMÂNCIO, R.F.; FORTI, N.; MARANHÃO, R.C. Ausência de efeito do captopril no metabolismo de uma emulsão lipídica artificial semelhante aos quilomícrons em pacientes hipertensos e hipercolesterolêmicos. *Arq Bras Cardiol*, v. 83, n. 6, p. 508-511, 2004.

ANDRADE, F.M.; COIMBRA Jr, C.E.A.; SANTOS, R.V.; GOICOECHEA, A.; CARNESE, F.R.; SALZANO, F.M.; HUTZ, M.H. High heterogeneity of apolipoprotein E gene frequencies in south american indians. *Annals of Human Biology*, v. 27, n. 1, p. 29-34, 2000.

AOUIZERAT, B.E.; KULKARNI, M.; HEILBRON, D.; DROWN, D.; RASKIN, S.; PULLINGER, C.R.; MALLOY, M.; KANE, J.P. Genetic analysis of a polymorphism in the human apo A-V gene: effect on plasma lipids. *Journal of Lipid Research*, v. 44, p. 1167-1173, 2003.

ARAI, H.; YAMAMOTO, A.; MATSUZAWA, Y.; SAITO, Y.; YAMADA, N.; OIKAWA, S.; MABUCHI, H.; TERAMOTO, T.; SASAKI, J.; NAKAYA, N.; ITAKURA, H.; ISHIKAWA, Y.; OUCHI, Y.; HORIBE, H.; EGASHIRA, T.; HATTORU, H.; KITA, T. Polymorphisms of apolipoprotein E and methylenetetrahydrofolate reductase in the Japanese population. *J Atheroscler Thromb*, v. 14, p. 167-171, 2007.

ARAÚJO, F.; YAMADA, A.T.; ARAÚJO, M.V.M.; LATORRE, M.R.D.O.; MANSUR, A.J. Lipidic profile of individuals without cardiopathy with overweight and obesity. *Arq Bras Cardiol*, v. 84, n. 5, p. 405-409, 2005.

ASO, Y.; WAKABAYASHI, S.; YAMAMOTO, R.; MATSUTOMO, R.; TAKEBAYASHI, K.; INUKAI, T. Metabolic Syndrome accompanied by hypercholesterolemia is strongly associated with proinflammatory state and impairment of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes. Synergistic effects of plasminogen activator inhibitor-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Diabetes care*, v. 28, p. 2211-2216, 2005.

AUSTIN, M.A.; ZHANG, C.; HUMPHRIES, S.E.; CHANDLER, W.L.; TALMUD, P.J.; EDWARD, K.L.; LEONETTI, D.L.; MCNEELY, M.J.; FUJIMOTO, W.Y. Heritability of C-reactive protein and association with apolipoprotein E genotypes in japanese americans. *Annals of Human Genetics*, v. 68, p. 179-188, 2004a.

AUSTIN, M.A.; TALMUD, P.J.; FARIN, F.M.; NICKERSON, D.A.; EDWARDS, K.L.; LEONETTI, D.; McNEELY, M.J.; VIERNES, H.M.; HUMPHRIES, S.E.; FUJIMOTO, W.Y. Association of apolipoprotein A5 variants with LDL particle size and triglyceride in japanese americans. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1688, p. 1-9, 2004b.

AZAD, N.A.; BUGAMI, M.; LOY-ENGLISH, I. Gender differences in dementia risk factors. *Gen Med*, v. 4, p. 120-129, 2007.

BACH-NGOHO, K.; GIRAUD, F.; KREMPF, M.; BARD, J.M. Influence of remnant accumulation markers on plasma concentrations of two lipoprotein (a) subspecies (containing or free of apo E). *Metabolism*, v. 50, n. 3, p. 277-282, 2001.

BAGGER, Y.Z.; RASMUSSEN, H.B.; ALEXANDERSEN, P.; WERGE, T.; CHRISTIANSEN, C.; TANKÓ, L.B.; PERF study group. Links between cardiovascular disease and osteoporosis in postmenopausal women: serum lipids or atherosclerosis per se? *Osteoporos Int*, v. 18, p. 505-512, 2007.

BAHRI, R.; ESTEBAN, E.; MORAL, P.; HASSINE, M.; HAMDA, K.B.; CHAABANI, H. Apolipoprotein gene polymorphisms and plasma levels in healthy tunisians and patients with coronary artery disease. *Lipids Health Dis*, v. 17, p. 7-46, 2008.

BAJZAR, L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 2511-2518, 2000.

BAJZAR, L.; JAIN, N.; WANG, P.; WALKER, J.B. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: not just an inhibitor of fibrinolysis. *Crit Care Med*, v. 32, n. 5, p. 320S-324S, 2004. Suplemento.

BALCERZYK, A.; ZAK, I.; KRAUZE, J. Synergistic effects of apolipoprotein E gene epsilon polymorphism and some conventional risk factors on premature ischaemic heart disease development. *Kardiologia Polska*, v. 65, p. 1058-1065, 2007.

BARBAGALLO, C.M.; POLIZZI, F.; SEVERINO, M.; RIZZO, M.; VIVONA, N.; ONORATO, F.; CALDARELLA, R.; CEFALÙ, A.B.; NOTO, D.; NOTARBARTOLO, A.; AVERNA, M.R. ApoE

polymorphism in a small Mediterranean island: relationships with plasma lipids, lipoproteins and LDL particle size. *European Journal of Epidemiology*, v. 17, p. 707-713, 2001.

BARRETO, S.M.; PASSOS, V.M.A.; CARDOSO, A.R.A.; LIMA-COSTA, M.F. Quantificando o risco de doença coronariana na comunidade. Projeto Bambuí. *Arq Bras Cardiol*, v. 81, n. 6, p. 549-555, 2003.

BAUM L.; TOMLINSON B.; THOMAS G.N. APOA5-1131T>C polymorphism is associated with triglyceride levels in Chinese men. *Clinical Genetics*, v. 63, p. 377-379, 2003.

BENNET, A.M.; ANGELANTONIO, E.; YE, Z.; WENSLEY, F.; DAHLIN, A.; AHLBOM, A.; KEAVNEY, B.; COLLINS, R.; WIMAN, B.; FAIRE, U.; DANESH, J. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*, v. 298, n. 11, p. 1300-1311, 2007.

BERTOLINI, S.; PISCIOTTA, L.; DI SCALA, L.; LANGHEIM, S.; BELLOCHIO, A.; MASTURZO, P. Genetic polymorphisms affecting expression of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, v. 174, p. 57-65, 2004.

BI, N.; YAN, S.; LI, G.; YIN, Z.; CHEN, B. A single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and alters triglyceride. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 83, p. 280-286, 2004.

BOFFA, M.B.; MARCOVINA, S.M.; KOSCHINSKY, M.L. Lipoprotein (a) as a risk factor for atherosclerosis and thrombosis: mechanistic insights from animal models. *Clinical Biochemistry*, v. 37, p. 333-343, 2004.

BOFFA, M.B.; KOSCHINSKY, M.L. Curiouser and curiouser: Recent advances in measurement of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and in understanding its molecular genetics, gene regulation, and biological roles. *Clinical Biochemistry*, v. 40, p. 431-442, 2007.

BOGAVAC-STANOJEVIĆ, N.; JELIĆ-IVANOVIĆ, Z.; SPASOJEVIĆ-KALIMANOVSKA, V.; SPASIĆ, S.; KALIMANOVSKA-OŠTRIĆ, D. Lipid and inflammatory markers for the prediction of coronary artery disease: a multi-marker approach. *Clinical Biochemistry*, v. 40, p. 1000-1006, 2007.

BOOSMSMA, D.I.; KNIJFF, P.; KAPTEIN, A.; LABEUR, C.; MARTIN, N.G.; HAVEKES, L.M.; PRINCEN, H.M.G. The effect of apolipoprotein (a)-, apolipoprotein E-, and apolipoprotein A4-polymorphisms on quantitative lipoprotein (a) concentrations. *Twin Research*, v. 3, p. 152-158, 2000.

BOUCHER, B.A.; & TRAUB, O. Achieving hemostasis in the surgical field. *Pharmacotherapy*, v. 29, n. 7, p. 2S-7S, 2009.

BROUWERS, M.C.G.J.; GOVERS-RIEMSLAG, J.; SCHALKWIJK, C.G.; GREEVENBROEK, M.M.J.V.; VAN DER KALLEN, C.J.H.; BEKERS, O.; VAN DIEIJEN-VISSER, M.P.; OEVER, J.T.; BILDERBEEK-BECKERS, M.A.L.; BRUIN, T.W.A.; CATE, H.T.; STEHOUWER, C.D.A. Plasma PAI-I levels are independently related to fatty liver and hypertriglyceridemia in familial combined hyperlipidemia, involvement of apolipoprotein E. *Thrombosis Research*, v. 122, p. 466-472, 2008.

BRUIJNE, E.L.E.; GILS, A.; GUIMARÃES, A.H.C.; DIPPEL, D.W.J.; DECKERS, J.W.; VAN DEN MEIRACKER, A.H.; POLDERMANS, D.; RIJKEN, D.C.; DECLERCK, P.J.; DE MAAT, M.P.M.; LEEBEEK, F.W.G. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in arterial thrombosis at a young age: the ATTAC study. *J Thromb Haemost*, v. 7, p. 919-927, 2009.

CAÇÃO, J.C.; SOUZA, D.R.S.; TOGNOLA, W.A.; GODOY, M.R.P.; PINHEL, M.A.S. Apolipoprotein E polymorphism in first-degree relatives of patients with familial or sporadic Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 65, n. 2-A, p. 295-298, 2007.

CAIN, W.J.; MILLAR, J.S.; HIMEBAUCH, A.S.; TIETGE, U.J.F.; MAUGEAIS, C.; USHER, D.; RADER, D.J. Lipoprotein (a) is cleared from the plasma primarily by the liver in a process mediated by apolipoprotein (a). *Journal of Lipid Research*, v. 46, p. 2681-2691, 2005.

CANTOS, G.A.; DUARTE, M.F.S.; DUTRA, R.L.; SILVA, C.S.M.; WALTRICK, C.D.A.; BALEN, M.G.; HERMES, E.; PEROZIN, A.R. Prevalência de fatores de risco de doença arterial coronária em funcionários de hospital universitário e sua correlação com estresse psicológico. *J Bras Patol Med Lab*, v. 40, n. 4, p. 240-247, 2004.

CARR, M.E. Diabetes mellitus a hypercoagulable state. *Journal of Diabetes and its complications*, v. 15, p. 44-54, 2001.

CERESA, E.; BROUWERS, E.; PEETERS, M.; JERN, C.; DECLERK, P.J.; GILS, A. Development of ELISAs measuring the extent of TAFI activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26, p. 423-428, 2006.

CHARRIERE, S.; BERNARD, S.; AQALLAL, M.; MERLIN, M.; BILLON, S.; PERROT, L.; LE COQUIL E.; SASSOLAS, A.; MOULIN, P.; MARCAIS, C. Association of APOA5 -1131T>C and S19W gene polymorphisms with both mild hypertriglyceridemia and hyperchylomicronemia in type 2 diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, v. 394, p. 99-103, 2008.

CHEN, C.C.; LEE, K.D.; GAU, J.P.; YU, Y.B.; YOU, J.Y.; LEE, S.C.; HSU, H.C.; CHAU, W.K.; HO, C.H. Plasma antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor did not differ in patients with or without disseminated intravascular coagulation. *Ann Hematol*, v. 84, p. 675-680, 2005.

CHIEN, K.; FANG, W.; WEN, H.; LIN, H.; LIN, Y.; LIN, S.; WU, J.; KAO, J. APOA1/C3/A5 haplotype and risk of hypertriglyceridemia in Taiwanese. *Clinica Chimica Acta*, v. 390, p. 56-62, 2008.

CHOY, P.C.; SIOW, Y.L.; MYMIN, D.; KARMIN, O. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol*, v. 82, p. 212-224, 2004.

COLUCCI, M.; BINETTI, B.M.; TRIPODI, A.; CHANTARANGKUL, V.; SEMERARO, N. Hyperprothrombinemia associated with prothrombin G20210A mutation inhibits plasma fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism. *Blood*, v. 103, n. 6, p. 2157-2161, 2004.

COUDERC, R.; BAILLEUL, S. L'apolipoproteine E et ses alleles chez le sujet sain et au cours de l'athérosclérose. *Ann Clin*, v. 56, p. 651-659, 1998.

DAHLBÄCK, B. Protein S and C4b-Binding Protein: componentes involved in regulation of the protein C anticoagulant system. *Thromb. Haemost.*, v. 66, n. 1, p. 49-61, 1991.

DANGAS, G.; SMITH, D.A.; BADIMON, J.J.; UNGER, A.H.; SHAO, J.H.; MERAJ, P.; COHEN, A.M.; LEVINE, D.; FALLON, J.T.; AMBROSE, J.A. Gender differences in blood thrombogenicity in hyperlipidemic patients and response to pravastatin. *Am J Cardiol*, v. 84, p. 639-643, 1999.

DARVALL, K.A.L.; SAM, R.C.; SILVERMAN, S.H.; BRADBURY, A.W.; ADAM, D.J. Obesity and trombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v.33, p.223-233 , 2007.

DAVIE, E.W. & RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DAVIGNON, J. Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 25, p. 267-269, 2005.

DI MINNO, M.N.D.; TREMOLI, E.; COPPOLA, A.; LUPOLI, R.; DI MINNO, G. Homocysteine and arterial thrombosis: Challenge and opportunity. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 103, p. 942-961, 2010.

DO, Y.H.; GIFFORD-MOORE, D.S.; BEIGHT, D.W.; RATHNACHALAM, R.; KLIMKOWSKI, V.J.; WARSHAWSKY, A.M.; LU, D. Inhibition of thrombin activable fibrinolysis inhibitor by cysteine derivatives. *Thrombosis Research*, v. 116, p. 265-271, 2005.

DUARTE, E.R.; PELLANDA, L.C.; PORTAL, V.L. Perfil inflamatório, metabólico e lipídico na síndrome isquêmica aguda: relação com eventos intra e pós-hospitalares. *Arq Bras Cardiol*, V. 84, n. 2, p. 122-129, 2005.

DULLENS, S.P.J.; PLAT, J.; MENSINK, R.P. Increasing apo A-I production as a target for CHD risk reduction. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 17, p. 616-628, 2007.

DUSSE, L.M.S.; COOPER, A.J.; LWALEE, B.A. Thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI): a role in pre-eclampsia? *Clinica Chimica Acta*, v. 378, p. 1-6, 2007.

EICHENBAUM-VOLINE, S.; OLIVIER, M.; JONES, E.L.; NAOUMOVA, R.P.; JONES, B.; GAU, B.; PATEL, H.N.; SEED, M.; BETTERIDGE, D.J.; GALTON, D.J.; RUBIN, E.M.; SCOTT, J.; SHOULDERS, C.; PENNACCHIO, L.A. Linkage and association between distinct variants of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 24, p. 167-174, 2004.

EICHINGER, S.; SCHÖNAUER, V.; WELTERMANN, A.; MINAR, E.; BIALONCZYL, C.; HIRSCHL, M.; SCHNEIDER, B.; QUEHENBERGER, P.; KYRLE, P.A. Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor and risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood*, v. 103, n. 10, p. 3773-3776, 2004.

EITZMAN, D.T.; WESTRICK, R.J.; XU, Z.; TYSON, J.; GINSBURG, D. Hyperlipidemia promotes thrombosis after injury to atherosclerotic vessels in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 1831-1834, 2000.

ELIAS, A.; BONFILS, S.; DAOUD-ELIAS, M.; GAUTHIER, B.; SIÉ, P.; BOCCALON, H.; BONEU, B. Influence of long term oral anticoagulants upon prothrombin fragment 1+2, thrombin-antithrombin III complex and D-dimer levels in patients affected by proximal deep vein thrombosis. *Thromb. Haemost.*, v. 69, n. 4, p. 302-305, 1993.

ENDO, K.; YANAGI, H.; ARAKI, J.; HIRANO, C.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; TOMURA, S. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Human Genetics*, v. 111, n. 6, p. 570-572, 2002.

EREM, C.; NUHOGLU, I.; KOC AK, M.; YILMAZ, M.; SIPAHI, S.T.; UCUNCU, O.; ERSOZ, H.O. Blood coagulation and fibrinolysis in patients with acromegaly: increased plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), decreased tissue factor pathway inhibitor (TFPI), and an inverse correlation between growth hormone and TFPI. *Endocrine*, v. 33, n. 3, p. 270-276, 2008.

ESMON, C.T. The protein C pathway. *Chest*, v. 124, n. 3, p. 26S-32S, 2003. Suplemento.

EVANS, D.; BUCHWALD, A.B.; BEIL, F.U. The single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia. *J Mol Med*, v. 81, p. 645-654, 2003.

FIEGENBAUM, M.; ANDRADE, F.M.; HUTZ, M.H. Association between plasma lipid parameters and APOC3 genotypes in brazilian subjects: effect of gender, smoking and APO E genotypes. *Clinica Chimica Acta*, v. 380, p. 175-181, 2007.

FILHO, W.S.; FILHO, E.E.M.; HORTA, P.; LEMOS, P.A.; MIGUELETTO, B.C.; SERRANO Jr, C.V.; RAMIRES, J.A.F.; MARTINEZ, T.L.R. Intracoronary inflammatory markers after percutaneous coronary interventions. *Arq Bras Cardiol*, v. 85, n. 3, p. 180-185, 2005.

FOLEY, S.M. Update on risk factors for atherosclerosis: the role of inflammation and apolipoprotein E. *Medsurg Nursing*, v. 14, n. 1, p. 43-50, 2005.

FORTI, N.; SALAZAR, L.A.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S.D.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Alterações genéticas e colesterolemia: recentes estudos brasileiros. *Arq Bras Cardiol*, v. 80, n. 5, p. 565-571, 2003.

FORTI, N.; DIAMENT, J. High-Density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, p. 672-679, 2006.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Apolipoproteínas B e A-I: fatores de risco cardiovascular? *Rev Assoc Med Bras*, v. 53, n. 3, p. 276-282, 2007.

FRANÇA, E.; ALVES, J.G.B.; HUTZ, M.H. Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipid levels in brazilian children. *Human Biology*, v. 76, n. 2, p. 267-275, 2004.

FRANÇA, E.; ALVES, J.G.B. Dyslipidemia among adolescents and children from Pernambuco – Brazil. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, n. 6, p. 722-727, 2006.

FRANCO, R.F. Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 34, p. 229-237, 2001a.

FRANCO, R.F.; FAGUNDES, M.G.; MEIJERS, J.C.M.; REITSMA, P.H.; LOURENÇO, D.; MORELLI, V.; MAFFFEI, F.H.; FERRARI, I.C.; PICCINATO, C.E.; SILVA-JR, W.A.; ZAGO, M.A. Identification of polymorphism in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica*, v. 86, n. 5, p. 510-517, 2001b.

FRANÇOSO, L.A.; COATES, V. Anatomicopathological evidence of the beginning of atherosclerosis in infancy and adolescence. *Arq Bras Cardiol*, v. 78, n. 1, p. 137-142, 2002.

FRERE, C.; RENARD, S.; GILS, A.; VAN DE WERF, F.; ALESSI, M.C. TAFI levels in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *J Thromb Haemost*, v. 3, p. 395-397, 2005.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, v. 18, p. 499-552, 1972.

FRIKE-SCHMIDT, R.; NORDESTGAARD, B.G.; AGERHOLM-LARSEN, B.; SCHNOHR, P.; TYBJAERG-HANSEN, A. Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype. *Journal of Lipid Research*, v. 41, p. 1812-1822, 2000.

FUZIKAWA, A.K.; PEIXOTO, S.V.; TAUFER, M.; MORIGUCHI, E.H.; LIMA-COSTA, M.F. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí health and aging study. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, p. 1429-1434, 2007.

GARCÉS, C.; CANTOS, M.; BENAVENTE, M.; GRANIZO, J.J.; CANO, B.; VITURRO, E.; DE OYA, M. Variations in APOE genotype distribution in children from areas with different adult cardiovascular disease mortality in Spain. *Human Biology*, v. 76, n. 4, p.615-621, 2004.

GARCIA, G.; TREJOS, J.; RESTREPO, B.; LANDÁZURI, P. Homocysteine, folate and vitamin B12 in Colombian Patients with coronary disease. *Arq Bras Cardiol*, v. 89, n. 2, p. 79-85, 2007.

GEMMATI, D.; SERINO, M.L.; VERZOLA, I.; MARI, R.; MORATELLI, S.; BALLERINI, G. Resistance to activated protein C and low levels of protein S activity in nine thrombophilic families: a correct diagnosis. *Blood Coag. Fibrinol.*, v. 8, p. 118-123, 1997.

GEORGIEVA, A.M.; CATE, H.T.; KEULEN, E.T.P.; OERLE, R.V.; GOVERS-RIEMSLAG, J.W.P.; HAMULYÁK, K.; VAN DER KALLEN, C.J.H.; VAN GREEVENBROEL, M.M.J.; BRUIN, T.W.A. Prothrombotic markers in familial combined hyperlipidemia evidence of endothelial cell activation and relation to metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, v. 175, p. 345-351, 2004.

GIASSAKIS, G.; VELETZA, S.; PAPANAS, N.; HELIOPOULOS, I.; PIPERIDOU, H. Apolipoprotein E and first-ever ischaemic stroke in Greek hospitalized patients. *The Journal of International Medical Research*, v. 35, p. 127-133, 2007.

GIULIANO, I.C.B.; COUTINHO, M.S.S.A.; FREITAS, S.F.T.; PIRES, M.M.S.; ZUNINO, J.N.; RIBEIRO, R.Q.C. Serum lipids in school kids and adolescents from Florianópolis, SC, Brazil – Healthy floripa 2040 study. *Arq Bras Cardiol*, v. 85, n. 2, p. 85-91, 2005.

GRANÉR, M.; KAHRI, J.; VARPULA, M.; SALONEN, R.M.; NYSSÖNEN, K.; JAUHAINEN, M.; NIEMINEN, M.S.; SYVÄNNE, M.; TASKINEN, M.R. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both carotid and coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 18, n.4, p.271-277, 2008.

GRAVINA-TADDEI, C.F.; BATLOUNI, M.; SARTESCHI, C.; BALTAR, V.T.; SALVARINI, N.A.C.; BERTOLAMI, M.C.; SOUSA, J.E.M.R. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for coronary atherosclerotic diseases in the elderly. *Arq Bras Cardiol*, v. 85, n. 3, p. 166-173, 2005.

GREEN, D. Coagulation cascade. *Hemodialysis International*, v. 10, p. s2-s4, 2006.

GREENOW, K.; PEARCE, N.J.; RAMJI, D.P. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med*, v. 83, p. 329-342, 2005.

GRÖNROOS, P.; RAITAKARI, O.T.; KÄHÖNEN, M.; HUTRI-KÄHÖNEN, N.; MARNIEMI, J.; VIIKARI, J.; LEHTIMÄKI, T. Influence of apolipoprotein E polymorfism on serum lipid and lipoprotein changes: a 21-year follow-up study from childhood to adulthood. The cardiovascular risk in young Finns study. *Clin Chem Lab Med*, v. 45, n. 5, p. 592-598, 2007.

GRÖNROOS, P.; RAITAKARI, O.T.; KÄHÖNEN, M.; HUTRI-KÄHÖNEN, N.; JUONALA, M.; MARNIEMI, J.; VIIKARI, J.; LEHTIMÄKI, T. Relation of apolipoprotein E polymorphism to markers of early atherosclerotic changes in young Finns study. *Circ J*, v. 72, p. 29-34, 2008.

GUIMARÃES, A.H.C.; BERTINA, R.M.; RIJKEN, D.C. A new functional assay of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost*, v. 3, p. 1284-1292, 2005.

GUYTON, A.C.; HALA, J.E. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. 973p.

HANDIN, R.I.; LOSCALZO, J. Hemostase, trombose, fibrinólise e doenças cardiovasculares. In: BRAUNWALD, E. *Tratado de medicina cardiovascular*. 4. ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 1897-1921.

HANDIN, R.I.; LUX, S.E.; STOSSEL, T.P. *Blood – Principles and practice of hematology*. 2ª edição. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 2304p.

HANSSON, G.K. Mechanisms of disease inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, v. 352, p. 1685-1695, 2005.

HARBOE-GONÇALVES, L.; VAZ, L.S.; BUZZI, M. Associação entre níveis plasmáticos de homocisteína e acidente vascular cerebral. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 63, n. 1, p. 97-103, 2005.

HARDMAN, J.G.; LIMBRID, L.E. (ED). *Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica*. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647p.

HATTERS, D.M.; PETERS-LIBEU, C.A.; WEISGRABER, K.H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci*, v. 31, n. 8, p. 445-454, 2006.

HEEREN, J.; BEISIEGEL, U.; GREWAL, T. Apolipoprotein E recycling. Implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26, p. 442-448, 2006.

HEGELE, R.; POLLEX, R.L. Apolipoprotein A-V genetic variation and plasma lipoprotein response to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, p. 1224-1227, 2007.

HOFFMAN, M. A cell-base model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews*, v. 17, p. s1-s5, 2003a.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, v. 16 (1/2), p. 17-20, 2003b.

HOLANDA, M.M.A.; FILIZOLA, R.G.; COSTA, M.J.C.; ANDRADE, R.V.C.L.; SILVA, J.A.G. A comparison between diabetic and non-diabetic patients with acute ischemic stroke. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 62, n. 2-A, p. 233-236, 2004.

HOLME, I.; AASTVEIT, A.H.; JUNGNER, I.; WALLDIUS, G. Relationships between lipoprotein components and risk of myocardial infarction: age, gender and short versus longer follow-up periods in the Apolipoprotein Mortality RISK study (AMORIS). *Journal of Internal Medicine*, v. 264, n. 1, p. 30-38, 2008.

HOPKINS, P.N.; WU, L.L.; HUNT, S.C.; BRINTON, E.A. Plasma triglycerides and type III hyperlipidemia are independently associated with premature familial coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, v. 45, n. 7, p. 1003-1012, 2005.

HOŘEJŠÍ, B.; ČEŠKA, R. Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein (a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis. *Physiol Res*, v. 49, p. 63-69, 2000. Suplemento I.

HOŘÍNEK, A.; VRÁBLÍK, M.; ČEŠKA, R.; ADÁMKOVÁ, V.; POLEDNE, R.; HUBACEK, J.A. T1131C polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridemic individuals. *Atherosclerosis*, v. 167, n. 2, p.369-370, 2003.

HUANG, X.; ZHAO, S.; ZHANG, Q.;BAI, L.; HU, M. Association of plasma apolipoprotein AV with lipid profiles in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, v. 204, p. e99-e102, 2009.

HUBÁČEK, J.A.; ŠKODOVÁ, Z.; LÁNSKÁ, V.; STÁVEK, P.; ADÁMKOVÁ, V.; POLEDNE, R. Apolipoprotein AV variants do not affect C-reactive protein levels in caucasian males. *Physiological Research*, v. 54, p. 687-689, 2005.

HUMPHRIES, S.E.; TALMUD, P.J.; HAWES, E.; BOLLA, M.; DAY, I.N.M.; MILLER, G.J. Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: a prospective study. *Lancet*, v. 358, p. 115-119, 2001.

INEU, M.L.; MANENTI, E.; COSTA, J.L.V.; MORIGUCHI, E. HDL management: recent advances and perspectives beyond LDL reduction. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, n. 6, p. 788-794, 2006.

IRIE, F.; MASAKI, K.H.; PETROVITCH, H.; ABBOTT, R.D.; ROSS, G.W.; TAAFFE, D.R.; LAUNER, L.J.; WHITE, L.R. Apolipoprotein E epsilon4 allele genotype and the effect of depressive symptoms on the risk of dementia in men: the Honolulu-Asia Aging Study. *Arch Gen Psychiatry*, v. 65, n. 8, p. 906-912, 2008.

ISBIR, T.; YILMAZ, H.; AGACHAN, B.; KARAALI, Z.E. Cholesterol ester transfer protein, apolipoprotein E and lipoprotein lipase genotypes in patients with coronary artery disease in the Turkish population. *Clin Genet*, v. 64, p. 228-234, 2003.

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

JAEGER, C.P.; KALIL, R.A.K.; GUARAGNA, J.C.V.C.; CARRION, L.J.M.; BODANESE, L.C.; PETRACCO, J.B. Preoperative serum fibrinogen as a predictor of myocardial infarction in the surgical myocardial revascularization. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, n. 3, p. 281-287, 2006.

JANG, Y.; KIM, J.Y.; KIM, O.Y.; LEE, J.E.; CHO, H.; ORDOVAS, J.M.; LEE, J.H. The -1131T→C polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with postprandial hypertriglycerolemia; elevated small, dense LDL concentrations; and oxidative stress in nonobese Korean men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 80, p. 832-840, 2004.

JANG, Y.; PAIK, J.K.; HYUN, Y.J.; CHAE, J.S.; KIM, J.Y.; CHOI, J.R.; LEE, S.H.; SHIN, D.; ORDOVAS, J.M.; LEE, J.H. The apolipoprotein A5 -1131T>C promoter polymorphism in Koreans: association with plasma APOA5 and coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*, v. 402, p. 83-87, 2009.

JARDIM, P.C.B.V.; GONDIM, M.R.P.; MONEGO, E.T.; MOREIRA, H.G.; VITORINO, P.V.O.; SOUZA, W.K.S.B.; SCALA, L.C.N. High blood pressure and some risk factors in a Brazilian capital. *Arq Bras Cardiol*, v. 88, n. 4, p. 452-457, 2007.

JOHN, S.; DROBNIK, W.; LACKNER, K.; SCHMIEDER, R.E. Soluble thrombomodulin and endothelial dysfunction in early atherosclerosis. *The Lancet*, v. 354, p. 1647, 1999.

JUDSON, R.; BRAIN, C.; WINDEMUTH, A.; RUAÑO, G.; REED, C. New and confirmatory evidence of an association between APOE genotype and baseline C-reactive protein in dyslipidemic individuals. *Atherosclerosis*, v. 177, p. 345-351, 2004.

JUHAN-VAGUE, I.; RENUCCI, J.F.; GRIMAU, M.; MORANGE, P.E.; GOVERNET, J.; GOURMELIN, Y.; ALESSI, M.C. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 2156-2161, 2000.

KAHRI, J.; SORO-PAAVONEN, A.; EHNHOLM, C.; TASKINEN, M.R. ApoE polymorphism is associated with C-reactive protein in low-HDL family members and in normolipidemic subjects. *Mediators of inflammation*, v. 2006, n. 3, p.12587, 2006.

KARÁSEK, D.; VAVERKOVÁ, H.; HALENKA, M.; SLAVÍK, L.; NOVOTNÝ, D. Endothelial haemostatic markers in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Thrombosis Research*, v. 123, p. 466-475, 2009.

KISFALI, P.; MOHÁS, M.; MAASZ, A. HADARITS, F.; MARKÓ, L.; HORVATOVICH, K.; OROSZLÁN, T.; BAGOSI, Z.; BUJTOR, Z.; GASZTONYI, B.; WITTMANN, I.; MELEGH, B. Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant associates with increased triglyceride levels and confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians. *Circulation Journal*, v. 72, p. 40-43, 2008.

KLOS, K.L.E.; HAMON, S.; CLARK, A.G.; BOERWINKLE, E.; LIU, K.; SING, C.F. APOA5 polymorphisms influence plasma triglycerides in young, healthy african americans and whites of the CARDIA Study. *J Lipid Res*, v. 46, p. 564-570, 2005.

KLUGER, M.; HEEREN, J.; MERKEL, M. Apoprotein A-V: an important regulator of triglyceride metabolism. *J Inherit Metab Dis*, v. 31, p. 281-288, 2008.

KWON, M.K.; RHEE, S.Y.; CHON, S.; OH, S.; WOO, J.T.; KIM, S.W.; KIM, J.W.; KIM, Y.S.; JEONG, K.H.; LEE, S.H.; LEE, T.W.; IHM, C.G. Association between apolipoprotein E genetic polymorphism and the development of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 77S, p. S228-S232, 2007.

LAI, C.; DEMISSIE, S.; CUPPLES, A.; ZHU, Y.; ADICONIS, X.; PARNELL, L.D.; CORELLA, D.; ORDOVAS, J.M. Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *J Lipid Res*, v. 45, p. 2096-2105, 2004.

LAUER, M.S.; FONTANAROSA, P.B. Updated guidelines for cholesterol management. *Jama*, v. 285, n. 19, p. 2508-2509, 2001.

LEIVA, E.; MUJICA, V.; ELEMATORE, I.; ORREGO, R.; DÍAZ, G.; PRIETO, M.; ARREDONDO, M. Relationship between apolipoprotein E polymorphism and nephropathy in

type-2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.78, n. 2, p. 196-201, 2007.

LI, G.P.; WANG, J.Y.; YAN, S.K.; CHEN, B.S.; XUE, H.; WU, G. Genetic effect of two polymorphisms in the apolipoprotein A5 gene and apolipoprotein C3 gene on serum lipids and lipoproteins levels in a Chinese population. *Clin Genet*, v. 65, p. 470-476, 2004.

LIMA, L.M.; SOUSA, M.O.; FERNANDES, A.P.; LOURES-VALE, A.A.; NETO, C.P.F.; GARCIA, J.C.F.; SAAD, J.A.; CARVALHO, M.G. Prothrombin fragment 1+2 in subjects undergoing coronary angiography. *Rev bras hematol hemoter*, v. 27, n. 3, p. 188-191, 2005.

LIMA, L.M.; CARVALHO, M.G.; LOURES-VALE, A.A.; FERNANDES, A.P.; MOTA, A.P.L.; NETO, P.F.; GARCIA, J.C.F.; SAAD, J.A.; SOUSA, M.O. Increased serum levels of lipoprotein (a) correlated with the severity of coronary artery disease in patients submitted to angiography. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, n. 3, p. 260-266, 2006.

LIMA, L.M.; CARVALHO, M.G.; SOUSA, M.O. Apo B/Apo A-I ratio and cardiovascular risk prediction. *Arq Bras Cardiol*, v. 88, n. 6, p. e187-e190, 2007a.

LIMA, L.M.; CARVALHO, M.G.; SABINO, A.P.; MOTA, A.P.L.; FERNANDES, A.P.; SOUSA, M.O. Apo B/Apo A-I ratio in central and peripheral arterial diseases. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 51, n. 7, p. 1160-1165, 2007b.

LIMA, L.M.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, A.P.; SABINO, A.P.; LOURES-VALE, A.A.; NETO, C.P.F.; GARCIA, J.C.F.; SAAD, J.A.; SOUSA, M.O. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase in subjects undergoing coronary angiography. *Arq Bras Cardiol*, v. 88, n. 2, p. 167-172, 2007c.

LIMA, L.M.; CARVALHO, M.G.; LOURES-VALE, A.A.; NETO, C.P.F.; GARCIA, J.C.F.; SAAD, J.A.; SOUSA, M.O. High-sensitivity C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *J Bras Patol Lab*, v. 43, n. 2, p. 83-86, 2007d.

LIPPI, G.; TESSITORE, N.; SALVAGNO, G.L.; BEDOGNA, V.; BASSI, A.; MONTAGNANA, M.; LUPO, A.; GUIDI, G.C. Influence of haemodialysis on high-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein (a), apolipoproteins A and B. *Clinical Biochemistry*, v. 40, p. 1336-1338, 2007.

LOTSPEICH-STEININGER, C.A. Introduction to hemostasis. In: LOTSPEICH-STEININGER, C.A.; STIENE-MARTIN, E.A.; KOEPKE, J.A. *Clinical hematology*. New York: J.B. Lippincott, 1992. p 564-578.

LOURENÇO, D.M. Mecanismos envolvidos na formação do trombo. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*, v. 7, n. 3, p. 333-338, 1997.

LOWE, G.D.O.; RUMLEY, A.; McMAHON, A.D.; FORD, I.; O'REILLY, D.S.J.; PACKARD, C.J.; for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Interleukin-6, fibrin D-dimer, and coagulation factors VII and XIIa in prediction of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 24, p. 1529-1534, 2004.

LUKÁŠ, Z.; KATEŘINA, Z.; MICHAL, V.; TOMÁŠ, H.; MARTINA, P.; HELENA, S.; RICHARD, C. Lipoprotein (a) and its position among other risk factors of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med*, v. 42, n. 5, p. 525-532, 2007.

LUTHRA, K.; BHARGHAV, B.; CHABBRA, S.; DAS, N.; MISRA, A.; AGARWAL, D.P.; PANDEY, R.M.; SRIVASTAVA, L.M. Apolipoprotein E polymorphism in northern Indian patients with coronary heart disease: phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. *Molecular and cellular Biochemistry*, v.232, p. 97-102, 2002.

MAASZ, A.; KISFALI, P.; JAROMI, L.; HORVATOVICH, K.; SZOLNOKI, Z.; CSONGEI, V.; SAFRANY, E.; SIPEKY, C.; HADARITS, F.; MELEGH, B. Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. *Circulation Journal*, v. 72, p. 1065-1070, 2008.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature*, v. 202, p. 498-499, 1964.

MALAVAZI, I.; ABRÃO, E.P.; MIKAWA, A.Y.; LANDGRAF, V.O.; COSTA, P.I. Abnormalities in apolipoprotein and lipid levels in an HIV-infected brazilian population under different treatment profiles: the relevance of apolipoprotein E genotypes and immunological status. *Clin Chem Lab Med*, v. 42, n. 5, p. 525-532, 2004.

MALÝ, M.A.; TOMAŠOV, P.; HÁJEK, P.; BLÁŠKO, P.; HRACHOVINOVÁ, I.; SALAJ, P.; VESELKA, J. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. *Physiol. Res.*, v. 56, p. 685-695, 2007.

MARTINEZ, T.L.R. *Manual de condutas clínicas em dislipidemias*. Rio de Janeiro: Medline, 2003. 392p.

MARTINEZ, T.L.R. *Dislipidemias: da teoria à prática*. São Paulo: Atheneu, 2004. 416p.

MARTINI, C.H.; BRANDTS, A.; BRUIJNE, E.L.E.; VLIEG, V.H.; LEEBEEK, F.W.G.; LISMAN, T.; ROSENDAAL, F.R. The effect of genetic variants in the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)-antigen levels, clot lysis time and the risk of venous thrombosis. *British Journal of Haematology*, v. 134, p. 92-94, 2006.

MÄRZ, W.; SCHARNAGL, H.; HOFFMANN, M.M.; BOEHM, B.O.; WINKELMANN, B.R. The apolipoprotein E polymorphism is associated with circulating C-reactive protein (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study). *European Heart Journal*, v. 25, p. 2109-2119, 2004.

MATOS, M.F.D.; SILVA, N.A.S.; PIMENTA, A.J.M.; CUNHA, A.J.L.A. Prevalência dos fatores de risco para doença cardiovascular em funcionários do centro de pesquisas da Petrobras. *Arq Bras Cardiol*, v. 82, n. 1, p. 1-4, 2004.

MATURANA, M.A.; IRIGOYEN, M.C.; SPRITZER, P.M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics*, v. 62, n. 1, p. 77-86, 2007.

MATYSZKO, J.; TYMCIO, J. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and other hemostatic parameters in patients with essential arterial hypertension. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*, v. 118, p. 36-40, 2008.

MEDINA-URRUTIA, A.X.; CARDOSO-SALDAÑA, G.C.; ZAMORA-GONZÁLEZ, J.; LIRIA, Y.K.; POSADAS-ROMERO, C. Apolipoprotein E polymorphism is related to plasma lipids and apolipoproteins in Mexican adolescents. *Human Biology*, v. 76, n. 4, p. 605-614, 2004.

MEIR, K.S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E – deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 24, p. 1006-1014, 2004.

MEISINGER, C.; LOEWEL, H.; MRAZ, W.; KOENIG, W. Prognostic value of apolipoprotein B and A-I in the prediction of myocardial infarction in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *European Heart Journal*, v. 26, p. 271-278, 2005.

MELTZER, M.E.; DOGGEN, C.J.M.; GROOT, P.G.; MEIJERS, J.C.C.; ROSENDAAL, F.R.; LISMAN, T. Low thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activity levels are associated with an increased risk of a first myocardial in men. *Haematologica*, v. 94, n. 6, p. 811-818, 2009.

MENDES-LANA, A.; PENA, G.G.; FREITAS, S.N.; LIMA, A.A.; NICOLATO, R.L.C.; NASCIMENTO-NETO, R.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; FREITAS, R.N. Apolipoprotein E polymorphism in Brazilian dyslipidemic individuals: Ouro Preto study. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, n. 1, p. 49-56, 2007.

MINIHANE, A.M.; JOFRE-MONSENY, L.; OLANO-MARTIN, E.; RIMBACH, G. Apo E genotype, cardiovascular risk and responsiveness to dietary fat manipulation. *Proc Nutr Soc*, v. 66, n. 2, p. 183-197, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Morte por doenças cardiovasculares caem 20,5% no Brasil, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_ar ea=124&CO NOTICIA=10817# Acesso em 14 de maio de 2010 às 11 horas.

MONASTERIO, J.; BERMÚDEZ, P.; QUIROGA, D.; FRANCISCO, E.; MENESES, B.; Plasma thrombin-activatable fibrinolytic inhibitor (TAFI) among healthy subjects and patients

with vascular diseases: a validation study. *Pathophysiol Haemost Thromb*, v. 33, p. 382-387, 2003/2004.

MONROE, D.M.; HOFFMAN, M. The coagulation cascade in cirrosis. *Clin Liver Dis.*, v. 13, p. 1-9, 2009.

MONTAÑO-LOZA, A.; MEZA-JUNCO, J.; VALLES, V.; CASTILLO-MARTÍNEZ, L.; OREA-TEJEDA, A. Concentraciones de homocisteína plasmática en pacientes mexicanos con cardiopatía isquémica. *Rev Invest Clin*, v. 56, n. 5, p. 580-585, 2004.

MOOIJART, S.P.; BERBÉE, J.F.P.; HEEMST, D.V.; HAVEKES, L.M.; CRAEN, A.J.M.; SLAGBOOM, P.E.; RENSEN, P.C.N.; WESTENDORP, R.G.J. Apo E plasma level and risk of cardiovascular mortality in old age. *Plos Medicine*, v. 3, n. 6, p. 874-883, 2006.

MORANGE, P.E.; TREGOUET, D.A.; FRERE, C.; LUC, G.; ARVEILER, D.; FERRIERES, J.; AMOUYEL, P.; EVANS, A.; DUCIMETIERE, P.; CAMBIEN, F.; TIRET, L.; JUHAN-VAGUE, I. ON BEHALF OF THE PRIME STUDY GROUP. TAFI gene haplotypes, TAFI plasma levels and future risk of coronary heart disease: the PRIME study. *J Thromb Haemost*, v. 3, p. 1503-1510, 2005.

MOZAS, P.; CASTILLO, S.; REYES, G.; TEJEDOR, D.; CIVEIRA, F.; GARCIA-ALVAREZ, I.; PUZO, J.; CENARRO, A.; ALONSO, R.; MATA, P.; POCOVI, M.; and the Spanish group FH Zaragoza, Huesca, and Madrid, Spain. Apolipoprotein E genotype is not associated with cardiovascular disease in heterozygous subjects with familial hypercholesterolemia. *Am Heart J*, v. 145, p. 999-1005, 2003.

MUDD, J.O.; BORLAUG, B.A.; JOHNSTON, P.V.; KRAL, B.G.; ROUF, R.; BLUMENTAL, R.S.; KWITEROVICH, P.O. Beyond low-density lipoprotein cholesterol. Defining the role of low-density. Lipoprotein heterogeneity in coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 50, n. 18, p. 1735-41, 2007.

MURASE, T.; OKUBO, M.; AMEMIYA-KUDO, M.; HIRAGA, T.; OKA, J.; SHIMADA, M.; IGARASHI, T. Impact of markedly elevated serum lipoprotein (a) levels (≥ 100 mg/dL) on the risk of coronary heart disease. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 56, p. 1187-1191, 2007.

MURDOCH, S.J.; BORIGHT, A.P.; PATERSON, A.D.; ZINMAN, B.; STEFFES, M.; CLEARY, P.; EDWARDS, K.; MARCOVINA, S.S.; PURNELL, J.Q.; BRUNZELL, J.D. LDL composition in E2/2 subjects and distribution by Apo E genotype in type 1 diabetes. *Atherosclerosis*, v. 192, p. 138-147, 2007.

MYLES, T.; NISHIMURA, T.; YUN, T.H.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; PATTERSON, A.J.; PEARL, R.G.; LEUNG, L.L.K. Thrombin activable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem*, v. 278, n. 51, p. 51059-51067, 2003.

NABIKA T, NASREEN S, KOBAYASHI S, MASUDA J. The genetic effect of the apoprotein AV gene on the serum triglyceride level in Japanese. *Atherosclerosis*, v. 165, 201-204, 2002.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. 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*, v. 285, n. 19, p. 2486-2497, 2001.

NEMERSON, Y. Tissue factor and haemostasis. *Blood*. 1988; 71: 1-8.

NESHEIM, M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest*, v. 124, n. 3, p. 33S-39S, 2003. Suplemento.

NESHEIM, M.; BAJZAR, L. The discovery of TAFI. *Journal of thrombosis and Haemostasis*. v. 3, p. 2139-2146, 2005.

NEVES, L.B.; MACEDO, D.M.; LOPES, A.C. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab*, v. 40, n. 5, p. 311-320, 2004.

NUNES FILHO, J.R.; DEBASTIANI, D.; NUNES, A.D.; PERES, K.G. Prevalence of cardiovascular risk factors in adults living in Luzerna, Santa Catarina, in 2006. *Arq Bras Cardiol*, v. 89, n. 5, p. 319-324, 2007.

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

ÖHLIN, A.K.; MORSER, J.; ÖHLIN, H. Soluble thrombomodulin antigen in plasma is increased in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Thromb. Res.*, v. 82, n. 4, p. 313-322, 1996.

PACE, B. Cholesterol and atherosclerosis. *Jama*, v. 285, n. 19, p. 2536, 2001.

PEI, W.D.; ZHANG, Y.H.; SUN, Y.H.; GU, Y.C.; WANG, Y.F.; ZHANG, C.Y.; ZHANG, J.; LIU, L.S.; HUI, R.T.; LIU, Y.Q.; YANG, Y.J. Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotypes in chinese families with familial combined hyperlipidemia. *Circ J*, v. 70, p. 1606-1610, 2006.

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

PENNACCHIO, L.A.; OLIVIER, M.; HUBACEK, J.A.; KRAUSS, R.M.; RUBIN, E.M.; COHEN, J.C. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence plasma triglyceride levels. *Human Molecular Genetics*, v. 11, n. 24, p. 3031-3038, 2002.

PENNACCHIO, L.A.; RUBIN, E.M. Apolipoprotein A5, a newly identified agent that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.23, n. 4, p. 529-534, 2003.

PÉREZ-GÓMEZ, F.; BOVER, R. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Revista Espano Cardiol.*, v. 60, n. 12, p. 1217-11219, 2007.

PINHEIRO, M.G.V.; RABELO Jr, A.; JESUS, R.S.; NASCIMENTO, L.C.; COSTA, U.M.M. Síndromes coronarianas agudas na ausência de doença arterial coronariana significativa. *Arq Bras Cardiol*, v. 84, n. 1, p. 24-28, 2005.

PIOVESAN, F.; VERONESE, F.J.V.; SANTOS, A.F.; POZZA, R.; SARTURI, P.S.; TOGNON, A.; GARCIA, V.D.; KEITEL, E.; SAITOVITCH, D. Serum homocysteine levels in renal transplant recipients with and without hypercholesterolemia. *Arq Bras Cardiol*, v. 89, n. 3, p. 170-175, 2007.

PITSAVOS, C.; CHOUMERIANOU, D.M.; SKOUMAS, J.; MAUMUS, S.; STEFANADIS, C.; DEDOUSSIS, G.V.Z.; VISVIKIS-SIEST, S. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with lipid levels and coronary artery disease in greek patients with familial hypercholesterolaemia. *Clin Exp Med*, v. 5, p. 196-201, 2005.

PRADO, E.S.; DANTAS, E.H.M. Efeitos dos exercícios físicos aeróbio e de força nas lipoproteínas HDL, LDL e lipoproteína (a). *Arq Bras Cardiol*, v. 79, n. 4, p. 429-433, 2002.

PUCETTI, L.; BRUNI, F.; PASQUI, A.L.; PASTORELLI, M.; BOVA, G.; CERCIGNANI, M.; PALAZZUOLI, A.; AUTERI, A. Dyslipidemias and fibrinolysis. *Ital Heart J*, v. 3, p. 579-586, 2002.

RAHEMTULLAH, A.; COTT E.M.V. Hypercoagulation testing in ischemic stroke. *Arch Pathol Lab Med*, v.131, p. 890-901, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904p.

RASHID, S.; GENEST, J. Effect of obesity on high-density lipoprotein metabolism. *Obesity*, v. 15, n. 12, p. 2875-2888, 2007.

RASSI Jr, A. Otimização do tratamento medicamentoso na doença arterial coronariana: tarefa para o subespecialista? *Arq Bras Cardiol*, v. 83, n. 3, p. 187-188, 2004.

RAYGANI, A.V.; RAHIMI, Z.; KHARAZI, H.; TAVILANI, H.; POURMOTABBED, T. Association between apolipoprotein E polymorphism and serum lipid and apolipoprotein levels with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v. 408, p. 68-72, 2006.

REINER, A.P.; DIEHR, P.; BROWNER, W.S.; HUMPHRIES, S.E.; JENNY, N.S.; CUSHMAN, M.; TRACY, R.P.; WALSTON, J.; LUMLEY, T.; NEWMAN, A.B.; KULLER, L.H.; PSATY, B.M. Common promoter polymorphisms of inflammation and thrombosis genes and longevity in older adults: the cardiovascular health study. *Atherosclerosis*, v. 181, p. 175-183, 2005.

REZENDE, F.A.C.; ROSADO, L.E.F.P.L.; RIBEIRO, R.C.L.; VIDIGAL, F.C.; VASQUES, A.C.J.; BONARD, I.S.; CARVALHO, C.R. Body mass index and waist circumference: association with cardiovascular risk factors. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, n. 6, p. 728-734, 2006.

RIBALTA, J.; FIGUERA, L.; FERNANDEZ-BALLART, J.; VILELLA, E.; CASTRO, M.C.; MASANA, L.; JOVEN, J. Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 9, p.1597-1600, 2002.

RIDDEL Jr, J.P.; AOUIZERAT, B. E.; MIASKOWSKI, C.; LILLICRAP, D.P. Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

RIJKEN, D.C.; LIJNEN, H.R. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*, v. 7, p. 4-13, 2009.

RINGWALD, J.; BUETTNER, S.; ZIMMERMANN, R.; WEISBACH, V.; STRASSER, E.; ECKSTEIN, R. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and activated factor XII in patients with systemic lupus erythematosus. *Thrombosis Research*, v. 119, p. 129-131, 2007.

RONTU, R.; OJALA, P.; HERVONEN, A.; GOEBELER, S.; KARHUNEN, P.J.; NIKKILÄ, M.; KUNNAS, T.; JYLHÄ, M.; EKLUND, C.; HURME, M.; LEHTIMÄKI, T. Apolipoprotein E genotype is related to plasma levels of C-reactive protein and lipids and to longevity in nonagenarians. *Clinical Endocrinology*, v. 64, p. 265-270, 2006.

RUIXING, Y.; QIMING, F.; DEZHAI, Y.; SHUQUAN, L.; WEIXIONG, L.; SHANGLING, P.; HAI, W.; YONGZHONG, Y.; FENG, H.; SHUMING, Q. Comparison of demography, diet, lifestyle, and serum lipid levels between the Guangxi Bai Ku Yao and Han populations. *J Lipid Res*, v. 48, p. 2673-2681, 2007.

SAIDI, S.; SLAMIA, L.B.; AMMOU, S.B.; MAHJOUR, T.; ALMAWI, W.Y. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with ischemic stroke involving large-vessel disease and its relation to serum lipid levels. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, v. 16, n. 4, p. 160-166, 2007.

SANTAMARÍA, A.; OLIVER, A.; BORREL, M.; MATEO, J.; BELVIS, R.; MARTÍ-FÁBREGAS, J.; ORTÍN, R.; TIRADO, I.; SOUTO, J.C.; FONTCUBERTA, J. Risk of ischemic stroke associated with functional thrombin-activable fibrinolysis inhibitor plasma levels. *Stroke*, v. 34, p. 2387-2391, 2003.

SANTAMARÍA, A.; BORRELL, M.; OLIVER, A.; ORTÍN, R.; FORNER, R.; COLL, I.; MATEO, J.; SOUTO, J.C.; FONTCUBERTA, J. Association of functional thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) with conventional cardiovascular risk factors and its correlation with other hemostatic factors in a spanish population. *Am J Hematol*, v. 76, p. 348-352, 2004.

SANTOS, W.B.; MESQUITA, E.T.; VIEIRA, R.M.R.; OLEJ, B.; COUTINHO, M.; AVEZUM, A. Proteína-C-reativa e doença cardiovascular. As bases da evidência científica. *Arq Bras Cardiol*, v. 80, n. 4, p. 452-456, 2003.

SCAZZIOTA, A.; ALTMAN, R. El mecanismo de la hemostasia normal. *Cuadernos de Trombosis*, v. 1, p. 9-26, 1995.

SCHAEFER, J.R.; SATTTLER, A.M.; HACKLER, B.; KURT, B.; HACKLER, R.; MAISCH, B.; SOUFI, M. Hyperlipidemia in patients with apolipoprotein E2/2 phenotype: apolipoprotein A5 S19W mutation as a cofactor. *Clinical Chemistry*, v.50, p. 2214, 2004.

SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J.R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. *J Bras Patol Med Lab*, v. 39, n. 4, p. 283-288, 2003.

SCHMIDT, C.; FAGERBERG, B. ApoB/apoA-I ratio is related to femoral artery plaques in 64-year-old women also in cases with low LDL cholesterol. *Atherosclerosis*, v. 196, p. 817-822, 2008.

SCHUMACHER, A.; SELJEFLOT, I.; SOMMERVOLL, L.; CHRISTENSEN, B.; OTTERSTAD, J.E.; ARNESEN, H. Increased levels of endothelial haemostatic markers in patients with coronary heart disease. *Thrombosis Research*, v. 105, p. 25-31, 2002.

SCHWANKE, C.H.A.; CRUZ, I.B.M.; LEAL, N.F.; SCHEIBE, R.; MORIGUCHI, Y.; MORIGUCHI, E.H. Analysis of the association between apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular risk factors in an elderly population with longevity. *Arq Bras Cardiol*, v. 78, n. 6, p. 571-579, 2002.

SEGEV, A.; HEGELE, R.A.; LAU, H.K.; SPARKES, J.D.; TEITEL, J.M.; CHISHOLM, R.J.; STRAUSS, B.H. Thr325ile polymorphism of the TAFI gene is related to TAFI antigen plasma levels and angiographic restenosis after percutaneous coronary interventions. *Thrombosis Research*, v. 114, p. 137-141, 2004.

SEPETIBA, R.J.C.; ANDRADE, J.; HIRATA, R.D.C.; SEPETIBA, C.R.G.; NAKAMURA, Y.; MATSUMOTO, L.O.; CAVALLI, S.A.; BERTOLAMI, M.C. Lipoprotein lipase *Pvull*

polymorphism is associated with variations in serum lipid levels in non-diabetic pregnant women. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, p. 919-926, 2007.

SHAROBEEM, K.M.; PATEL, J.V.; RITCH, A.E.S.; LIP, G.Y.H.; GILL, P.S.; HUGHES, E.A. Elevated lipoprotein (a) and apolipoprotein B to aI ratio in south Asian patients with ischaemic stroke. *Int J Clin Pract*, v. 61, n. 11 p. 1824-1828, 2007.

SHEARER, M.J. Vitamin K. *Lancet*, v. 345, p. 229-234, 1995.

SILVA, M.A.M.; RIVERA, I.R.; FERRAZ, M.R.M.T.; PINHEIRO, A.J.T.; ALVES, S.W.S.; MOURA, A.A.; CARVALHO, A.C.C. Prevalência de fatores de risco cardiovasculares em crianças e adolescentes da rede de ensino da cidade de Maceió. *Arq Bras Cardiol*, V. 84, n. 5, p. 387-392, 2005.

SIMONSSON, M.; SCHMIDT, C.; SIGURDADOTTIR, V.; HELENIUS, M.L.; FAGERBERG, B. Life style habits such as alcohol consumption and physical activity in relation to serum apoB/apoA-I ratio amongst 64-year-old women with varying degrees of glucose tolerance. *J Intern Med*, v. 262, p. 537-544, 2007.

SMART, M.C.; DEDOUSSIS, G.; LOUIZOU, E.; YANNAKOULIA, M.; DRENOS, F.; PAPOUTSAKIS, C.; MANIATIS, N.; HUMPHRIES, S.E.; TALMUD, P.J. APOE, CETP and LPL genes show strong association with lipid levels in Greek children. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 20, n. 1, p. 26-33, 2010.

SNIDERMAN, A.D.; ROSENBLOOM, M. If apo B is so good, why isn't everybody measuring it? *The Netherlands Journal of Medicine*, v. 63, n. 6, p. 232-235, 2005.

SNIDERMAN, A.D.; HOLME, I.; AASTVEIT, A.; FURBERG, C.; WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Relation of age, the apolipoprotein B/Apolipoprotein A-I ratio, and risk of fatal myocardial infarction and implications for the primary prevention of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, v. 100, p. 217-221, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*, v. 77, p. 1-48, 2001. Suplemento III.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*, v. 88, p. 1-19, 2007. Suplemento I.

SOFI, F.; MARCUCCI, R.; ABBATE, R.; GENSINI, G.F.; PRISCO, D.; Lipoprotein (a) and venous thromboembolism in adults: A meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, v. 120, n. 8, p. 728-733, 2007.

SOUFI, M.; SATTLER, A.M.; MAISCH, B.; SCHAEFER, J.R. Molecular mechanisms involved in atherosclerosis. *Herz*, v. 27, p. 637-648, 2002.

SOUSA, M.O.; CORBELLA, E.; ALÍA, P.; CÁMARA, J.; CASTRO, M.J.; PINTÓ, X.; NAVARRO, M.A. Ausencia de asociación entre el genotipo de la apolipoproteína E y la respuesta al tratamiento con estatinas en los pacientes con episodios isquémicos agudos. *Med Clin (Barc)*, v. 11, p.401-404, 2008a.

SOUSA MO, ALÍA P, PINTÓ X, CORBELLA E, NAVARRO MA. Sex specific interaction between APOA5 -1131T>C and APOE polymorphisms and their association with severe hypertriglyceridemia. *Clinica Chimica Acta*, v. 395, p. 68-71, 2008b.

SOUZA, D.R.S.; CAMPOS, B.F.; ARRUDA, E.F.; YAMAMOTO, L.J.; TRINDADE, D.M.; TOGNOLA, W.A. Influence of the polymorphism of apolipoprotein E in cerebral vascular disease. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 61, n. 1, p. 7-13, 2003.

SOUZA, G.M.A.; ROMANO, N.L.; WHITTLE, M.R. Efficient mispriming during apolipoprotein E genotyping. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n. 1, p. 25-28, 2005.

SOUZA, D.R.S.; NAKACHIMA, L.; BIAGIONI, R.B.; NAKAZONE, M.A.; PINHEL, M.A.S.; TRINDADE, D.M.; MAFRA, V.T.; TÁCITO, L.H.B.; MARTINS, J.F.V.; PINHEIRO JUNIOR, S.; BRANDÃO, A.C. Relevance of apolipoprotein E4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, n. 2, p. 189-197, 2007.

SPRONK, H.M.H.; VAN DER VOORT, D.; CATE, H.T. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. *Thrombosis Journal*, v. 2, p. 1-10, 2004.

STENGARD, J.H.; KARDIA, S.L.R.; HAMON, S.C.; FRIKKE-SCHMIDT, R.; TYBJAERGHANSEN, A.; SALOMAA, V.; BOERWINKLE, E.; SING, C.F. Contribution of regulatory and structural variations in APOE to prediction dyslipidemia. *Journal of Lipid Research*, v. 47, p. 318-328, 2006.

STÜHLINGER, M.C.; STANGER, O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Current Drug Metabolism*, v. 6, n. 1, p. 3-14, 2005.

SUCKER, C.; HETZEL, G.R.; FAROKHZAD, F.; DAHHAN, F.; SCMITZ, M.; KURSCHAT, C.; GRABENSEE, B.; MARUHN-DEBOWSKI, B.; ZOTZ, R.; SCHARF, R. Association of genotypes of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitors with thrombotic microangiopathies – a pilot study. *Nephrol Dial Transplant*, v. 22, p. 1347-1350, 2006.

SVOBODOVÁ, H.; KUCERA, F.; STULC, T.; VRABLÍK, M.; AMARTUVSHIN, B.; ALTANNAVCH, TS.; CESKA, R. Apolipoprotein E gene polymorphism in the Mongolian population. *Folia Biologica (Praha)*, v. 53, p. 138-142, 2007.

TALMUD, P.J.; HAWES, E.; MARTIN, S.; OLIVIER, M.; MILLER, G.J.; RUBIN, E.M.; PENNACCHIO, L.A.; HUMPHRIES, S.E. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Human Molecular Genetics*, v. 11, n. 24, p. 3039-3046, 2002.

TALMUD, P.J.; MARTIN, S.; TASKINEN, M.R.; FRICK, H.; NIEMINEN, M.S.; KESANIEMI, Y.A.; PASTERNAK, A.; HUMPHRIES, S.E.; SYVANNE, M. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. *Journal of Lipid Research*, v. 45, p. 750-756, 2004.

TAVINTHARAN, S.; LIM, S.C.; CHAN, Y.H.; SUM, C.F. Apolipoprotein E genotypes affects the response to lipid-lowering therapy in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 9, p. 81-86, 2007.

TERRA, P. *Coagulação: interpretação clínica dos testes laboratoriais de rotina*. São Paulo: Atheneu, 2004. 225p.

TONSTAD, S.; THORSRUD, H.; TORJESEN, P.A.; SELJEFLOT, I. Do novel risk factors differ between men and women aged 18 to 39 years with a high risk of coronary heart disease? *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 56, p. 260-266, 2007.

TOPIC, A.; KALIMANOVSKA, V.S.; ZELJKOVIC, A.; VEKIC, J.; IVANOVIC, Z.J. Gender-related effect of apo E polymorphism on lipoprotein particle sizes in the middle-aged subjects. *Clinical Biochemistry*, v. 41, p. 361-367, 2008.

TREGOUET, D.D.; SCHNABEL, R.; ALESSI, M.C.; GODEFROY, T.; DECLERCK, P.J.; DECLERCK, P.J.; NICAUD, V.; MUNZEL, T.; BICKEL, C.; RUPPRECHT, H.J.; LUBOS, E.; ZELLER, T.; JUHAN-VAGUE, I.; BLANKENBERG, S.; TIRET, L.; MORANGES, P.E. FOR THE ATHEROGENE INVESTIGATORS. Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. *J Thromb Haemost*, v. 7, p. 49-57, 2009.

TREMBLAY A.J.; BERGERON, J.; GAGNÉ, J.M.; GAGNÉ, C.; COUTURE, P. Influence of apolipoprotein E genotype on the reliability of the Friedewald formula in the estimation of low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 54, p. 1014-1019, 2005.

TRIPODI, A.; MANNUCCI, P.M. Markers of activated coagulation and their usefulness in the clinical laboratory. *Cli. Chem.*, v. 42, n. 5, p. 664-669, 1996.

TSUKAMOTO, K.; WATANABE, Y.; MATSUSHIMA, T.; KJNOSHITA, M.; KATO, H.; HASHIMOTO, Y.; KUROKAWA, K.; TERAMOTO, T. Determination by PCR-RFLP of apo E genotype in a Japanese population. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 121, n. 4, p. 598-602, 1992.

TZIAKAS, D.N.; CHALIKIAS, G.K.; ANTONOGLU, C.O.; VELETZA, S.; TENTES, I.K.; KORTSARIS, A.X.; HATSERAS, D.I.; KASKI, J.C. Apolipoprotein E genotype and circulating interleukin-10 levels in patients with stable and unstable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, v. 48, p. 2471-2481, 2006.

UEHARA, S.K.; BALUZ, K.; ROSA, G. Possible thrombogenic mechanisms of hyperhomocysteinemia and its nutritional treatment. *Rev Nutr*, v. 18, n. 6, p. 743-751, 2005.

UNDAS, A.; BROZEK, J.; JANKOWSKI, M.; SIUDAK, Z.; SZCZEKLIK, A.; JAKUBOWSKI, H. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26, p. 1397-1404, 2006.

VALEN, G.; SIGURDARDOTTIR, O.; VAAGE, J. Systemic release of thrombomodulin, but not from the cardioplegic, reperfused heart during open heart surgery. *Thromb. Res.*, v. 83, n. 4, p. 321-328, 1996.

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

VAN DER VLIET, H.N.; SCHAAP, F.G.; LEVELS, J.H.M.; OTTENHOFF, R.; LOOIJIE, N.; WESSELING, J.G.; GROEN, A.K.; CHAMULEAU, R.A.F.M. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 295, p. 1156-1159, 2002.

VAN TIBURG, N.H.; ROSENDAAL, F.R.; BERTINA, R.M. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood*, v. 95, p. 2855-2859, 2000.

VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit*, v. 7, n. 5, p. 1075-1085, 2001.

VAYÁ, A.; MARTÍNEZ, M.; BALLESTA, A.; MARTÍ, R.; ORTUÑO, C.; AZNAR, J. Thrombomodulin levels in asymptomatic familial hipercholesterolemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 20, p. 91-96, 1999.

VIEBIG, R.F.; VALERO, M.P.; ARAÚJO, F.; YAMADA, A.T.; MANSUR, A.J. Cardiovascular health profile of an adult population from the metropolitan region of São Paulo. *Arq Bras Cardiol*, v. 86, n. 5, p. 353-360, 2006.

VILLACORTA, H.; MASETTO, A.C.; MESQUITA, E.T. C-reactive protein: an inflammatory marker with prognostic value in patients with decompensated heart failure. *Arq Bras Cardiol*, v. 88, n. 5, p. 585-589, 2007.

VINE, A.K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina*, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2009.

VRABLÍK, M.; HORÍNEK, A.; CESKA, R.; STULC, T.; KVASNICKA, T. Familial dysbetalipoproteinemia in three patients with apoE 2* (Arg 136→Cys) gene variant. *Physiol Res*, v. 52, p. 647-650, 2003.

WALKER, J.B.; BAJZAR, L. The intrinsic threshold of the fibrinolytic system is modulated by basic carboxypeptidases, but the magnitude of the antifibrinolytic effect of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor is masked by its instability. *J Biol Chem*, v. 279, n. 27, p. 27896-27904, 2004.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I.; AASTVEIT, A.H. The apoB/apoA-I ratio is better than cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clin Chem Lab Med*, v. 42, p. 1355-1363, 2004.

WALLDIUS, G.; AASTVEIT, A.H.; JUNGNER, I. Stroke mortality and the apoB/apoA-I ratio: results of the AMORIS prospective study. *J Intern Med*, v. 259, p. 259-266, 2006.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Is there a better marker of cardiovascular risk than LDL cholesterol? Apolipoproteins B and A-I – new risk factors and targets for therapy. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease*, v. 17, p. 565-571, 2007.

WILLEMSE, J.L.; HENDRIKS, D.F. Measurement of procarboxypeptidase U (TAFI) in human plasma: A laboratory challenge. *Clinical Chemistry*, v. 52, n. 1, p. 30-36, 2006.

WOUTERS, K.; SHIRI-SVERDLOV, R.; VAN GORP, P.J.; BILSEN, M.V.; HOFKER, M.H. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and Ldlr mice. *Clin Chem Lab Med*, v. 43, n. 5, p. 470-479, 2005.

YAMADA, Y.; KATO, K.; HIBINO, T.; YOKOI, K.; MATSUO, H.; SEGAWA, T.; WATANABE, S.; ICHIHARA, S.; YOSHIDA, H.; SATOH, K.; NOZAWA, Y. Prediction of genetic risk for metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, v. 191, p. 298-304, 2007a.

YAMADA, Y.; MATSUO, H.; WARITA, S.; WATANABE, S.; KATO, K.; OGURI, M.; YOKOI, K.; METOKI, N.; YOSHIDA, H.; SATOH, K.; ICHIHARA, S.; AOYAGI, Y.; YASUNAGA, A.; PARK, H.; TANAKA, M.; NOZAWA, Y. Prediction of genetic risk for dyslipidemia. *Genomics*, v. 90, p. 551-558, 2007b.

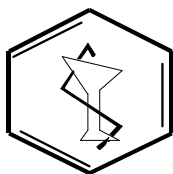
YOUNG, I.S.; NICHOLLS, D.P. Lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, v. 18, n. 6, p. 689-691, 2007.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu, 2004. 1081p.

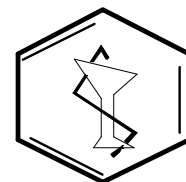
ZEERLEDER, S.; SCHROEDER, V.; HACK, E.C.; KOHLER, H.P.; WUILLEMIN, W.A. TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thrombosis Research*, v. 118, p. 205-212, 2006.

ZHANG, Y.; VASUDEVAN, S.; SOJITRAWALA, R.; ZHAO, W.; CUI, C.; XU, C.; FAN, D.; NEWHOUSE, Y.; BALESTRA, R.; JEROME, W.G.; WEISGRABER, K.; LI, Q.; WANG, J. A monomeric, biologically active, full-length human apolipoprotein E. *Biochemistry*, v. 46, p.10722-10732, 2007.

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa “ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO GENÓTIPO DA APOLIPOPROTEÍNA E (Apo E) E AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMOSTÁTICA EM INDIVÍDUOS COM DISLIPIDEMIAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS”

Prezado Sr. (a),

A pesquisa que o senhor (a) está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) tem o objetivo de detectar algumas alterações genéticas relacionadas ao aumento do colesterol e triglicérides no sangue. O benefício que você receberá será através da possibilidade de conhecimento da presença de possíveis alterações genéticas e suas implicações, importantes para que o clínico possa planejar melhor o tratamento adequado.

Nesta pesquisa, cada participante deve responder a um questionário, que será aplicado pela equipe da pesquisa, e deve doar uma amostra de sangue, na qual serão realizados vários exames laboratoriais, cujos resultados serão encaminhados para o seu médico.

A coleta de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sangüíneo subcutâneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada em local adequado, por um profissional farmacêutico, com capacidade técnica e experiência que estará atento e tomará todas as providências necessárias. Na coleta de 22 mL de sangue será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito do procedimento.

O nome do participante e, também, os resultados dos exames serão mantidos em segredo e privacidade, sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores. Os resultados serão apresentados em reuniões clínicas, nos setores da instituição ligados ao estudo ao final do trabalho e estarão disponíveis inclusive para os participantes. Este projeto visa também publicação dos resultados em revistas especializadas e tese de doutorado.

Não haverá despesas pessoais para o paciente, ficando o ônus (material, recurso humano, despesa com laboratório) para o patrocinador, também não haverá compensação financeira pela sua participação, nem remuneração financeira do pesquisador, cujo interesse é apenas científico.

Caso você não queira participar da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo no seu tratamento ou na assistência recebida pelo seu médico. Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato, por telefone, com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão relacionados a seguir:

- Profa. Dra Marinez de Oliveira Sousa – Tel: (31) 3499 6896 / 8811 1642.
Coordenadora do projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG.
- Profa. Dra Maria das Graças Carvalho – Tel: (31) 3499 6900

Professora de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

- Cláudia Natália Ferreira – Tel: (31) 3441 6903, 8807 6903.

Bioquímica e aluna de doutorado da Faculdade de Farmácia da UFMG.

- MÉDICO COLABORADOR DO PROJETO DE PESQUISA

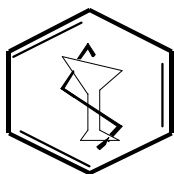
TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de 22 mL de sangue para ser utilizado na pesquisa acima.

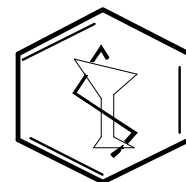
Nome completo: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

APÊNDICE B



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**



FICHA CLÍNICA

Projeto de Pesquisa **“ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO GENÓTIPO DA APOLIPOPROTEÍNA E (Apo E) E AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMOSTÁTICA EM INDIVÍDUOS COM DISLIPIDEMIAS NO ESTADO DE MINAS GERAIS”**

I – IDENTIFICAÇÃO:

1.Nome: _____
 2.Data de nascimento: ____/____/____
 3.Endereço: _____
 4.Telefone: _____ 5. CEP: _____
 6.Data da entrevista/coleta de sangue: ____/____/____ 7.Jejum: _____

II – DADOS DEMOGRÁFICOS:

1.Sexo: () M () F
 2.Estado Civil: () solteiro () casado () viúvo () separado () divorciado
 3.Tabagista: () Não () Sim Quantos cigarros por dia, em média: _____
 4.Ex-tabagista: () Não () Sim Parou a quanto tempo: _____
 5.Etilista: () Não () Sim Qual bebida: _____ Quantidade/dia: _____
 6.Ex-etilista: () Não () Sim Parou a quanto tempo: _____
 7.Doenças:
 () Hipertensão arterial () Insuficiência cardíaca () Arritmia
 () doença coronariana () Asma, enfisema () Doença renal
 () Doença hepática () Doença hematológica () Tromboses
 () Neoplasias () Outras: _____
 8.Cirurgias prévias: _____
 9.Atividade física regular? () Não () Sim : Qual modalidade: _____
 Frequência semanal: _____ Duração dos exercícios: _____
 10.Diagnóstico de dislipidemia prévia: () Não () Sim Qual: _____
 Tempo de diagnóstico: _____ Medicamentos em uso e dose: _____
 11 Outros medicamentos em uso e dose: _____
 12 DUM: _____, uso de AOH : _____ Menopausa: () Não () Sim
 uso de TRH _____

III – HISTÓRIA FAMILIAR:

1. Etnia: () Caucasiano () Mestiço: mulato, pardo () Negro () Índio () Asiático () Outros mestiços: _____
2. Seu pai tem/tinha alguma doença? () Não () Sim (Qual? _____)
3. Sua mãe tem/tinha alguma doença? () Não () Sim (Qual? _____)
4. Algum filho seu tem alguma doença? () Não () Sim () Não se aplica (Qual? _____)
5. Existe alguma doença presente em mais de uma pessoa de sua família (incluindo tios, tias, primos, avós, sobrinhos)? () Não () Sim (Qual e membros afetados? _____)

IV- EXAME FÍSICO:

- Peso : _____ altura: _____
- IMC: _____ Circunferência abdominal: _____
- Arco corneano: () Não () Sim
- Xantelasma : () Não () Sim
- Xantomas : () Não () Sim - Local: _____ Tipo: _____
- Outras alterações ao exame: _____

Exames (mais recentes)

EXAMES/ DATA			
Hb			
Ht			
Leucócitos			
Plaquetas			
Glicemia jejum			
TSH			
Uréia /Creatinina			
TGO			
TGP			
CT			
HDL			
LDL			
VLDL			
TG			

Critérios de exclusão : dislipidemias secundárias

CLÍNICAS	MEDICAMENTOSAS
Diabetes melito Hipotireoidismo Síndrome nefrótica Insuficiência renal crônica Doença hepática Doença autoimune Câncer Gravidez	Corticóides Anabolizantes Isotretinoína Ciclosporina Antiretrovirais

médico responsável
(carimbo e assinatura)

APÊNDICE C

Artigos publicados

FERREIRA, C.N.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, A.P.S.M.; LIMA, L.M.; LOURES-VALLE, A.A.; DANTAS, JANKA, Z.; J.; PALOTÁS, SOUSA, M.O. Comparative study of apolipoprotein-E polymorphism and plasma lipid levels in dyslipidemic and asymptomatic subjects, and their implication in cardio/cerebro-vascular disorders. *Neurochemistry International*, v. 56, p. 177-182, 2010.

FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.S.; CARVALHO, M.G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. Manuscrito 719 (Classificação: Atualização) aprovado em 23/11/2009.

APÊNDICE D

Resumos em congressos

20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Cytology.

Período: 28/09 a 02/10/2008, Fortaleza/CE – Brazil

Título: Apolipoprotein E allelic frequencies and lipoprotein-lipid plasma levels in normolipidemic and dyslipidemic subjects in the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. (H162)

Autores: FERREIRA, C.N.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, A.P.; LIMA, L.M.; SOUSA, M.O.

II Congresso de Ciências farmacêuticas de Ouro Preto.

Período: 30/03 a 03/04/2009, Ouro Preto/MG – Brasil

Título: Determinação da frequência do polimorfismo $-1131T>C$ no gene da *APOA5* na população de Minas Gerais.

Autores: SANTOS, I.R.; CRUZ, N.G.; COELHO, F.F.; BRITO, D.D.; FERREIRA, C.N.; RODRIGUES, K.F.; PINHEIRO, P.S.; FERNANDES, A.P.; SOUSA, M.O.; GOMES, K.B.

XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.

Período: 11 a 16/07/2009, Boston - USA

Título: TAFI plasma levels assessment in dyslipidemic subjects in Minas Gerais state, Brazil.

Autores: CARVALHO, M.G.; SOUSA, M.O.; FERNANDES, A.P.; FERREIRA, C.N.

43^o Congresso Brasileiro de Patologia Clínica.

Período: 15 a 18/08/2009, Belo Horizonte/MG – Brasil

Título: Frequência do polimorfismo $-1131T>C$ no gene da apolipoproteína A5 em indivíduos dislipidêmicos do estado de Minas Gerais – Brasil.

Autores: BORGES, K.B.G.; FERREIRA, C.N.; FERNANDES, A.P.; SOUSA, M.O.

ANEXO A

COMITÊ DE ÉTICA DA UFMG

ANEXO B

COMITÊ DE ÉTICA DO SOCOR