



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Rossana Ghesa Andrade de Freitas

Estudos dos Polimorfismos dos Genes da Apolipoproteína E (APOE) e do Receptor de LDL (RLDL - A370T) em Indivíduos Jovens Pertencentes ao Estudo do Rio de Janeiro em Seguimento de 28 Anos

Rio de Janeiro
2011

Rossana Ghessa Andrade de Freitas

Estudos dos Polimorfismos dos Genes da Apolipoproteína E (APOE) e do Receptor de LDL (RLDL - A370T) em Indivíduos Jovens Pertencentes ao Estudo do Rio de Janeiro em Seguimento de 28 Anos

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Dayse Aparecida da Silva

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Maria Eliane Campos Magalhães

Rio de Janeiro
2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F862 Freitas, Rossana Ghesa Andrade de.

Estudo dos polimorfismos dos genes da apolipoproteína E (ApoE) e do receptor de LDL (RLDL – A370T) em indivíduos jovens pertencentes ao Estado do Rio de Janeiro em seguimento de 28 anos / Rossana Ghesa Andrade de Freitas. - 2011.

XX f. : il.

Orientadora : Dayse Aparecida da Silva.

Coorientadora: Maria Eliane Campos Magalhães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Polimorfismo (Genética) - Teses. 2. Sistema cardiovascular - Doenças - Teses. 3. Dislipidemias. I. Silva, Dayse Aparecida da. II. Magalhães, Maria Eliane Campos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 591.151

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rossana Ghessa Andrade de Freitas

Estudos dos Polimorfismos dos Genes da Apolipoproteína E (APOE) e do Receptor de LDL (RLDL - A370T) em Indivíduos Jovens Pertencentes ao Estudo do Rio de Janeiro em Seguimento de 28 Anos

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de agosto de 2011.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Dayse Aparecida da Silva (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

Prof. Dr. Elizeu Fagundes Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ

Prof. Dr. Armando da Rocha Nogueira
Centro de Ciências da Saúde da UFRJ

Rio de Janeiro
2011

DEDICATÓRIA

À minha família e ao Wagner Titara pelo amor, alegria, amizade, força, apoio, exemplo e conselhos. Saibam que vocês tornam minha vida muito mais feliz.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela fé, força, sabedoria na conquista de mais uma etapa em minha vida.

Ao meu pai José Rossano Freitas pelo amor e por permitir mais esta conquista.

À minha mãe Francisca Andrade e meu irmão Ronaldo Andrade pelo carinho, apoio, alegria, confiança e torcida sempre.

Aos meus queridos avôs Alcides Freitas, Expedita Andrade e Josefa Freitas pelo exemplo de vida, amor, conselhos e apoio em todos os meus projetos.

Ao meu querido Wagner Titara pelo apoio, dedicação, incentivo, exemplo, paciência e amor em todos os momentos.

À professora Dra. Dayse Aparecida da Silva pela orientação, apoio, incentivo, paciência e exemplo fazendo sempre tudo com dedicação e carinho.

À professora Dra. Maria Luiza Fernandes pela confiança na minha capacidade, paciência, apoio e incentivo para o início desta jornada.

À professora Dra. Maria Eliane Campos Magalhães pela orientação e apoio ao longo de todo este projeto.

Aos colaboradores Dra. Andréia Araújo Brandão, Dra. Érika Maria Campana pelo apoio e incentivo ao longo de todo este tempo.

Ao Dr. Roberto Pozzan pelo apoio e assistência para a realização das análises estatísticas.

Aos meus amigos Kelly, Márcia, Monique, Raquel, Rômulo, Rose, Ana Carolina, Jaqueline, Holy e Saulo pela amizade, convívio, incentivo e momentos de descontração.

Aos amigos Simone e Ciro pela assistência, apoio, exemplo e amizade adquirida ao longo deste tempo.

Aos queridos José Carlos e Cristiane pela atenção, assistência sempre realizando seu trabalho com dedicação.

A CAPES, pela concessão da bolsa que permitiu que eu me dedicasse com mais tranquilidade aos estudos.

A todas as pessoas que participaram e que foram fundamentais para a execução deste projeto

RESUMO

FREITAS, Rossana Ghesa Andrade de. *Estudo dos polimorfismos dos genes da apolipoproteína E (ApoE) e do receptor de LDL (RLDL - A370T) em indivíduos jovens pertencentes ao Estudo do Rio de Janeiro em seguimento de 28 anos*. Brasil, 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Estudos demonstram a associação de alterações da apolipoproteína E (ApoE) e do receptor do LDL (RLDL) com a ocorrência de doenças cardiovasculares e dislipidemia. O objetivo principal deste trabalho foi investigar a associação entre genótipos diferenciais da ApoE e do RLDL com a persistência de alterações de variáveis lipídicas em indivíduos jovens acompanhados há 28 anos no Estudo do Rio de Janeiro (ERJ). Através de um estudo longitudinal, tipo coorte, investigou-se 56 indivíduos (35M) em três avaliações. Em A1 (13.30±1.53 anos), A2 (22.09±1.91 anos) e A3 (31.23±1.99). Nas três ocasiões foi realizada avaliação clínica. Em A2 e A3: colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos. Em A3 acrescentou-se o estudo dos polimorfismos genéticos da ApoE e do RLDL. Os fragmentos de interesse neste estudo foram amplificados por PCR (polymerase chain reaction) e os genótipos foram identificados através de reações de restrição. As frequências genotípicas de ApoE foram $\epsilon 3/\epsilon 3$ (62,5%), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (25%), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (5,4%), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (5,4%) e $\epsilon 4/\epsilon 4$ (1,8%) e para os genótipos de RLDL foram AA (85,7%), AT (12,5%) e TT (1,8%). O genótipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ não foi observado. A análise da distribuição dos genótipos de ApoE segundo a permanência de dislipidemia mostrou que todos os indivíduos com genótipo de ApoE dos tipos $\epsilon 2/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$ mantiveram pelo menos um lípide alterado em A2 e A3 entretanto, todos os indivíduos com genótipo de ApoE do tipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ não tinham lípides alterados em A2 e A3. Para o genótipo do RLDL não houve diferença significativa. Quando analisadas isoladamente, não foi identificado nenhum resultado significativo em A2 e/ou A3 associado a estes genótipos. O polimorfismo do gene da ApoE esteve associado à permanência de dislipidemia em indivíduos jovens acompanhados em estudo de seguimento longitudinal.

Palavras-chave: Dislipidemia. Polimorfismos do gene da APOE. Polimorfismos do gene do RLDL. Doenças cardiovasculares. Jovens.

ABSTRACT

Studies have shown the association of changes in the apolipoprotein E (ApoE) and LDL receptor (LDLR) with the occurrence of cardiovascular diseases and dyslipidemia. The objective of this study was to investigate the association between different ApoE genotypes and LDLR with the persistence of changes in lipid variables in young individuals followed-up 28 years in the study of Rio de Janeiro (ERJ). Through a longitudinal study cohort, 56 subjects (35M) in A1(13.30 ± 1.53 years), A2(22.09 ± 1.91 years) and A3(31.23 ± 1.99) were investigated. On all three occasions clinical evaluation was conducted. In A2 and A3: total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides. In A3 was added to the study of genetic polymorphisms of the ApoE and LDLR. The fragments of interest in this study were amplified by PCR (polymerase chain reaction) and the genotypes were identified by reaction with the restriction enzyme *HhaI* and *HaeIII* for ApoE and LDLR polymorphisms, respectively. ApoE genotypes were identified as $\epsilon 3/\epsilon 3$ (62.5%), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (25%), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (5.4%), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (5.4%) and $\epsilon 4/\epsilon 4$ (1.8%) and the LDLR genotypes identified as AA (85.7%), AT (12.5%) and TT (1.8%). $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotype was not observed. The analysis of the distribution of ApoE and LDLR genotypes according to the permanence of the dyslipidemia in the study sample showed that all individuals with the ApoE genotype $\epsilon 2/\epsilon 4$ and $\epsilon 4/\epsilon 4$ kept at least one lipid changes in A2 and A3 and all individuals ApoE genotype $\epsilon 2/\epsilon 3$ had not altered lipids in A2 and A3, while for RLDL genotype no difference was found. When analyzed individually, no lipid variable altered in A2 and/or A3, associated with these genotypes, were found. The ApoE gene polymorphism was associated with the permanence of dyslipidemia in young individuals in a longitudinal follow-up study.

Keywords: Dyslipidemia. Apolipoprotein E gene polymorphisms. LDL receptor gene polymorphisms. Cardiovascular diseases. Young.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alelos do gene da APOE.....	30
Figura 2	Alelos do gene do receptor de LDL.....	32
Figura 3	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% dos produtos de amplificação do gene da APOE, digeridos pela enzima <i>HhaI</i>	35
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose 3,5% dos produtos de amplificação do gene do RLDL, digeridos pela enzima <i>HaeIII</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias e desvios padrão das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais nos três momentos de avaliação	34
Tabela 2	Médias e desvios padrão das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais no grupo 0 em A3	36
Tabela 3	Médias e desvios padrão das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais no grupo 1 em A3	37
Tabela 4	Médias e desvios padrão das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais no grupo 2 em A3	38
Tabela 5	Tracking de Dislipidemia para os genótipos do gene da ApoE	39
Tabela 6	Tracking de Dislipidemia para os genótipos do gene do RLDL	40
Tabela 7	Médias das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais das amostras do ERJ em A3	41
Tabela 8	Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos dos genes da ApoE e do RLDL em amostras do ERJ e do LDD	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Altura
A1	Avaliação 1 (Fase Escolar)
A2	Avaliação 2 (Fase Familiar)
A3	Avaliação 3 (Fase Ambulatorial)
Ala	aminoácido alanina
ApoA	Apolipoproteína A
ApoB	Apolipoproteína B
ApoC	Apolipoproteína C
Apõe	Apolipoproteína E
ApoE F	Primer franqueador do gene da ApoE
ApoE R	Primer franqueador do gene da ApoE
Arg	Aminoácido arginina
°C	graus Celsius
CA	Circunferência abdominal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cm	Centímetro
Col-T	Colesterol total
Cys	Aminoácido cisteína
DAC	Doença Arterial Coronária
DCV	Doença cardiovascular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
$\epsilon 1$	Alelo épsilon 1 do gene da ApoE
$\epsilon 2$	Alelo épsilon 2 do gene da ApoE
$\epsilon 3$	Alelo épsilon 3 do gene da ApoE
$\epsilon 4$	Alelo épsilon 4 do gene da ApoE
$\epsilon 5$	Alelo épsilon 5 do gene da ApoE
$\epsilon 7$	Alelo épsilon 7 do gene da ApoE
ERJ	Estudo do Rio de Janeiro
FR	Fatores de risco
HA	Hipertensão Arterial

<i>Hae III</i>	Endonuclease de restrição para o gene do LDL
HCL	Ácido clorídrico
HDL	High Density Lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)
HDL-c	HDL colesterol
He	Heterozigosidade esperada
HF	Hipercolesterolemia Familiar
<i>HhaI</i>	Endonuclease de restrição para o gene da ApoE
HLP-III	Hipercolesterolemia tipo III
Ho	Heterozigosidade observada
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
Kb	Quilobase
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
LDD	Laboratório de Diagnósticos por DNA
LDL	Low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
LDL-c	LDL colesterol
M	Metro
m ²	Metro quadrado
Mg	Miligrama
M	Molar
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
MS	Ministério da Saúde

NaCl	Cloreto de sódio
Ng	Nanograma
NPHS-II	The Second Northwick Park Heart Study
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio
p	Peso
P1	Primer Franqueador 1 do gene do RLDL
P2	Primer Franqueador 2 do gene do RLDL
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PB	Par de Base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDAY	Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth
Ph	Potencial hidrogeniônico
Pmol	Pico mol
Q	Braço longo dos cromossomos
RLDL	Receptor de LDL Colesterol
RPM	Rotações por minuto
TE	Tampão Tris, EDTA
TG	Triglicérides
Thr	Aminoácido treonina
TLH	Tampão de lise de hemácias
Tris	Trihidroximetil aminometano
U	Unidades
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VLDL	Very low density lipoprotein (lipoproteína de muito baixa densidade)
Mg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
χ^2	Qui-quadrado

LISTA DE SÍMBOLOS

$\geq$	Maior ou igual
$<$	Menor

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1	Interação entre doenças cardiovasculares e as lipoproteínas plasmáticas.....	17
1.2	Interação entre as lipoproteínas plasmáticas, aterosclerose, hipertensão arterial e dislipidemia	18
1.3	Indícios entre a doenças cardiovasculares e os polimorfismos da ApoE no metabolismo das lipoproteínas	20
1.4	Indícios entre as doenças cardiovasculares e os polimorfismos do RLDL no metabolismo das lipoproteínas	22
2	OBJETIVOS	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	Caracterização da amostra do estudo.....	26
3.2	Métodos	28
3.2.1	<u>Dados clínicos, antropométricos, e laboratoriais coletados</u>	28
3.2.2	<u>Análise dos polimorfismos genéticos</u>	28
3.2.2.1	Extração do DNA	29
3.2.2.2	Genotipagem	29
3.2.2.2.1	Gene da apolipoproteína E (APOE)	29
3.2.2.2.2	Gene do receptor de LDL (RLDL)	31
3.2.3	<u>Análise Estatística</u>	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais	34
4.2	Análise molecular dos polimorfismos genéticos na população geral	35
4.3	Descrição dos Grupos	36
4.4	Análise do “tracking” de Dislipidemia para os genótipos de ApoE	38
4.5	Análise do “tracking” de Dislipidemia para os genótipos do RLDL	39
4.6	Análise das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais em A3 (terceira etapa de avaliação)	40
4.7	Análise das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de ApoE e do RLDL na população do ERJ e da amostra LDD	41
5	DISCUSSÃO	43

6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS	52

INTRODUÇÃO

Os indicadores de saúde, particularmente aqueles baseados em dados de mortalidade vêm, há muito tempo, sendo utilizados para diagnosticar situações agravantes que afetam as populações, refletindo em condições de vida e saúde. A análise desses indicadores contribui para o desenvolvimento de ações preventivas nas diversas áreas relacionadas à saúde, contribuindo assim para o planejamento de ações assistenciais e para a definição de prioridades de ordem sócio-econômica ^{1,2}.

Diante disto, as doenças cardiovasculares (DCV) apresentam uma importância fundamental na busca por ações assistenciais preventivas, pois são as principais causas de morte em todo mundo, sendo responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade precoces³⁻⁷. No Brasil, as DCV concentram 29,4% do total de óbitos declarados, com 308 mil registros somente no ano de 2007, segundo dados da Saúde Brasil ⁸, embora estes dados apontem uma queda dos índices em 26%, ao longo dos anos de 1996-2007, a mortalidade por doenças cardiovasculares ainda são responsáveis por quase um terço dos óbitos em todo país⁸. Estes índices justificam a busca por um conhecimento mais aprofundado desta doença, em especial de seus fatores de risco (FR), para que possamos ampliar as medidas de prevenção.

Este tipo de medida é eficaz e benéfica, visto que a queda nos índices de mortalidade das doenças cardiovasculares, observadas na população brasileira, estaria associada ao diagnóstico e tratamento precoce, além da promoção de medidas educativas voltadas para a população em relação à área de saúde⁸.

Nesse sentido, a detecção precoce de indivíduos de alto risco e o estabelecimento de estratégias de prevenção é de fundamental importância para redução dos índices de morbidade e mortalidade e todos os esforços devem ser feitos para prevenir o primeiro evento cardiovascular, pois ele pode ser fatal, incapacitante, além de representar um alto custo com cuidados médicos. Desta forma, a busca do perfil de alto risco cardiovascular deve fazer parte da avaliação rotineira de todos os indivíduos, em especial de crianças e adolescentes, para permitir sua inclusão precoce em programas de prevenção⁹.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Interação entre doenças cardiovasculares e as lipoproteínas plasmáticas

Diante desta problemática, diversos estudos epidemiológicos têm sido desenvolvidos ao longo das últimas décadas buscando conhecer o perfil de risco cardiovascular em populações jovens, dentre estes, destaca-se o estudo de Bogalusa^{10,11} iniciado em 1973 nos Estados Unidos, com contribuições até os dias atuais. Esse estudo investiga os fatores de risco (FR) precursores das DCV que se iniciam na infância, além dos fatores genéticos e ambientais que possam contribuir para o estabelecimento da doença na fase adulta. Em um destes estudos realizados por Berenson et al¹¹, foram analisados laudos de necropsias de 204 indivíduos jovens (2 a 39 anos) que morreram de diversas causas, os autores observaram que a extensão das estrias gordurosas e das placas ateroscleróticas era crescente com a idade e que os fatores de risco clássicos se associavam com a presença e com a extensão das lesões encontradas na aorta e nas coronárias¹¹.

Outros estudos seguiram esta mesma associação, é o caso do estudo PDAY^{12,13} que demonstrou que o processo aterosclerótico se iniciava na infância, além de estabelecer que a progressão destas lesões clinicamente significativas se fazia desde a infância até a idade adulta e que correlacionavam-se positivamente com os níveis de colesterol total (Col-T) e de lipoproteínas de baixa densidade (low density lipoprotein – LDL), e inversamente com os níveis de lipoproteína de alta densidade (high density lipoprotein - HDL) *post mortem*^{12,13}. Além deste, o estudo de Muscatine¹⁴⁻¹⁶ demonstrou a relação entre pressão arterial (PA) e a presença de calcificações nas artérias coronárias em adultos jovens. Estes achados reforçaram a importância dos FR nessas faixas etárias como determinantes de risco cardiovascular.

De forma geral, estes estudos têm demonstrado que os FR clássicos estão presentes tanto em crianças quanto em adolescentes, apontando que a busca por indivíduos de alto risco deve começar ainda na idade escolar e corroboram a necessidade crescente de pesquisas para ampliar e refinar a estratificação de risco nestas populações³⁻⁵. Assim, entender o comportamento dos FR ao longo dos anos é de fundamental importância, pois eles determinam alterações progressivas no aparelho cardiovascular.

Com relação a etiologia das DCV, as evidências indicam que elas apresentam uma etiologia complexa, originada da associação de vários genes que se relacionam entre si e com

fatores ambientais. Essa complexidade nas interações torna o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos difícil e vagaroso ¹⁷.

Dentre os fatores de risco associados ao maior desenvolvimento das DCV desde a infância destacam-se as dislipidemias e a hipertensão arterial (HA) ^{18,19}. Evidências sugerem que estes fatores de risco tendem a se agregar e são frequentemente encontrados juntos no mesmo indivíduo, esta associação aumenta o risco de eventos cardiovasculares, pois cada fator de risco tende a reforçar o outro e, conseqüentemente, a morbidade e a mortalidade associadas²⁰.

No que diz respeito às alterações no perfil lipídico, sabe-se que estas ocorrem silenciosamente desde a infância, porém as suas conseqüências futuras, como a lesão aterosclerótica, somente será diagnosticada na fase adulta ¹¹.

Estudos têm evidenciado a relação entre as concentrações elevadas dos níveis plasmáticos das lipoproteínas como os triglicérides (TG), o Col-T e o LDL, assim como, a diminuição dos níveis de HDL e o desenvolvimento das DVC ^{21,22}. Sabe-se que o risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) aumenta significativamente e progressivamente a partir dos valores limítrofes destas lipoproteínas (TG, Col-T, LDL), já em relação ao HDL colesterol (HDL-c), o risco aumenta à medida que seus valores diminuem. Evidências também indicam que a hipertrigliceridemia aumenta o risco para DAC quando associada a HDL-c diminuído e/ou LDL-colesterol (LDL-c) elevado ⁷.

1.2 Interação entre as lipoproteínas plasmáticas, aterosclerose, hipertensão arterial e dislipidemia

As lipoproteínas permitem a solubilização e transporte dos lípides, que em geral apresentam caráter hidrofóbico no meio aquoso plasmático. Estruturalmente as lipoproteínas são partículas esféricas que possuem um núcleo lipídico neutro, não polar, constituído por ésteres de colesterol e triglicérides envolvidos por uma substância relativamente polar formada por fosfolípides, colesterol livre e proteínas, estas proteínas são denominadas apolipoproteínas (Apos). As Apos são classificadas como: Apo A, Apo B, Apo C e Apo E, e diferem entre si quanto ao tamanho, composição química e no tipo de partícula lipoproteica a que cada molécula se liga. Do ponto de vista funcional, o principal denominador comum entre elas é a participação no metabolismo lipídico ^{7,23-25}.

Quanto à classificação, existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grupos, a saber: grupo 1: formado pelas lipoproteínas ricas em triglicérides, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa ou “very low density lipoprotein” (VLDL), de origem hepática; e o grupo 2: constituído pelas lipoproteínas ricas em colesterol, as de densidade baixa (LDL) e as de densidade alta (HDL). A via biológica do metabolismo das lipoproteínas é extremamente complexa e inclui várias etapas ^{7,23}.

Atualmente, sabe-se da participação das lipoproteínas no processo aterogênico, esta evidência é conhecida e aceita sem controvérsias. A aterosclerose é caracterizada como uma doença inflamatória crônica de etiologia multifatorial que ocorre em resposta à agressão a camada íntima do endotélio de artérias de médio e grande calibre. Dentre os fatores de risco associados ao início da formação da placa aterosclerótica, através da agressão ao endotélio vascular, podemos citar: a elevação dos níveis plasmáticos de lipoproteínas consideradas aterogênicas (LDL, VLDL e remanescentes de quilomícrons), hipertensão arterial (HA) e tabagismo, entre outros. Em relação ao depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave para o início da aterogênese, sabe-se que este ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma sanguíneo ⁷.

Diante disto, as dislipidemias têm sido enfatizadas nas últimas décadas como importante fator de risco cardiovascular²⁶ estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado uma estreita e consistente associação entre níveis elevados de colesterol sérico e mortalidade por DAC ²⁷.

De forma geral, as dislipidemias podem ser caracterizadas como alterações lipídicas decorrentes de distúrbios em qualquer fase do metabolismo lipídico, que ocasionem repercussão nos níveis séricos das lipoproteínas, podem ser causadas por fatores genéticos e/ou ambientais ²⁸. De acordo com sua etiologia as dislipidemias podem ser classificadas em primárias ou secundárias. As dislipidemias primárias caracterizam-se por aumento ou diminuição dos lípides plasmáticos, resultantes de alterações genéticas que interferem com os mecanismos de síntese ou remoção das lipoproteínas circulantes, e englobam as hiperlipidemias e as hipolipidemias. As dislipidemias secundárias resultam de alterações das concentrações plasmáticas das lipoproteínas, provenientes de uma causa específica (efeito colateral de medicamentos, outras doenças ou de hábitos de vida inadequados)^{3-5,7}.

Evidências indicam ligação existente entre as dislipidemias e a aterosclerose através de estudos epidemiológicos, clínicos, experimentais, anatomopatológicos e terapêuticos,

baseados em dados de valores bioquímicos das dosagens do Col-T, dos TG e do HDL-c ou da determinação do LDL-c reforçam essa correlação ⁷.

Outro ponto importante a ser considerado é a frequente associação entre HA e as anormalidades lipídicas que incluem hipertrigliceridemia, HDL-c baixo e aumento do LDL-c. Sendo, portanto, importante conhecer os mecanismos envolvidos no aumento da PA e os níveis elevados das lipoproteínas ricas em colesterol (LDL e HDL) ²⁶.

Sabe-se que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese da HA e das dislipidemias compartilham anormalidades metabólicas comuns, que podem agir sinergicamente ou até mesmo acelerar o processo de aterogênese ²⁹.

Apesar da elevação das lipoproteínas não ser por si só elemento exclusivo à predisposição para aterosclerose, segundo dados experimentais, epidemiológicos e clínicos, há consenso de que os mesmos são importantes como marcadores metabólicos com potencial aterogênico ⁷.

Mesmo diante destas evidências, pouco se conhece da prevalência de dislipidemias ou HA em crianças em idade escolar ³⁰.

1.3 Indícios entre as doenças cardiovasculares e os polimorfismos da ApoE no metabolismo das lipoproteínas

Com a execução do projeto Genoma, estima-se que aproximadamente 400 genes regulem os processos de função endotelial, inflamação, coagulação e metabolismo de macromoléculas, sendo o metabolismo lipídico um dos mais estudado e conhecido devido a sua variedade de mutações e polimorfismos associados à aterosclerose e à DAC ³¹⁻³⁵.

A apolipoproteína E (ApoE) é uma glicoproteína identificada no início da década de 1970 ³⁶ que é composta por 299 aminoácidos. A ApoE é codificada por um gene polimórfico que possui peso molecular de 34 kDa ³⁷ e extensão aproximada de 3,7 kb ³⁸. Este gene está localizado no braço longo (q) do cromossomo 19, na posição 13.2, e produz três alelos principais ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) que geram seis genótipos na população, destes três alelos principais, o mais encontrado na população é o $\epsilon 3$, os outros são considerados variantes ³⁷⁻⁴¹. Outros alelos também encontrados, mas extremamente raros, são: $\epsilon 1$, $\epsilon 5$, $\epsilon 7$ ³⁷. Os alelos diferem entre si quanto as propriedades metabólicas e estruturais das proteínas codificadas, incidência na população e à localização do aminoácido neutro cisteína (Cys) e do aminoácido básico

arginina (Arg) nas posições 112 e 158, sendo $\epsilon 2$ (Cys₁₁₂/Cys₁₅₈), $\epsilon 3$ (Cys₁₁₂/Arg₁₅₈) e $\epsilon 4$ (Arg₁₁₂/Arg₁₅₈)^{24,41,43}.

A síntese de ApoE é regulada por fatores hormonais e nutricionais^{44,45} e acontece principalmente no fígado, aproximadamente 90%, além de outros tecidos, como intestino, cérebro, pulmões, rins e até macrófagos⁴².

Os primeiros estudos de associação na área da cardiologia foram os que envolviam o polimorfismo da ApoE e a DAC⁴⁶, isto devido as importantes ações desempenhadas pela ApoE na estrutura e metabolismo das lipoproteínas. A APOE possui ações: 1- na estabilidade estrutural das lipoproteínas HDL-c, VLDL, quilomícrons, quilomícrons remanescentes; 2- no metabolismo das lipoproteínas ricas em TG; 3- no transporte do colesterol em diferentes órgãos e tecidos como cérebro, nervos e paredes das artérias, além de promover a absorção do colesterol através do intestino e ainda proporciona absorção específica de partículas do colesterol, especialmente os quilomícrons, VLDL e seus remanescentes; 4- ação como de ligante de alta afinidade do receptor de LDL nos hepatócitos; 5- ativadora de enzimas, como a lipase hepática^{25,43,47,48}. Desta forma a APOE mantém a estrutura regular do metabolismo dessas lipoproteínas, fazendo o transporte, absorção e redistribuição das mesmas entre os diferentes tecidos e órgãos⁴⁹ tanto sob condições normais quanto patológicas⁵⁰.

Através destas funções, a ApoE influencia o metabolismo das lipoproteínas consideradas aterogênicas (LDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), o metabolismo e transporte reverso do colesterol e, conseqüentemente, as dislipidemias⁵¹, que pode ser comprovada através da interação existente entre as variáveis alélicas do gene da ApoE e as concentrações plasmáticas de Col-T, LDL-c⁵¹. Estudos também tem chamado a atenção para a influência dos polimorfismos do gene da ApoE no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares^{48,52,53}.

Ao longo das últimas décadas, estudos populacionais têm demonstrado uma associação de maiores níveis plasmáticos de LDL-c com as variáveis alélicas da ApoE, estes estudos mostram que os maiores níveis estão presente em indivíduos que possuem o alelo $\epsilon 4$, intermediários nos indivíduos com o alelo $\epsilon 3$ e baixos com o alelo $\epsilon 2$ ⁵⁴⁻⁵⁷.

Entretanto, em relação ao aumento dos níveis de TG esta associação é controversa, foi encontrado em alguns estudos, uma a associação do aumento dos níveis com alelo $\epsilon 2$ ^{56,58-61}, assim como em outros esta associação ao alelo $\epsilon 2$ não foi encontrada⁶², há ainda estudos que mostram uma associação ao aumento destes níveis ao alelo $\epsilon 4$ ^{63,64}. Em um estudo realizado por de Andrade⁶⁵ com 446 indivíduos da população brasileira de Porto Alegre, foi

demonstrada uma relação do alelo $\epsilon 2$ com a diminuição destes níveis, evidenciando para este um efeito protetor, enquanto que o alelo $\epsilon 4$ estava associado a elevação dos níveis de TG ⁶⁵.

Nesse sentido, a presença do genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ tem sido relacionado em alguns estudos, ao desenvolvimento de hipercolesterolemia tipo III (HLP-III), esta doença caracteriza-se pelo aumento na produção de lipoproteínas ricas em TG, levando ao desenvolvimento precoce de aterosclerose ^{48,66,67}. Breslow ⁶⁸ mostrou em seu estudo com 34 pacientes com HLP-III, que 31 apresentavam genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$, enquanto que 2 apresentavam o genótipo $\epsilon 4\epsilon 2$ e 1 o $\epsilon 3\epsilon 2$. Com base nesses dados, inferiu-se que o genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ poderia ser um marcador em 91% dos pacientes com HLP-III ⁶⁹. Por outro lado, alguns autores enfatizam que a presença do genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ é uma condição necessária porém não suficiente para o desenvolvimento de HLP-III e que outros fatores genéticos devem ser necessários para propiciar a expressão fenotípica da doença ^{23,48,70}.

Outros estudos também evidenciam que na maioria dos indivíduos a presença de apenas um alelo $\epsilon 2$ em seu genótipo, não representa alterações nos níveis plasmáticos das lipoproteínas, ao contrário, este alelo na maioria dos estudos está sempre associado a baixos níveis de Col-T e LDL-c ^{48,53,54,60,63,65,70-75}.

Já a presença do alelo $\epsilon 4$ aparece sempre associada o aumento dos níveis de LDL e Col-T ^{48,53,54,57,60,62,63,65,70-77}, além de estar relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento da doença aterosclerótica e doenças cardiovasculares ^{23,48,53,54,71,77,78}.

1.4 Indícios entre as doenças cardiovasculares e os polimorfismos do RLDL no metabolismo das lipoproteínas

O gene do receptor de LDL (RLDL) está também localizado no cromossomo 19 e codifica uma proteína de 839 aminoácidos com domínios de ligação para as ApoB e ApoE. Nesse gene já foram identificados mais de 45 polimorfismos e 1000 mutações ⁷⁹ que afetam os domínios da proteína proporcionando graus variáveis de deficiência ao receptor de LDL-c e que estão associados ao fenótipo da hipercolesterolemia familiar (HF), sendo esta a principal desordem genética associada a alteração nos níveis de LDL-c no sangue ^{25,80-85} com incidência de 1/500 nas populações ocidentais ⁸⁶.

Os indivíduos adultos portadores de HF podem apresentar diferentes níveis para os lípides plasmáticos podendo apresentar Col-T superior a 6,7 mmol/l ou LDL-c, assim como

Col-T superior a 7,5 mmol/l ou LDL-c superior a 4,9 mmol/l associado à presença de xantomas no paciente ou em seus parentes de primeiro grau (pais, irmãos ou filhos) ou de segundo grau (avós, tios ou tias)⁸⁷. As alterações dos níveis plasmáticos que decorrem deste polimorfismo podem ser causadas devido ao número reduzido de receptores de LDL nas células hepáticas, condição que ocorre quando há heterozigose do polimorfismo; ou até mesmo ausência completa destes receptores, quando na presença de homozigose do polimorfismo, é importante citar que em ambos os casos a presença do polimorfismo ocasiona níveis elevados de LDL-c desde o nascimento⁷⁹.

Os polimorfismos do gene RLDL apresentam expressão clínicas variáveis e estas podem ser atribuídas aos diferentes efeitos das mutações sobre a afinidade de ligação do RLDL com as partículas que contém ApoB ou ApoE; estas variações também podem estar relacionados ao próprio efeito funcional da mutação, assim como, a presença de um outro gene herdado que suprime os efeitos das mutações do gene RLDL sobre os níveis de LDL-c, ou até mesmo a presença de outros polimorfismos genéticos associados⁸⁸⁻⁹².

Independente das variações do polimorfismo sabe-se, que em indivíduos homozigotos para essas mutações, os níveis de LDL-c suplantam em cinco vezes o nível normal, podendo ocasionar infarto do miocárdio já na primeira década de vida²⁵, além de estarem mais susceptíveis ao desenvolvimento precoce de aterosclerose, DAC e isquemia cardíaca^{76,87}.

Dentre os diferentes polimorfismos encontrados do gene do RLDL, o escolhido para a análise neste estudo é o conhecido como A370T. Este polimorfismo decorre da mudança de posição dos aminoácidos alanina (Ala) e treonina (Thr) na posição 370 da proteína receptora do LDL⁹³. O polimorfismo A370T está incluído no haplótipo do receptor de LDL para estudos de co-segregação em famílias com HF⁹⁴⁻⁹⁷. Um estudo realizado na Dinamarca por Frikke-Schmidt⁹⁸ relatou que indivíduos homozigotos para este polimorfismo apresentaram um risco 3,6 vezes maior para desenvolvimento de isquemia vascular cerebral em indivíduos TT (95% IC 1.5–8.8) em relação aos AA (95% IC 1.3–9.8)⁹⁸.

Atualmente, o diagnóstico da HF envolve a avaliação clínica e exames bioquímicos (perfil lipídico). Porém, existem indícios de que o rastreio genético pode ser eficaz na identificação precoce de pessoas com HF⁸⁷.

Nesse sentido, alguns estudos avaliaram o papel dos testes de DNA na determinação do risco de DAC em indivíduos com HF e após o ajuste para idade, sexo, tabagismo e pressão arterial sistólica, os portadores de mutação genética apresentaram risco de desenvolvimento de DAC 84% maior em comparação com aqueles sem mutação detectável ($p = 0,001$ global)⁸⁷.

Sendo aceito portanto que os estudos de associação podem contribuir para a identificação de variáveis genéticas que predisõem às doenças cardiovasculares, o objetivo deste trabalho foi contribuir para a investigação de fatores de risco destas patologias, usando como metodologia a análise longitudinal do tipo coorte, com base no estudo dos polimorfismos genéticos dos genes da ApoE e do RLDL.

2 OBJETIVOS

Considerando:

- 1) o início precoce dos distúrbios do metabolismo lipídico em crianças e adolescentes;
- 2) a crescente importância das dislipidemias na gênese das doenças cardiovasculares em adultos;
- 3) a escassez de trabalhos que incluem a avaliação e acompanhamento longitudinal dos fatores de risco em crianças e adolescentes na população brasileira ao longo de vários anos;

O presente estudo tem como objetivos:

- Investigar a relação entre os polimorfismos da apolipoproteína E (ApoE) e do RLDL com variáveis pressóricas, antropométricas e laboratoriais em indivíduos jovens acompanhados longitudinalmente há 28 anos ($\pm$ 336 meses), pertencentes ao Estudo do Rio de Janeiro.

- Avaliar a frequência dos polimorfismos encontrados, confrontando com os dados de literaturas nacionais e internacionais.

- Contribuir para a investigação de fatores de risco das doenças cardiovasculares, usando a metodologia de análise longitudinal do tipo coorte, com base no estudo dos polimorfismos genéticos dos genes ApoE e RLDL.

3 METODOLOGIA

3.1 Caracterização da amostra do estudo

A amostra populacional do presente estudo origina-se do *Estudo do Rio de Janeiro* (ERJ), uma análise longitudinal do tipo coorte que faz parte de uma linha de pesquisa sobre pressão arterial e outros FR cardiovasculares em jovens, desenvolvida no departamento de hipertensão arterial do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, desde 1983⁹⁹⁻¹¹⁴.

O ERJ divide-se em 2 etapas: na primeira, foram avaliadas crianças entre 6 e 9 anos (1983-1986) em duas fases: escolar e domiciliar; na segunda, foram avaliadas crianças e adolescentes entre 10 e 15 anos (1987-2000), em 4 fases: escolar (1987 / 1988), domiciliar (1989 / 1991), hospitalar (1992 / 1995) e familiar (1996 / 1999)⁹⁹⁻¹¹⁴.

Na primeira etapa iniciada em 1983, durante a *Fase Escolar*, foram examinadas 3109 crianças (alunos-alvo) de 6 a 9 anos de idade e ainda nesta primeira etapa, na *Fase Domiciliar*, foram selecionados aleatoriamente 219 indivíduos, os quais foram reexaminados em seus domicílios juntamente com os pais e irmãos, com o objetivo de avaliar a agregação familiar das variáveis de risco cardiovascular⁹⁹⁻¹¹⁴.

A segunda etapa do *Estudo de Rio de Janeiro* iniciou-se em 1987 com a avaliação de 3.906 alunos-alvo entre 10 e 15 anos de idade (*Fase Escolar*). Posteriormente, na *Fase Domiciliar*, foram selecionados aleatoriamente, 106 alunos-alvo que também foram reexaminados em seus domicílios, juntamente com seus pais e irmãos, com o objetivo avaliar a agregação familiar das variáveis de risco cardiovascular. Na *Fase Hospitalar*, parte dos alunos-alvo foram convidados a comparecer ao hospital para serem submetidos a uma avaliação clínica e laboratorial. Decidiu-se então ampliar este estudo aos familiares dos indivíduos avaliados inicialmente, na busca de agregação familiar dos FR para o desenvolvimento de DCV, iniciando-se em 1996 a *Fase Familiar* quando foram selecionadas aleatoriamente 816 famílias que foram convidadas a comparecer ao ambulatório do hospital, onde foram submetidos a exame clínico e laboratorial. Foram então avaliadas, 385 famílias que responderam ao convite e compareceram ao hospital⁹⁹⁻¹¹⁴.

Dando continuidade a esse estudo, iniciou-se a quinta fase de avaliação de indivíduos entre 27 e 35 anos de idade (2004 / 2005), denominada *Fase Ambulatorial (A3)*, onde se insere o presente estudo. Nesta etapa, foram avaliados 115 indivíduos (alunos-alvo) de ambos

os sexos, em nível ambulatorial e serão consideradas 3 avaliações (A1, A2 e A3) a partir da segunda etapa do Estudo do Rio de Janeiro, a saber: A1 (fase escolar de 10-16 anos / 1987-1988), A2 (fase familiar de 18-26 anos / 1996-1999) e A3 (fase ambulatorial de 27-35 anos / 2004-2005)⁹⁹⁻¹¹⁴.

Desta população de 115 alunos-alvo, foi possível obter amostras de 75 indivíduos para o estudo dos polimorfismos genéticos e destes, 56 foram avaliados em A1, A2 e A3. Estes 56 indivíduos foram estratificados em três grupos de acordo com a presença de dislipidemia, independente do lípide alterado em A2 e A3, com o objetivo de investigar a sua prevalência na população do ERJ ao longo das avaliações e sua associação com os polimorfismos genéticos da ApoE e do RLDL. Esta análise foi chamada “*tracking*” de dislipidemia e os grupos constituídos foram:

- Grupo 0: nenhuma variável lipídica alterada em A2 e A3;
- Grupo 1: pelo menos uma variável lipídica alterada em A2 ou em A3;
- Grupo 2: pelo menos uma variável lipídica alterada tanto em A2 como em A3.

No sentido de comprovar a aleatoriedade da coleta efetuada na amostra populacional do ERJ, foram utilizadas também para este estudo, amostras selecionadas a partir de um banco de dados com 10.000 indivíduos que participaram de perícias realizadas no Laboratório de Diagnósticos por DNA (LDD) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), entre os anos de 2001 e 2009, e que consentiram na utilização de suas amostras biológicas para estudos científicos. Estes indivíduos são residentes no estado do Rio de Janeiro e com ausência de parentesco direto. Deste banco de dados foram extraídas aleatoriamente amostras de DNA de 75 indivíduos (41 homens e 34 mulheres). Neste estudo essa amostra foi identificada como amostra LDD (amostra do Laboratório de Diagnósticos por DNA da UERJ).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) sob o número de protocolo 2130-CEP/HUPE e todos os indivíduos avaliados e/ou os seus responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e todas as condutas adotadas seguiram as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde.

3.2 Métodos

3.2.1 Dados clínicos, antropométricos e laboratoriais coletados

Na população pertencente ao ERJ foram coletados dados de pressão arterial (PA), medida da circunferência abdominal (CA), peso (P), altura (A) e o cálculo do índice de massa corporal (IMC) foram realizados nas etapas A1, A2 e A3. Em A2 e A3 foram ainda dosados, após jejum de 12h, o Col-T, o HDL-c, os TG e calculado o LDL-c. A coleta do sangue para realização dos testes genéticos foi realizada em A3. Os valores de normalidade para o perfil lipídico e CA seguiram as recomendações da IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose ⁷. Desta maneira, foram considerados portadores ou não de dislipidemia aqueles indivíduos que apresentavam elevação do Col-T, do LDL-c, dos TG e redução do HDL-c, isolados ou em associação. Para a avaliação da PA foi considerada aumentada quando a PAS e/ou PAD foi ≥ 95 percentil para sexo e idade em A1, e em A2 e A3 quando a PAS ≥ 140 mmHg e/ou PAD ≥ 90 mmHg. Para avaliação da circunferência abdominal (CA) as medidas utilizadas foram < 94 cm para homens e < 80 cm para mulheres. A partir das medidas de peso e altura foi calculado o IMC, medida expressa em Kg/m^2 , por meio do quociente entre o peso (kg) e o quadrado da altura(m).

Para a análise do IMC, os seguintes valores foram considerados de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde ¹¹⁵: 25 a 29,99 Kg/m^2 caracterizando sobrepeso e ≥ 30 Kg/m^2 para obesidade ¹¹⁵.

3.2.2 Análise dos polimorfismos genéticos

Foram avaliados os polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo de lipoproteínas plasmáticas (ApoE e RLDL);

3.2.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada pelo método de Salting-out, utilizando alíquotas de sangue total (2 ml) ¹¹⁶, conforme descrito a seguir.

Uma alíquota de sangue total (2 ml) é transferida para um tubo cônico. Adicionam-se 2 ml de tampão de lise de hemácias (TLH), homogeneizando-se a solução contida no tubo e centrifugando-a a 3.000 rpm por 5 min. Terminada a centrifugação descarta-se o sobrenadante. Observa-se a presença de um pellet que é desprendido manualmente e a este são acrescentados 500 µL de tampão de lise de célula e 30 µL de proteinase K (20mg/ml). Homogeneiza-se o tubo manualmente e incuba-se a 37 °C por 12h. Após a digestão, adicionam-se 300 µL de NaCl 6M e faz-se o agito da solução por cerca de 30 seg. O tubo é centrifugado por 10 min a 3.000 rpm. O sobrenadante é transferido para um novo tubo cônico, adiciona-se a este 1 ml de etanol gelado, homogeneiza-se o tubo, descarta-se o etanol. Observar a precipitação de DNA após o descarte do álcool. Ao precipitado são adicionados 300 µL de TE e a amostra é mantida a -20 °C.

3.2.2.2 Genotipagem

3.2.2.2.1 - Gene da ApoE

- PCR (reação em cadeia da polimerase) do gene da ApoE

Para a análise das variantes alélicas do gene da ApoE (ε2,ε3,ε4) uma região de 244 pb, que inclui os sítios polimórficos deste gene foi amplificada através da PCR utilizando-se dois primers franqueadores ApoE F 5'- TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3' e ApoE R 5'- ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3' ³⁸. A mistura da reação em volume final de 40 µL foi preparada com 10 pmol de cada primer, 100 µM dNTPs, 1U de Taq platinum Polimerase (Invitrogen, Ca, USA), tampão contendo 1,5mM MgCl₂, DMSO 1% e 50ng do DNA da amostra. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 96 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento (pareamento) a 63 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min e uma extensão final a 72 °C por 10 min. A eficiência da PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (0,5µg/ml).

- Genotipagem dos polimorfismos do gene da ApoE

Para a determinação dos polimorfismos do marcador do gene da APOE, os produtos da amplificação por PCR foram submetidos à análise de restrição com a enzima *HhaI* (Fermentas,

Ontario, Canadá). A genotipagem foi realizada através da digestão dos produtos da PCR (25µl) com 5 U da enzima de restrição *Hha I* em tampão específico. A digestão foi incubada a 37°C, por 16 horas e, a seguir, analisada em gel de poliacrilamida (12%), utilizando-se uma amostra da escala de alelos 50 pares de base (pb) (Fermentas, Ontario, Canadá) como referência de tamanho molecular. As bandas características de cada alelo foram analisadas e identificadas. A figura 1 mostra um esquema da análise de restrição para o marcador do gene ApoE.

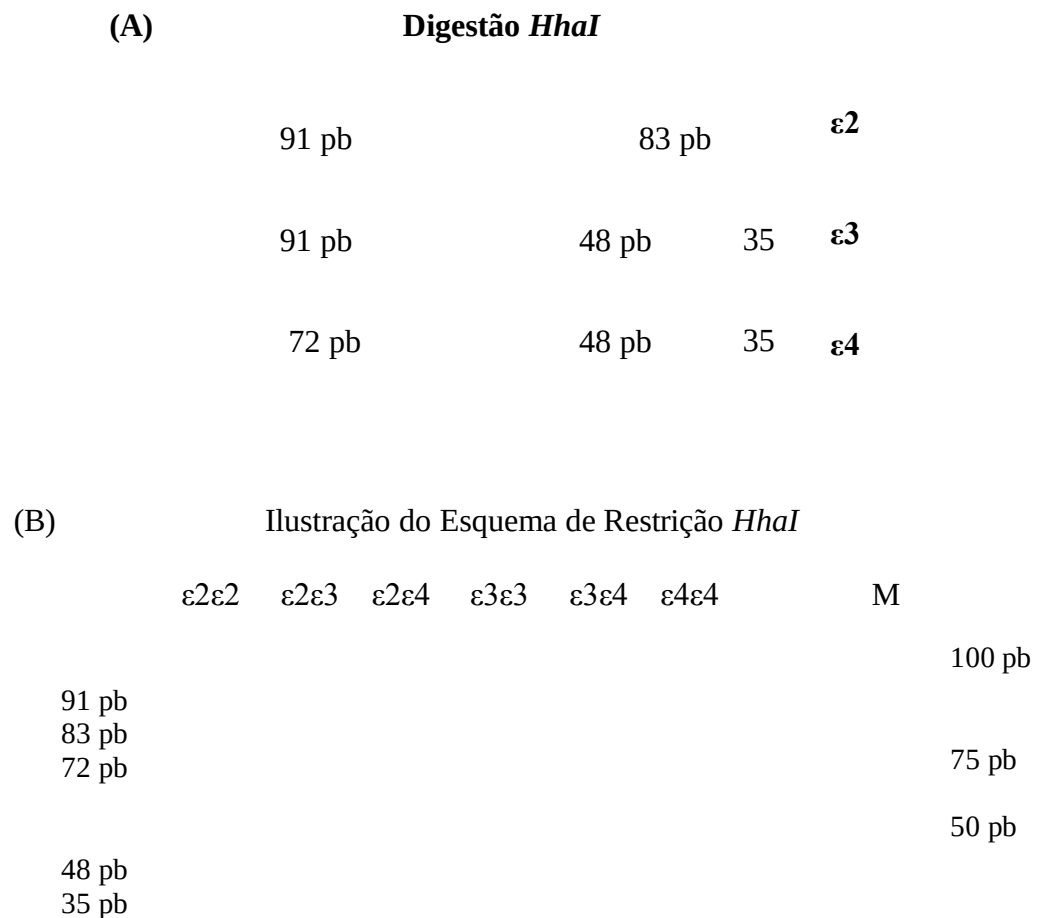


Figura 1: Alelos do gene da ApoE. (A) Esquema ilustrativo dos produtos da digestão do gene ApoE através de PCR com a enzima *HhaI*. (B) Padrões alélicos esperados dos produtos do gene da ApoE na eletroforese após a digestão. Genótipo ε2/ε2: fragmento de 91 pb e 83 pb. Genótipo ε2/ε3: fragmentos de 91,83,48 e 35 pb. Genótipo ε2/ε4: fragmentos de 91,83,72,48,35 pb. Genótipo ε3/ε3: fragmentos de 91, 48 e 35 pb. Genótipo ε3/ε4: fragmentos de 91,72,48,35 pb. Genótipo ε4/ε4 fragmentos de 72,48,35 pb. pb = pares de base; M = marcador de referência de tamanho molecular (50 pb)

3.2.2.2.2 - Gene do RLDL

- PCR do gene do RLDL (A370T)

Para a análise das variantes alélicas do gene do RLDL (AA, AT, TT) uma região de 150 pb, que inclui os sítios polimórficos deste gene foi amplificada através da PCR utilizando-se para isto dois primers franqueadores P1: 5'-GAG TGT CAG GAT CCC GAC ACC TGC GCC-3', 1 µmol/litro; P2: 5'-AAG TCG ACC CAC CCG CCG CCT TCC CGT-3', 0.75 µmol/litro⁹⁸. As condições de ciclagem seguidas na PCR foram uma desnaturação inicial de 96°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 68°C por 1 min, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 10 min. O volume final de reação para a PCR foi de 30 µL utilizando-se: 0.5 U da enzima Taq platinum Polimerase (Invitrogen, Ca, USA) e 200 µmol de cada dNTP por litro, 0.75 mmol de cloreto de magnésio, tampão 1x (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, e 500 mM KCl), e 0.1–0.2 µg de DNA. A eficiência da PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio (0,5µg/ml).

- Genotipagem dos polimorfismos do gene do RLDL

Para a determinação dos polimorfismos do marcador do gene do RLDL, os produtos da amplificação por PCR foram submetidos à análise de restrição com a enzima *HaeIII* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA). A genotipagem foi realizada através da digestão dos produtos da PCR (10µl) com 5 U da enzima de restrição *HaeIII* em tampão específico. A digestão foi incubada a 37°C, por 16 horas e, a seguir, os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 3.5% e detectados com brometo de etídeo (0,5µg/ml), utilizando-se uma amostra da escala de alelos 50 pares de base (pb) (Fermentas, Ontário, Canadá) como referência de tamanho molecular. As bandas características de cada alelo foram analisadas e identificadas. A figura 2 mostra um esquema da análise de restrição para o marcador do gene RLDL.

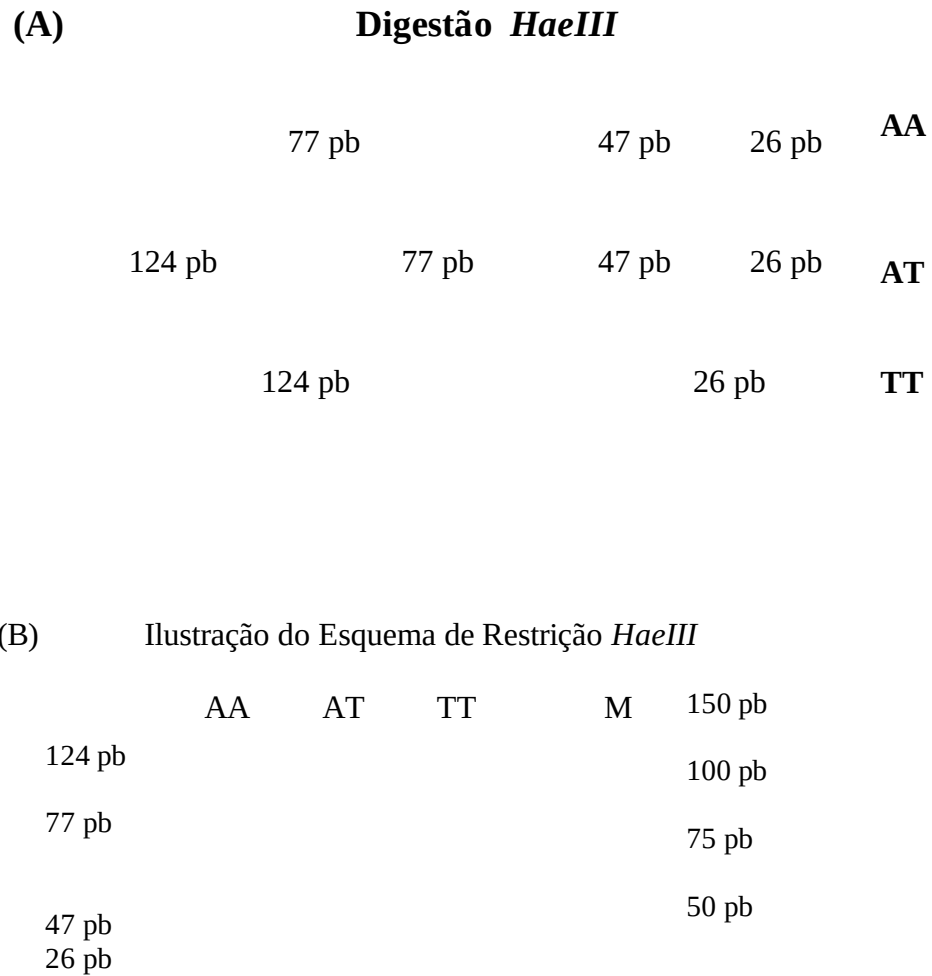


Figura 2: Alelos do gene RL DL. (A) Esquema ilustrativo da digestão dos produtos do gene do RL DL através de PCR com a enzima *HaeIII*. (B) Padrões alélicos esperados dos produtos do gene do RL DL na eletroforese após a digestão. Genótipo AA: fragmentos de 77, 47 e 26 pb. Genótipo AT: fragmentos de 124 pb, 77, 47 e 26 pb. Genótipo TT: fragmentos de 124 pb e 26 pb.
pb = pares de base; M = marcador de referência de tamanho molecular (50 pb).

3.2.3 Análise Estatística

Para o tratamento estatístico dos dados, utilizou-se o programa *SPSS for Windows* versão 12.0 ¹¹⁷ (Chicago, Illinois, EUA). Os seguintes métodos estatísticos foram utilizados, considerando-se 5,0% ($p=0,05$) para o nível de rejeição da hipótese nula: o teste do qui-quadrado (χ^2) e a análise de variância (F). Quando necessário as amostras foram sequenciadas para confirmação do genótipo.

As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas de acordo com Nei ⁴⁶. O teste exato de diferenciação de populações, assim como os parâmetros populacionais de Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Equilíbrio de Hardy-Weiberg (HW) das amostras analisadas foram calculados usando o software ARLEQUIN versão 3.0 ¹¹⁸.

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais

No presente estudo foram coletados os dados de variáveis clínicas, laboratoriais e antropométricas, bem como aqueles relativos a análise genética da amostra de 56 indivíduos, 35 do sexo masculino (62,5%) e 21 do sexo feminino (37,5%) em seguimento de $\pm$ 336 meses.

Na tabela 1 estão apresentados os dados das médias e desvios padrão obtidos para as variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais analisadas nos 56 indivíduos pertencentes ao ERJ nas três etapas de avaliação (A1, A2 e A3). Como pode ser visto as médias de PAS, PAD, peso, IMC foram maiores em A3 quando comparadas a A1 e A2 e o mesmo acontece com as dosagens dos lípides séricos para A3 quando comparadas a A2.

Tabela 1 Médias e desvios padrão das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais nos três momentos da avaliação (N=56)			
Variáveis	Momentos de Avaliação		
	A1	A2	A3
PAS(mmHg)	115,28 $\pm$ 14,83	124,35 $\pm$ 13,79	125,43 $\pm$ 16,67
PAD(mmHg)	63,81 $\pm$ 12,84	79,86 $\pm$ 10,79	83,20 $\pm$ 13,72
Peso(kg)	50,94 $\pm$ 11,62	70,03 $\pm$ 14,41	78,29 $\pm$ 19,55
IMC(Kg/m ²)	20,26 $\pm$ 3,05	24,04 $\pm$ 3,64	26,79 $\pm$ 5,53
CA(cm)	-	-	92,96 $\pm$ 14,66
Col-T	-	175,37 $\pm$ 34,34	181,44 $\pm$ 31,72
TG	-	88,37 $\pm$ 42,34	103,71 $\pm$ 56,14
HDL	-	45,87 $\pm$ 13,16	49,05 $\pm$ 15,87
LDL	-	111,82 $\pm$ 27,58	111,23 $\pm$ 27,95

Legenda: PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; Col-T: colesterol total; TG: triglicérides.

4.2 Análise molecular dos polimorfismos genéticos na população geral

Para a realização da análise genética, as amostras de DNA dos 56 indivíduos da população do ERJ e dos 75 indivíduos pertencentes a amostra LDD foram preparadas conforme descrito em material e métodos.

Na figura 3 observa-se o padrão de bandas obtido após eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, dos produtos de amplificação digeridos pela enzima de restrição *Hha I* para a análise dos polimorfismos do gene da APOE. Para este polimorfismo os seguintes genótipos podem ser encontrados: $\epsilon 2\epsilon 3$ (91,83,48 pb), $\epsilon 2\epsilon 4$ (91,83,72,48 pb), $\epsilon 2\epsilon 2$ (91,83 pb), $\epsilon 3\epsilon 3$ (92,48 pb), $\epsilon 3\epsilon 4$ (91,72,48 pb) e $\epsilon 4\epsilon 4$ (72,48 pb).

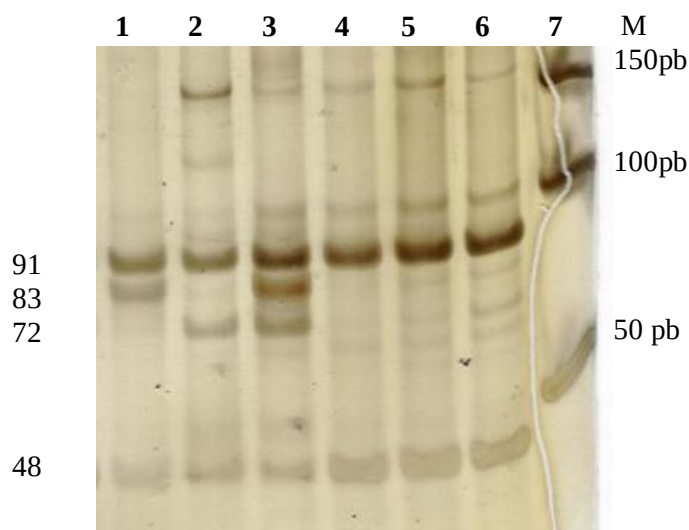


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% dos produtos de amplificação do gene da ApoE, digeridos pela enzima *HhaI*. Colunas 1 a 6: amostras de indivíduos do estudo. Coluna 1: amostra de indivíduo com genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ (91, 83, 48 pb). Coluna 2: amostra de indivíduo com genótipo $\epsilon 3\epsilon 4$ (91,72, 48 pb). Coluna 3: amostra de indivíduo com genótipo $\epsilon 2\epsilon 4$ (91,83,72,48 pb). Colunas 4,5 e 6: amostras de indivíduos com genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ (91,48 pb). Coluna 7: marcador de tamanho molecular (50 pb). Coluna M: referência do tamanho dos fragmentos do marcador em pares de base (pb).

A figura 4 mostra uma eletroforese em gel de agarose 3,5% dos produtos de amplificação digeridos pela enzima de restrição *HaeIII* para a análise dos polimorfismos do gene do RLDL. Para este polimorfismo os genótipos que podem ser encontrados são: AA (77, 47 e 26 pb), AT (124, 77,47 e 26 pb) e TT (124 e 26 pb).

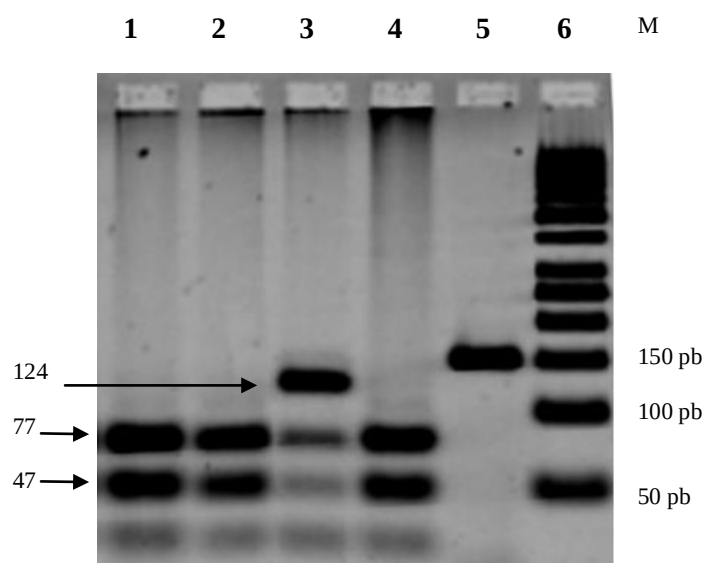


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 3,5% dos produtos de amplificação do gene do RLDL, digeridos pela enzima *HaeIII*. Colunas 1 a 4: amostras de indivíduos do estudo. Colunas 1,2 e 4: amostras de indivíduos com genótipo AA (77, 47 e 26 pb). Coluna 3: amostra de indivíduo com genótipo AT (124, 77,47 e 26 pb). Coluna 5: Controle negativo (k562 -150 pb). Coluna 6: marcador de tamanho molecular (50pb). Coluna M: referência do tamanho dos fragmentos do marcador em pares de base (pb).

4.3 Descrição dos Grupos

A amostra pertencente ao ERJ foi estratificada pelo “*tracking*” de dislipidemia entre A2 e A3 e foram constituídos três grupos cujas características serão descritas a seguir:

- Grupo 0 – nenhuma variável lipídica alterada em A2 e A3. Este grupo possui 11 indivíduos (19,6%), 1 do sexo masculino e 10 do sexo feminino, estes possuem idade média de $30,89 \pm 1,64$. A tabela 2 mostra as médias e desvios padrão deste grupo para as variáveis analisadas.

Tabela 2 Médias e desvios padrão das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais no grupo 0 em A3 (N=11)	
Variáveis	Grupo 0 (Valores)
PAS(mmHg)	114,36±14,58
PAD(mmHg)	76,36±8,66
Peso(kg)	61,23±12,7
IMC(Kg/m ²)	23,81±3,72
CA(cm)	80,5±6,74
Col-T	164,45±18,35
TG	64,18±31,44
HDL	62,09±9,63
LDL	89,47±13,59

Legenda: PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; Col-T: colesterol total; TG: triglicérides.

- Grupo 1 – pelo menos uma variável lipídica alterada em A2 ou A3. Este grupo é composto por 12 indivíduos (21,4%), com idade média de 31,47±2,35 e possui 2 indivíduos do sexo feminino e 10 do sexo masculino. Na tabela 3 pode ser visto as médias e desvios padrão deste grupo para as variáveis analisadas.

Tabela 3 Médias e desvios padrão das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais no grupo 1 em A3. (N=12)	
Variáveis	Grupo 1 (Valores)
PAS(mmHg)	120,17±13,05
PAD(mmHg)	78,17±13,89
Peso(kg)	71,84±15,71
IMC(Kg/m ²)	24,34±4,02
CA(cm)	86,91±8,72
Col-T	179,58±29,12
TG	81,33±41,37
HDL	53,0±11,55
LDL	106,56±28,6

Legenda: PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; Col-T: colesterol total; TG: triglicérides.

- Grupo 2 – pelo menos uma variável lipídica alterada em A2 e A3. Este grupo possui 33 indivíduos, destes 24 são do sexo masculino e 9 do sexo feminino. A média de idade foi de $31,25 \pm 1,99$. Os dados das médias e desvios padrão deste grupo para as variáveis analisadas são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 Médias e desvios padrão das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais no grupo 2 em A3. (N=33)	
Variáveis	Grupo 2 (Valores)
PAS(mmHg)	$129,76 \pm 15,79$
PAD(mmHg)	$85,27 \pm 13,44$
Peso(kg)	$86,32 \pm 18,44$
IMC(Kg/m ²)	$28,67 \pm 5,81$
CA(cm)	$98,63 \pm 14,26$
Col-T	$187,78 \pm 34,5$
TG	$125,03 \pm 57,68$
HDL	$43,51 \pm 15,99$
LDL	$119,9 \pm 27,55$

Legenda: PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; Col-T: colesterol total; TG: triglicérides.

4.4 Análise do “tracking” de Dislipidemia para os genótipos da ApoE

A análise estatística através do teste do χ^2 revelou diferença estatisticamente significativa para a distribuição dos genótipos da ApoE nos grupos estudados em relação ao tracking de dislipidemia ($\chi^2 = 16,848$, $p = 0,032$). Observa-se que no grupo 0 (sem dislipidemia em A2 e A3) não foi encontrado nenhum indivíduo com genótipo $\epsilon 2\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$, enquanto que no

grupo 2 (com dislipidemia em A2 e A3) não foi observado nenhum indivíduo com genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$. (Tabela 5).

Tabela 5 “Tracking” de Dislipidemia para os genótipos do gene da ApoE (N=56)				
Genótipos de APOE	Dislipidemia			Total
	0	1	2	
$\epsilon 2\epsilon 3$	3 (27,3%)	-	-	3 (5,4%)
$\epsilon 3\epsilon 3$	5 (45,5%)	10 (83,3%)	20 (60,6%)	35 (62,5%)
$\epsilon 3\epsilon 4$	3 (27,3%)	2 (16,7%)	9 (27,3%)	14 (25%)
$\epsilon 2\epsilon 4$	-	-	3 (9,1%)	3 (5,4%)
$\epsilon 4\epsilon 4$	-	-	1 (3%)	1 (1,8%)
Total*	11 (100%)	12 (100%)	33 (100%)	56(100%)
Total**	(19,6%)	(21,4%^)	(59%)	
		$\chi^2=16,848$		P=0,032

Legenda: Grupo 0 (nenhuma variável lipídica alterada em A2 e A3); grupo 1 (uma ou mais variáveis lipídicas alteradas em A2 ou A3) e grupo 2 (uma ou mais variáveis lipídicas alteradas em A2 e A3); P: valor de p. Valores significativos destacados. *Valores percentuais relacionados com as frequências genotípicas para cada grupo. ** Valores percentuais relacionados com as frequências genotípicas de cada grupo na amostra total (n=56).

4.5 Análise do “tracking” de Dislipidemia para os genótipos do RLDL

Quando se analisou a distribuição dos genótipos do RLDL pelos grupos estratificados pelo “tracking” de dislipidemia, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 1,500$ e $p = 0,827$), conforme pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6 “Tracking” de Dislipidemia para os genótipos do gene do RLDL (N=56)

Genótipos de RLDL	Dislipidemia			Total
	0	1	2	
AA	9 (81,8%)	10 (83,3%)	29 (87,9%)	48 (85,7%)
AT	2 (18,2%)	2 (16,7%)	3 (9,1%)	7 (12,5%)
TT	-	-	1 (3%)	1 (1,8%)
Total*	11 (100%)	12 (100%)	33 (100%)	56 (100%)
Total**	(19,6%)	(21,4%)	(59%)	
		$\chi^2=1,500$		P=0,827

Legenda: Grupo 0 (nenhuma variável lipídica alterada em A2 e A3); grupo 1 (uma ou mais variáveis lipídicas alteradas em A2 ou A3) e grupo 2 (uma ou mais variáveis lipídicas alteradas em A2 e A3). P:valor de p. *Valores percentuais se relacionam com as frequências genótípicas para cada grupo. ** Valores percentuais relacionados com as frequências genótípicas de cada grupo na amostra total (n=56).

4.6 Análise das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais em A3 (terceira etapa da avaliação)

Na tabela 7 são apresentados os resultados obtidos através da análise de variância (F) realizada com os dados das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais coletados na avaliação 3 (A3), que corresponde ao momento atual dos 56 alunos-alvo, quando se analisou a comparação entre os grupos estratificados para dislipidemia. Conforme pode ser observado foi encontrado significância estatística no grupo 2 (com dislipidemia em A2 e A3) em relação a frequência do alelo ϵ_4 quando comparado aos grupos 0 e 1 para as variáveis PAS, peso, IMC, CA, HDL, LDL e TG (Tabela 7).

Tabela 7 Médias das variáveis clínicas, antropométricas e laboratoriais das amostras do ERJ em A3 (N=56)					
Variáveis	Grupos			Teste F	P
	0	1	2		
Idade	30,89±1,641	31,47±2,358	31,25±1,997	0,239	0,788
PAS	114,36±14,583	120,17±13,058	129,76±15,794	5,011	0,01
PAD	76,36±8,663	78,17±13,895	85,27±13,443	2,692	0,077
Peso	61,23±3,829	71,84±15,716	86,32±3,21	10,153	<0,001
IMC	23,81±3,725	24,34±4,023	28,67±5,812	5,435	0,007
CA	80,50±6,745	86,91±8,725	98,63±14,263	10,861	<0,001
Col-T	164,45±18,354	179,58±29,121	187,78±34,505	2,371	0,103
HDL	62,09±9,637	53,0±11,556	43,51±15,996	7,507	0,001
LDL	89,47±13,597	106,56±28,608	119,90±27,556	6,019	0,004
TG	64,18±31,444	81,33±41,370	125,03±57,686	7,486	0,001

Legenda: A3: terceira avaliação dos alunos-alvo. Grupo 0 (nenhuma variável lipídica alterada em A2 e A3); grupo 1 (uma ou mais variáveis lipídicas alteradas em A2 ou A3) e grupo 2 (uma ou mais variáveis lipídicas alteradas em A2 e A3). PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; Col-T: colesterol total; TG: triglicérides. Teste F: análise de variância. P: valor de p. Valores significativos destacados.

4.7 Análise das frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de ApoE e do RLDL na população do estudo e na população LDD

As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos dos genes da APOE e do RLDL dos indivíduos do *Estudo do Rio de Janeiro* e da amostra da população selecionada a partir de um banco de dados do laboratório de diagnóstico por DNA (LDD) da UERJ estão mostradas na tabela 8.

Tabela 8 Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos genes da ApoE e do RLDL em amostras do ERJ e do LDD

APOE			RLDL		
Genótipos	Frequência		Genótipos	Frequência	
	ERJ (N=75)	LDD (N=75)		ERJ (N=75)	LDD (N=75)
ε2ε3	5,3%	4,2%	AA	88%	86,5%
ε3ε3	66,7%	75%	AT	10,6%	13,5%
ε3ε4	22,7%	18%	TT	1,3%	-
ε2ε4	4,0%	2,8%			
ε4ε4	1,3%	-			
Alelos			Alelos		
Frequência			Frequência		
ε2	6,6%	3,5%	A	93,5%	93,3%
ε3	79,4%	86%	T	6,5%	6,7%
ε4	14%	10,5%			
Ho	34,6%	25%	Ho	10,52%	13,51%
He	34,8%	24,8%	He	12,37%	12,68%
HWE	P=0,5098 SD=0,0005	P=0,2128 SD=0,0004	HWE	P=0,2715 SD=0,0004	P= 1,000 SD= 0,00
Teste Exato de Fisher	P=0,51528 SD=0,001		Teste Exato de Fisher	P= 0,990 SD=0,003	

Legenda: He=heterozigosidade esperada, Ho=heterozigosidade observada, HWE=Equilíbrio de Hardy-Weinberg

5 DISCUSSÃO

Os polimorfismos genéticos contribuem para diversas variações fenotípicas nos indivíduos que conferem a estas características únicas sejam estas antropométricas, relacionadas ao risco ou proteção ao desenvolvimento de doenças e na resposta adaptativa ao ambiente. Diante disso, a procura de genes relacionados ao desenvolvimento de doenças tem sido alvo de estudos em todo mundo.

Nesse sentido, as doenças cardiovasculares e suas interações com o gene-ambiente apresentam-se como alvo de vários estudos devido aos seus elevados índices de morbidade e mortalidade nas populações mundiais, uma vez que, essas doenças envolvem fatores genéticos que podem contribuir para sua ocorrência de maneira causal ou na sua patogênese ¹¹⁹.

Estudos epidemiológicos realizados ao longo das últimas décadas têm demonstrado que os fatores de risco clássicos estão presentes tanto em crianças quanto em adolescentes e indicam que a busca por indivíduos de alto risco deve começar ainda na idade escolar e corroboram a necessidade crescente de pesquisas para ampliar e refinar a estratificação de risco nestas populações ³⁻⁵. Esses estudos indicam que o nível de colesterol na fase infantil é um valor preditivo para o nível de colesterol na fase adulta ^{120,121}.

Mesmo diante destas evidências, no Brasil estudos que avaliam a prevalência de alterações lipídicas na fase infato-juvenil ainda são escassos ¹²².

Diante do exposto, as avaliações realizadas no Estudo do Rio de Janeiro (ERJ) são de grande contribuição, pois apresentam dados de avaliações colhidos ao longo de 28 anos, relacionados a fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e suas evoluções ocorridas durante as fases da infância, adolescência e fase adulta. É importante ressaltar que em nenhum outro estudo envolvendo a população brasileira com o objetivo de se investigar os fatores de risco ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares assim como avaliar o perfil lipídico nestas faixas etárias, houve um acompanhamento longitudinal dessa natureza.

A análise do tipo coorte realizada no ERJ, se mostra então como um instrumento importante no estudo da evolução dos fatores de risco diante de evidências que sugerem a agregação e reforço destes com o passar do tempo que, por sua vez, aumentam o risco de eventos cardiovasculares precoces ²⁰.

Sendo aceito que as dislipidemias podem ser causadas por fatores genéticos e/ou ambientais ²⁸ e que estas são apontadas como fator de risco cardiovascular ²⁶, no presente

estudo, este e outros fatores de risco foram investigados da fase infantil à fase adulta, relacionando-os com a presença de polimorfismos genéticos (ApoE e RLDL). Os dados colhidos podem contribuir para o melhor entendimento da ligação entre o desenvolvimento ou proteção de doenças em detrimento da presença de determinado genótipo ou alelo desses marcadores genéticos e, portanto representam uma ferramenta valiosa de investigação.

As principais doenças associadas à presença de dislipidemias são a aterosclerose e a doença arterial coronariana (DAC) ^{26,27,123-129}. Em relação ao início do processo da aterogênese, que se dá devido ao depósito de lipoproteínas na parede arterial, sabe-se que este ocorre de maneira proporcional à concentração das lipoproteínas LDL-c, VLDL e remanescentes de quilomícrons no plasma sanguíneo ⁷. Vários estudos sugerem que o processo de formação da placa aterosclerótica inicia-se na infância e evolui lenta e silenciosamente até a vida adulta, quando repercutem sob diversas manifestações clínicas da doença, que culminam nas elevadas taxas de mortalidade ³, nesta evolução verifica-se então um longo período assintomático ^{3,130,131}.

Em relação aos fatores de risco para DAC, estudos têm demonstrado que um dos principais fatores é a presença de hipercolesterolemia, uma vez que, aproximadamente, 96% do material lipídico do ateroma correspondem a colesterol ¹³².

No presente estudo, 59% dos indivíduos avaliados na população do ERJ apresentaram algum tipo de dislipidemia, considerando apenas os indivíduos pertencentes ao grupo 2 da análise do tracking de dislipidemia, estes indivíduos apresentaram algum lípide alterado na avaliação 2 (A2) e na 3 (A3). Considerando também a prevalência do grupo 1 (algum lípide alterado em A2 ou A3) este índice aumenta para 80,4% dos indivíduos avaliados.

Esses dados indicam uma tendência já descrita na literatura que preconizam aumento da prevalência de dislipidemias em crianças e jovens ^{120,133-134}. Entretanto, no presente estudo a prevalência apresentou altos níveis, uma vez que, para esta faixa etária a literatura apresenta valores entre 2,9 e 33%, embora preconizem um aumento progressivo desses níveis ao longo dos anos ^{135,136}.

Diante disso, desperta atenção os achados do presente estudo e de outros relacionados a população brasileira em relação a prevalência de dislipidemia na fase infanto-juvenil, os estudos realizados apontam uma alta prevalência nestas faixas etárias, como demonstrado por Gama e cols ³⁰ em estudo com 231 crianças para análise do perfil lipídico com idades entre 5 e 9 anos na cidade do Rio de Janeiro. Os autores mostraram que 68,4% das crianças avaliadas apresentavam algum tipo de dislipidemia, destas 18,6% apresentavam aumento de LDL-c, 35% tinham alterações no HDL-c e 3,5% do TG.

Corroborando estes dados, outro estudo realizado por Silva e cols ¹³⁷, também no Rio de Janeiro com 787 indivíduos de ambos os sexos com idade entre 2 e 19 anos mostrou que 41% destes indivíduos não apresentavam valores de Col-T dentro da faixa de normalidade. Em relação aos dados de LDL-c apenas 67% dos pacientes encontram-se na faixa considerada desejável. Os dados de TG mostram resultados alterados, principalmente nos indivíduos de 10 anos (40%), assim como as alterações dos valores para HDL-c (31%), apresentaram predominância nesta faixa etária, estando estes dados de acordo com os resultados obtidos para TG e HDL-c em estudo realizado no Sul do país ¹³⁸.

Em estudo do programa de prevenção primária de doenças ateroscleróticas, desenvolvido pelo Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo foi analisado o perfil lipídico de 104 crianças e 180 adolescentes. Os autores observaram uma alteração de Col-T em 57,7% das crianças e 42,7% dos adolescentes, em relação ao LDL-c 55,4% e 38,3%, em crianças e adolescentes respectivamente. Os níveis plasmáticos de TG também apresentaram alteração em 51,0% das crianças e 31,9% dos adolescentes, enquanto que o HDL-c apresentou valores alterados em 13,5% e 14,2%, para crianças e adolescentes, respectivamente ¹³⁹.

Outro estudo realizado em São Paulo por Moura et al ¹⁴⁰, avaliou de acordo com a idade e o sexo o perfil lipídico de 1600 escolares, em 35% destes foi verificado hipercolesterolemia.

Essa alta prevalência de dislipidemia em crianças e adolescentes não foi somente encontrada na região sudeste, Pereira e cols ¹²², em estudo observacional do tipo transversal, avaliou 470 estudantes com idade entre 10 e 14 anos de ambos os sexos na cidade de Recife (PE), observou que 63,8% dos participantes do estudo apresentaram algum tipo de dislipidemia, considerando como dislipidêmico o adolescente com alteração em pelo menos uma fração do perfil lipídico (IC _{95%} 59,3-68,2; $p < 0,05$).

Altos índices também foram encontrados em estudo realizado na cidade de Campina Grande (PB) por Carvalho e cols ¹⁴¹, com 180 adolescentes com idade entre 14 e 17 anos de ambos os sexos foi observado que em 66,7% dos indivíduos estudados (n=120) possuíam algum tipo de dislipidemia considerando para isto qualquer lipídeo alterado e destes 56,7% apresentavam alteração do HDL-c.

Diante dos resultados mostrados para a prevalência de dislipidemia no presente estudo e nos demais citados, a busca do perfil de alto risco cardiovascular deve fazer parte da avaliação rotineira de todos os indivíduos, em especial de crianças e adolescentes, para possibilitar sua inclusão precoce em programas de prevenção⁹.

Sabe-se que a investigação genotípica de uma doença em uma população é realizada através da procura por genes que quando presentes causam a doença ou torna o indivíduo mais susceptível (ou mais protegido) àquela determinada doença. Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados objetivando corroborar a real associação das alterações genéticas encontradas com a presença da doença. Diante deste contexto, as interações que ocorrem entre os fatores ambientais e os genes polimórficos também estão associados e representam uma maior ou menor predisposição para o desenvolvimento de uma determinada doença¹⁴².

Diante disto, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de investigar os efeitos dos polimorfismos da ApoE nos níveis plasmáticos dos lipídeos, uma vez que, este polimorfismo possui importantes funções relacionadas ao metabolismo das lipoproteínas, principalmente naquelas ricas em colesterol. No entanto, a magnitude deste efeito varia entre os grupos étnicos o que gera divergências nos resultados destes estudos¹⁴³.

Como dito, a associação entre os genótipos de ApoE e o perfil lipídico é controversa, visto que diferentes estudos têm evidenciado a relação dos polimorfismos do gene da ApoE com níveis elevados de Col-T, TGL e LDL-c e as doenças cardiovasculares^{48,53,54}, como as coronariopatias^{77,144} e a doença arterial coronariana (DAC)^{77, 79}. Nesse sentido, o genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ tem sido associado a ocorrência de hiperlipoproteinemia tipo III (HLP-III) e DAC^{42,54,67, 145,146}. Há evidências de que a presença do genótipo $\epsilon 2\epsilon 2$ é necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento de HLP-III, sendo fundamental a associação a fatores genético e/ou ambientais^{48,63,70}.

No entanto, a maioria dos estudos têm demonstrado que existe uma forte associação desse polimorfismo com baixos níveis séricos de Col-T e LDL-c^{58,146-148}, que exerceria um efeito protetor para dislipidemia como demonstrado por Ferreira et al¹⁴⁹ em estudo que envolveu 216 indivíduos (109 dislipidêmicos e 107 indivíduos normolipidêmicos) que foram avaliados para os polimorfismos de ApoE e a sua contribuição relativa para os níveis dos lipídios plasmáticos. As frequências alélicas encontradas nesse estudo foram semelhantes tanto nos indivíduos dislipidêmicos como nos normolipidêmicos. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis plasmáticos de lipídeos e lipoproteínas e os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ou $\epsilon 4$ nos dislipidêmicos. Entretanto, nos normolipidêmicos, o alelo $\epsilon 2$ mostrou-se associado com os menores níveis de Col-T e LDL-c, configurando um melhor perfil lipídico. Os autores finalizaram concluindo que os polimorfismos da ApoE não têm nenhum efeito sobre os níveis plasmáticos de lipídeos e lipoproteínas em indivíduos dislipidêmicos. Em contrapartida, em indivíduos normolipidêmicos, dependendo de outros fatores co-existent, o alelo $\epsilon 2$, pode

desempenhar um papel protetor ou patológico ¹⁴⁹. Nesse sentido, outros autores também observaram um efeito protetor associado ao alelo $\epsilon 2$ em relação à DAC ^{143,150,151}.

Em contrapartida, o alelo $\epsilon 4$ está frequentemente associado ao maior risco de DAC, visto que, estudos demonstram uma elevação das taxas de Col-T e LDL-c, considerados parâmetros aterogênicos, relacionada a presença desse polimorfismo ^{58,77,143,146,147,148,150,152}. A elevação das taxas de LDL-c também foi observada em indivíduos saudáveis que possuem este alelo ^{153,154}.

Um interessante estudo realizado por Lala et al ¹⁵⁵ demonstrou que o efeito do alelo $\epsilon 4$ nos níveis Col-T plasmáticos apresentaram-se mais elevados quando associados a uma dieta rica em colesterol e ácidos graxos saturados, o que nos sugere que o tipo de dieta parece ser um fator de influencia nos níveis plasmáticos de lipídios. O efeito do alelo $\epsilon 4$ aumenta com uma maior ingestão de gorduras saturadas e colesterol ¹⁵⁵.

Em relação aos níveis de TG associados a presença dos polimorfismos de ApoE, os resultados também são controversos. Níveis elevados de TG têm sido associados tanto ao alelo $\epsilon 2$ ¹⁵⁶ quanto ao alelo $\epsilon 4$ ^{70,157,158}, assim como a ambos os alelos ^{59,75,159,160}.

No presente estudo procuramos investigar o padrão de comportamento dos fatores de risco para as dislipidemias ao longo das três avaliações, em associação com os polimorfismos de ApoE e de RLDL, considerando a ocorrência de dislipidemia, com base na alteração de uma ou mais variáveis lipídicas. Nessa análise, denominada tracking de dislipidemia, observou-se que os indivíduos que possuem o genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ estiveram sempre presentes no grupo 0, isto é, no grupo onde as variáveis lipídicas analisadas (Col-T, TG, HDL-c e LDL) estiveram sempre nos níveis normais nas duas avaliações (A1 e A2). Entretanto, todos os indivíduos que possuíam o genótipo $\epsilon 2\epsilon 4$ estiveram presentes no grupo 2, grupo no qual uma ou mais variáveis estavam sempre alteradas nas duas avaliações.

Este resultado reforça que o alelo $\epsilon 2$ só exerceria seu fator protetor, como já demonstrado por Ferreira et al ¹⁴⁹, quando associado ao alelo $\epsilon 3$. Esta evidência também foi observada em um estudo do tipo coorte realizado por Bazzaz et al ¹⁶¹ que avaliaram 320 indivíduos da população iraniana, com o objetivo de investigar as associações entre os polimorfismos do gene da APOE, o perfil lipídico e o IMC. Os autores observaram que o alelo $\epsilon 2$ era mais frequente nos pacientes que apresentaram Col-T <200 mg/dL (P 0,01 OR 2,1 IC 95% 1,1-4,2), além de uma maior associação dos indivíduos com níveis séricos de Col-T normais com o genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ em relação aos indivíduos com níveis anormais. (P = 0,003 OR 2,4 IC 95% = 1,3-4,6).

Quando associado ao alelo $\epsilon 4$, o alelo $\epsilon 2$ perderia ou teria diminuída sua condição protetora, evidenciando que o alelo $\epsilon 4$ pode estar fortemente associado a evolução para dislipidemia. De fato, a partir dos resultados do presente estudo, verificou-se que todos os indivíduos que tinham o alelo $\epsilon 4$ em qualquer um dos genótipos encontrados ($\epsilon 2\epsilon 4$, $\epsilon 3\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$), se encontravam no grupo 2, inclusive todos aqueles com o genótipo $\epsilon 4\epsilon 4$.

Estes dados são corroborados por outros estudos, como demonstrado por Salazar LA et al ¹⁴⁴, em estudo investigando o polimorfismo *HhaI* em 150 mulheres coronariopatas e normais. As coronariopatas apresentaram taxas significativamente mais elevadas de Col-T, TG e LDL-c e uma frequência maior do genótipo $\epsilon 3\epsilon 4$ em relação às mulheres controles (40% e 14%, respectivamente), com relação a frequência dos alelos, o alelo $\epsilon 4$ foi o mais frequente nas coronariopatas ¹⁴⁴.

Em outro estudo realizado na população da Tunísia, foi observado mais uma evidência da associação dos polimorfismos da APOE com DAC. Neste estudo, os autores encontraram associação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e uma maior gravidade da DAC, além da presença de um perfil lipídico desfavorável, evidenciando que o alelo $\epsilon 4$ pode também estar envolvido no nível de gravidade da DAC ¹⁴⁸.

Estas evidências também foram encontradas no presente estudo ao analisar os dados da tabela 5, onde se observam as variáveis coletadas em na terceira avaliação (A3) em relação aos grupos estratificados para dislipidemia (0,1 e 2) para o gene da ApoE. Na população de alunos-alvo, os indivíduos que possuem perfil lipídico mais desfavorável pertencem ao Grupo 2 (o qual possui dislipidemia em A2 e A3) e este é o mesmo grupo o qual existe prevalência nos indivíduos do alelo $\epsilon 4$. Os indivíduos que possuem melhor perfil lipídico encontram-se nos grupos 0 e 1 e o grupo 0 (com o melhor perfil lipídico) possui uma prevalência do alelo $\epsilon 2$. Os dados de pressão arterial sistólica (PAS), peso, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal (CA, HDL, LDL e TG apresentaram significância estatística quando os grupos foram comparados entre si, evidenciando a tendência de pior perfil lipídico associado ao alelo $\epsilon 4$.

Outro fato interessante observado na análise do grupo 2 para o gene da ApoE foi a associação do gênero masculino a um perfil de risco desfavorável, sendo observado um predomínio deste gênero no grupo 2 (32 indivíduos - 62,5%). O gênero, assim como, a idade estão incluídos nos fatores de risco não modificáveis e são fatores de risco importantes no determinismo das DCV. O gênero masculino reconhecidamente está associado a um maior risco cardiovascular ¹⁶²⁻¹⁶⁴.

No presente estudo, não foi encontrada nenhuma associação entre as variáveis analisadas (PAS, PAD, CA, IMC, Col-T, HDL, LDL, TG) e os polimorfismos do gene do RLDL. Entretanto, esta falta de associação também foi evidenciada em outros estudos que pesquisaram a relação do polimorfismo do RLDL com variáveis lipídicas¹⁶⁵⁻¹⁶⁶. Vieira et al¹⁶⁷ em estudo com 2.659 indivíduos saudáveis também não encontrou associação entre o aumento dos níveis das lipoproteínas plasmáticas relacionado ao polimorfismo do RLDL¹⁶⁷. Frikke-Schmidt et al⁹⁸ em estudo com 9.000 indivíduos de ambos os sexos, não encontraram associação significativa entre os níveis lipídicos plasmáticos de Col-T, LDL-c nos indivíduos que apresentavam genótipos AA em relação ao TT, entretanto, relataram aumento do risco para desenvolvimento de isquemia vascular cerebral de 3,6 vezes maior em indivíduos homozigóticos TT em relação aos AA.

Em relação à presença de hipercolesterolemia familiar não foi observada relação com os polimorfismos do gene do RLDL para as amostras analisadas. Esta não associação também foi relatada em outros estudos⁹⁸.

No sentido de comprovar a aleatoriedade da coleta efetuada na amostra populacional do ERJ, selecionamos também para este estudo uma amostra de indivíduos residentes no estado do Rio de Janeiro e com ausência de parentesco direto (amostra LDD) e comparamos os padrões de distribuição e de diversidade alélica e genotípica dessas populações. Esses dados também foram confrontados com os de outras populações mundiais, para as quais encontramos dados dos mesmos marcadores analisados nesse estudo.

Com base no perfil de diversidade genética, verificamos que nas duas populações as frequências genotípicas observadas para polimorfismos dos genes da ApoE e do RLDL estão de acordo com as esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em relação ao gene da ApoE, outros dois estudos, um realizado por Seixas²⁴ com 165 indivíduos das populações da ilha de São Tomé e Príncipe e de Portugal e outro realizado na população brasileira por Fuzikawa et al⁶⁰, envolvendo 1406 indivíduos foi demonstrada esta mesma conformidade com as frequências esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Vieira et al¹⁶⁷ demonstraram em seu estudo com 3.012 indivíduos ingleses que as frequências genotípicas observadas naquela população também estavam de acordo com as frequências esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos do gene do RLDL.

Na população ERJ foram encontrados cinco genótipos para o polimorfismo de ApoE enquanto que na amostra LDD, apenas quatro genótipos foram encontrados, destacando-se a ausência do genótipo e4e4. Em relação aos polimorfismos de RLDL, os três polimorfismos

foram encontrados na população ERJ, enquanto que na amostra LDD, apenas 2 foram encontrados, com ausência do genótipo TT. O genótipo da ApoE mais comum observado nas duas populações foi o $\epsilon 3\epsilon 3$, enquanto que o de RLDL foi o AA.

As frequências alélicas encontradas na população ERJ para os polimorfismos do gene da ApoE foram $\epsilon 2$ (0,06), $\epsilon 3$ (0,79) e $\epsilon 4$ (0,14) enquanto que as dos genótipos foram $\epsilon 3\epsilon 3$ (0,66), $\epsilon 3\epsilon 4$ (0,22), $\epsilon 2\epsilon 3$ (0,05), $\epsilon 2\epsilon 4$ (0,04) e $\epsilon 4\epsilon 4$ (0,01), se assemelham com as de outras populações brasileiras, como as encontradas em Porto Alegre (RS)⁴³ assim como, as de populações mundiais caucasianas (alemães, escocesas, canadenses, holandesas, finlandesas, italianas e francesas) e asiáticas (chinesas)^{54, 168-174}.

Há evidências de que este padrão varie em outras populações, embora o alelo $\epsilon 3$ sempre apresente predominância^{47,168}. Como exemplo de variação, podemos destacar o padrão de variabilidade do alelo $\epsilon 4$ que em países do norte da Europa^{52,175} e nos EUA apresenta uma frequência aumentada, enquanto que no sul da Europa e no Japão apresenta uma frequência menor^{145,175,176}.

As frequências alélicas na população do ERJ para os polimorfismos do gene do RLDL foram A (0,93) e T (0,07) enquanto que as genotípicas foram AA (0,88), AT (0,10) e TT (0,01). Estas frequências encontradas na população em estudo se assemelham as encontradas em outras populações como no estudo realizado por Frikke-Schmidt et al⁹⁸ na população da Dinamarca proveniente do “The Copenhagen City Heart Study”, os autores encontraram frequência de 0,9 para indivíduos A370T homozigóticos, 0,09 para A370T heterozigóticos e 0,003 para 370T homozigóticos.

O teste de diferenciação populacional realizado a partir do teste exato de Fisher não indicou a existência de diferenças significativas entre as distribuições alélicas das populações do ERJ e LDD.

Um fator fundamental para a execução deste estudo foi o acompanhamento longitudinal dos indivíduos desde a fase infantil até a fase adulta o que nos possibilitou avaliar o padrão de evolução das dislipidemias (tracking) e de outros fatores de risco para as doenças cardiovasculares verificados ao longo dos anos durante as avaliações realizadas. Este acompanhamento nos permitiu realizar diferentes medições associadas ao avanço de doenças cardiovasculares e de suas possíveis associações aos polimorfismos genéticos envolvidos nestes padrões de evolução das variáveis clínica, antropométrica e laboratorial.

6 CONCLUSÃO

Com base nesses resultados, os genótipos de ApoE $\epsilon 2\epsilon 4$ e $\epsilon 4\epsilon 4$ apresentaram-se associados com a permanência de dislipidemia em indivíduos jovens avaliados em estudo longitudinal. A presença do alelo $\epsilon 2$ parece representar um efeito protetor para os indivíduos, em contra partida, a presença do alelo $\epsilon 4$ estaria anulando tal efeito protetor ou mesmo determinando predisposição ao risco de dislipidemias. Para os genótipos do RLDL esta associação não foi encontrada, assim como, estes genótipos também não foram associados com a presença de hipercolesterolemia familiar.

Uma vez que não foram encontradas diferenças entre o perfil genético da amostra-coorte do ERJ e da aleatória do banco de dados do laboratório de Diagnósticos por DNA, parece legítimo inferir que os fatores de risco detectados na primeira serão os mesmos encontrados na população em geral.

Por fim, as análises dos polimorfismos genéticos juntamente com outros parâmetros clínicos podem determinar a existência de predisposição de um indivíduo na faixa etária infanto-juvenil apresentar dislipidemia, podendo este ser acompanhado ao longo de sua vida com medidas educacionais e terapêuticas para a prevenção de doenças associadas, o que torna esta análise uma ferramenta de grande utilidade na área da saúde.

7 REFERÊNCIAS

- 1-Ministério da Saúde/Cepeni: Sistema de informações sobre mortalidade (SIM) e base demográfica do IBGE. 1997.
- 2-IBGE. Síntese de indicadores sociais 2000. Estudos e pesquisas, informação demográfica e socioeconômica. Rio de Janeiro. 2001.
- 3-Rivera ARQ et al N° 1. Capítulo 1 Introdução in Souza GMR et al. Proteína C-Reativa e doença arterial coronária. Série Monografias Dante Pazzanese. Rio de Janeiro: Ed Revinter; 2004. p.1 – 4.
- 4-Rivera ARQ et al N° 1. Capítulo 7. Uso da proteína C-reativa na prática clínica in Souza GMR et al. Proteína C-Reativa e doença arterial coronária. Série Monografias Dante Pazzanese. Rio de Janeiro:Ed Revinter; 2004. p.25 – 29.
- 5-Rivera ARQ et al N° 1. Capítulo 8 Comentários e Conclusões in Souza GMR et al. Proteína C-Reativa e doença arterial coronária. Série Monografias Dante Pazzanese. Rio de Janeiro:Ed Revinter; 2004. p. 33 – 39.
- 6-Brandão AC, Jr SP, Pinhel MA, Anacleto AM, De Godoy JMP, De Godoy MF et al. Polimorfismo genético da apolipoproteína E na doença arterial periférica. J Vasc Br. 2004; 3(4):317-22.
- 7-IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq Bras Cardiol. 2007;88(supl I):1-19.
- 8-Ministério da Saúde do Brasil. [homepage na Internet]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 6 ed. 2009 - [atualizada em: 2010 Dez 14; acesso .em 2011 Jun 20]. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11994
- 9-Burke GL, Cresanta JL, Shear CL, Miner MH, Berenson GS. Cardiovascular risk factors and their modification in children. Cardiol Clin. 1986 Feb; 4 (1): 33 – 46.
- 10-Berenson GS, Srinivisan SR, Bao W. Precursors of cardiovascular risk in young adults from a biracial (black-white) population: The Bogalusa Heart Study. Ann N Y Acad Sci. 1996:189-98.
- 11-Berenson GS, Srinivisan SR, Bao W, Newman III WP, Tracy RE, Wattigney WA, for the Bogalusa Heart Study. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. N Engl J Med. 1998 ;338:1650-6.
- 12-McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group.

Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation*. 2002 Jun 11; 105(23):2712-8.

- 13-Zieske AW, Malcom GT, Strong JP. Natural history and risk factors of atherosclerosis in children and youth: the PDAY Study. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2002; 21(2): 213-37.
- 14-Clarke WR, Schrott HG, Leaverton PE, Connor WE, Lauer RM. Tracking of blood lipids and blood pressures in school age children: the Muscatine study. *Circulation*. 1978; 58:626-634.
- 15-Rames LK, Clarke WR, Connor WE, Reiter MA, Lauer RM. Normal blood pressure elevation in childhood: the Muscatine Study. *Pediatrics*. 1978; 61: 245-51.
- 16-Lauer RM, Burns TL, Clarke WR. Assessing children's blood pressure – considerations of age and body size: The Muscatine Study. *Pediatrics*. 1985; 75: 1081-90.
- 17-Tavares A. Polimorfismos dos genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e as moléstias Cardiovasculares. *Rev Bras Hipertens* 2000; 3: 237-42.
- 18-Williams CL, Hayman LL, Daniels SR, Robinson TN, Steinberger J, Paridon S et al. Cardiovascular health in childhood: a statement for health professionals from the Committee on Atherosclerosis, Hypertension and Obesity in the Young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation*. 2002; 106:143-60.
- 19-Armstrong N, Balding J, Gentle P, Kirby B. Serum lipids and blood pressure in relation to age and sexual maturity. *Ann Hum Biol* 1992;19:477-87.
- 20-Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factors categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.
- 21-Schulte H, Cullen P, Assmann G. Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Munster Heart Study (PROCAN). *Atherosclerosis*. 1999;144:199-209.
- 22-Kannel WB. The Framingham Study: its 50 years legacy and future promise. *J Atheroscler Thromb*. 2000; 6:60-6.
- 23-Novak EM, Bydlowski SP. *Biologia Molecular das Dislipidemias. Variação Genética das Apolipoproteínas*. *Arq Bras Cardiol*. 1996; 67(6):411-17.
- 24-Seixas SA. 2002. Análise dos padrões de diversidade genética em três regiões funcionalmente relevantes do genoma humano Apolipoproteína E (ApoE) α 1-antitripsina (PI) Grupo Sanguíneo Duffy (FY). Dissertação (Doutorado em Biologia). Porto. Faculdade de Ciências da Cidade do Porto. p 54.
- 25-Forti N, Salazar LA, Diamant J, Giannini Sd, Hirata MH, Hirata RDC. Alterações Genéticas e colesterolemia: Recentes estudos brasileiros. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 80 (5):565-71.

- 26-Marte AP e Santos RD. Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2007; 14(4): 252-257.
- 27-Lima JCC. As dislipidemias e suas avaliações laboratoriais. *HiperAtivo*. 1999; 2: 133-7.
- 28-Reinaldo Mano, Manuais de Cardiologia, Livro virtual - ano 10 [homepage na Internet]. [Acesso em: 2009 Mar 31].Disponível em:
<http://www.manuaisdecardiologia.med.br/Dislipidemia/Lipid1.htm>
- 29-Sposito AC. Emerging insights into hypertension and dyslipidemia synergies. *Eur Heart J*. 2004;6 (supl G):G8-G12.
- 30-Gama SR, Carvalho MS, Chaves CRM de M. Prevalência em crianças de fatores de risco para as doenças cardiovasculares. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro. set 2007; 23 (9): 2239-45.
- 31-Francis SE et al. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease.*Circulation*.1999; 99:861-866.
- 32-Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC, Kastelein JJ.Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2001; 80 (2-3):161-72.
- 33-Moatti D et al. Polymorphism in the fractalkine receptor X3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*. 2001 ; 97:1925–28.
- 34-Brand NJ, Barton PJR. Myocardial molecular biology: an introduction. *Heart*. 2002; 87:284-293.
- 35-Wick G, Knoflach M. and Xu Q. Autoimmune and Inflammatory mechanisms in Atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:361–403.
- 36-Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins: separation of species differing in protein components. *Biochem*. 1973; 12: 502-7.
- 37-Ojopi EB, Bertoncini AB, Neto ED. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. *Rev Psiquiatr Clin*. 2004; 31 (1): 26-33.
- 38-Hixson JE & Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990; 31(3):545-8.
- 39-Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature*. 1977; 269:604-7.
- 40-Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet*. 1981; 33:11-24.
- 41-Utermann G, Steinmetz A, Weber W. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet*. 1982;60:344-51.

- 42-Martinelli N, Olivieri O et al. Additive effect of LRP8/APOER2 R952Q variant to APOE $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype in modulating apolipoprotein E concentration and the risk of myocardial infarction: a case-control study. *BMC Med Genet.* 2009; 10: 41.
- 43-Schwanke CHA, Cruz IBM da, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Análise da Associação entre Polimorfismo do Gene da Apolipoproteína E e Fatores de Risco Cardiovasculares em Idosos Longevos. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 78: 561-70.
- 44-Kim MH, Nakayama R, Manos P et al. Regulation of apolipoprotein E synthesis and mRNA by diet and hormones. *J Lipid Res.* 1989; 30: 663-71.
- 45-Lenich CM, Chobanian AV, Brecher P, Zannis VI. Effect of dietary cholesterol and alloxan diabetes on tissue cholesterol and apolipoprotein E mRNA levels in the rabbit. *J Lipid Res.* 1991; 32: 431-8.
- 46-Mansur AP. Análise do componente genético da doença coronariana. *Arq Bras Cardiol.* 2000; 74: 531-3.
- 47-Kamboh MI. Apolipoprotein E polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease. *Hum. Biol.* 1995; 67:195-215.
- 48-Mahley RW, Rail SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000; 1:507-537.
- 49-Raber JAR. APOE, and cognitive function. *Horm Behav.* 2008; 53 (5): 706-15.
- 50-Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988;240:622-629.
- 51-Martins MC, Faleiro LL, Rodrigues MO, Albergaria I, Fomseca A. Influência dos polimorfismos da ApoE em alguns fatores de risco de Aterosclerose. *Acta Med Port.* 2008; 21: 433-440.
- 52-Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2002;155(6):487-95.
- 53-Kardia LR, Stengård J, Templeton A. 1999. An evolutionary perspective on the genetic architecture of susceptibility to cardiovascular disease. In: Stearns, S. C, (ed). *Evolution in Health and Disease.* Oxford University. Press Oxford. p. 231-245.
- 54-Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1988; 8: 1-21.
- 55-Menzel HJ, Kladetzky RG, Asmann G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Arteriosclerosis.* 1983; 3: 310-5.
- 56-Kwijt P, Maagdenberg AM, Frants RR, Hawekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Human Mut.* 1994;4:178-94.

- 57-Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics*. Dec 2000 18;4(2):101-108.
- 58-Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African -American and white young adults. *Am J Epidemiol*. 1998;148: 859–868.
- 59-Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by ApoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res*. 1992; 33: 447-454.
- 60-Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Association of ApoE polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambuí Health Aging Study (BHAS). *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41: 89-94.
- 61-Sephernia et al. Genetic studies of humans apolipoproteins X The effect of the apolipoprotein E polymorphism on quantitative levels of lipoproteins in Nigerian blacks. *Am J Hum Genet*. 1989; 45:586-591.
- 62-Volcik KA, Barkley RA, Hutchinson RG, Mosley TH, Heiss G, Sharrett AR, et al. Apolipoprotein E polymorphisms predict low-density lipoprotein cholesterol levels and carotid artery wall thickness but not incident coronary heart disease in 12,491 ARIC study participants. *Am J Epidemiol*. 2006; 164: 342-348.
- 63-Mahley RW et al. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res*. 1995;36:839-859.
- 64-Gerdes LU et al. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum Genet*. 1996;98:546-550.
- 65-de Andrade FM, Larrandaburu M, Callegari-Jacques SM, Gastaldo G & Hutz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer 's disease in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33:529-537.
- 66-Hazzard WR, Prote Jr D, Bierman EL. Abnormal lipid composition of very low density lipoproteins in diagnosis of broad beta disease (type III hyperlipoproteinemia). *Metab Clin Exp*. 1972; 21: 1009-19.
- 67-Karube M, Nakabayashi K, Fujioka Y, Yoshihara K, Yamada A, Matsunaga A, et al. Lipoprotein glomerulopathy-like disease in a patient with type III hyperlipoproteinemia due to apolipoprotein E2 (Arg158 Cys)/3 heterozygosity. *Clin Exp Nephrol*. 2007; 11(2):174-9.
- 68-Breslow JL, Zannis VI. Genetic variation in apolipoprotein E and type III hyperlipoproteinemia. *Arterioscler Ver*. 1988; 14: 119-42.
- 69-Havel RJ, Kotite L, Kane JP, Tun P, Bersot J. Atypical familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein phenotype E3/3. *J Clin Invest*. 1983; 72: 379-87.
- 70-Mahley RW, Rail SC Jr.1995. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein e in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Srivier,

C. R., Beaudet, A. L., Sly, W., Valle, D. (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill. New York. p 1953-1980.

- 71-Eto M, Watanabe K, Makino I. Increased frequencies of apolipoprotein epsilon 2 and epsilon 4 alleles in patients with ischemic heart disease. Clin Genet. 1989;36:183-188.
- 72-Hallman DM, Boerwinkle EN, Saha et al. The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. Am J Hum Genet. 1991; 49:338-349.
- 73-Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D et al. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. Neurology. 1993;43:1467-1472.
- 74-Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D. Apolipoprotein E: High affinity binding to β A amyloid and increased frequency of type 4 allele in familial Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 1993;90: 1977-1981.
- 75-Boer JMA. Interactions between lifestyle-related factors and the apoE polymorphism on plasma lipids and apolipoproteins - the EARS study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17: 1675-1681.
- 76-Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype. J Lipid Res. 2000;41:1812-1822.
- 77-Moreno JA, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F. Influencia de los factores genéticos y ambientales en el metabolismo lipídico y riesgo cardiovascular asociado al gen apoE/ Influence of genetic and environmental factors on lipid metabolism and cardiovascular risk associated with the apoE gene. Med Clin Barc. 2006; 127(9): 343-351.
- 78-Katzel L, Fleg JL, Paidi M, et al. APOE polymorphism increases the risk for exercise-induced silent myocardial ischemia in older men. Atheroscler Thromb. 1993; 13: 1495-500.
- 79-Guardamagna O, Restagno G et al. The type of LDLR gene mutation predicts cardiovascular risk in children with familial hypercholesterolemia. J Pediatr. 2009; 155:199.
- 80-Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, Hopkins PN. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. Am J Cardiol. 1993; 72: 171-176.
- 81-Breslow JL, Scrivner C, Beaudet A. Familial disorders of high density lipoprotein metabolism. In: The metabolic basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill. 1995: 2031-52.
- 82-Boekholdt SM, Peters RJ, Fountoulaki K, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Molecular variation at the apolipoprotein B gene locus in relation to lipids and cardiovascular disease: a systematic meta-analysis. Hum Genet. 2003;113 (5):417-25.

- 83-Chiodini BD, Barlera S, Franzosi MG, Beceiro VL, Inrona M, Tognoni G. Apo B gene polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2003;167(2):355-66.
- 84-Austin MA, Hutter CM et al. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol*. 2004; 160:407.
- 85-Zakharova FM, Damgaard D, Mandelshtam MY, Golubkov VI, Nissen PH, Nilsen GG et al. Familial hypercholesterolemia in St-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. *BMC Med Genet*. 2005; 8(6):6.
- 86-Muller PY, Miserez AR. Large heterogeneity of mutations in the gene encoding the low-density lipoprotein receptor in subjects with familial hypercholesterolaemia. *Atheroscler Suppl*. 2004;5:1-5.
- 87-National Collaborating Centre for Primary Care. Identification and management of familial hypercholesterolaemia (FH) - Full guideline. August 2008. [homepage na Internet]. [Acesso em: 2009 Maio 30]. Disponível em: www.nice.org.uk/CG71
- 88-Hobbs HH, Leidersdorf E, Leffert C et al. Evidence for a dominant gene that suppresses hypercholesterolemia in a family with defective low-density lipoprotein receptors. *J Clin Invest*. 1989; 84: 656.
- 89-Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed.). *The metabolic basis of inherited disease*. New York, McGraw Hill. 1995 p. 1981-2030.
- 90-Bertolini S, Canatafora A, Averna M et al. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1-12.
- 91-Lundhal B, Leren TP, Ose L et al. A functional polymorphism of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP-493 G/T) influences lipoprotein phenotype in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1784-8.
- 92-Sá ACM. 2010. O Papel dos Polimorfismos Genéticos na Doença Cardíaca Isquêmica. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina). Porto. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar. Universidade do Porto. p. 8.
- 93-Heath KE, Whittall RA, Miller GJ, Humphries S. I705 variant in the low density lipoprotein receptor gene has no effect on plasma cholesterol levels. *J Med Genet*. 2000; 37(9):713-15.
- 94-Kotze MJ, Langenhoven E, Retief AE, Steyn K, Marais MP, Grobbelaar JJ et al. Haplotype associations of three DNA polymorphisms at the human low density lipoprotein receptor gene locus in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet*. 1987;24(12): 750-755.

- 95-Miserez AR, Schuster H, Chiodetti N, Keller U. Polymorphic haplotypes and recombination rates at the LDL receptor gene locus in subjects with and without familial hypercholesterolemia who are from different populations. *Am J Hum Genet.* 1993;52(4):808-826.
- 96-Chaves FJ, Puig O, Garcia-Sogo M, Real J, Gil JV, Ascaso J et al. Seven DNA polymorphisms in the LDL receptor gene: application to the study of familial hypercholesterolemia in Spain. *Clin Genet.* 1996; 50(1):28–35.
- 97-Defesche JC, Van Diermen DE, Hayden MR, Kastelein JP. Origin and migration of an Afrikaner foundermutation FH Afrikaner-2 (V408M) causing familial hypercholesterolemia. *Gene Geogr.* 1996; 10(1):1–10.
- 98-Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Schmidt R. Single nucleotide polymorphism in the low-density lipoprotein receptor is associated with a threefold risk of stroke. A case-control and prospective study. *Eur Heart J.* 2004;25(11):943–951.
- 99-Brandão AP. A importância do desenvolvimento físico no comportamento da curva de pressão arterial em crianças de 6 a 9 anos de idade. *Arq Bras Cardiol.* 1987a; 48: 203-9.
- 100-Brandão AP, Brandão AA, Araujo EMM. The significance of physical development on blood pressure curve of children between 6 and 9 years of age and its relationship with familial aggregation. *J Hypertens* 1989; 7 (suppl 1): S37-9.
- 101-Brandão AP, Brandão AA, Oliveira RC, Ferreira JO, Schzerwald CL, Araujo EMM. Skin color and blood pressure in children and adolescents - The Rio de Janeiro Study [Abstract]. In: Sixth International Conference on Hypertension in Blacks. Health and Disease in Multicultural Societies: A Focus on Miscigenation; 1991:33.
- 102-Brandão AA, Pozzan R, Albanesi FFM, Brandão AP. Role of anthropometric indexes and blood pressure as determinants of left ventricular mass and geometry in adolescents: the Rio de Janeiro Study. *Hypertension.* 1995; 26: 1190-4.
- 103-Pozzan R, Brandão AA, Cerqueira RCO, Brandão AP. The importance of overweight on the follow-up of adolescents with different percentiles of blood pressure – The Rio de Janeiro Study [Abstract]. *Hypertension.* 1995; 25: 28.
- 104-Brandão AP, Ferreira JO, Brandão AA, Pozzan R, Cerqueira RCO. Avaliação da pressão arterial em crianças e adolescentes: Estudo do Rio de Janeiro. *HiperAtivo.* 1996; 3: 86-92.
- 105-Pozzan R, Brandão AA, Brandão AP. Early involvement of left ventricle in adolescents with upper percentile of blood pressure – The Rio de Janeiro Study [Abstract]. *J Am Coll Cardiol.* 1996a; 27 (Suppl A): 105A-6A.
- 106-Pozzan R, Brandão AA, Silva SL, Brandão AP. Hyperglycemia, hyperinsulinemia, overweight, and high blood pressure in young adults: The Rio de Janeiro Study. *Hypertension.* 1997; 30 (3pt2): 650-3.

- 107-Brandão AA, Pozzan R, Magalhães MEC, Cerqueira RCO, Roussoulières ALS, Szwarcwald C, Brandão AP. Familial aggregation of left ventricular mass marked by blood pressure percentile of children and adolescents – The Rio de Janeiro Study [Abstract]. J Am Coll Cardiol. 1998; 31 (Suppl C): 408C.
- 108-Magalhães MEC, Pozzan R, Brandão AA, Cerqueira RCO, Roussoulières ALS, Czwarcwald C, Brandão AP. Early blood pressure level as a mark of familial aggregation of metabolic cardiovascular risk factors – The Rio de Janeiro Study. J Hypertens. 1998; 16: 1885-9.
- 109-Brandão AA, Pozzan R, Magalhães MEC Brandão AP. Aggregation of metabolic abnormalities, overweight and high blood pressure, in young subjects followed-up for a 10-year-period [Abstract]. The Rio de Janeiro Study. J Am Coll Cardiol. 2000b; 35 (suppl A): 264A.
- 110-Brandão AA, Pozzan R, Magalhães MEC, Brandão AP. Early determinants of left ventricular mass and hypertrophy in children and adolescents: The Rio de Janeiro Study [Abstract]. J Am Coll Cardiol. 2001; 37 (Suppl A): 290A.
- 111-Campana EMG, Brandão AA, Pozzan R, França MF, Fonseca FL, Pizzi OL, Magalhães MEC, Freitas EV, Brandão AP. Pressão arterial e o perfil antropométrico e metabólico de indivíduos jovens acompanhados por 16 anos, estratificados pelo comportamento da pressão arterial. Estudo do Rio de Janeiro. Rev Socerj. 2006, 19 (6): 1 – 9.
- 112-Fonseca FL, Brandão AA, Pozzan R, Campana EMG, Pizzi OL, Magalhães MEC, Freitas EV, Brandão AP. A Relação entre a Pressão Arterial e Índices Antropométricos na infância/Adolescência e o Comportamento das Variáveis de Risco Cardiovascular na Fase Adulta Jovem, em Seguimento de 17 Anos: Estudo do Rio de Janeiro. Revista da Socerj. set/out 2008; 21(5):281-290.
- 113-Campana EMG, Brandão AA, Pozzan R, França MF, Fonseca FL, Pizzi OL, Magalhães MEC, Freitas EV, Brandão AP. Pressão Arterial em Jovens como Marcador de Risco Cardiovascular. Estudo do Rio de Janeiro. (Blood Pressure in Young Individuals as a Cardiovascular Risk Marker. The Rio de Janeiro study). Arq Bras Cardiol. 2009; 93(6): 657-665.
- 114-Fonseca FL, Brandão AA, Pozzan R, Campana EMG, Pizzi OL, Magalhães MEC, Freitas EV, Brandão AP. Excesso de Peso e o risco Cardiovascular em Jovens Seguidos por 17 anos. Estudo do Rio de Janeiro. (Overweight and Cardiovascular Risk among Young Adults Followed-up for 17 Years: The Rio de Janeiro Study, Brazil). Arq Bras Cardiol. 2010; 94 (2): 207-215.
- 115-WHO, World Health Organization. Obesity: preventing and managing the total epidemic. Report of a WHO Consultation Group. Geneva: WHO; 1997. [Acesso em: 2006 Jun 17]. Disponível em: <http://www.who.int/bmi/index.jsp>
- 116-Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. Nucleic Acids Res. February 1988; 16(3): 1215.
- 117-SSPS for Windows. SPSS version 9.0. Chicago, Illinois: SPSS Inc.; 1998.

- 118-Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005;1: 47-50.
- 119-Grillo LP, Crispim SP, Siebert NA, de Andrade ATW, Rossi A, de Campos IC. Perfil lipídico e obesidade em escolares de baixa renda. *Rev Bras Epidemiol*. 2005; 8(1): 75-81.
- 120-Giuliano ICB, Coutinho MSSA, Freitas SFT, Pires MMS, Zunino JN, Ribeiro RQC. Lípides séricos em crianças e adolescentes de Florianópolis, SC – Estudo Floripa Saudável 2040. *Arq Bras Cardiol* 2005; 85(2): 85-91.
- 121-Brotons C, Ribera A, Perich RM, Abrodos D, Magaña P, Pablo S. Worldwide distribution of blood lipids and lipoproteins in childhood and adolescence: a review study. *Atherosclerosis*. 1998; 139: 1-9.
- 122-Pereira PB, de Arruda IKG, Cavalcanti AMTS, Diniz AS. Perfil lipídico em escolares de Recife – PE. *Arq. Bras. Cardiol*. 2010 (95);5:606-613.
- 123-Giannini SD. Doença coronariana aterosclerótica e colesterol. *Rev Bras Med*. 1989; 46: 31-8.
- 124-Giannini SD. Prevenção primária e secundária da doença coronária aterosclerótica. *Rev Bras Med*. 1990; 47: 113-19.
- 125-Giannini SD. Fatores de risco na aterogênese. In: Quintão E, (ed). *Colesterol e Aterosclerose*. Rio de Janeiro. Qualitymark. 1992: p 137.
- 126-Pyoralla K. Determinants of plasma HDL cholesterol level and its status as a CHD risk factor. *Lipid Ver*. 1990; 4: 25-30.
- 127-Loscalzo J. Lipoprotein (a): a unique risk factor for atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*. 1990; 10:672.
- 128-Rubins HB, Robins SJ, Collins D et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group.. *N. Engl. J. Med*. 1999; 341 (6): 410–8.
- 129-LaRosa JC, Cleeman JL. Cholesterol-lowering as treatment for established coronary heart disease. *Circulation*. 1992; 85: 1229-35.
- 130-Caramelli B, Giuliano ICB. Dislipidemia em crianças e adolescentes. *Rev Soc Cardiol (São Paulo)*. 2005; 6:518-23.
- 131-Francoso LA, Coates V. Anatomicopathological evidence of the beginning of atherosclerosis in infancy and adolescence. *Arq Bras Cardiol*. 2002;78:131-42.
- 132- Tietz NW. *Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 2000.

- 133-Moura EC, Castro CM, Mellin AS, Figueiredo DB. Perfil lipídico em escolares de Campinas, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2000; 34 (5): 499-505.
- 134-Scherr C, Magalhães CK, Malheiros W. Análise do perfil lipídico em escolares. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 89 (2): 73-8.
- 135-Shehri SN, Saleh, ZA, Salama MM, Hassan YM. Prevalence of hyperlipidemia among Saudi school children in Riyadh. *Ann Saudi Med*. 2004; 24 (1): 6-8.
- 136-Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 85 (supl 6): S4-36.
- 137-Silva RA, Kanaan S, da Silva LE, Peralta RHS. Estudo do perfil lipídico em crianças e jovens do ambulatório pediátrico do Hospital Universitário Antônio Pedro associado ao risco de dislipidemias. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2007(43);2:95-101.
- 138-Seki M, et al. Estudo do perfil lipídico em crianças e jovens até 19 anos de idade. *J Bras Patol*. 2001(37);4:247-51.
- 139-Forti N, Giannini DS, Diamant J, et al. Fatores de risco para doenças arterial coronariana em crianças e adolescentes filhos de coronariopatas jovens. *Arq Bras Cardiol*. 1996; 66: 119-23.
- 140-Moura EC, Castro CM, Mellin AS, Figueiredo DB. Perfil lipídico em escolares de Campinas, SP, Brasil. *Ver Saúde Pública*. 2000; 34(5): 499-505.
- 141-Carvalho DF, Paiva AA, Melo ASO, Ramos AT, Medeiros JS, Medeiros CCM, Cardoso MAA. Perfil lipídico e estado nutricional de adolescentes. *Rev Bras Epidemiol*. 2007;10(4): 491-8.
- 142-Rondinelli E, Neto RSM. Perspectivas futuras: o papel da genética na abordagem do indivíduo hipertenso. *Revista da Socerj*. 2003, 9: 81-87.
- 143-De Andrade FM. 1999. O Polimorfismo da Apolipoproteína E em Três Grupos Étnicos e suas influências sobre os níveis lipídicos e a Doença de Alzheimer. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 19-21.
- 144-Salazar LA, Hirata MH, Giannini SD et al. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. *Clin Chem Acta*. 2000; 300: 139-49.
- 145-Corbo RM, Vilaro T, Ruggeri M, Gemma AT, Scacchi R. Apolipoprotein E genotype and plasma levels in coronary artery disease: A case-control study in the Italian population. *Clin Biochem*. 1999; 32: 217–222.
- 146-Isbir T, Yilmaz H, Agachan B, Karaali ZE. Cholesterol Ester transfer protein, apolipoprotein E and lipoprotein lipase genotypes in patients with coronary artery disease in the Turkish population. *Clin Genet*. 2003; 64:228–234.

- 147-Baroni MG, Berni A, Romeo S, Arca M, Tesorio T, Sorropago G, Di Mario U, Galton DJ. Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. *BMC Med Genet.* 2003;4:8.
- 148-Bahri R, Esteban E, Moral P, Hassine M, Ben Hamda K, Chaabani H. Apolipoprotein gene polymorphisms and plasma levels in healthy Tunisians and patients with coronary artery disease. *Lipids Health Dis.* Nov 2008;17(7):46.
- 149-Ferreira CN, Carvalho MG, Fernandes AP, Lima LM, Loures-Valle AA, Dantas J, Janka Z, Palotás A, Sousa MO. Comparative study of apolipoprotein-E polymorphism and plasma lipid levels in dyslipidemic and asymptomatic subjects, and their implication in cardio/cerebro-vascular disorders. *Neurochem Int.* 2010;56(1):177-82.
- 150-Braeckman L, De Bacquer D, Rosseneu M, De Backer G. Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men: phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. *Atherosclerosis.* 1996;120(1-2): 67-73.
- 151-Hoshino T, Kamino K, Matsumoto M. Gene dose effect of the APOE-epsilon4 allele on plasma HDL cholesterol level in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* Jan-Feb 2002; 23(1): 41-5.
- 152-Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Current Opin Lipid.* 1999; 10: 207-17.
- 153-Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16: 1250-5.
- 154-Srinivasan SR, Ehnholm C, Elkasabany A, Berenson G. Influence of apolipoprotein E polymorphism on serum lipids and lipoprotein changes from childhood to adulthood the Bogalusa Heart study. *Atherosclerosis.* 1999;143:435-43.
- 155-Lala A, Scoppola A, Motti C, Cortese C, Caccese D, Menzinger G. Apolipoprotein E genotype and cholesterologenesis in polygenic hypercholesterolemia. *Metabolism.* 1998;47:97-100.
- 156-Septhemia B, Kamboh MI, Adams-Camppele LL, Bunker CH, Nwankwo M, Majumder PP et al. Genetic studies of human apolipoproteins . X. The effect of the apolipoprotein E polymorphism on quantitative levels of lipoproteins in Nigerian blacks. *Am J Hum Genet.* 1989;45:586-591.
- 157-Gerdes LU, Gerdes C, Hansen PS, Klausen IC, Færgeman O. Are men carrying the apolipoprotein E*4 or E*2 allele less fertile than E*3/E*3 genotypes? *Hum Genet.* 1996a;98:239-242.
- 158-Gerdes LU, Gerdes C, Hansen PS, Klausen IC, Færgeman O, Dyerberg J. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum Genet.* 1996b;98:546-550.

- 159-Muros M, Rodríguez-Ferrer C. Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing Apo E4. *Atherosclerosis*. 1996;121:13-21.
- 160-Valdez R, Stern MP, Howard BV, Haffner SM. Apolipoprotein E polymorphism and insulin levels in a biethnic population. *Diabetes Care*. 1995; 18:992-1000.
- 161-Bazzaz JT, Nazari M, Nazem H, Amiri P, Fakhrzadeh H, Heshmat R et al. Apolipoprotein E gene polymorphism and total serum cholesterol level in Iranian population. *J Postgrad Med*. Jul-Sep 2010;56(3):173-5.
- 162-Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretriz Brasileira de Hipertensão. *Rev Bras Hipert*. 2010; 13 (1): 4-63.
- 163-Santos MG, Pegoraro M, Sandrini F, Macuco EC. Fatores de Risco no Desenvolvimento da Aterosclerose na Infância e Adolescência. *Arq Bras Cardiol*. 2008; 90 (4): 301-8.
- 164-Al-Sendi AM, Shetty P, Musaiger AO, Myatt M. Relationship between body composition and blood pressure in Bahraini adolescents. *British Journal of Nutrition*. 2003; 90: 837–844.
- 165-Choong ML, Sethi SK, Koay ES. The StuI polymorphism on exon 8 of the low density lipoprotein (LDL) receptor gene: prevalence and impact on serum lipid levels in an Asian cohort. *Ann Acad Med Singapore*. 1998; 27(4):503–506.
- 166-Weiss N, Binder G, Keller C. Heterozygosity for the missense mutation Ala370→Thr in exon 8 of the low density lipoprotein receptor gene does not cause hypercholesterolemia. *Eur J Med Res*. 1998; 3(1–2):20–24.
- 167-Vieira JRS, Whittall RA, Cooper JA, Miller GJ, Humphries SE. The A370T Variant (StuI Polymorphism) in the LDL Receptor Gene is not associated with plasma lipid levels or cardiovascular risk in UK men. *Annals of Human Genetics*. 2006; 70:697–704.
- 168-Cumming AM, Robertson FW. Polymorphism at the apoprotein-E locus in relation to risk of coronary disease. *Clin Genet*. 1984;25: 310-313.
- 169-Bailleul S, Couderc R, Landais V, Lefevre G, Raichvarg D, Etienne JV. Direct phenotyping of human apolipoprotein E in plasma: application to population frequency distribution in Paris (France). *Hum Hered*. 1993 ;43:159–65.
- 170-James RW, Boemi MG, Giansanti R, Fumelli P, Pometta D. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arterioscler Thromb*. 1993;13: 1456–9.
- 171-Walden CC, Hegele RA. Apolipoprotein E in hiperlipidemia. *Ann Intern Med*. 1994; 120: 1026-1036.
- 172-Chanprasertyothin S, Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Piaseu N, Chailurkit LO, Puavilai G. Correlation of apolipoprotein E gene polymorphism to serum lipid concentrations in healthy Thais. *J Med Assoc Thai*. 2000; 83: 1233-1239.

- 173-Gamboa R, Hernandez-Pacheco G, Hesiquio R, Zuniga J, Masso F, Montano LF, et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum Biol.* 2000; 72: 975-981.
- 174-Thelma BK, Juyal RC, Dodge HH, Pandav R, Chandra V, Ganguli M. APOE polymorphism in a rural older population-based sample in India. *Hum Biol.* 2001; 73: 135-144.
- 175-Lucotte G, Loirau F, Hazout S. Pattern of gradient of apolipoprotein E allele *4 frequencies in Western Europe. *Hum. Biol.* 1997;69: 253-262.
- 176-Eto M, Watanabe K, Ishii K. A racial difference in apolipoprotein E allele frequencies between the Japanese and Caucasian populations. *Clin Genet.* 1986; 30: 422-427.