UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas
Área de Bioquímica

**Polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica:
Efeitos sobre a incidência de doença arterial coronária, lípidos
plasmáticos e sobre o metabolismo dos quilomícrons**

Katia Aparecida de Almeida

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo

2005

18275

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011175

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Almeida, Katia Aparecida de
A477p Polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica: efeitos sobre
a incidência de doença arterial coronária, lípidos plasmáticos
e sobre o metabolismo dos quilomícrons / Katia Aparecida
de Almeida. -- São Paulo, 2005.

110p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

1. Diagnóstico molecular : Medicina 2. Lipoproteína :
Metabolismo 3. DNA : Polimorfismo genético I. T. II. Maranhão,
Raul Cavalcante, orientador.

616.0756 CDD

Katia Aparecida de Almeida

**Polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica:
Efeitos sobre a incidência de doença arterial coronária, lípidos
plasmáticos e sobre o metabolismo dos quilomícrons**

**Comissão Julgadora
Da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Orientador/presidente**

Ana Campar
1º examinador

Antonio de Padua Mansur
2º examinador

Olivia M^{te} Guerra Rhinohara
3º examinador

Estela Maria Novak
4º examinador

São Paulo, 10/03 de 2005.

Dedico este trabalho à minha querida filha Gabriela e ao meu marido Germano por me fazerem lembrar, todos os dias, como é bom viver.

Agradeço pelo encorajamento e tolerância durante um longo período, pois este trabalho roubou parte do tempo que deveria ter sido dedicado a eles.

À DEUS, por iluminar sempre meu caminho.

Aos meus pais *Valério e Cida*, meus agradecimentos especiais, pois foram meus maiores incentivadores, fazendo-me perceber que meus estudos estavam à frente de tudo.

Aos meus familiares, *Sérgio, Edith, Eric, Rafael, Bruna, Fernando, Simone, Isabela, Emanuela, Sr. Germano, Sra Nair, Sidney, Mara, Vinícius, Simone e Cristiano*, que cada um a seu modo contribuiu para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, por ensinar-me não somente ciência pura, mas também a ciência da vida proporcionando o amadurecimento e despertando o senso crítico.

Ao Dr. Antonio de Pádua Mansur, Diretor da Unidade Clínica de Emergência do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela co-orientação, apoio, amizade e pelas valiosas observações feitas durante o exame de qualificação.

À Dra Célia Maria Strunz, Diretora do Laboratório Central do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela valiosa colaboração, apoio, amizade e boa vontade que sempre me dedicou.

À Dra Jaqueline Scholz Issa, Diretora do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela valiosa colaboração, apoio e amizade.

À Profa Dra Elvira Maria Guerra-Shinohara, do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, meu obrigado muito especial e minha gratidão eterna pela dedicação, compreensão, paciência, amizade e boa vontade que me dedicou, além das valiosas sugestões e correções feitas durante o exame de qualificação.

À Profa Dra Rosário Hirata, do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela compreensão, paciência, amizade e boa vontade que me dedicou nos momentos mais difíceis na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Carmen Vinagre do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sempre pronta e disposta a ajudar a todos, pela amizade e colaboração.

Ao Renato Barboza e à Débora Fernandes Deus, pela maneira sempre dedicada com que me atenderam sempre que havia necessidade de preparar a emulsão lipídica.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo agradável convívio diário.

À Profa Dra Anna Campa, do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela valiosa colaboração e observações feitas durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski Superintendente do Laboratório de hematologia molecular da Fundação Pró-Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração e acolhida em seu laboratório para realização dos experimentos de biologia molecular.

À Dra Adriana de Aguiar Debes-Bravo do Laboratório de hematologia molecular da Fundação Pró-Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelas sugestões na padronização das técnicas de biologia molecular.

As biomédicas Cristina de Lourdes Silva e Cardoso, Marilza Aparecida de Farias, Marli Rafael da Silva Cruz pelo auxílio na realização dos experimentos de biologia molecular e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de hematologia molecular da Fundação Pró-Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo agradável convívio diário. Em especial ao Antonio Carlos Magnanelli e Rosangela de Paula por sugestões referentes às análises estatísticas.

Ao estatístico Helymar Machado, por analisar os resultados obtidos neste trabalho e pelas sugestões.

A todos amigos de pós-graduação e funcionários do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo incentivo.

A Janete Matos de Almeida secretária do Laboratório Central do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela valiosa colaboração e amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela atenção e dedicação dispensada em todos os momentos que sempre me atenderam nas questões formais, durante o curso de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao senhor(a) assessor(a) da FAPESP pelas sugestões e correções realizadas durante a execução deste trabalho.

Aos pacientes, colaboradores desconhecidos, porém de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho, meu profundo agradecimento.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Existem dois alvos na vida: primeiro, conseguir: e o segundo, usufruir o que se desejou. Somente os mais sábios é que atingem o segundo.

LOGAN PEARSALL SMITH

SUMÁRIO

	Pg
LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE TABELAS EM ANEXOS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
RESUMO.....	V
SUMMARY.....	VI
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Metabolismo de lípides.....	2
1.2- Lipase lipoprotéica.....	9
2- OBJETIVOS.....	13
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1- Casuística.....	14
3.1.1- Critérios de inclusão e exclusão.....	15
3.2- Material.....	16
3.2.1- Reagentes e Equipamentos.....	16
3.2.2- Amostras biológicas.....	17
3.3- Métodos.....	17
3.3.1- Avaliação Laboratorial.....	17
3.3.2- Amostras biológicas.....	18
3.3.3- Avaliação eletroforética do DNA genômico.....	18
3.3.4- Determinação do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica.....	19
3.3.5- PCR-RFLP para o polimorfismo <i>LPL</i> C1595G.....	20
3.3.6- Análise do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G.....	22
3.3.7- Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP.....	24
3.3.8- Preparo dos quilomícrons artificiais.....	24
3.3.9- Avaliação da cinética plasmática dos quilomícrons.....	25
3.3.9.1- Análise compartimental da curva de decaimento plasmático da emulsão	25
3.3.9.2- Análise da cinética do éster de colesterol radioativo.....	27
3.3.9.3- Análise da cinética dos triglicérides radioativos.....	27
3.4- Análise estatística.....	29
4- RESULTADOS.....	30
4.1- Características gerais dos grupos controle e DAC.....	32
4.2- Análise dos lípides plasmáticos.....	32
4.3- Frequência dos genótipos do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G.....	35
4.4- Análise dos lípides plasmáticos de acordo com os genótipos do polimorfismo	
<i>LPL</i> C1595G.....	38
4.5- Análise de covariância dos genótipos e lípides plasmáticos.....	40
4.6- Análise do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G como fator protetor para DAC.....	42
4.7- Análise do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G sobre o metabolismo de quilomícrons.	48

5- DISCUSSÃO.....	53
6- CONCLUSÕES.....	58
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8- ANEXOS I – TABELAS.....	75
9- ANEXOS II- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..	92
10- ANEXOS III- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA HC-FM-USP.....	
11- ANEXOS IV- TRABALHO PUBLICADO NO PERÍODO.....	

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de covariância
Apo	apolipoproteína
Apo A-I	apolipoproteína A-I
Apo A-II	apolipoproteína A-II
Apo B-100	apolipoproteína B-100
Apo B-48	apolipoproteína B-48
Apo C-I	apolipoproteína C-I
Apo C-II	apolipoproteína C-II
Apo E	apolipoproteína E
pb	pares de base
C	citosina
CE	colesterol esterificado
CETP	proteína de transferência do colesterol esterificado
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronária
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio-padrão
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
G	guanina
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-c	colesterol da lipoproteína de alta densidade
HWE	equilíbrio de Hardy-Weinberg
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IMC	índice de massa corpórea
Kb	quilobases
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LPL	lipase lipoprotéica (ou lipoproteína lipase)
ML	mililitro
mmol	milimol
Mmol/L	milimol/litro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
PCR	reação da polimerase em cadeia
PBS	tampão fosfato salina
QM	quilomícrons
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
rpm	Rotações por minuto
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TE	Tampão tris-EDTA
Tg	triglicérides
U	unidades

µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
UV	ultravioleta
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa
V	volts
vs	versus

LISTA DE TABELAS

		Pg
TABELA 1	Iniciadores utilizados na reação de PCR para amplificação do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G.	20
TABELA 2	Risco relativo para DAC devido aos fatores de risco clássicos calculados por análise de regressão logística univariada.	34
TABELA 3	Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides nos grupos Controle e DAC.	36
TABELA 4	Risco relativo para DAC na população estudada devido a concentrações de lípides calculados por análise de regressão logística univariada.	37
TABELA 5	Distribuição dos genótipos e das frequências relativas dos alelos do polimorfismo S447X do gene <i>LPL</i> C1595G nos grupos Controle e DAC.	39
TABELA 6	Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides nos grupos controle e DAC de acordo com os genótipos do polimorfismo S447X do gene <i>LPL</i> C1595G.	41
TABELA 7	Análise de covariância dos genótipos e lípides plasmáticos, corrigida para os fatores de risco clássicos.	43
TABELA 8	Risco relativo para DAC devido influência de fatores de risco clássicos e genótipos do polimorfismo S447X calculados por análise de regressão logística multivariada.	45
TABELA 9	Risco relativo para DAC devido influência de fatores de risco clássicos e genótipos do polimorfismo S447X calculados por análise de regressão logística multivariada, sexo feminino.	46
TABELA 10	Risco relativo para DAC devido influência de fatores de risco clássicos e genótipos do polimorfismo S447X calculados por análise de regressão logística multivariada, sexo masculino.	47
TABELA 11	Características gerais dos indivíduos que realizaram a cinética de quilomicrons artificiais, segundo genótipo.	49
TABELA 12	Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides dos indivíduos que realizaram a cinética de quilomicrons.	50
TABELA 13	Distribuição das taxas fracionais de remoção dos triglicérides radioativos e do éster de colesterol radioativos segundo genótipos dos indivíduos que realizaram a cinética de quilomicrons.	52

LISTA DE TABELAS EM ANEXOS

	Pg
TABELA A1	Distribuição das frequências relativa e absoluta nos intervalos de idade, grupos Controle e DAC. 75
TABELA A2	Distribuição das frequências absolutas e relativas das raças, grupos Controle e DAC. 76
TABELA A3	Distribuição das frequências absolutas e relativas nos intervalos de IMC, grupos Controle e DAC. 77
TABELA A4	Distribuição das frequências absoluta e relativa de tabagismo, grupos Controle e DAC. 78
TABELA A5	Distribuição das frequências absoluta e relativa de hipertensão arterial sistêmica, grupos Controle e DAC. 79
TABELA A6	Distribuição das frequências absoluta e relativa de diabetes, grupos Controle e DAC. 80
TABELA A7	Distribuição das frequências absoluta e relativa de antecedentes familiares, grupos Controle e DAC. 81
TABELA A8	Risco relativo para DAC sexo feminino devido aos fatores de risco clássicos calculados por análise de regressão logística univariada. 82
TABELA A9	Risco relativo para DAC sexo masculino devido aos fatores de risco clássicos calculados por análise de regressão logística univariada. 83
TABELA A10	Distribuição das concentrações dos lípides plasmáticos dos grupos Controle e DAC segundo sexo. 84
TABELA A11	Risco relativo para DAC (feminino e masculino) devido as concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, LDL-c e HDL-c calculados por análise de regressão logística univariada. 85
TABELA A12	Distribuição dos genótipos do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G segundo raça nos grupos Controle e DAC. 86
TABELA A13	Distribuição dos genótipos do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G segundo raça nos grupos Controle e DAC sexo feminino. 87
TABELA A14	Distribuição dos genótipos do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G segundo raça nos grupos controle e DAC sexo masculino. 88
TABELA A15	Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides de acordo com os genótipos do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G nos grupos Controle e DAC do sexo feminino. 89
TABELA A16	Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides de acordo com os genótipos do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G nos grupos Controle e DAC do sexo masculino. 90
TABELA A17	Risco relativo para DAC devido os genótipos CG E GG do polimorfismo S447X do gene <i>LPL</i> C1595G calculados por análise de regressão logística univariada. 91

LISTA DE FIGURAS

	Pg
Figura 1 Modelo de PCR-RFLP utilizando a enzima <i>Mnl</i> I para a identificação do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G	21
Figura 2 Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, sob luz ultravioleta, dos produtos de digestão enzimática com <i>Mnl</i> I do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G. Indivíduo heterozigoto para o polimorfismo e genótipo CG (linhas 3 e 6); indivíduo sem polimorfismo e genótipo CC (linhas 4 e 5); indivíduos homozigoto para o polimorfismo e genótipo GG (linha 2); marcador de tamanho molecular de 100 pb (linha 1).	23
Figura 3 Modelo compartimental utilizado para demonstrar a cinética plasmática dos quilomícrons artificiais.	26
Figura 4 Curvas de decaimento dos triglicérides radioativos nos indivíduos com genótipo CC (preto) e nos indivíduos com genótipo CG (branco) do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G.	51
Figura 5 Curvas de decaimento do éster de colesterol radioativo nos indivíduos com genótipo CC (preto) e nos indivíduos com genótipo CG (branco) do polimorfismo <i>LPL</i> C1595G.	51

RESUMO

A lipase lipoprotéica é a principal enzima responsável pela hidrólise dos triglicérides das lipoproteínas ricas em triglicérides, os quilomícrons e VLDL. A frequência do polimorfismo S447X da lipase lipoproteica na população varia de 17 a 22% e está associado a menores concentrações plasmáticas de triglicérides e proteção contra doença arterial coronária (DAC). Os objetivos desse estudo foram avaliar os efeitos desse polimorfismo sobre os lípides plasmáticos em controles e em pacientes com DAC prematura e verificar o comportamento metabólico dos quilomícrons em indivíduos saudáveis portadores desse polimorfismo. Foram estudados 313 pacientes com DAC prematura e 150 indivíduos controle que foram genotipados para esse polimorfismo. Os lípides plasmáticos, colesterol total, frações e triglicérides foram determinados nesses pacientes. O metabolismo dos quilomícrons foi avaliado por uma injeção endovenosa de uma emulsão de quilomícrons artificiais com dupla marcação radioisotópica. A cinética plasmática dos triglicérides radioativos (^3H -Tg) avalia os mecanismos relacionados à lipólise: remoção da partícula parcialmente lipolisada e remoção dos ácidos graxos livres. A cinética plasmática do éster de colesterol radioativo (^{14}C -CE) avalia a remoção das partículas dos quilomícrons e remanescentes. O metabolismo dos quilomícrons artificiais foi avaliado em 12 pacientes normolipidêmicos que apresentaram o polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica e pareados com 13 indivíduos que não apresentavam esse polimorfismo e tinham a mesma idade e sexo. A frequência desse polimorfismo foi de 18% no grupo com DAC prematura e de 23% no grupo controle. No sexo masculino do grupo DAC a presença do polimorfismo foi associada a menores concentrações plasmáticas de triglicérides. As taxas fracionais de remoção do ^{14}C -CE da emulsão foram similares nos indivíduos com e sem o polimorfismo. Também não houve diferença nas taxas fracionais de remoção dos ^3H -Tg entre os indivíduos com e sem o polimorfismo. A presença do polimorfismo S447X não alterou o catabolismo intravascular dos quilomícrons avaliado pelo método de quilomícrons artificiais.

SUMMARY

Lipoprotein lipase catalyzes the hydrolysis of the triglycerides contained in both very-low-density lipoproteins and chylomicrons for storage in both hepatic and dietary origin fat adipose tissue and muscle. The S447X lipoprotein lipase is the most common polymorphism of the enzyme, affecting roughly 20% of the population and is accompanied by normal or diminished fasting triglycerides and perhaps lower incidence of coronary artery disease (CAD). Delay in the removal of chylomicron and remnant is now an established CAD risk factor. The objective of this study was to clarify whether the presence of this polymorphism is related to the plasma lipids profile and the presence of CAD. Total cholesterol and fractions and triglycerides were determined in two groups: 313 patients with premature (< 55 years old) CAD and in 150 control subjects without CAD. The chylomicron metabolism was evaluated in 12 normolipidemic subjects with the S447X and in 13 age and sex-paired control subjects without the mutation. The doubly labeled chylomicron-like emulsion method was used to evaluate chylomicron metabolism. The emulsions labeled with cholesteryl-oleate (^{14}C -CE) and triglycerides (^3H -Tg) were injected intravenously. The decay curves of the labels were then determined by blood sampling over 60 min followed by radioactive counting. The S447X polymorphism was present in 18% of CAD patients and in 23% the control subjects. There was no alteration in total cholesterol, fractions or triglycerides in the presence of this polymorphism. Male patients with CAD and with the polymorphism had lower triglycerides concentrations than male CAD patients without the polymorphism. There was no difference of the fractional clearance rate (FCR, min^{-1}) of the labels in the S447X carriers compared to the noncarriers. In the studied population, the S447X polymorphism showed no protection against premature CAD or although it was related with lower triglycerides in the male sex. The chylomicron intravascular lipolysis monitored by the (^3H -Tg) emulsion and the remnant removal monitored by the (^{14}C -CE) emulsion were not altered by the presence of this polymorphism of great populational impact.

1- INTRODUÇÃO

A doença arterial coronária (DAC) geralmente resulta da aterosclerose, processo que envolve o endotélio, células musculares lisas da parede dos vasos, plaquetas, lípidos entre outros fatores; sendo uma resposta às lesões por diversos agentes etiológicos que levam à formação do ateroma e placas fibrosas. Esse processo inicia-se na infância e tem progressão lenta e silenciosa levando décadas para apresentar as manifestações clínicas (MCGILL, 1963).

No Brasil os altos índices de DAC em idade precoce são semelhantes aos grandes centros dos países desenvolvidos, sendo este um dos maiores problemas atuais de saúde pública (LOTUFO *et al*, 1998).

A prevalência e a gravidade da doença varia entre indivíduos, grupos étnicos e também com a idade (CORRADO *et al*, 1988; SCHWARTZ *et al*, 1991; ROSS *et al*, 1993).

Os fatores que predis põem DAC são vários, destacando-se sexo masculino, idade, diabetes, hipertensão, tabagismo, sedentarismo, estresse, obesidade, dislipidemias e antecedentes familiares (BRUNNER *et al*, 1972; HULLEY *et al*, 1980; NORA *et al*, 1980; KANNEL *et al*, 1990).

No Brasil tem sido observada uma tendência de queda na mortalidade por DAC, devido a uma provável diminuição a exposição aos fatores de risco e uma melhora da sobrevivência dos indivíduos acometidos pela doença (MANSUR *et al*, 2001; LOTUFO & LOLLIO, 1994).

A dislipidemia é um dos fatores de risco mais prevalentes na população com DAC. Vários estudos epidemiológicos estabeleceram associações entre as dislipidemias e

aumento de risco para o desenvolvimento e complicações da DAC (KANNEL *et al*, 1971; CASTELLI *et al*, 1977; MARTIN *et al*, 1986).

1.1- Metabolismo de lípides

O transporte de lípidos na circulação sanguínea divide-se em dois sistemas principais, ambos tendo início com a síntese de lipoproteínas ricas em triglicérides. O sistema endógeno, que corresponde ao transporte de lípidos de origem hepática e tem início com a síntese hepática de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e o sistema exógeno, que constitui a via de transporte de lípidos de origem alimentar inicia-se com a síntese intestinal de quilomícrons.

O transporte endógeno inicia-se no fígado, com a produção de VLDL, cuja síntese é modulada por fatores hormonais assim como fatores dependentes do balanço energético e metabólico. A principal função da VLDL é o transporte de triglicérides e colesterol para os tecidos periféricos (PARACKARD, 1997).

Logo após sua secreção na circulação, a VLDL entra em contato com outras lipoproteínas e através de colisões com a lipoproteína de alta densidade (HDL), adquire da mesma as apolipoproteínas E e C-II. A Apo C-II é um cofator de ativação da lipase lipoprotéica (KRAUSS *et al*, 1973).

A ação da lipase lipoprotéica resulta na hidrólise dos triglicérides da VLDL, que se converte em uma partícula com menor diâmetro e maior densidade, a lipoproteína de densidade intermediária (IDL). Durante o catabolismo da VLDL, os componentes de superfície da lipoproteína em excesso, principalmente colesterol e fosfolípidos, são transferidos para a HDL, que interage com uma enzima plasmática, a lecitina colesterol acil

transferase (LCAT) que esterifica o colesterol com ácidos graxos originados de fosfolípidos (lecitina). Uma vez esterificado, o colesterol é transferido para a IDL, através da ação da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP). As partículas de IDL formadas a partir do catabolismo da VLDL podem seguir dois caminhos. As partículas de maior tamanho são removidas pelo fígado, através de um mecanismo de endocitose, por ligação tanto ao receptor específico de apo E (receptor E ou receptor de remanescentes), quanto ao receptor de apo B e E (receptor B/E ou receptor de LDL) e as partículas de menor tamanho podem ser removidas pelo fígado ou continuarem perdendo triglicérides e fosfolípidos através da ação da lipase hepática, enzima presente no endotélio dos capilares hepáticos e converte-se em LDL (BROWN & GOLDSTEIN, 1986).

A LDL tem como função fisiológica o transporte de colesterol necessário para a síntese de membranas de células em divisão e a síntese de hormônios esteróides no córtex supra-renal e gônadas. Em indivíduos normais a LDL transporta cerca de 70% do colesterol plasmático total. A captação e retirada ocorrem principalmente no fígado através de interação dessas partículas com receptores específicos de alta afinidade presentes na superfície das células nos tecidos hepáticos e extra-hepáticos que reconhecem a apo B-100 e apo E (BROWN & GOLDSTEIN, 1986).

Concentrações plasmáticas elevadas de colesterol de LDL (LDL-c) levam a um maior tempo de permanência da LDL no espaço subendotelial, o que pode aumentar a possibilidade da mesma sofrer modificações na sua composição lipídica ou protéica. Uma vez modificada, a LDL passa a não ser reconhecida por receptores específicos e é removida da circulação sanguínea através de receptores de varredura os “*scavengers*”, presentes em células do sistema retículo endotelial, como macrófagos. Estas células não possuem o mecanismo de retroalimentação negativa e tornam-se repletas de colesterol, convertendo-se

em células espumosas, cujo aparecimento é um dos eventos mais precoces no processo aterogênico.

A HDL é sintetizada principalmente no fígado e é uma lipoproteína que no plasma desempenha importante papel no transporte endógeno de lípidos. Essas partículas captam o excesso de colesterol livre das células dos tecidos periféricos e da superfície das lipoproteínas ricas em triglicérides, sendo convertidas a partículas menores as HDL₃. A HDL₃ é o substrato de eleição da enzima lecitina colesterol acil transferase (LCAT), que é sintetizada e secretada pelo fígado e é transportada na circulação sanguínea em associação com a HDL.

A HDL rica em colesterol esterificado é captada pelo fígado através de receptores celulares específicos que reconhecem a apo E (receptores B/E). A HDL também desempenha a importante função de doar apolipoproteínas para lipoproteínas ricas em triglicérides. Além da importante função no transporte reverso do colesterol, a HDL também está envolvida com proteção da função endotelial e mecanismos de proteção contra processos oxidativos de lipoproteínas.

A via exógena corresponde ao transporte de lípidos disponíveis para absorção no trato intestinal os quais são derivados da dieta ou de origem endógena, constituindo-se de fosfolípidos e colesterol de origem biliar e outras fontes como saliva e células de descamação, presentes no intestino. A partir destes lípidos inicia-se a síntese intestinal de quilomícrons.

Os quilomícrons são secretados na linfa mesentérica. O número, tamanho e composição dos quilomícrons dependem do aporte e da natureza dos lípidos absorvidos. Após a secreção na linfa, os quilomícrons perdem apo A-I, A-II e A-IV, as quais serão

incorporadas as HDL, preservando na partícula a Apo B-48 e recebendo apo E, C-II e C-III, provenientes do HDL e VLDL (HAVEL *et al*, 1973).

Nos capilares, os quilomícrons aderem aos sítios de ligação na superfície dos vasos, onde se encontra a lipase lipoprotéica, esta enzima é a responsável pela formação dos remanescentes de quilomícrons (MAHLEY *et al*, 1991), sendo inicialmente ativada pela apo C-II (La ROSA *et al*, 1970), a qual irá hidrolisar as partículas de triglicérides no centro dos quilomícrons, em monoglicerídios e ácidos graxos. Estes lipídios simples serão absorvidos pelas células de tecidos como o muscular e adiposo, onde serão reesterificados, e formarão novamente lipídios complexos como os triglicérides. Estes serão estocados no citoplasma das células, principalmente do tecido adiposo, para serem armazenados como reserva energética do organismo frente a jejuns prolongados (PATSCHE & GOTTO, 1995). A ligação entre os quilomícrons e a lipase lipoprotéica faz-se por intermédio da superfície de contacto e interação com as apolipoproteínas.

Zilversmith e colaboradores foram os primeiros a avaliar a possibilidade dos quilomícrons serem por si próprios aterogênicos. Pelo fato dos quilomícrons serem as lipoproteínas responsáveis pelo transporte do colesterol da dieta na circulação sanguínea e da primeira etapa de sua degradação ocorrer em contato com a lipase lipoprotéica no endotélio vascular (ZILVERSMITH, 1979).

Tanto o processo de lipólise de quilomícrons, como a captação hepática dos remanescentes podem estar envolvidos com a aterogênese (MARANHÃO *et al*, 1996; MEYER *et al*, 1996; WEINTRAUB *et al*, 1996). Nas lesões ateroscleróticas encontram-se lípidos extracelulares não associados com lipoproteínas. Os ácidos graxos são originados provavelmente do processo de lipólise de lipoproteínas ricas em triglicérides pela ação da lipase lipoprotéica. Vários trabalhos demonstram o papel aterogênico dos quilomícrons e

seus remanescentes e que essas lipoproteínas estão relacionadas com o desenvolvimento (PATSCHE *et al*, 1992) e com a progressão de DAC (KARPE *et al*, 1994). A duração e a magnitude da lipemia pós-prandial em pacientes hipertrigliceridêmicos é muito maior que em indivíduos normolipidêmicos, sugerindo que a exposição prolongada dos quilomícrons e seus remanescentes ao endotélio vascular pode ter um papel importante na incidência aumentada de DAC nesses pacientes (RASSIN *et al*, 1992). Na parede arterial os lípidos podem promover a expressão de fatores de crescimento e moléculas de adesão, assim como, causar alterações na ação vasodilatadora do óxido nítrico. Os remanescentes de quilomícrons são removidos rapidamente da circulação, principalmente pelo fígado, porém em deficiências metabólicas da apo E, receptor E ou lipase hepática, ocorre um acúmulo de remanescentes no plasma, os quais podem infiltrar a parede arterial. Os produtos da lipólise dos quilomícrons podem alterar a permeabilidade do endotélio arterial, o que pode facilitar a passagem de constituintes plasmáticos para o espaço subendotelial (PROCTOR & MAMO, 1996).

A avaliação do metabolismo de lipoproteínas normalmente é realizada através da determinação de seu conteúdo lipídico e/ou protéico. Entretanto, diversos fatores têm dificultado o estudo dos quilomícrons e seus remanescentes no homem. A remoção plasmática de quilomícrons é um processo complexo, afetado por vários fatores, que ocorre em um espaço de tempo muito pequeno. Esse fato torna difícil o estudo desse circuito metabólico.

A concentração plasmática dos quilomícrons depende muito da taxa de absorção lipídica intestinal que varia de indivíduo para indivíduo. Enquanto o processo de absorção dura horas os remanescentes são rapidamente removidos pelo fígado e seus lípidos

recirculam como parte das VLDL. Soma-se o fato de que os quilomícrons e remanescentes são de difícil separação, já que suas densidades se sobrepõem.

O metabolismo dos quilomícrons e remanescentes é avaliado por intermédio do estudo da ingestão de uma quantidade específica de gordura onde se determina a curva de aparecimento dos triglicérides no plasma (SCHNEEMAN *et al*, 1993), ou por cinética plasmática de vitamina A radioativa (HAZZARD & BIERMAN, 1976).

A reinjeção autóloga de quilomícrons extraídos da linfa intestinal tem sido utilizada para se retirar a influência do componente intestinal na avaliação do metabolismo dessas lipoproteínas (BEER E KERN, 1984). Entretanto, este procedimento é extremamente laborioso.

Estes testes sofrem interferência de uma série de fatores. A vitamina A é incorporada nos quilomícrons nascentes e pode servir como um marcador das partículas no plasma. A realização desses testes é extremamente trabalhosa e estes processos não representam somente o comportamento dos quilomícrons no plasma mas também espelha acúmulo de VLDL, pela competição com os quilomícrons, assim como recirculação dos lípides após a captação hepática. Além disso, a componente absorção intestinal varia muito de indivíduo para indivíduo, o que é um complicador a mais na interpretação desses dados.

Na década de 80 Redgrave e Maranhão (1985) desenvolveram emulsões desprovidas de proteínas que apresentam o componente lipídico similar ao dos quilomícrons (REDGRAVE & MARANHÃO, 1985; MARANHÃO *et al*, 1990). Essas emulsões artificiais são marcadas duplamente com ésteres de colesterol e triglicérides. Os triglicérides são removidos mais rapidamente do que o éster de colesterol devido a hidrólise que os primeiros sofrem pela lipase lipoprotéica. Os ésteres de colesterol são marcadores dos núcleos da emulsão avaliando os quilomícrons e seus remanescentes.

A emulsão quando injetada na circulação entra em contato com as lipoproteínas e recebe a apo CII e a Apo E, que permitem respectivamente lipólise pela lipase lipoprotéica e ligação com receptores hepáticos (MARANHÃO *et al*, 1990; NAKANDAKARE *et al*, 1994).

Estudos realizados em ratos mostraram que quando a emulsão é injetada endovenosamente apresenta um comportamento metabólico similar ao quilomícron natural (HIRATA *et al*, 1987). Outra demonstração da similaridade do metabolismo das emulsões artificiais e dos quilomícrons naturais foi mostrada em humanos, através da observação da cinética plasmática das emulsões artificiais ser mais lenta após uma refeição rica em gordura, o que sugere que ocorra uma competição das emulsões com os quilomícrons naturais (MARANHÃO *et al*, 1996).

A cinética das emulsões artificiais pode fornecer informações sobre diversos aspectos dinâmicos do metabolismo dos quilomícrons, como velocidade de remoção plasmática, função de receptores celulares, processo de lipólise, transferência de componentes lipídicos de superfície para outras lipoproteínas, ações enzimáticas diversas, destacando-se atividade da lipase lipoprotéica, da lecitina colesterol aciltransferase e da enzima de transferência de colesterol éster.

O modelo de emulsões artificiais, como estratégia para avaliação do metabolismo das lipoproteínas pós-prandiais, tem sido utilizado em diversas condições patológicas como hipertensão arterial maligna (BERNARDES-SILVA *et al*, 1995), DAC (MARANHÃO *et al*, 1996), lúpus eritematoso sistêmico (BORBA *et al*, 2000), em pacientes submetidos a transplante cardíaco (VINAGRE *et al*, 2000) e em mulheres obesas (OLIVEIRA & MARANHÃO, 2002).

1.2- Lipase lipoprotéica

A lipase lipoprotéica é uma glicoproteína sintetizada e secretada por células parenquimatosas de vários tecidos extra-hepáticos, principalmente músculo, tecido adiposo (QUINN *et al*, 1982) e células mesenquimais do coração (CHAJEK *et al*, 1978; STEIN *et al*, 1991). A lipase lipoprotéica é sintetizada de forma inativa e após ser glicosilada no aparato de Golgi torna-se cataliticamente ativa. Depois de secretada para o lúmen vascular, a enzima se liga à membrana basal das células endoteliais, através de interações iônicas com um proteoglicano, o sulfato de heparana (ECKEL, 1989).

A lipase lipoprotéica é a principal enzima responsável pela hidrólise dos triglicérides das lipoproteínas ricas em triglicérides, os quilomícrons e VLDL.

A lipase lipoprotéica converte quilomícrons em remanescentes e inicia o processo de conversão da VLDL em LDL. O processo de lipólise inicia-se quando os quilomícrons, nos capilares sanguíneos, interagem com a lipase lipoprotéica que provavelmente se dissocia das células endoteliais e continua a realizar a hidrólise dos triglicérides dos quilomícrons na circulação sanguínea (GOLDBERG, 1996).

A atividade da lipase lipoprotéica pode também regular os níveis plasmáticos do colesterol de HDL, através de pelo menos três mecanismos. O processo de lipólise das lipoproteínas ricas em triglicérides, mediado pela lipase lipoprotéica, lípidos e apolipoproteínas da superfície dessas lipoproteínas são transferidos para a HDL (ECKEL, 1989). Durante o catabolismo dos quilomícrons, o colesterol esterificado da HDL é transferido para as lipoproteínas ricas em triglicérides que em troca doam triglicérides a HDL. A quantidade de colesterol de HDL que é trocado por triglicérides é modulada pelos níveis de lipoproteínas ricas em triglicérides na circulação sanguínea. A lipase lipoprotéica

diminuindo a concentração plasmática de triglicérides, reduz também a transferência de colesterol esterificado da HDL para as lipoproteínas ricas em triglicérides, mediada pela enzima de transferência de colesterol éster (PATSCHE *et al*, 1998). Quando a lipase lipoprotéica encontra-se inibida, a HDL torna-se pobre em colesterol esterificado e rica em triglicérides, os quais podem ser rapidamente removidos através da ação da lipase hepática, resultando em partículas pobres em lípidos com uma taxa de remoção plasmática aumentada e baixos níveis plasmáticos de HDL-c.

Há quase 50 anos sabe-se que a injeção de heparina facilita a hidrólise dos triglicérides em humanos (ROBINSON & HARRIS, 1959). A heparina leva a liberação de duas enzimas-chaves no catabolismo das lipoproteínas, a lipase lipoprotéica e a lipase hepática (WEINTRAUB *et al*, 1994). A lipólise induzida por heparina tem sido usada para avaliar a influência da lipase lipoprotéica no metabolismo das lipoproteínas e no transporte reverso do colesterol.

Deficiência na atividade da lipase lipoprotéica no músculo e tecido adiposo diminui a hidrólise de triglicérides dos quilomícrons e pode levar a um aumento no retorno de triglicérides pós-prandiais para o fígado, o que pode estimular a produção hepática de lipoproteínas ricas em triglicérides (KARPE *et al*, 1993).

A baixa atividade da lipase lipoprotéica pode afetar as concentrações de lípidos plasmáticos causando hipertrigliceridemias isoladas ou mistas, leves ou graves (ASSMANN *et al*, 1991). Deste modo, mutações no gene da lipase lipoprotéica podem contribuir para o risco de DAC, através de seu impacto na concentração dos lípidos plasmáticos (STEIN & STEIN, 2003; HENDERSON *et al*, 1999).

Mais de 60 diferentes mutações do gene da lipase lipoprotéica foram descritas e como conseqüências dessas mutações a enzima pode deixar de ser produzida ou ter a sua

atividade reduzida resultando em concentrações aumentadas de triglicérides e diminuídas de HDL-c (MURTHY *et al*, 1996; WITTRUP *et al*, 1999).

O gene da lipase lipoprotéica (*LPL*) está localizado no cromossomo 8p22 (SPARKES *et al*, 1987) é composto por 10 exons, interrompido por 9 introns, com massa molecular de aproximadamente 30 Kb e codifica uma proteína com 475 aminoácidos (DEEB & PENG, 1989; OKA *et al*, 1990).

Várias mutações foram descritas no gene *LPL* Asp9Asn, Asn291Ser e S447X são as mais importantes devido a sua maior frequência e sua influência na susceptibilidade à aterosclerose (MURTHY *et al*, 1996; HOKANSON, 1997; HATA *et al*, 1990).

O polimorfismo S447X ocorre no exon 9 do gene *LPL* e é devido à substituição de C por um G na posição 1595 (STOCKS *et al*, 1992; PEACOCK *et al*, 1992) e conseqüentemente resulta na troca de uma serina por um códon de terminação, deletando os dois últimos aminoácidos, serina e glicina na posição 447 da proteína (HATA *et al*, 1990).

A frequência desse polimorfismo na população caucasiana varia de 17-22% (WITTRUP *et al*, 1999a; GROENEMEIJER *et al*, 1997; JEMAA *et al*, 1995).

Os estudos têm apresentado resultados diversos quanto relacionaram polimorfismo S447X com a atividade da lipase lipoprotéica. Essa atividade *in vitro*, tem sido descrita como muito aumentada (HENDERSON *et al*, 1999), aumentada (MIESENBOCK *et al*, 1993) ou ligeiramente diminuída (PREVIATO *et al*, 1994), mas na maioria dos estudos *in vitro* não estava alterada (SING *et al*, 1999; KNUDSEN *et al*, 1997).

Interessantemente, o polimorfismo S447X parece ser favorável no metabolismo das VLDL. Indivíduos portadores deste polimorfismo podem ter concentrações de triglicérides diminuídas quando comparados com não portadores (GAGNÉ *et al*, 1999; HENDERSON *et al*, 1999; KUIVENHOVEN *et al*, 1997; GROENEMEIJER *et al*, 1997; JEMAA *et al*,

1995) e modesta elevação nas concentrações de HDL-c (GROENEMEIJER *et al*, 1997; JEMAA *et al*, 1995). A hipertrigliceridemia associada aos baixos níveis de HDL constitui um fator de risco importante no desenvolvimento de DAC. O fato do polimorfismo S447X apresentar relação com concentrações diminuídas de triglicérides e concentrações aumentadas de HDL-c sugere um papel protetor no desenvolvimento de DAC. Por outro lado, o aspecto fisiopatológico importante do metabolismo dos triglicérides, o circuito de transporte dos quilomícrons, não havia sido avaliado na vigência do polimorfismo S447X.

2- OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

- Verificar o efeito do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica sobre os lípides plasmáticos de pacientes com DAC prematura e controles;
- Verificar o comportamento metabólico dos quilomícrons em indivíduos saudáveis portadores do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Casuística

Fizeram parte deste estudo 463 indivíduos atendidos de março de 2000 a setembro de 2004, no Instituto do Coração (InCor) do hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os participantes eram voluntários e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos II).

Este protocolo experimental foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética Médica do Instituto do Coração e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (protocolo de pesquisa nº 345/99) (Anexos III).

Foram estudados 150 indivíduos não aparentados, sem história pessoal de DAC e eram em sua maioria funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e 313 pacientes com idade menor ou igual a 55 anos, não aparentados com DAC prematura. Estes pacientes foram selecionados do ambulatório da Unidade Clínica de Doenças Coronárias do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foi aplicado um questionário a cada participante contendo as seguintes informações: idade, peso, altura, raça, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, antecedentes familiares e DAC.

O critério para definir a raça foi à referência do próprio paciente (IBGE). Para o tabagismo o conceito não, foi atribuído àqueles indivíduos que nunca tiveram o hábito de fumar; sim para aqueles que tinham o hábito de fumar mais de cinco cigarros por dia ou serem fumantes até um ano e ex-tabagistas aqueles que não fumavam a mais de um ano. Para a hipertensão o conceito não foi para aqueles que nunca haviam apresentado diagnóstico de hipertensão e o conceito sim para aqueles com diagnóstico prévio de hipertensão. Para a diabetes o conceito não foi para aqueles que nunca apresentaram concentração de glicose no sangue maior que 126 mg/dL após jejum noturno de 12 horas e sim para aqueles que tinham diagnóstico prévio de diabetes. Para antecedentes familiares o conceito não foi para aqueles que não tinham pais ou irmão com história de DAC e sim para aqueles que tinham pais e irmão com história de DAC com menos de 55 anos para os homens e menos de 65 anos para as mulheres.

3.1.1- Critérios de inclusão e exclusão

Para o grupo controle foram incluídos indivíduos de ambos os sexos com idade entre 18 e 55 anos, com avaliação clínica, cardiológica e eletrocardiograma de repouso e de esforço normal.

Para o grupo DAC foram incluídos pacientes de ambos os sexos com idade entre 18 e 55 anos, que tinham DAC documentada angiograficamente, e/ou infarto do miocárdio diagnosticado pela dor precordial e presença de alteração eletrocardiográfica.

Foram excluídos deste estudo portadores de doenças reumáticas, hepáticas, renais, endócrinas, neurológicas, clinicamente importantes e mulheres grávidas ou em idade reprodutiva sem o uso de métodos contraceptivos.

3.2- Material

3.2.1- Reagentes e Equipamentos

Cloreto de sódio, cloreto de amônio, bicarbonato de amônio, etanol absoluto, ácido clorídrico fumegante, ácido acético glacial, cloreto de potássio, azul de bromofenol, nitrato de prata, hidróxido de sódio, etanol P.A. e formaldeído foram adquiridos da Merck S.A. (Darmstadt, Alemanha); cloreto de magnésio, xilenocianol-FF e duodecil sulfato de sódio da Sigma Chemical Co (St. Lois, Estados Unidos); ácido bórico, glicerol, EDTA, Tris ultra puro, agarose ultra pura, enzima de restrição *Mnl* I e seu respectivo tampão de reação 10X, marcadores de tamanho molecular de DNA de 100bp, 1Kb, Taq DNA polimerase e seu respectivo tampão de reação 10X, soluções de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), brometo de etídeo, proteinase K e iniciadores foram adquiridos da Invitrogen do Brasil (São Paulo, Brasil). Os reagentes para determinação de colesterol, HDL-c e triglicérides da Roche Diagnostics (Somerville, Estados Unidos); trioleína, oleato de colestetrol, lecitina de ovo e colesterol da Sigma Chemical Co (St. Lois, Estados Unidos); ^{14}C éster de colesterol e ^3H trioleína da Amershan (Estados Unidos); heparina sódica da Roche (São Paulo, Brasil); filtros da Millipore (São Paulo, Brasil) e triton X-100 da Rohm & Haas (Estados Unidos).

A centrífuga de bancada modelo 5417R foi adquirida da Eppendorf (Estados Unidos). Os microtubos, as ponteiras e a cuba para eletroforese em gel de agarose foram adquiridos da Invitrogen (São Paulo, Brasil); as micropipetas da Gilson (Emeryville, Estados Unidos); o termociclador da Perkin-Elmer (Boston, Estados Unidos); equipamento automatizado Cobas-Integra 700 da Roche Diagnostics (Somerville, Estados Unidos); sistema de fotodocumentação Eagle Eye da Stratagene (Estados Unidos); disruptor celular

modelo B450 da Branson Ultrasonics Corp (Estados Unidos); rotor TR 641 e ultracentrifuga modelo OTD Comb da Sorvall (Estados Unidos); o contador Beta modelo Tri-Carb 2100TR Liquid Scintillation Analyzer da Packard (Estados Unidos) e espectrofotômetro modelo DU 7400 da Beckman (Estados Unidos).

3.2.2- Amostras biológicas

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa, após 12 horas de jejum. Para a avaliação laboratorial foram coletados 10 mL de sangue em tubo a vácuo sem anticoagulante e o soro foi separado por centrifugação durante 10 minutos a 2500 r.p.m.

Para a avaliação do polimorfismo *LPL* C1595G, foram coletados 5 mL de sangue total em tubo a vácuo contendo K₃EDTA.

3.3- Métodos

3.3.1- Avaliação laboratorial

As concentrações plasmáticas de colesterol total foram determinadas em equipamento automatizado Cobas-Integra 700, pelo método enzimático-colorimétrico (ALLAIN *et al*, 1974). A determinação do HDL-c foi obtida pelo mesmo método utilizado na determinação do colesterol, após precipitação das lipoproteínas que contêm apo B com solução composta de cloreto de magnésio e ácido fosfotungstico (BURSTEIN *et al*, 1970).

As concentrações plasmáticas dos triglicérides foram determinadas em equipamento automatizado Cobas-Integra 700, pelo método enzimático-colorimétrico (EKINDJIAN & DUCHASSAING, 1979).

O valor do LDL-c foi calculado através da fórmula de Friedewald e colaboradores (1972). $LDL-c = CT - (HDL-c + TG/5)$

3.3.2- Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado de sangue periférico segundo o método de Miller e colaboradores (1988). A lise de hemácias foi realizada por meio de uma mistura de cloreto de amônio 0,144 M e bicarbonato de amônio 0,01 M em quantidade igual ao volume de sangue. Após centrifugação os núcleos celulares foram lisados com 3,0 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 400 mM; Na₂EDTA 0,5 M pH 8,0; 200 µL de SDS 10%; 500 µL de tampão com proteinase K (10 µL de proteinase K; 50 µL SDS 10%; 2 µL de Na₂EDTA 0,5 M pH 8; 0,488 mL de água destilada). As proteínas foram removidas por precipitação salina com 1 mL de NaCl 6 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado, purificado por precipitação em etanol absoluto e ressuspenso com 100 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8) e mantido a -20°C.

3.3.3- Avaliação eletroforética do DNA genômico

A integridade das amostras de DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo (10mg/mL), em tampão TBE (Tris-HCl 0,45

mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM) (SAMBROOK *et al*, 1989). As amostras contendo 5 µL de DNA e 3 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol 30%) foram aplicadas no gel submerso no tampão TBE. A separação eletroforética foi realizada a 100V por 45 minutos e a visualização das bandas foi feita sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 1 Kb. A documentação dos resultados foi realizada utilizando o sistema Eagle Eye .

As quantificações e análises de pureza dos extratos de DNA foram determinadas em espectrofotômetro, pela leitura da densidade óptica em comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm em luz ultravioleta, após a diluição das amostras (1:100) em tampão TE (SAMBROOK *et al*, 1989).

3.3.4- Determinação do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica

Nos resultados o polimorfismo S447X foi apresentado com a nomenclatura do gene, ou seja, *LPL* C1595G. Esse polimorfismo foi analisado pela amplificação do DNA genômico, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida da técnica do polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP). Os iniciadores com as sequências oligonucleotídicas foram descrito por Groenemeijer e colaboradores (1997), e estão indicados na Tabela 1.

TABELA 1- Iniciadores utilizados na reação de PCR para amplificação do polimorfismo *LPL* C1595G.

Gene	Polimorfismo	Éxon	Iniciadores	Produto de PCR
<i>LPL</i>	C1595G	9	<i>Sense</i> 5'TACACTAGCAATGTCTAGGTGA3' <i>Anti-sense</i> 5'-TCAGCTTTAGCCCAGAATGC-3	488 pb

O DNA genômico foi aquecido a 56°C durante 20 minutos e 1 µg do mesmo foi amplificado nas seguintes condições de reação: tampão da Taq polimerase, 40 pmol de cada iniciador, 1 pmol de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µg de BSA, 1,5 µL de Cloreto de Magnésio 50 mM, 0,5 U Taq DNA polimerase e água esterilizada para volume final de 50 µL.

3.3.5- PCR-RFLP para o polimorfismo *LPL* C1595G

A reação de amplificação do fragmento de 488 pb, referente ao polimorfismo *LPL* C1595G, consistiu de uma etapa inicial de desnaturação à 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridação à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 30 segundos) e extensão final à 72°C por 7 minutos. A PCR foi realizada em termociclador automático. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE, durante 50 minutos a 100V. Este procedimento foi realizado para verificar a eficiência da amplificação, antes de tratar os produtos de PCR com a enzima de restrição.

Os produtos de PCR foram submetidos a digestão enzimática, empregando a enzima de restrição *Mnl* I, na concentração final de 10 U da enzima, 2,5 μ L de tampão da enzima concentrado 10 vezes, 20 μ L de produto de PCR, 0,25 μ L BSA (10mg/mL) e 1,65 μ L de água esterilizada para volume final de 25 μ L. Incubou-se por 18 horas a 37°C, para posterior análise dos fragmentos de restrição.

A genotipagem do polimorfismo *LPL* C1595G foi esquematizada na Figura 1.

Figura 1- Modelo de PCR-RFLP utilizando a enzima *Mnl* I para a identificação do polimorfismo *LPL* C1595G.

3.3.6- Análise do polimorfismo *LPL* C1595G

O produto de 488 pb amplificado pela reação da polimerase em cadeia foi submetido à restrição enzimática, utilizando a enzima *Mnl* I (Figura 2). Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e identificados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo. A separação eletroforética foi realizada sob corrente constante de 45mA por 3 horas. A migração das amostras foi comparada com a do marcador de tamanho molecular de DNA 100 pb. A visualização das bandas foi feita utilizando-se um transiluminador de luz ultravioleta. O gel foi analisado e documentado no sistema Eagle Eye. Após a separação eletroforética, pode-se observar a presença de fragmentos de diferentes tamanhos. Na presença do genótipo CG foram produzidos fragmentos de 288 pb, 250 pb, 200 pb e 38 pb (Figura 2, linhas 3 e 6). Para o genótipo CC foram observados os fragmentos 288 pb e 200 pb (Figura 2, linhas 4 e 5), e observaram-se os fragmentos 250 pb, 200 pb e 38 pb (Figura 2, linha 2) para o genótipo GG.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, sob luz ultravioleta, dos produtos de digestão enzimática com *Mnl* I do polimorfismo *LPL* C1595G. Indivíduo heterozigoto para o polimorfismo e genótipo CG (linhas 3 e 6); indivíduo sem polimorfismo e genótipo CC (linhas 4 e 5); indivíduo homozigoto para o polimorfismo e genótipo GG (linha 2); marcador de tamanho molecular de 100 pb (linha 1).

3.3.7- Controle de qualidade das reações de PCR-RFLP

As reações de PCR realizadas foram avaliadas por controle de qualidade dos reagentes utilizados na reação de PCR. O controle de reagentes consiste numa reação de amplificação onde são colocados todos os reagentes necessários para a reação exceto a amostra de DNA. Para avaliar a reprodutibilidade da reação de PCR, 10% das amostras foram repetidas.

A presença do sítio constitutivo nos produtos de PCR-RFLP (sítio de reconhecimento da enzima de restrição na sequência do produto de PCR) para o polimorfismo *LPL* C1595G nos permite verificar a atividade da enzima durante a reação de restrição, podendo ser utilizado como controle da reação de digestão enzimática.

3.3.8 - Preparo dos quilomícrons artificiais

As emulsões foram preparadas segundo o método de Maranhão e colaboradores (1996). A mistura de lípides (69% de trioleína, 6% oleato de colesterol, 23% lecitina de ovo e 2% colesterol) foi dissolvida em clorofórmio:metanol (2:1) adicionando-se, éster de colesterol radioativo ($EC^{14}C$) e triglicérides radioativos (Tg^3H). A mistura foi submetida à irradiação ultra-sônica, em 6 mL de solução de NaCl densidade 1,202 g/mL, pH 7,0 sob fluxo de nitrogênio. As emulsões foram purificadas por duas etapas de ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade 1,065 g/ml, 1,020 g/ml e 1,006 g/ml. Após centrifugação a camada do topo foi desprezada e o restante do volume foi submetido a ultracentrifugação. Foram aspirados 3,0 mL do sobrenadante, imediatamente esterilizadas, através de passagem em filtro com porosidade de 0,22 μm de diâmetro e armazenadas em

frascos estéreis. Todo o procedimento de preparo de emulsão foi realizado em condições estéreis e apirogênicas.

3.3.9- Avaliação da cinética plasmática dos quilomícrons

Os participantes que estavam em jejum de 12 horas foram submetidos a cateterização endovenosa para coleta de amostra de sangue destinada à determinação de concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicérides.

Após a coleta acima mencionada, foram injetados, utilizando-se a mesma veia, cerca de 100 μL de emulsão, contendo 148 kBq (4 μCi) de Tg^3H e 74 kBq (2 μCi) de EC^{14}C . Através de outra punção venosa, foram colhidas amostras de sangue (6,0 mL) em tubos de ensaio contendo 50 μL de heparina, em intervalos de tempo pré-estabelecidos (2, 4, 6, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos), mantendo-se a cateterização venosa com soro fisiológico 0,9%. Após centrifugação alíquotas de 1 mL de plasma foram pipetadas em frascos de cintilação e acrescentados 7 mL de solução cintiladora PPO/POPOP/tritonX-100/tolueno para a determinação da radioatividade presente nas amostras, utilizando-se um contador Beta. As contagens obtidas foram utilizadas para as determinações das curvas de decaimento plasmático.

3.3.9.1- Análise compartimental da curva de decaimento plasmático da emulsão

No modelo utilizado (Figura 3), a cinética da emulsão foi avaliada através das avaliações isoladas das remoções plasmáticas de seus componentes lipídicos radioativos,

pelo fato dos mesmos apresentarem cinéticas diferentes. Assim como no metabolismo dos quilomícrons naturais, os triglicérides da emulsão são hidrolizados durante o metabolismo, enquanto que o éster de colesterol permanece no interior da partícula até a captação da mesma pelo fígado.

Figura 3- Modelo compartimental utilizado para demonstrar a cinética plasmática dos quilomícrons artificiais.

3.3.9.2- Análise da cinética do éster de colesterol radioativo

A curva de remoção plasmática do éster de colesterol radioativo reflete a cinética do colesterol esterificado e apresenta um perfil biexponencial com um rápido decaimento inicial seguido de outro mais lento. Esse perfil levou à adoção de um modelo com dois compartimentos que representam o colesterol esterificado dos quilomícrons artificiais no espaço intravascular, tal como foi injetado (compartimento 1) ou na partícula remanescente, resultante do processo de lipólise (compartimento 2).

- o compartimento 1 representa quando a emulsão marcada com $EC^{14}C$ é introduzida no espaço intravascular;

- o $k_{1,0}$ representa a fração da emulsão que é retirada do compartimento plasmático através de via não específica;

- o $k_{1,2}$ representa a fração da emulsão que sofre a ação da lipase lipoprotéica, perdendo triglicérides e se transformando em uma partícula menor, o remanescente de quilomícron, o qual é representado pelo compartimento 2;

- o compartimento 2 representa o remanescente de quilomícron, resultante da ação lipolítica;

- o $k_{2,0}$ representa a fração de remanescente de quilomícron que é removida do compartimento plasmático, através de captação principalmente hepática.

3.3.9.3- Análise da cinética dos triglicérides radioativos

A curva de remoção plasmática dos triglicérides radioativos representa a cinética das moléculas de triglicérides. Embora essa curva apresente as mesmas características da

curva de remoção do $EC^{14}C$, o seu decaimento é mais rápido devido à ação da lipase lipoprotéica. A cinética do Tg^3H é representada por três compartimentos: os triglicérides na partícula, tal como foi injetada na circulação sanguínea (compartimento 3), as partículas remanescentes (compartimento 4) e os ácidos graxos livres, derivados da hidrólise dos triglicérides (compartimento 5).

- o compartimento nº 3 representa quando a emulsão marcada Tg^3H é injetada na circulação sanguínea;
- o $k_{3,0}$ representa a fração da emulsão que é removida do compartimento plasmático através de via não específica;
- o $k_{3,4}$ representa a fração da emulsão que sofre a ação da lipase lipoprotéica, perde triglicérides se transforma no remanescente de quilomícron;
- o compartimento nº 4 representa o remanescente de quilomícron;
- o $k_{3,5}$ representa a fração de ácidos graxos livres formada a partir da hidrólise dos triglicérides, pela ação da lipase lipoprotéica sobre os quilomícrons;
- o $k_{4,5}$ representa a fração de ácidos graxos livres formada a partir da hidrólise dos triglicérides, pela ação da lipase lipoprotéica sobre os quilomícrons;
- o $k_{4,0}$ representa a fração de remanescente captada principalmente pelo fígado.
- o $k_{5,0}$ representa o desaparecimento dos ácidos graxos livres do compartimento extravascular.

Para representar a remoção das partículas foram utilizadas taxas fracionais de remoção (TFR), dos lípides marcados, calculados pela média ponderada das respectivas taxas fracionais de transferência (k)

A análise compartimental proposta por Redgrave and Zech (1987) para o estudo de cinéticas de emulsões foi modificado por Mesquita, 1994 e nossa análise compartimental foi realizada pelo programa AnaComp versão 4.1 (MESQUITA, 1994).

3.3.9.4- Ausência de risco

A dose radiológica injetada foi avaliada de acordo com as normas da "International Commission on Radiological Protection" (ICRP) (SOWBY, 1984). O parâmetro "Annual Limit for Intake" (ALI) de radionuclídeo é definido como a quantidade de radioisótopo que induz a uma dose equivalente de 50 mSv. Para componentes orgânicos marcados com ^{14}C ou ^3H , os valores de ALI são 9×10^7 e 3×10^9 Bq, respectivamente. No presente estudo, a dose injetada de ^{14}C foi de $22,2 \times 10^4$ Bq, o que equivale a: $(22,2 \times 10^4 \text{ Bq} / 9 \times 10^7 \text{ Bq}) \times 50\text{mSv} = 0,1233\text{mSv}$. Para o ^3H , a dose injetada foi de $44,4 \times 10^4$ Bq, portanto a dose equivalente: $(44,4 \times 10^4 \text{ Bq} / 3 \times 10^9 \text{ Bq}) \times 50 \text{ mSv} = 0,0075 \text{ mSv}$.

A dose equivalente incorporada no corpo inteiro em consequência da exposição aos lípides radioativos foi estimada em 0,04 mSv, conforme avaliado pelo método MIRD - Medical Internal Radiological Dosimetry (SMITH, 1977). Os dados descritos para ratos pesando 0,4 kg foram ajustados para seres humanos, estimando-se um peso médio de 70 kg, utilizando-se um fator de correção com a equação seguinte:

$$K_{\text{homem}} = K_{\text{rato}} \times (70\text{kg}/0,4\text{kg})^{1-x}$$

O valor exponencial X representa uma escala de variações interespecies da farmacocinética, levando em consideração o tempo biológico de cada espécie, que varia de 0,65 a 0,95. Considerando o valor de $X=0,86$, estima para os seres humanos um nível plasmático total de 204 mg/dL e uma excreção diária de colesterol de 1250 mg/dia

(BOXENBAUM & RONFELD, 1983). Esse valor está dentro da média descrita em avaliações laboratoriais desses parâmetros em seres humanos (MARANHÃO & QUINTÃO, 1983).

O método acima descrito permite estimar que os participantes deste estudo receberam por dose injetada de éster de colesterol ^{14}C , 0,26 mGy no intestino grosso inferior, 0,5 mGy no intestino grosso superior, 0,18 mGy na pele, 0,13 mGy na superfície dos ossos e 0,13 mGy no fígado. A dose recebida pelos pulmões, coração, ovários ou testículos é desprezível. Em conformidade com as normas de proteção radiológica (Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1988), este valor é muito inferior ao máximo permitido. A dose de radiação induzida pela injeção dos radioisótopos é menor que a obtida com a maioria dos procedimentos radiológicos, sendo cerca de 10 vezes menor que a dose induzida por uma radiografia de crânio (ALTMAN & DITTMER, 1974).

3.4- Análise estatística

Para avaliar as variáveis contínuas utilizamos a análise descritiva. Para as variáveis categóricas utilizamos tabelas de frequência. Os valores com distribuições assimétricas e grandes variabilidades foram submetidos à transformação logarítmica ($\log_{10}$) para posterior aplicação da análise estatística.

Foi utilizado o teste do qui-quadrado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) nos grupos estudados (controle e DAC). Os teste de qui-quadrado e o exato de Fisher foram aplicados para analisar a frequência dos genótipos do polimorfismo estudado nos diferentes grupos étnicos.

Para avaliar o efeito do polimorfismo na variação dos valores dos parâmetros bioquímicos analisados foi utilizado o teste *t* de Student para comparar variáveis com 2 categorias.

A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para analisar a influência das variáveis: idade, tabagismo, diabetes, hipertensão e antecedentes familiares sobre os valores de lípides nos genótipos CC versus CG+GG.

A regressão logística multivariada foi utilizada para analisar a influência dos fatores de risco para DAC e foram utilizadas as seguintes variáveis independentes, idade >40 anos, IMC >25 Kg/m², ser tabagista, ter hipertensão arterial sistêmica, ter diabetes, ter antecedentes familiares, ter concentrações de triglicérides >200 mg/dL, de colesterol total >238 mg/dL, de LDL-c >169 mg/dL e HDL-c <40mg/dL. Os valores de referência são sugeridos pelas diretrizes brasileiras de cardiologia de 2001. A DAC foi a variável dependente

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *SAS for Windows* (*Statistical Analysis System*), versão 6.12. SAS Institute Inc, 1989-1996, Cary, NC, USA.

4- RESULTADOS

4.1- Características gerais dos grupos controle e DAC

O grupo controle apresentou menor frequência de pacientes com idade igual ou superior a 40 anos que o grupo DAC (48 vs 75; $p<0,001$).

A distribuição das raças foi diferente no grupo DAC, houve maior frequência de pacientes negras (32%) no sexo feminino e maior frequência de pacientes brancos (79%) no sexo masculino ($p=0,020$).

Os pacientes do grupo DAC do sexo masculino apresentaram maior frequência de IMC=25-30 Kg/m² e IMC>30 Kg/m² que as pacientes do sexo feminino do mesmo grupo ($p=0,046$).

Os pacientes do grupo DAC apresentaram maior frequência de tabagismo ($p<0,001$), hipertensão ($p<0,001$), diabetes ($p<0,001$) e antecedentes familiares ($p<0,001$) quando comparados aos controles, tanto no sexo feminino como no masculino.

Os fatores de risco clássicos de desenvolvimento da doença foram analisados como variáveis independentes e seu risco relativo para DAC foi calculado pela análise de regressão univariada.

A Tabela 2 mostra que o risco relativo para DAC foi de 2,08 ($p<0,001$) para pacientes do sexo masculino, risco de 9,05 ($p<0,001$) para idade maior que 40 anos, risco de 1,90 ($p=0,018$) para IMC >30 kg/m², risco de 9,02 ($p<0,001$) para tabagismo e risco de 2,55 ($p<0,001$) para antecedentes familiares. A raça não apresentou risco para DAC.

Os fatores de risco hipertensão e diabetes foram variáveis com alto poder de discriminação devido a apenas 2 casos de hipertensão entre os controles e nenhum caso de diabetes, resultando numa razão de risco super estimada.

Os sexos feminino e masculino foram analisados separadamente devido à incidência de DAC ser diferente entre eles. Para o sexo feminino o risco relativo para DAC foi de 11,53 ($p<0,001$) para idade maior que 40 anos o risco, risco de 6,14 ($p<0,001$) para tabagismo e risco de 2,09 ($p=0,008$) para antecedentes familiares. A raça e o IMC não apresentaram risco para DAC.

Para o sexo masculino o risco relativo para DAC foi de 9,21 ($p<0,001$) para idade maior que 40 anos o risco, risco de 6,42 ($p<0,001$) para tabagismo e risco de 3,43 ($p<0,001$) para antecedentes familiares. A raça e o IMC não apresentaram risco para DAC.

Os dados destas afirmações estão expostos nas tabelas em anexos.

TABELA 2- Risco relativo para DAC devido aos fatores de risco clássicos calculados por análise de regressão logística univariada.

Variável independente			OR	IC 95%OR	<i>p</i>
Sexo	Feminino		1,00	---	
	Masculino		2,08	1,40-3,10	<0,001
Idade	≤30 anos		1,00	---	
	31-39 anos		4,64	2,24-9,62	<0,001
	≥40 anos		9,05	4,65-17,61	<0,001
Raça	Branca		1,00	---	
	Negra		0,79	0,51-1,21	0,280
IMC	<25 Kg/m ²		1,00	---	
	25-30 Kg/m ²		1,50	0,97-2,33	0,071
	>30 Kg/m ²		1,90	1,12-3,21	0,018
Tabagismo	Não		1,00	---	
	Sim		9,02	4,26-19,06	<0,001
	Ex-tabagista		5,29	3,32-8,42	<0,001
Hipertensão arterial sistêmica	Não		1,00	---	
	Sim		89,11	21,69-366,05	<0,001
Diabetes	Não		1,00	---	
	Sim		8,48	3,02-23,82	<0,001
Antecedentes familiares	Não		1,00	---	
	Sim		2,55	1,71-3,80	<0,001

OR (*Odds Ratio*)= risco relativo para DAC; IC 95% OR= intervalo de 95% de confiança para o risco relativo.
DAC=doença arterial coronária.

4.2- Análise dos lípides plasmáticos

As concentrações médias de triglicérides, colesterol total e LDL-c foram maiores no grupo DAC quando comparadas às concentrações médias apresentadas no grupo controle. A concentração média de HDL-c foi mais alta no grupo controle (Tabela 3).

As concentrações de triglicérides, colesterol total, LDL-c e HDL-c foram analisadas como variáveis independentes e seu risco relativo para DAC foi calculado pela análise de regressão univariada.

A Tabela 4 mostra que o risco relativo para DAC foi de 14,73 ($p<0,001$) para concentração >200 mg/dL de triglicérides, risco de 15,71 ($p<0,001$) para concentração >238 mg/dL de colesterol total, risco de 12,30 ($p<0,001$) para concentração >169 mg/dL de LDL-c e risco de 3,15 ($p<0,001$) para concentração < 40 mg/dL de HDL-c.

Para o sexo feminino o risco relativo para DAC foi de 18,95 ($p=0,004$) para concentração >200 mg/dL de triglicérides, risco de 23,11 ($p=0,002$) para concentração >238 mg/dL de colesterol total, risco de 17,15 ($p=0,006$) para concentração >169 mg/dL de LDL-c e risco de 2,22 ($p=0,022$) para concentração < 40 mg/dL de HDL-c.

Para o sexo masculino o risco relativo para DAC foi de 11,07 ($p<0,001$) para concentração >200 mg/dL de triglicérides, risco de 10,68 ($p=0,001$) para concentração >238 mg/dL de colesterol total, risco de 8,62 ($p=0,004$) para concentração >169 mg/dL de LDL-c e risco de 3,22 ($p<0,001$) para concentração < 40 mg/dL de HDL-c.

Os dados destas afirmações estão expostos nas tabelas em anexos.

TABELA 3- Distribuição das concentrações plasmáticas de lípidos nos grupos Controle e DAC.

LÍPIDES mg/dL	Controle Média ± DP n=150	DAC Média ± DP n=313	Teste <i>t</i> de Student <i>p</i>
Triglicérides	100 ± 44 (36-200)	175 ± 122 (42-997)	<0,001
Colesterol total	184 ± 36 (103-239)	212 ± 54 (76-594)	<0,001
LDL-c	119 ± 30 (36-175)	137 ± 45 (36-345)	0,003
HDL-c	48 ± 11 (30-83)	41 ± 11 (14-75)	<0,001

Variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$); n=número de indivíduos; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade, DP=desvio padrão; DAC=doença arterial coronária.

TABELA 4- Risco relativo para DAC na população de estudo devido a concentrações de lípidos calculados por análise de regressão logística univariada.

Variável independente	Concentrações de lípidos	OR	IC 95%OR	p
Triglicérides	≤200 mg/dL	1,00	---	
	>200 mg/dL	14,73	5,30-40,98	<0,001
Colesterol Total	≤238 mg/dL	1,00	---	
	>238 mg/dL	15,71	4,87-50,72	<0,001
LDL-c	≤169 mg/dL	1,00	---	
	>169 mg/dL	12,30	3,79-39,89	<0,001
HDL-c	>40 mg/dL			
	≤ 40 mg/dL	3,15	2,05-4,86	<0,001

DAC=doença arterial coronária. OR (*Odds Ratio*)= razão de risco para DAC; IC 95% OR= intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade.

4.3- Frequência dos genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G

A frequência do polimorfismo no grupo controle foi de 24% e no grupo DAC foi de 18%. A frequência do alelo G no grupo controle foi de 0,12 e no grupo DAC foi de 0,10.

Não houve diferença entre as frequências dos genótipos entre os grupos controle e DAC (masculino e feminino). Também não houve diferença entre as frequências dos genótipos no grupo controle (feminino vs masculino) e no grupo DAC (feminino vs masculino).

A distribuição dos genótipos (CC, CG e GG) no grupo controle (sexo feminino e masculino) e grupo DAC sexo masculino estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Porém, as distribuições genotípicas do grupo DAC total e do grupo DAC sexo feminino não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg como mostra a Tabela 5.

Não houve diferença na distribuição dos genótipos entre as raças branca e negra nos grupos controle e DAC.

Para o sexo feminino o genótipo CC apresentou maior frequência na raça negra no grupo DAC e os genótipos CG+GG apresentaram maior frequência na raça branca no grupo DAC.

Para o sexo masculino as frequências de genótipos foram similares entre as raças tanto do grupo controle como no grupo DAC.

Os dados destas afirmações estão expostos nas tabelas em anexos.

TABELA 5- Distribuição dos genótipos e das frequências relativas dos alelos do polimorfismo *LPL* C1595G nos grupos Controle e DAC.

<i>LPL</i> C1595G	Controle n (%)	DAC n (%)
Total		
CC	115 (76)	257 (82)
CG	34 (23)	47 (15)
GG	1 (1)	9 (3)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Frequência relativa dos alelos		
Alelo C	0,88	0,90
Alelo G	0,12	0,10
Feminino		
CC	69 (77)	109 (83)
CG	20 (22)	17 (13)
GG	1 (1)	5 (4)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Frequência relativa dos alelos		
Alelo C	0,88	0,89
Alelo G	0,12	0,11
Masculino		
CC	46 (77)	148 (81)
CG	14 (23)	30 (17)
GG	0 (0)	4 (2)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Frequência relativa dos alelos		
Alelo C	0,88	0,90
Alelo G	0,12	0,10

* Devido à baixa frequência alguns testes foram realizados agrupando CG com GG.

Teste de Fisher: sexo feminino (Controle vs DAC) (CC vs CG vs GG) $p = 0,140$; sexo masculino (Controle vs DAC) (CC vs CG vs GG) $p = 0,321$. Teste Qui-quadrado: sexo feminino (Controle vs DAC) (CC vs CG+GG) $p = 0,228$; sexo masculino (Controle vs DAC) (CC vs CG+GG) $p = 0,433$; controle (sexo feminino vs masculino) (CC vs CG+GG) $p = 1,0$; DAC (sexo feminino vs masculino) (CC vs CG+GG) $p = 0,667$; DAC (sexo feminino vs masculino) (CC vs CG vs GG) $p = 0,509$. DAC=doença arterial coronária.

4.4- Análise das concentrações plasmáticas de lípides de acordo com os genótipos do polimorfismo *LPL C1595G*

Não houve diferença nas concentrações médias de triglicérides, colesterol total , LDL-c e HDL quando comparados os diferentes genótipos nos grupos controle e DAC (Tabela 6).

Para o sexo feminino não houve diferença nas concentrações médias de triglicérides, colesterol total , LDL-c e HDL quando comparados os diferentes genótipos nos grupos controle e DAC.

Para o sexo masculino não houve diferença nas concentrações médias de colesterol total , LDL-c e HDL quando comparados os diferentes genótipos no grupo controle. Entretanto, os pacientes do grupo DAC com genótipos CG+GG apresentaram concentrações médias de triglicérides menores quando comparadas às concentrações médias de triglicérides dos pacientes com genótipo CC (156 ± 92 vs 214 ± 147 mg/dL; $p=0,010$).

Os genótipos foram analisados como variáveis independentes por análise de regressão univariada e os genótipos CG + GG não foram considerados como um fator de proteção para DAC, população total (OR=1,40; $p=0,169$), sexo feminino (OR=1,51; $p=0,229$) e sexo masculino (OR=1,33; $p=0,434$).

Os dados destas afirmações estão expostos nas tabelas em anexos.

TABELA 6- Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides nos grupos controle e DAC de acordo com os genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G.

LÍPIDES (mg/dL)	CC Média ± DP	CG+GG Média ± DP	Teste <i>t</i> de Student
Controle	n=115	n=35	<i>p</i>
Triglicérides	102 ± 44 (37-200)	93 ± 44 (36-200)	0,204
Colesterol total	186 ± 36 (103-239)	179 ± 31 (119-231)	0,465
LDL-c	121 ± 31 (36-175)	111 ± 26 (56-164)	0,162
HDL-c	48 ± 10 (31-83)	49 ± 12 (30-75)	0,672
DAC	n=257	n=56	
Triglicérides	180 ± 127 (42-997)	153 ± 91 (46-480)	0,114
Colesterol total	211 ± 54 (76-594)	214 ± 52 (138-358)	0,666
LDL-c	136 ± 45 (35-345)	143 ± 47 (65-284)	0,272
HDL-c	41 ± 11 (14-75)	41 ± 11 (23-70)	0,640

Variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$). n=número de indivíduos; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade. DAC=doença arterial coronária.

4.5 Análise de covariância dos genótipos e lípides plasmáticos

Sabendo que o genótipo CG/GG está relacionado aos menores valores de triglicérides para o sexo masculino no grupo DAC e que não houve diferença entre os valores de triglicérides para o sexo feminino no grupo controle e DAC e para o sexo masculino no grupo controle analisamos possíveis influências das variáveis como idade, tabagismo, diabetes, hipertensão e antecedentes familiares nas concentrações dos lípides plasmáticos, usando a análise de covariância (ANCOVA).

As concentrações de lípides plasmáticos foram similares entre os genótipos CC, CG+GG quando os fatores de risco clássicos para DAC foram desconsiderados para os grupos controle (sexo feminino e masculino) e grupo DAC (sexo feminino). Porém, os resultados apresentados na Tabela 7 confirmam que houve diferença significativa na concentração de triglicérides plasmáticos quando comparados genótipos CC com genótipos CG+GG no pacientes do sexo masculino do grupo DAC, quando as análises foram corrigidas para os fatores de risco clássicos (idade, tabagismo, diabetes, hipertensão e antecedentes familiares).

TABELA 7- Análise de covariância dos genótipos e lípides plasmáticos, corrigida para os fatores de risco clássicos.

Grupos	Genótipos	Lípides*	<i>p</i>
Controle	CC	Triglicérides	0,748
	vs	Colesterol total	0,423
	CG+GG	LDL-c	0,994
		HDL-c	0,319
Controle sexo feminino	CC	Triglicérides	0,661
	vs	Colesterol total	0,340
		LDL-c	0,452
	CG+GG	HDL-c	0,328
Controle sexo masculino	CC	Triglicérides	0,300
	vs	Colesterol total	0,864
		LDL-c	0,801
	CG+GG	HDL-c	0,654
DAC	CC	Triglicérides	0,204
	vs	Colesterol total	0,326
		LDL-c	0,125
	CG+GG	HDL-c	0,563
DAC sexo feminino	CC	Triglicérides	0,634
	vs	Colesterol total	0,463
		LDL-c	0,840
	CG+GG	HDL-c	0,362
DAC sexo masculino	CC	Triglicérides	0,030
	vs	Colesterol total	0,606
		LDL-c	0,113
	CG+GG	HDL-c	0,755

* variáveis transformadas em logaritmo (log10) LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade. DAC=doença arterial coronária.

4.6- Análise do polimorfismo C1595G como fator protetor para DAC

A análise de regressão logística multivariada foi realizada para analisar a influência dos fatores de risco e obter o risco relativo dos genótipos na presença de DAC.

Os fatores de risco que foram incluídos nesta análise foram triglicérides, colesterol total, LDL-c, HDL-c, genótipos, tabagismo, idade e antecedentes familiares. Foram excluídos os fatores de risco hipertensão e diabetes por serem variáveis que devido à baixa frequência no grupo controle resultaram num risco relativo superestimado. As variáveis raça e IMC foram excluídas por não discriminaram DAC dos controles.

Pelos resultados apresentados na Tabela 8 observamos que as variáveis selecionadas pela análise de regressão logística multivariada como possíveis candidatas a fator prognóstico foram: idade (OR=9,05; $p<0,001$); tabagismo (OR=9,02; $p<0,001$); antecedentes familiares (OR=2,27; $p<0,001$); triglicérides (OR=8,06; $p<0,001$); colesterol total (OR=5,38; $p=0,003$); e HDL-c (OR=2,58; $p<0,001$). A presença dos genótipos CG e GG do polimorfismo *LPL* C1595G não foi considerado como um fator protetor para DAC.

Os resultados apresentados na Tabela 9 indicam que para o sexo feminino, as variáveis selecionadas pela análise de regressão logística multivariada como possíveis candidatas a fator prognóstico foram: idade (OR=11,53; $p<0,001$); tabagismo (OR=6,86; $p<0,001$) e triglicérides (OR=11,14; $p<0,023$). A presença dos genótipos CG e GG do polimorfismo *LPL* C1595G não foi considerado como um fator protetor para DAC sexo feminino.

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam que para o sexo masculino, as variáveis selecionadas pela análise de regressão logística multivariada como possíveis candidatas a fator prognóstico foram: idade (OR=9,21; $p<0,001$); tabagismo (OR=13,48; $p<0,001$); triglicérides (OR=7,43; $p=0,003$) e HDL-c (OR=3,21; $p=0,001$). A presença dos genótipos CG e GG do polimorfismo *LPL* C1595G não foi considerado como um fator protetor para DAC sexo masculino.

TABELA 8- Risco relativo para DAC devido influência de fatores de risco clássicos e genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G calculados por análise de regressão logística multivariada

Variável		OR	IC 95% OR	p
Idade	≤30 anos	1,00	---	
	31-39 anos	4,64	2,24-9,62	<0,001
	≥40 anos	9,05	4,65-17,61	<0,001
Tabagismo	Não	1,00	---	
	Sim	9,02	4,26-19,06	<0,001
	Ex-tabagista	5,29	3,32-8,42	<0,001
Antecedentes	Não	1,00	----	----
Familiares	Sim	2,27	1,45-3,55	<0,001
Genótipos	CG+GG	1,00	----	----
	CC	1,58	0,91-2,73	0,105
Triglicérides	<200 mg/dL	1,00	----	----
	≥200 mg/dL	8,06	2,76-23,56	<0,001
Colesterol total	<238 mg/dL	1,00	----	----
	≥238 mg/dL	5,38	1,18-24,61	0,003
LDL-c	<169 mg/dL	1,00	----	----
	≥ 169 mg/dL	3,38	0,73-15,76	0,121
HDL-c	>40 mg/dL	1,00	----	----
	≤40 mg/dL	2,58	1,59-4,18	<0,001

OR (Odds Ratio)= razão de risco para DAC (n=150 Controles e n=313 DAC); IC 95% OR=intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. IMC=índice de massa corpórea; AF=antecedentes familiares; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade. DAC=doença arterial coronária.

TABELA 9- Risco relativo para DAC devido influência de fatores de risco clássicos e genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G calculados por análise de regressão logística multivariada, sexo feminino.

Variável		OR	IC 95% OR	p
Idade	≤30 anos	1,00	---	
	31-39 anos	5,94	1,77-19,85	0,004
	≥40 anos	11,53	3,74-35,49	<0,001
Tabagismo	Não	1,00	---	
	Sim	6,86	2,29-20,53	<0,001
	Ex-tabagista	3,29	1,42-7,59	0,005
Antecedentes	Não	1,00	----	----
Familiares	Sim	1,65	0,91-3,01	0,100
Genótipos	CG+GG	1,00	----	----
	CC	1,80	0,84-3,88	0,132
Triglicérides	<200 mg/dL	1,00	----	----
	≥200 mg/dL	11,14	1,39-89,22	0,023
Colesterol total	<238 mg/dL	1,00	----	----
	≥238 mg/dL	6,69	0,60-74,79	0,123
LDL-c	<169 mg/dL	1,00	----	----
	≥ 169 mg/dL	4,75	0,40-56,10	0,216
HDL-c	>40 mg/dL	1,00	----	----
	≤40 mg/dL			

OR (Odds Ratio)= razão de risco para DAC (n=150 Controles e n=313 DAC); IC 95% OR=intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. IMC=índice de massa corpórea; AF=antecedentes familiares; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade. DAC=doença arterial coronária.

TABELA 10- Risco relativo para DAC devido influência de fatores de risco clássicos e genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G calculados por análise de regressão logística multivariada, sexo masculino.

Variável	Níveis da Variável	OR	IC 95% OR	p
Idade	≤30 anos	1,00	---	---
	31-39 anos	4,39	1,67-11,55	0,003
	≥40 anos	9,21	3,82-22,20	<0,001
Tabagismo	Não	1,00	---	---
	Sim	13,48	2,77-65,61	0,001
	Ex-tabagista	4,34	1,96-9,63	<0,001
Antecedentes	Não	1,00	----	----
Familiares	Sim	1,65	0,91-3,01	0,100
Genótipos	CG+GG	1,00	----	----
	CC	1,44	0,64-3,27	0,381
Triglicérides	<200 mg/dL	1,00	----	----
	≥200 mg/dL	7,43	2,01-27,54	0,003
Colesterol total	<238 mg/dL	1,00	----	----
	≥238 mg/dL	4,63	0,60-35,66	0,141
LDL-c	<169 mg/dL	1,00	----	----
	≥ 169 mg/dL	2,79	0,36-21,52	0,325
HDL-c	>40 mg/dL	1,00	----	----
	≤40 mg/dL	3,21	1,60-6,43	0,001

OR (Odds Ratio)= risco relativo para DAC (n=90 Controles e n=131 DAC); IC 95% OR=intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. IMC= índice de massa corpórea; AF=antecedentes familiares; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade. DAC=doença arterial coronária.

4.7- Análise do polimorfismo *LPL* C1595G sobre o metabolismo de quilomícrons

Para a avaliação do metabolismo de quilomícrons foram selecionados 25 indivíduos do grupo controle, sendo 13 indivíduos com genótipo CC e 12 indivíduos com genótipo CG do polimorfismo do gene *LPL* C1595G. Nesta seleção todos eram da raça branca e foram considerados sexo, idade, IMC e perfil lipídico semelhantes.

Não houve diferença entre as variáveis sexo, idade, raça, IMC, tabagismo, hipertensão, diabetes e antecedentes familiares entre os grupos (genótipo CC vs CG) selecionados para cinética de quilomicrons (Tabela 11).

A Tabela 12 mostra que os lípides plasmáticos foram similares entre os grupos (genótipo CC vs CG).

A Figura 4 mostra que a curva de decaimento dos triglicérides radioativos foi similar entre os grupos (genótipo CC vs CG).

A curva de decaimento do éster de colesterol radioativo também foi semelhante entre os grupos (genótipo CC vs CG), com demonstra a Figura 5.

A Tabela 13 mostra que as taxas fracionais de remoção dos triglicérides e do éster de colesterol foram similares entre os grupos (genótipo CC vs CG).

TABELA 11- Características gerais dos indivíduos que realizaram a cinética de quilomícrons artificiais, segundo genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G.

Variáveis	Frequência n		Média ± DP		p
	CC	CG	CC	CG	
Sexo					
Feminino	7	7			0,695
Masculino	6	5			
Idade (anos)			33 ± 8	36 ± 9	0,516
Raça					
Branca	13	12			
IMC (kg/m²)			25 ± 5	24 ± 3	0,554
Tabagismo					
Não	10	10			0,668
Sim	3	2			
Hipertensão arterial sistêmica					
Não	13	12			
Sim	0	0			
Diabetes					
Não	13	12			
Sim	0	0			
Antecedentes familiares					
Não	7	7			0,821
Sim	6	5			

n=números de indivíduos; IMC=índice de massa corpórea; DP=desvio padrão.

TABELA 12- Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides dos indivíduos que realizaram a cinética de quilomícrons de acordo com os genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G.

Lípides (mg/dL)	CC Média ± DP n=13	CG Média ± DP n=12	Teste <i>t</i> de Student
Triglicérides	92 ± 37 (37-200)	87 ± 31 (36-200)	0,760
Colesterol total	182 ± 27 (103-239)	175 ± 41 (119-231)	0,636
LDL-c	115 ± 28 (36-175)	111 ± 38 (56-164)	0,783
HDL-c	49 ± 8 (31-83)	47 ± 5 (30-75)	0,552

Variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$); n=número de indivíduos; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade, DP=desvio padrão.

FIGURA 4- Curvas de decaimento dos triglicérides radioativos nos indivíduos com genótipo CC (preto) e nos indivíduos com genótipo CG (branco) do polimorfismo *LPL* C1595G.

FIGURA 5- Curvas de decaimento do éster de colesterol radioativo nos indivíduos com genótipo CC (preto) e nos indivíduos com genótipo CG (branco) do polimorfismo *LPL* C1595G.

TABELA 13- Distribuição das taxas fracionais de remoção dos triglicérides radioativos e do éster de colesterol radioativos segundo genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G.

Taxa fracional de remoção	CC Média ± DP n=13	GG Média ± DP n=12	Teste <i>t</i> de Student
Tg ³ H (min ⁻¹)	0,0033 ± 0,017	0,0029 ± 0,009	0,568
EC ¹⁴ C (min ⁻¹)	0,0095 ± 0,0069	0,0013 ± 0,0050	0,245

Tg³H=triglicérides radioativos; EC¹⁴C=éster de colesterol radioativo. DP=desvio padrão.

5- DISCUSSÃO

A ação da lipase lipoprotéica constitui-se no evento central do processo de catabolismo das lipoproteínas na circulação plasmática. Ao catalisar a hidrólise dos triglicérides das VLDL e do quilomícrons, a lipase lipoprotéica passa a ser a principal determinante da concentração no plasma não só das VLDL e dos quilomícrons mas também dos remanescentes dessas lipoproteínas e das HDL. No caso dessa última, o acúmulo de VLDL decorrente da ação diminuída da enzima resulta em transferência do colesterol da HDL para as VLDL pela ação das proteínas de transferência. Daí, o "efeito gangorra," onde o aumento da trigliceridemia leva à diminuição do colesterol de HDL e vice-versa. Portanto, polimorfismos ou mutações que afetem esta enzima podem influenciar a concentração plasmática e o metabolismo de todas as lipoproteínas, gerando fatores de risco para DAC.

O presente trabalho constitui-se no primeiro relato da frequência do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica em pacientes com DAC prematura na população brasileira, caracterizada por intensa miscigenação racial.

Neste trabalho a frequência do polimorfismo S447X foi de 23% na raça branca. Essa frequência foi similar as reportadas anteriormente em populações caucasianas da Europa, Austrália e América do Norte (WITTRUP *et al*, 1999; BOCKXMEER *et al*, 2001; SING *et al*, 1999). Em nosso estudo a frequência desse polimorfismo foi similar entre as raças branca e negra. A raça amarela não foi avaliada devido a apenas 3 casos na população estudada. Apesar das concentrações menores de triglicérides, concentrações maiores de HDL-c e menor mortalidade por DAC na raça negra quando comparada à raça branca esse polimorfismo apresentou frequências similares entre as raças (HALL *et al*, 2000).

A frequência desse polimorfismo em pacientes com DAC foi de 18%, similar às descritas em populações caucasianas com DAC (WITTRUP *et al*, 1999; BOCKXMEER *et al*, 2001; SING *et al*, 1999). Por outro lado, pacientes caucasianos do sexo masculino e hipertrigliceridêmicos apresentaram uma frequência de 10 % (STOCKS *et al*, 1992; PEACOCK *et al*, 1992) e pacientes chineses hipertrigliceridêmicos apresentaram frequência de 9% (HATA *et al*, 1990). As diferentes frequências encontradas podem estar relacionadas ao fator racial das populações e aos critérios de inclusão usados para definir os indivíduos controles.

Neste estudo analisamos os efeitos do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica sobre os lípides plasmáticos em pacientes com DAC prematura.

Dados epidemiológicos mostram que a incidência de DAC difere entre os sexos feminino e masculino, este fato pode ser devido à exposição aos fatores de risco envolvidos e a diferenças hormonais. Neste estudo analisamos sexos feminino e masculino separadamente.

No sexo feminino a presença do polimorfismo S447X não teve efeito sobre as concentrações plasmáticas de lípides, resultados similares foram descritos na população europeia (GAGNÉ *et al*, 1999; WITTRUP *et al*, 2000; WITTRUP *et al*, 2002.).

No sexo masculino a presença desse polimorfismo no grupo DAC foi associada a menores concentrações plasmáticas dos triglicérides quando comparada com as concentrações plasmáticas dos pacientes com DAC sem o polimorfismo. Resultados similares foram descritos na população europeia caucasiana do sexo masculino com DAC (JEMAA *et al*, 1995; ZHANG *et al*, 1995; GROENEMEIJER *et al*, 1997; GAGNE *et al*, 1999; WITTRUP *et al*, 2000). Por outro lado, a presença deste polimorfismo não alterou as concentrações plasmáticas de triglicérides (SING *et al*, 1999; KNUDSEN *et al*, 1997).

O polimorfismo S447X ocorre na região C terminal da lipase lipoprotéica que é uma região onde ocorrem as ligações entre receptores da lipase lipoprotéica e lipoproteínas. A deleção dos dois últimos aminoácidos podem potencializar este modo de ação, aumentando a retirada dos triglicérides dos quilomícrons e VLDL, resultando na redução dos triglicérides (LOOKENE *et al*, 2000; WITTRUP *et al*, 2002). Entretanto, o modo de ação exato não está completamente esclarecido.

A associação entre sexo masculino, diminuição na concentração de triglicérides e polimorfismo S447X, não é facilmente explicada. Algumas explicações podem ser encontradas nas diferentes regulações hormonais dos processos metabólicos nas mulheres e nos homens. Em homens concentrações diminuídas de testosterona estão associadas com diminuição da atividade da lipase lipoprotéica (BREIER *et al*, 1985) e em homens com hipogonadismo a reposição da testosterona está associada a um aumento na atividade da lipase lipoprotéica (SORVA *et al*, 1988). Por outro lado, o estrógeno diminui a atividade da lipase lipoprotéica (IVERIUS *et al*, 1988) pela desregulação na transcrição do gene (HOMMA *et al*, 2000) ou devido a uma possível modificação pós-transcricional da proteína (PRICE *et al*, 1998).

A análise de regressão multivariada é um procedimento estatístico que seleciona dentre um conjunto de variáveis aquelas que possivelmente tenham uma ação independente sobre determinada doença. Nossos resultados mostraram que a presença do polimorfismo S447X não foi considerada como um fator de proteção independente para DAC sexo feminino. Esse polimorfismo também não foi considerado um fator de proteção no sexo feminino em populações europeias (WITTRUP *et al*, 2002; GAGNÉ *et al*, 1999).

Para o sexo masculino, a presença do polimorfismo S447X não foi considerada como um fator de proteção independente para DAC o que está de acordo com resultados

anteriores (MATTU *et al*, 1994; SASS *et al*, 1998). Outros estudos mostraram que em populações européias do sexo masculino, a presença do polimorfismo S447X foi considerada como um fator de proteção para DAC (WITTRUP *et al*, 2002; WITTRUP *et al*, 2000; GAGNÉ *et al*, 1999; JEMAA *et al*, 1995; MATTU *et al*, 1994). Os efeitos protetores ou anti-aterogênicos podem ser parciais e independentes dos efeitos sobre os lípides plasmáticos (GAGNÉ *et al*, 1999; PEACOCK *et al*, 1992). Entretanto, esse polimorfismo pode conferir proteção contra DAC principalmente nos homens (CLEE *et al*, 2001; GAGNÉ *et al*, 1999; HUMPHRIES *et al*, 1998; PEACOCK *et al*, 1994; STOCKS *et al*, 1992).

Neste estudo também mostramos que o polimorfismo S447X não alterou o catabolismo intravascular dos quilomícrons avaliado pelo método de emulsões de quilomícrons artificiais.

A análise da cinética do catabolismo intravascular dos quilomícrons artificiais oferece uma avaliação de alta resolução do metabolismo intravascular das partículas ricas em triglicérides. A cinética dos triglicérides radioativos avalia os mecanismos relacionados à lipólise, remoção da partícula parcialmente lipolisada e remoção dos ácidos graxos livres. A cinética do éster de colesterol radioativo avalia a remoção das partículas de quilomícrons e remanescentes (MARANHÃO *et al*, 1986). O uso de emulsões artificiais avalia especificamente a remoção dos quilomícrons do compartimento plasmático, evitando processos complexos como a digestão e absorção de lípides (MARANHÃO *et al* 1996; REDGRAVE *et al*, 1993). Por outro lado, outras metodologias utilizadas em alguns estudos apresentaram a desvantagem de não controlar a digestão e absorção de lípides, como testes de ingestão de gordura (SCHNEEMAN *et al*, 1993), avaliados por cinética plasmática do retinil palmitato após a ingestão de gordura suplementada com vitamina A (COHN *et al*,

1993), avaliados por cinética de lípidos marcados com radioisótopos ingeridos com a gordura (DUBOIS *et al*, 1996) e avaliados por cinética de quilomícrons autólogos colhidos após a ingestão de gordura enriquecida com retinil palmitato e injetados endovenosamente (BEER & KERN, 1984).

Estudos utilizando o método de quilomícrons artificiais demonstraram que o metabolismo de quilomícrons estava alterado em pacientes com DAC (MARANHÃO *et al*, 1996), hipertensão arterial sistêmica (BERNARDES-SILVA *et al*, 1995); lúpus eritematoso sistêmico (BORBA *et al*, 2000); em pacientes submetidos a transplante cardíaco (VINAGRE *et al*, 2000) e em pacientes obesas (OLIVEIRA & MARANHÃO, 2002).

A literatura mostra resultados divergentes nos efeitos do polimorfismo S447X na atividade da lipase lipoprotéica. A atividade da enzima pós heparina determinada "*in vitro*" foi similar (FAUSTINELLA *et al*, 1991), menor (KOBAYASHI *et al*, 1992) e maior (KOZAKI *et al*, 1993; GROENEMEIJER *et al*, 1997) quando comparada com os não portadores do polimorfismo.

Entretanto, existe uma fraca correlação entre a atividade da lipase lipoprotéica pós heparina e concentrações de triglicérides das VLDL ($r = -0,3$, $p < 0,05$) (TORVALL *et al*, 1995). Nesse contexto, também observamos uma fraca associação entre atividade da lipase lipoprotéica pós heparina e taxa fracional de remoção dos triglicérides em indivíduos normolipidêmicos ($r = -0,34$; $p = 0,0026$) (SANTOS, 1999).

Embora quilomícrons e VLDL compartilhem a mesma via metabólica, pela lipase lipoprotéica, o catabolismo mais lento de quilomícrons não implica necessariamente um aumento das concentrações plasmáticas de VLDL (MARANHÃO *et al*, 1996). Portanto, a cinética de quilomícrons artificiais e a concentração de triglicérides em jejum são parâmetros independentes.

6- CONCLUSÕES

- O polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica está relacionado com diminuição das concentrações de triglicérides nos pacientes do sexo masculino com DAC, não havendo essa relação com o sexo feminino.
- A presença do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica não foi associada com a presença ou ausência de DAC.
- A presença do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica não foi associada a alterações no metabolismo de quilomícrons, tanto a lipólise intravascular dos quilomícrons quanto a remoção plasmática dos seus remanescentes.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzimatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.**, Winston Salen, v.20, p.470-475, 1974.

ARAI, T.; TSUKADA, T.; OKUBO, M.; MURASE, T.; MATSUMOTO, K. Ser447Stop mutation of the lipoprotein lipase gene occurs at a higher frequency in Japanese subjects with normal triglycerides levels than in hypertriglyceridemic patients **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.147, p.417-420, 1999.

ASSMANN, G.; BETTERIDGE, D.J.; GOTTO Jr., A.M.; STEINER, J. Management of hypertiglyceridemic patients: treatment classifications and goals. **Am. J. Cardiol.**, Philadelphia, v.68, p.30A-34A, 1991.

ALTMAN, P. L. & DITTMER, D.S. **Biology Data Book**. Federation of the American Societies for experimental biology, vol.III. Bethesda. MD 183, 1974.

BERNARDES-SILVA, H.; TOFFOLETTO, O.; BORTOLOTTI, L.A.; LATRILHA, M.C.M.; KRIEGER, E.M.; PILEGGI, F.; MARANHÃO, R.C. Malignant hypertension is accompanied by marked alterations in chylomicron metabolism. **Hypertension**, Hagerstown, v.26, p.1207-1210, 1995.

BERR, F.; KERN, F. Plasma clearance of chylomicrons labeled with retynil palmitate in health human subjects. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.38, p.301-314, 1984.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- BOCKXMEER, F.M.; LIU, Q.; MAMOTTE, C.; BURKE, V.; TAYLOR, R. Lipoprotein lipase D9N, N291S and S447X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.157, p.123-129, 2001.
- BORBA, E.F.; BONFA, E.; VINAGRE, C.G.C.; RAMIRES, J.A.F.; MARANHÃO, R.C. Chylomicron metabolism is markedly altered in systemic lupus erythematosus. **Arthritis. Rheum.**, v.43, p.1033-1040, 2000.
- BOXENBAUM, H.; RONFELD, R. Interspecies pharmacokinetic scaling and the Dedrick plots. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p.r768, 1983.
- BREIER, C.; MUHLBERGER, V.; DREXEL, H.; HEROLD, M.; LISCH, H.J.; KNAPP, E.; BRAUNSTEINER, H. Essential role of post-heparin lipoprotein lipase activity and of plasma testosterone in coronary artery disease. **Lancet**, v.1, p. 1242-1244, 1985.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, Washington, v.232, p.34-47, 1986.
- BROWN, M.S.; KOVANEN, P.T.; GOLDSTEIN, J.L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. **Science**, Washington, v.212, p.628-635, 1981.
- BRUNNER, H.R.; LARAGH, J.H.; BAER, L.; NEWTON, M.A.; GOODWIN, F.T.; KRAKOFF, L.R.; BARD, R.H.; BUHLER, F.R. Essential hypertension: Renin and aldosterone, heart attack and stroke. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.286, p.441-449, 1972.
- BURSTEIN, M.; SCHOLNICK, H.R.; MORFIN, R. Rapid method for the isolation of lipoprotein from human plasma serum by precipitation with polyanions. **J. Lipid Res.**, New York, v.11, n.6, p.583-595, 1970.

- CASTELLI, W.P.; DOYLE, J.T.; GORDON, T.; HAMES, G.G.; HJOTRLAND, M.C.; HULLEY, S.B.; KAGAN, A.; ZUKEL, W.J. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease: the Cooperative lipoprotein phenotyping study. **Circulation**, Hagerstown, v.55, p.767-772, 1977.
- CARR, M.C.; AYYOBI, A.F.; MURDOCH, S.J.; DEEB, S.S.; BRUNZELL, J.C. Contribution of hepatic lipase, lipoprotein lipase, and cholesteryl ester transfer protein to LDL and HDL heterogeneity in healthy women. **Arterioscler., Tromb., Vasc. Biol.**, Dallas, v.22, p.667-673, 2002.
- CHAJEK, T.; STEIN, O.; STEIN, Y. Lipoprotein lipase of cultured mesenchymal rat heart cell. I. Synthesis, secretion and releasability by heparin. **Biochim. Biophys Acta**, v.528, p.456-465, 1978.
- COHN, J.S.; JOHNSON, E.J.; MILLAR, J.S.; COHN, S.D.; MILNE, R.W.; MARCEL, Y.L.; RUSSEL, R.M.; SCHAEFER, E.J. Contribution of apo B 48 and apo B 100 triglycerides rich lipoproteins (TRL) to postprandial increases in the plasma concentration of TRL triglycerides and retinyl esters. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.34, p.2033-2040, 1993.
- DEEB, S.S.; PENG, R. Struture of the human lipoprotein lipase gene. **Biochemistry**, Columbus, v.28, p.4131-4135, 1989.
- III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.77 (supl.III), p.4-8, 2001.
- DUBOIS, C.; ARMAND, M.; FERZOU, J.; BEGUMIER, G.; PORTUGAL, H.; PAILI, A.M.; BERNARD, P.M.; BECUE, T.; LAJONT, H.; LAIRON, D. Postprandial appearance of dietary deuterated cholesterol in the chylomicron fraction and whole plasma in healthy subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.64, p.47-52, 1996.

- ECKEL, R.H. Lipoprotein lipase: a multifunctional enzima relevant to common metabolic diseases. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.320, p.1060-1068, 1989.
- EKINDJIAN, O.G.; DUCHASSAING, D. Critical study of methods of estimation by an enzymatic method of serum triglycerides. **Ann. Biol. Clin.**, London, v.37, n.3, p.175-180, 1979.
- FAUSTINELLA, F.; CHANG, A.; BIERVLIET, J.P.; ROSSENEU, M.; VINAÏMONT, N.; SMITH, L.C.; CHEN, S.; CHAN, L. Catalytic triad residue mutation (Asp156→Gly) causing familial lipoprotein lipase deficiency. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.266, p.14418-14424, 1991.
- FISHER, R.M.; HUMPHRIES S.E.; TALMUD, P.J. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.135, p.145-159, 1997.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifugation. **Clin. Chem.**, Wiston Salem, v.18, p.499-509, 1972.
- GAGNÉ, S.E., LARSON, M.G.; PIMSTONE, S.N.; SCHAEFER, E.J.; KASTELIEN, J.J.P.; WILSON, P.W.F.; ORDOVAS, J.M.; HAYDEN, M.R. A common truncation variant of lipoprotein lipase (Ser447X) confers protection against coronary heart disease: the Framingham Offspring Study. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v.55, n.6, p.450-454, 1999.
- GOLDBERG, I.J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.37, p.693-707, 1996.

- GROENEMEIJER, B.E.; HALLMAN, M.D.; REYMER, P.W.; CAGNE, E.; KUIVENHOVEN, J.A.; BRUIN, T.; JANSEN, H.; LIE, K.I.; BRUSCHKE, A.V.; BOERWINKLE, E.; HAYDEN, M.R.; KASTELEIN, J.J.P. Genetic variant showing a positive interaction with β -blocking agents with a beneficial influence on lipoprotein lipase activity, HDL cholesterol, and triglycerides levels in coronary artery disease patients: the Ser447Stop substitution in the lipoprotein lipase gene. **Circulation**, Hagerstown, v.95, p.2628-2635, 1997.
- GROOT, P.H.; VAN STIPHOUT, W.A.C.J.; KRAUSS, X.H.; JANSEN, H.; VAN TOL, A.; VAN RAMSHORST, E. Post-prandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. **Arterioscler Thromb.**, v.11, p. 53-62, 1991.
- HALL, S.; TALMUD, P.J.; COOK, D.G. Frequency and allelic association of common variants in the lipoprotein lipase gene in different ethnic groups: The Wandsworth Heart and stroke study. **Genet. Epidemiol.**, v.18, p.203-216, 2000.
- HATA, A.; ROBERTSON, M.; EMI, M.; LALOUEL, J.M. Direct detection and automated sequencing of individual alleles after electrophoretic strand separation: identification of a common nonsense mutation in exon 9 of the human lipoprotein lipase gene. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.18, p.5407-5411, 1990.
- HAVEL, R.J.; KANE, J.P.; KASHYAP, M.L. Interchange of apolipoprotein between chylomicron and high density lipoproteins during alimentary lipaemia in man. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.52, p.32-38, 1973.
- HAZZARD, W.R.; BIERMAN, E.L. Delayed clearance of chylomicron remnants following vitamin A containing oral fat loads in broad beta disease (Type III hyperlipoproteinemia). **Metabolism**, v.25, p. 777-901, 1976.

- HENDERSON, H.E.; KASTELIEN, J.J.P.; ZWINDERMAN, A.H.; CAGNE, E.; JUKEMA, J.W.; REYMER, P.W.A.; GROENEMEYER, B.E.; LIE, K.I.; BRUSCHKE, A.V.G.; HAYDEN, M.R.; JANSEN, H. Lipoprotein lipase activity is decreased in a large cohort of patients with coronary artery disease and is associated with changes in lipids and lipoproteins. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.40, p.735-743, 1999.
- HIRATA, M.H.; OLIVEIRA, H.C.F.; QUINTÃO, E.C.R.; REDGRAVE, T.G.; MARANHÃO, R.C. The effects of Triton WR-1339, protamine sulfate and heparin on the plasma removal of emulsion models of chylomicron and remnants in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.917, p.314-346, 1987.
- HOKANSON, J.E. Lipoprotein lipase gene variants and risk of coronary disease: a quantitative analysis of population-based studies. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v.27, p.24-34, 1997.
- HOMMA, H.; KURACHI, H.; NISHIO, Y. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. **J. Biol. Chem.**, v.275, p. 11404-11411, 2000.
- HULLEY, S.B.; ROSENMAN, R.H.; BAWOL, R.D.; BRAND, R.J. Epidemiology as a guide to clinical decisions, the association between triglyceride and coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, p.1383-1389, 1980.
- HUMPHRIES, S.E.; NICAUD, V.; MARGALEF, J.; TIRET, L.; TALMUD, P.J. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and post-prandial plasma triglycerides. The European atherosclerosis research study (EARS). **Arterioscler Tromb. Vasc. Biol.** v.18, p.526-534, 1998.

- IVERIUS, P.H.; BRUNZELL, J.D. Relationship between lipoprotein lipase activity and plasma sex steroid level in obese women. **J. Clin. Invest.**, v.82, p. 1106-1112, 1988.
- JEMAA, R.; FUMERON, F.; POIRIER, O.; LECERF, L.; EVANS, A.L.; ARVEILER, D.; LUC, G.; CAMBOU, J.; BARD, J.; FRUCHART, J.; APFELBAUM, M.; CAMBIEN, F.; TIRET, L. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: association with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.36, p.2141-2146, 1995.
- KANNEL, W.B., AGOSTINO, R.B., BELANGER, A.J., CAGNON, D.R. Diabetes, fibrinogen and risk of cardiovascular disease: The Framingham experience. **Am. Heart J.**, Orlando, v.120, p.672-676, 1990.
- KANNEL, W.B., CASTELLI, W.P., GORDON, T., MACNAMARA, P.M. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. **Ann. Intern. Med.**, v.71, p.1-12, 1971.
- KARPE, F.; STEINER, G.; OLIVECRONA, T.; CARLSON, L.A.; HAMSTEN, A. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.91, p.748-758, 1993.
- KARPE, F.; STEINER, G.; UFFELMAN, K.; OLIVECRONA, T.; HAMSTEN, A. Postprandial lipoproteins and progression of coronary atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.106, p.83-97, 1994.
- KNUDSEN, P.; MURTOMAK, S.; ANTINEN, M.; EHNHOLM, S.; LAHDENPERA, S.; EHNHOLM, C. TASKINEN, M.R. The Asn→291Ser and Ser447Stop mutations of the lipoprotein lipase gene and their significance for lipid metabolism in patients with hypertriglyceridemia. **Eur. J. Clin. Invest.**, Oxford, v.27, p.928-935, 1997.
- KOBAYASHI, J.; NISHIDA, T.; AMEIS, D.; STAHNKE, G.; SCHOTZ, M.; HASHIMOTO, H. A heterozygous mutation (the codon for Ser447-a stop codon) in

- lipoprotein lipase contributes to a defect in lipid interface recognition in a case with type I hyperlipidemia. **Biochem. Biophys Res. Comm.**, v.182, p.70-77, 1992.
- KOZAKI, K.; GOTODA, T.; KAWAMURA, M.; SHIMANO, H.; YAZAKI, Y.; OUCHI, Y.; ORIMO, H.; YAMADA, N. Mutational analysis of human lipoprotein lipase by carboxy-terminal truncation. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.34, p.1765-1772, 1993.
- KRAUSS, R.M.; HERBERT, P.N.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. **Circ. Res.**, Hagerstown, v.33, p.403-411, 1973.
- KUIVENHOVEN, J.A.; GROENEMEYER, B.E.; BOER, J.M.A.; REYMER, P.W.A.; BERGHUIS, R.; BRUIN, T.; JANSSEN, H.; SEIDELL, J.C.; KASTELEIN, J.J.P. Ser 447 stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Dallas, v.17, p.595-599, 1997.
- LaROSA, J.C.; LEVY, R.I.; HERBERT, P.; LUX SE, FREDRICKSON, D.S. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.41, p.57-62, 1970.
- LOLIO, C.A.; LOTUFO, P.A.; LIRA, A.C.; ZANETTA, D.M.Y.; MASSAD, E. Tendência da mortalidade da doença isquêmica do coração nas capitais de regiões metropolitanas do Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v.64, p.195-199, 1995.
- LOOKENE, A.; NIELSEN, M.S.; GLIEMANN, J.; OLIVECRONA, G. Contribution of the carboxy-terminal domain of lipoprotein lipase to interaction with heparin and lipoproteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.271, p. 15-21, 2000.
- LOTUFO, P.A. Mortalidade precoce por doenças do coração no Brasil. Comparação com outros países. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro v.70, p.321-325, 1998.

- MAHLEY, R.W.; CHIN-ON, S.; HOFMAN, A.; CRESSWELL, S.R.; HAVEKES, L. Post-prandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. **Arterioscler Tromb.**, v.11, p.653-662, 1991.
- MANSUR, A.P.; FAVARATO, D.; SOUZA, M.F.M.; AVAKIAN, S.D.; ALDRIGHI, J.M.; CÉSAR, L.A.M.; RAMIREZ, J.A.F. Tendência do risco de morte por doenças circulatórias no Brasil de 1979 a 1996. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v.79, p. 497-503, 2001;
- MARANHÃO, R.C.; FERES, M.C.; MARTINS, M.T.; MESQUITA, C.H.; TOFFOLETTO, O.; VINAGRE, C.G.C.; GIANINNI, S.D.; PILEGGI, F. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.126, p.15-25, 1996.
- MARANHÃO, R.C.; ROLAND, I.A., HIRATA, M.H. Effects of triton wr 1339 and heparin on the transfer of surface lipids from triglyceride-rich emulsions to high density lipoproteins in rats. **Lipids**, Champaign, v.25, p.701-705, 1990.
- MARANHÃO, R.C.; LINCOLN, E.C.; BRUNEGRABER, H.; SMALL, D.M.; REDGRAVE, T.G. The clearance of lipid recombinant lipoprotein models resembling chylomicrons and their remnants. **Circulation**, Hagerstown, v.70, p.299-315, 1984.
- MARANHÃO, R.C.; QUINTÃO, E.C.R. Long term steroid metabolism balance studies in subjects on cholesterol-free and cholesterol-rich diets: comparison between normal and hypercholesterolemic individuals. **J. Lipid Res.**, v.24, p. 167, 1983.
- MARTIN, M.J.; HULLEY, S.B.; BROWNER, W.S.; KULLER, L.H.; WENTWORTH, D. Serum cholesterol, blood pressure and mortality: implications from a cohort of 361 622 men. **Lancet**, v.2, p.933-939, 1986.

- MATTU, R.K.; NEEDHAM, E.W.A.; MORGAN, R.; REES, A.; HACKSHAW, A.K.; STOCKS, J.; ELWOOD, P.C.; GALTON, D.J. DNA variants at the LPL gene locus associate with angiographically defined severity of atherosclerosis and serum lipoprotein levels in a Welsh population. **Artheroscler. Thromb.**, Dallas, v.14, n.7, p.1090-1097, 1994.
- MCGILL, H.C.; GEER, J.C.; STRONG, J.P. Natural history of human atherosclerotic lesions. In: SANDLER, M., BOURNE, G. H. eds. *Atherosclerosis and its Origin*. New York: Academic Press. V.18, p.509-526, 1963.
- MESQUITA, C.H. **Cinética do quilomícron marcado com ^3H -TG e ^{14}C -CE: análise compartimental auxiliar.** São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), 1994. [Publicações IPEN].
- MEYER, E.; WESTERVELD, T.; RUYTER-MEIJSTEK, F.C.; VAN GREEVENBROEK, M.M.J.; RIENKS, R.; VAN RIJN, H.J.M.; ERKELENS, D.W.; DEBRUIN, T.W.A. Abnormal postprandial apolipoprotein B-48 and triglyceride responses in normolipidemic women with greater than 70% stenotic coronary artery disease: a case-control study. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.124, p.221-235, 1996.
- MIESENBOCK, G.; HOLZL, B.; FOGER, B.; BRANDSTATTER, E.; PAULWEBER, B.; SANDHOTER, F.; PATSCH, J.R. Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense mutation as the cause of impaired triglycerides tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v.91, p.448-455, 1993.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.16, p.1215, 1988.
- MURTHY, V.; JULIEN, P.; GAGNÉ, C. Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. **Pharmacol. Ther.**, v.70, p. 101-135, 1996.

- NAKANDAKARE, E.R.; LOTTENBERG, S.A.; OLIVEIRA, H.C.; BERTOLAMI, M.C.; VASCONCELOS, K.S.; SPEROTTO, G.; QUINTÃO, E.C. Simultaneous measurements of chylomicron lipolysis and remnant removal using a doubly labeled artificial lipid emulsion: studies in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.35, p.143-152, 1994.
- NICKERSON, D.A.; TAYLOR, S.L. WEISS, K.M.; CLARK, A.G.; HUTCHINSON, R.G.; STENGARD, J. SALOMAA, V.; VARTIAINEN, E.; BOERWINKLE, E. SING, C.F. DNA sequence diversity in a 9,7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. **Nat. Genet.**, Brentwood, v19, p.233-240, 1998.
- NORA, J.J.; LORTSCHER, R.H.; SPANGLER, R.D.; NORA, A.H.; KIMBERLING, W.J. Genetic-epidemiologic study of onset ischaemic heart disease. **Circulation**, v.61, p.503-508, 1980.
- OKA, K.; TKALCEVIC, G.T.; NAKANO, T.; TUCKER, H.; ISHIMURA-OKA, K.; BROWN, V. Structure and polymorphic map of human lipoprotein lipase gene. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1049, p.21-26, 1990.
- OLIVEIRA, M.R.M.; MARANHÃO, R.C. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in nomolipidemic obese women after a short-period weight loss by energy-restricted diet. **Metabolism**, 2002.
- PARACKARD, C. Plasma lipids and lipoprotein metabolism in the 1990: what we know and what we need know. **Lipids: Curr. Perspec.**, London, p.1-20, 1997.
- PATSCH, J. Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. **Eur. Heart J.**, Amsterdam, v.19, suppl.H, p.H2-H6, 1998.

- PATSCH, J.R.; GOTTO, J.R. A high density lipoprotein cholesterol, plasma triglyceride, and coronary heart disease: pathophysiology and management. **Adv. Pharmacol.**, San Diego, v.32, p.375-398, 1995.
- PATSCH, J.R.; MIESENBOCK, G.; HOPFERWIESER, T.; MUHLBERGER, V.; KNAPP, E.; DUNN, J.K.; GOTTO, A.M.; PATSCH, W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.12, p.1336-1345, 1992.
- PEACOCK, R.E.; HAMSTEN, A.; NILSSON-EHLE, P.; HUMPHRIES, S.E. Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlation of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Sweden. **Atherosclerosis**, v.97, p.171-185, 1992.
- PREVIATO, L.; GUARDAMAGNA, O.; DUGI, K.A. A novel missense mutation in the C-terminal domain of lipoprotein lipase (Glu410-val) leads to enzyme inactivation and familial chylomicronemia. **J. Lipid Res.**, Birmingham, v.35, p.1552-1560, 1994.
- PRICE, T.M.; O'BRIEN, S.N.; WELTER, B.H.; GEORGE, R.; ANANDJIWALA, J.; KILGORE, M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase-possible mechanism of body fat distribution. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.178, p. 101-107, 1998.
- PROCTOR, S.D.; MAMO, J.C.L. Arterial fatty lesions have increased uptake of chylomicron remnants but not low-density lipoproteins. **Coron. Artery Dis.**, Philadelphia, v.7, p.239-245, 1996.
- QUINN, D.; SHIRAI, K.; JACKSON, R.L. Lipoprotein lipase: mechanism of action and role in lipoprotein metabolism. **Prog. Lipid Res.**, Amsterdam, v.22, p.35-78, 1982.
- REDGRAVE, T.G.; LY, H.L.; QUINTÃO, E.C.R.; RAMBERG, C.F.; BOSTON, R.C. Clearance from plasma of triacylglycerol and cholesteryl ester after intravenous

- injection of chylomicron-like lipid emulsions in rats and man. **Biochem. J.**, Colchester, v.290, p.843-847, 1993.
- REDGRAVE, T.G.; ZECH, L.A. A kinetic model of chylomicron core lipid metabolism in rats: the effect of a single meal. **J. Lipid Res.**, v.5, p. 473-482, 1987.
- REDGRAVE, T.G.; MARANHÃO, R.C. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.835, p.104-112, 1985.
- SANTO, R. D. Efeito da heparina e do gemfibrozil na cinética de quilomícrons artificiais: comparação entre indivíduos hipertrigliceridêmicos e normolipidêmicos. Tese de doutorado. São Paulo, 1999.
- ROBSON, D.S.; HARRIS, P.M. The production of lipolytic activity in the circulation of the hind limb in response to heparin. **Q. J. Exp. Physiol.**, Cambridge, v.44, p.80-90, 1959.
- SALAH, D.; BOHNET, K.; GUEGUEN, R.; SIEST, G.; VISVIKIS, S.; Combined effects of lipoprotein and apolipoprotein E polymorphisms on lipid and lipoprotein levels in the Stanislas cohort. **J. Lipid Res.**, v.38, p.904-912, 1997.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p.E10-E14.
- SASS, C.; HERBETH, B.; SIEST, G.; Lipoprotein lipase (C/G) 447 polymorphism and blood pressure in the Stanislas cohort. **J. Hypertens**, v.18, p.1775-1781, 2000.
- SCHNEEMAN, B.O.; KOTITE, L.; TODD, K.M.; HAVEL, R.J. Relationship between the responses of triglyceride-rich lipoproteins in blood plasma containing apolipoproteins

- B 48 and B 100 to a fat-containing meal in normolipidemic humans. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.90, p.2069-2073, 1993.
- SIMONS, L.A.; DWYER, T.; SIMONS, J.; BERNSTEIN, L.; MOCK, P.; POONIA, N.S. Chylomicrons and chylomicrons remnants in coronary artery disease: a case-control. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.65, p. 181, 1987.
- SIMPSON, H.S.; WILLIAMSON, C.M.; OLIVECROMA, T.; PRINGLE, S.; MACLEAN, J.; LORIMAR, A.R. Post-prandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.85, p. 193, 1990.
- SING, K.; BALLANTYNE, C.; FERLIC, L.; BRUGADA, R.; CUSHMAN, I.; DUNN, J.K.; HERD, J.A.; PWNALL, H.J.; GOTTO, A.M.; MARIAN, A.J. Lipoprotein lipase gene mutations, plasma lipid levels, progression/regression of coronary atherosclerosis, response to therapy, and future clinical events lipoprotein and coronary atherosclerosis study. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.144, p.435-442, 1999.
- SMITH, R.M. **Dose estimate techniques**. In: Rollo FD (ed). Nuclear medicine physics, instrumentation and agents. Saint Louis. USA: C. V. Mosby. V.14, p. 513, 1977.
- SORVA, R.; KUUSI, T.; TASKINEN, M.R.; PERBEENTUPA, J.; NIKKILA, E.A. Testosterone substitution increases the activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase in hypogonadal males. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.69, p. 191-197, 1988.
- SOWBY, F.S. Editor. **Radiation protection** ICRP publication 30 Part I Limits for intakes of radionuclides by workers 31. Oxford: Pergamon Press, 1984.
- SPARKES, R.S.; ZOLLMANS, S.; KLISAK, I.; KIRSHGESSNER, T.G.; KOMAROMY, M.C.; MOHANDAS, T.; SCHOTZ, M.C.; LUSIS, A.J. Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. **Genomics**, New York, p.138-144, 1987.

- STEIN, O.; STEIN, Y.; PRESSMAN-SCHWARTZ, S.; RESHEF, A.; CHAJEK-SHAUL, T.; BEN-NAIM, M.; FRIEDMAN, G.; LEITERSDORF, E. Expression of lipoprotein lipase mRNA in rat heart is localized mainly to mesenchymal cells as studied by in-situ hybridization. *Arterioscler Thromb.*, v.11, p.857-863, 1991.
- STEIN, Y.; STEIN, O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, Amsterdam, v.170, p.1-9, 2003.
- STOCKS, J.; THORN, J.A.; GALTON, D.J. Lipoprotein lipase genotypes for a common premature termination codon mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis and restriction digestion. *J. Lipid Res.*, Birmingham, v.33, p.853-857, 1992.
- TORNVALL, P.; OLIVECRONA, G.; KARPE, F.; HAMSTEN, A.; OLIVECROMA, T. Lipoprotein lipase mass and activity in plasma and their increase after heparin are separate parameters with different relations to plasma lipoproteins *Atheroscler Tromb. Vasc. Biol.*, v.15, p. 1086-1093, 1995.
- VINAGRE, C.G.; STOLF, N.A.G.; BOCCHI, E.; MARANHÃO, R.C. Chylomicron metabolism in patients submitted to cardiac transplantation. *Transplantation*, Hagerstown, v.69, n.4, p.532-537, 2000.
- WEINTRAUB, M.S.; RASSIN, T.; EISENBERG, S. Continuous intravenous heparin administration in humans causes a decrease in serum lipolytic activity and accumulation of chylomicron in circulation. *J. Lipid Res.*, Birmingham, v.35, p.229-238, 1994.
- WEINTRAUB, M.S.; GROSSKOPF, I.; RASSIN, T.; MILLER, H.; CHARACH, G.; ROTMENSCH, H.H.; LIRON, M.; RUBINSTEIN, A.; ISINA, A. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *Br. Med. J.*, London, v.312, p.935-939, 1996.

WITTRUP, H.H.; NORDESTGAARD, B.G.; STEFFENSEN, R.; JENSEN, G.; TYBAJAERG-HASEN, A. Effect of gender on phenotypic expression of the S447X mutation in LPL The Copenhagen City Heart Study. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v.165, p.119-126, 2002.

WITTRUP, H.H.; TYBAJAERG-HASEN, A.; STEFFENSEN, R.; DEEB, S.S.; BRUNZEL, J.D.; JENSEN, G.; NORDESTGAARD, B.G. Mutations in the lipoprotein lipase gene associated with Ischemic Heart Disease in men the Copenhagen City heart study. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Dallas, v.19, p.1535-1540, 1999.

WITTRUP, H.H.; TYBAJAERG-HASEN, A.; NORDESTGAARD, B.G. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease a meta-analysis. **Circulation**, Hagerstown, v.99, p.2901-2907, 1999a.

ZHANG, H.; REYMER, P.W.A.; LIU, M.S.; FORSYTHE, I.J.; GROENEMEYER, B.E.; FROHLICH, J.; BRUNZELL, J.D.; KASTELEIN, J.J.P.; HAYDEN, M.R.; MA, Y. Patients with Apo E3 deficiency (E2/2, E3/2, and E4/2) who manifest with hyperlipidemia have increased frequency of an Asn291→Ser mutation in the human LPL gene. **Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.**, Dallas, v.15, n.10, p.1695-1703, 1995.

ZILVERSMIT, D.B. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. **Circulation**, Hagerstown, v.60, n.3, p.473-485, 1979.

8- ANEXOS I

TABELA A1- Distribuição das frequências relativa e absoluta nos intervalos de idade, grupos Controle e DAC.

Idade	Controle	DAC
	n (%)	n (%)
Total	150 (100)	313 (100)
≤30 anos	39 (26)	14 (4)
31-39 anos	39 (26)	65 (21)
≥40 anos	72 (48)	234 (75)
Feminino	90 (100)	131(100)
≤30 anos	21 (23)	4 (3)
31-39 anos	23 (26)	26 (20)
≥40 anos	46 (51)	101 (77)
Masculino	60 (100)	182 (100)
≤30 anos	18 (30)	10 (6)
31-39 anos	16 (27)	39 (21)
≥40 anos	26 (43)	133 (73)

DAC=doença arterial coronária. Teste Qui-Quadrado: Sexo feminino (controle vs DAC) $p<0,001$; sexo masculino (controle vs DAC) $p<0,001$; Controle (feminino vs masculino) $p=0,581$; DAC (feminino vs masculino) $p=0,530$.

TABELA A2- Distribuição das frequências absolutas e relativas das raças, grupos Controle e DAC.

Raça	Controle	DAC
	n (%)	n (%)
Total	150 (100)	313 (100)
Branca	103 (69)	233 (74)
Negra	45 (30)	79 (25)
Amarela	2 (1)	1 (1)
Feminino	90 (100)	131(100)
Branca	58 (65)	89 (68)
Negra	30 (33)	42 (32)
Amarela	2 (2)	0 (0)
Masculino	60 (100)	182 (100)
Branca	45 (75)	144 (79)
Negra	15 (25)	37 (20)
Amarela	0 (0)	1 (1)

* A raça amarela foi desconsiderada devido à baixa frequência. Teste Qui-Quadrado: Sexo feminino (controle vs DAC) $p=0,754$; sexo masculino (controle vs DAC) $p=0,457$; Controle (feminino vs masculino) $p=0,238$; DAC (feminino vs masculino) $p=0,020$. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A3- Distribuição das frequências absolutas e relativas nos intervalos de IMC, grupos Controle e DAC.

IMC	Controle	DAC
	n (%)	n (%)
Total	150 (100)	313 (100)
<25 Kg/m ²	71 (47)	111 (35)
25-30 Kg/m ²	52 (35)	122 (39)
>30 Kg/m ²	27 (18)	80 (26)
Feminino	90 (100)	131(100)
<25 Kg/m ²	48 (53)	56 (43)
25-30 Kg/m ²	26 (29)	42 (32)
>30 Kg/m ²	16 (18)	33 (25)
Masculino	60 (100)	182 (100)
<25 Kg/m ²	23 (38)	55 (30)
25-30 Kg/m ²	26 (44)	80 (44)
>30 Kg/m ²	11 (18)	47 (26)

Teste Qui-Quadrado: Sexo feminino (controle vs DAC) $p=0,251$; sexo masculino (controle vs DAC) $p=0,371$; Controle (feminino vs masculino) $p=0,143$; DAC (feminino vs masculino) $p=0,046$. DAC=doença arterial coronária; IMC=índice de massa corpórea.

TABELA A4- Distribuição das frequências absoluta e relativa de tabagismo, grupos Controle e DAC.

Tabagismo	Controle n (%)	DAC n (%)
Total	150 (100)	313 (100)
Não	107 (71)	91 (29)
Sim	34 (23)	153 (49)
Ex-tabagista	9 (6)	69 (22)
Feminino	90 (100)	131(100)
Não	63 (70)	44 (34)
Sim	20 (22)	57 (43)
Ex-tabagista	7 (8)	30 (23)
Masculino	60 (100)	182 (100)
Não	44 (74)	47 (26)
Sim	14 (23)	96 (53)
Ex-tabagista	2 (3)	39 (21)

Teste Qui-Quadrado: Sexo feminino (controle vs DAC) $p<0,001$; sexo masculino (controle vs DAC) $p<0,001$; Controle (feminino vs masculino) $p=0,532$; DAC (feminino vs masculino) $p=0,225$. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A5- Distribuição das frequências absoluta e relativa de hipertensão arterial sistêmica, grupos Controle e DAC.

Hipertensão arterial sistêmica	Controle	DAC
	n (%)	n (%)
Total	150 (100)	313 (100)
Não	148 (99)	142 (45)
Sim	2 (1)	171 (55)
Feminino	90 (100)	131(100)
Não	88 (98)	61 (47)
Sim	2 (2)	70 (53)
Masculino	60 (100)	182 (100)
Não	60 (100)	81 (45)
Sim	0 (0)	101 (55)

Teste Qui-Quadrado: Sexo feminino (controle vs DAC) $p<0,001$; sexo masculino (controle vs DAC) $p<0,001$; Controle (feminino vs masculino) $p=0,517$; DAC (feminino vs masculino) $p=0,718$. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A6- Distribuição das frequências absoluta e relativa de diabetes, grupos Controle e DAC.

Diabetes	Controle	DAC
	n (%)	n (%)
Total	150 (100)	313 (100)
Não	150 (100)	104 (79)
Sim	0 (0)	27 (21)
Feminino	90 (100)	131(100)
Não	90 (100)	104 (79)
Sim	0 (0)	27 (21)
Masculino	60 (100)	182 (100)
Não	60 (100)	150 (82)
Sim	0 (0)	32 (18)

Teste Qui-Quadrado: Sexo feminino (controle vs DAC) $p<0,001$; sexo masculino (controle vs DAC) $p<0,002$; Controle (feminino vs masculino) $p=0,650$; DAC (feminino vs masculino) $p=0,499$. DAC=doença arterial coronária

TABELA A7- Distribuição das frequências absoluta e relativa de antecedentes familiares, grupos Controle e DAC.

Antecedentes familiares	Controle	DAC
	n (%)	n (%)
Total	150 (100)	313 (100)
Não	90 (60)	116 (37)
Sim	60 (40)	197 (63)
Feminino	90 (100)	131(100)
Não	50 (56)	49 (37)
Sim	40 (44)	82 (63)
Masculino	60 (100)	182 (100)
Não	40 (67)	67 (37)
Sim	20 (33)	115 (63)

Teste Qui-Quadrado: Sexo feminino (controle vs DAC) $p=0,008$; sexo masculino (controle vs DAC) $p<0,001$; Controle (feminino vs masculino) $p=0,174$; DAC (feminino vs masculino) $p=0,915$. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A8- Risco relativo para DAC sexo feminino devido aos fatores de risco clássicos calculados por análise de regressão logística univariada.

Variável independente	Níveis da Variável	OR	IC 95%OR	p
Idade	≤30 anos	1,00	---	
	31-39 anos	5,94	1,77-19,85	0,004
	≥40 anos	11,53	3,74-35,49	<0,001
Raça	Branca + Amarela	1,00	---	
	Negra	0,94	0,53-1,67	0,843
IMC	<25 Kg/m ²	1,00	---	
	25-30 Kg/m ²	1,39	0,74-2,58	0,306
	>30 Kg/m ²	1,77	0,87-3,60	0,116
Tabagismo	Não	1,00	---	
	Sim	6,14	2,47-15,22	<0,001
	Ex-tabagista	4,08	2,16-7,73	<0,001
Hipertensão arterial sistêmica	Não	1,00	---	
	Sim	50,49	11,93-213,73	<0,001
Diabetes	Não	1,00	---	
	Sim	7,53	2,21-25,66	0,001
Antecedentes familiares	Não	1,00	---	
	Sim	2,09	1,21-3,61	0,008

OR (*Odds Ratio*)= razão de risco para DAC; IC 95% OR= intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A9- Risco relativo para DAC sexo masculino devido aos fatores de risco clássicos calculados por análise de regressão logística univariada.

Variável independente	Níveis da Variável	OR	IC 95%OR	p
Idade	≤30 anos	1,00	---	
	31-39 anos	4,39	1,67-11,55	0,003
	≥40 anos	9,21	3,82-22,20	<0,001
Raça	Branca + Amarela	1,00	---	
	Negra	0,77	0,39-1,52	0,446
IMC	<25 Kg/m ²	1,00	---	
	25-30 Kg/m ²	1,29	0,67-2,48	0,453
	>30 Kg/m ²	1,79	0,79-4,05	0,164
Tabagismo	Não	1,00	---	
	Sim	18,26	4,16-80,13	<0,001
	Ex-tabagista	6,42	3,20-12,87	<0,001
Hipertensão arterial sistêmica	Não	1,00	---	
	Sim	999,0*	0,00-999,0	0,922
Diabetes	Não	1,00	---	
	Sim	12,59	1,68-94,22	0,014
Antecedentes familiares	Não	1,00	---	
	Sim	3,43	1,86-6,35	<0,001

OR (*Odds Ratio*)= razão de risco para DAC; IC 95% OR= intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A10- Distribuição das concentrações dos lípides plasmáticos dos grupos Controle e DAC segundo sexo.

LÍPIDES(mg/dL)	Controle Média ± DP	DAC Média ± DP	Teste <i>t</i> de Student *<i>p</i>
Feminino	n=90	n=131	
Triglicérides	90 ± 36 (42 - 200)	137 ± 76 (42 - 424)	<0,001
Colesterol total	183 ± 35 (23 - 238)	206 ± 43 (118 - 336)	<0,001
LDL-c	117 ± 27 (53 - 169)	133 ± 37 (42 - 249)	0,003
HDL-c	51 ± 11 (31 - 83)	46 ± 11 (14 - 75)	<0,001
Masculino	n=60	n=182	
Triglicérides	114 ± 51 (36 - 200)	203 ± 140 (46 - 997)	<0,001
Colesterol total	186 ± 37 (86 - 239)	216 ± 61 (76 - 594)	<0,001
LDL-c	121 ± 33 (36 - 175)	140 ± 50 (36 - 345)	<0,001
HDL-c	44 ± 8 (30 - 68)	37 ± 9 (18 - 73)	<0,001

Variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$). n=número de indivíduos; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade.

Teste *t* de Student: Controle (Feminino vs masculino): triglicérides $p=0,009$; colesterol total $p=0,606$; LDL-c $p=0,792$ e HDL-c $p<0,001$. DAC (Feminino vs masculino): triglicérides $p<0,001$; colesterol total $p=0,180$; LDL-c $p=0,416$ e HDL-c $p<0,001$. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A11- Risco relativo para DAC (feminino e masculino) devido as concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, LDL-c e HDL-c calculados por análise de regressão logística univariada.

Variável independente		OR	IC 95%OR	p
Feminino				
Triglicérides	≤200 mg/dL	1,00	---	
	>200 mg/dL	18,95	2,51-143,12	0,004
Colesterol Total	≤238 mg/dL	1,00	---	
	>238 mg/dL	23,11	3,08-173,46	0,002
LDL-c	≤169 mg/dL	1,00	---	
	>169 mg/dL	17,15	2,26-129,98	0,006
HDL-c	>40 mg/dL			
	≤ 40 mg/dL	2,22	1,12-4,39	0,022
Masculino				
Triglicérides	≤200 mg/dL	1,00	---	
	>200 mg/dL	11,07	3,34-36,73	<0,001
Colesterol Total	≤238 mg/dL	1,00	---	
	>238 mg/dL	10,68	2,51-45,42	0,001
LDL-c	≤169 mg/dL	1,00	---	
	>169 mg/dL	8,62	2,02-36,81	0,004
HDL-c	>40 mg/dL			
	≤ 40 mg/dL	3,22	1,76-5,90	<0,001

LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade.
DAC=doença arterial coronária.

TABELA A12- Distribuição dos genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G segundo raça nos grupos Controle e DAC.

<i>LPL</i> C1595G	BRANCA	NEGRA	AMARELA
Controle	103 (69)	45 (30)	2 (1)
CC	79 (77)	35 (78)	1 (50)
CG	24 (23)	9 (20)	1 (50)
GG	0 (0)	1 (2)	0 (0)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Frequência relativa dos alelos			
Alelo C	0,88	0,88	0,75
Alelo G	0,12	0,12	0,25
DAC	233	79	1
CC	186 (80)	70 (89)	1 (100)
CG	38 (16)	9 (11)	0 (0)
GG	9 (4)	0	0 (0)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	p<0,05	p>0,05	
Frequência relativa dos alelos			
Alelo C	0,88	0,94	
Alelo G	0,12	0,06	

* Devido à baixa frequência a raça amarela foi desconsiderada dos testes estatísticos.. Teste Qui-quadrado: Controle (CC vs CG+GG) $p=0,886$; DAC (CC vs CG+GG) $p=0,079$. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A13- Distribuição dos genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G segundo raça nos grupos Controle e DAC sexo feminino.

Feminino	BRANCA	NEGRA	AMARELA
Controle	58	30	2
CC	46 (79)	22 (73)	1 (50)
CG	12 (21)	7 (23)	1 (50)
GG	0 (0)	1 (4)	0 (0)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	p>0,05	p>0,05	
Frequência relativa dos alelos			
Alelo C	0,90	0,85	0,75
Alelo G	0,10	0,15	0,25
DAC	89	42	0
CC	70 (79)	39 (93)	0 (0)
CG	14 (16)	3 (7)	0 (0)
GG	5 (5)	0 (0)	0 (0)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	p<0,05	p>0,05	
Frequência relativa dos alelos			
Alelo C	0,86	0,96	
Alelo G	0,14	0,04	

* Devido à baixa frequência a raça amarela foi desconsiderada dos testes estatísticos. Teste de Fisher: sexo feminino DAC (CC vs CG vs GG) p=0,121. Alguns testes foram realizados agrupando CG com GG. Teste Qui-quadrado: Controle (CC vs CG+GG) p=0,526; DAC (CC vs CG+GG) p=0,042. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A14- Distribuição dos genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G segundo raça nos grupos controle e DAC sexo masculino.

Masculino	BRANCA	NEGRA	AMARELA
Controle	45	15	0
CC	33 (73)	13 (87)	0 (0)
CG	12 (27)	2 (13)	0 (0)
GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	p>0,05	p>0,05	
Frequência relativa dos alelos			
Alelo C	0,87	0,94	
Alelo G	0,13	0,06	
DAC	144	37	1
CC	116 (80)	31 (84)	1 (100)
CG	24 (17)	6 (16)	0 (0)
GG	4 (3)	0	0 (0)
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	p>0,05	p>0,05	
Frequência relativa dos alelos			
Alelo C	0,89	0,92	
Alelo G	0,11	0,08	

* Devido à baixa frequência a raça amarela foi desconsiderada dos testes estatísticos. Alguns testes foram realizados agrupando CG com GG devido à baixa frequência. Teste de Fisher: Controle (CC vs CG) p=0,483; DAC (CC vs CG vs GG) p=0,918. Teste Qui-quadrado: DAC (CC vs CG+GG) p=0,654. DAC=doença arterial coronária

TABELA A15- Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides de acordo com os genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G nos grupos Controle e DAC do sexo feminino.

Feminino	CC	CG+GG	Teste <i>t</i> de Student
Lípides mg/dL	Média ± DP	Média ± DP	
Controle	n=69	n=21	<i>p</i>
Triglicérides	92 ± 36 (43-200)	84 ± 36 (42-170)	0,315
Colesterol total	183 ± 37 (23-238)	184 ± 29 (134-231)	0,581
LDL-c	118 ± 28 (53-169)	114 ± 24 (73-164)	0,709
HDL-c	50 ± 11 (31-83)	53 ± 12 (34-75)	0,344
DAC	n=109	n=22	
Triglicérides	134 ± 73 (42-424)	149 ± 90 (59-356)	0,561
Colesterol total	204 ± 41 (118-336)	211 ± 50 (138-329)	0,620
LDL-c	132 ± 36 (42-244)	135 ± 45 (65-249)	0,937
HDL-c	47 ± 11 (14-75)	47 ± 13 (25-70)	0,720

Variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$). n=número de indivíduos; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A16- Distribuição das concentrações plasmáticas de lípides de acordo com os genótipos do polimorfismo *LPL* C1595G nos grupos Controle e DAC do sexo masculino.

Masculino	CC	CG+GG	Teste <i>t</i> de Student
Lípides mg/dL	Média ± DP	Média ± DP	
Controle	n=46	n=14	<i>p</i>
Triglicérides	117 ± 50 (37 - 200)	104 ± 53 (36 - 200)	0,406
Colesterol total	191 ± 37 (86 - 239)	169 ± 34 (119 - 218)	0,084
LDL-c	125 ± 34 (36 - 175)	106 ± 28 (56 - 153)	0,116
HDL-c	44 ± 8 (31 - 68)	43 ± 9 (30 - 63)	0,581
DAC	n=148	n=34	
Triglicérides	214 ± 147 (48 - 997)	156 ± 92 (46 - 480)	0,010
Colesterol total	216 ± 62 (76 - 594)	216 ± 55 (148 - 358)	0,873
LDL-c	138 ± 50 (36 - 345)	148 ± 48 (71 - 284)	0,224
HDL-c	37 ± 10 (18 - 73)	38 ± 6 (23 - 50)	0,508

Variáveis transformados em logaritmo ($\log_{10}$). n=número de indivíduos; LDL-c=colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=colesterol da lipoproteína de alta densidade. DAC=doença arterial coronária.

TABELA A17- Análise de regressão logística univariada segundo sexo para variável dependente DAC e genótipos como variáveis independentes.

Variável independente	Níveis da Variável	OR	IC 95%OR	<i>p</i>
Total				
Genótipos	CG+GG	1,00	---	
	CC	1,40	0,87-2,25	0,169
Feminino				
Genótipos	CG+GG	1,00	---	
	CC	1,51	0,77-2,95	0,229
Masculino				
Genótipos	CG+GG	1,00	---	
	CC	1,33	0,66-2,68	0,434

OR (*Odds Ratio*)= razão de risco para DAC; IC 95% OR= intervalo de 95% de confiança para a razão de risco. DAC=doença arterial coronária.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisa Científica em Seres Humanos – Resolução nº 01 de 13.6.1988 – CNS)

O Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração está realizando uma pesquisa clínica de avaliação do metabolismo de lipoproteínas. A fim de decidir se você deseja participar deste estudo clínico, você deve entender os riscos e benefícios que este exame pode oferecer para poder fazer um julgamento informado. Este processo é chamado termo de consentimento livre e esclarecido.

Este estudo foi submetido ao Comitê Ético desta Instituição que garantiu sua aprovação quanto ao conteúdo ético deste trabalho.

É importante ressaltar que a sua participação neste estudo clínico é voluntária e, se desejar o Sr(a) poderá desistir a qualquer momento.

Asseguramos que, ao participar deste estudo clínico, os seus dados pessoais serão mantidos em sigilo.

A equipe do laboratório se coloca à sua disposição, bem como à de seus familiares, para esclarecer quaisquer dúvidas, seja antes de iniciá-lo ou durante a sua administração.

Após assinado, uma cópia deste documento será anexada ao seu prontuário e outra ficará com o pesquisador.

O estudo que está sendo proposto chama-se:

“Avaliação do Metabolismo de Lipoproteínas Artificiais ”.

JUSTIFICATIVA

Para um melhor entendimento de doenças onde existe alta incidência de problemas cardiovasculares, é importante estudar o metabolismo do colesterol e das gorduras na circulação sanguínea, por estarem os mesmos relacionados com tais problemas.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar o metabolismo do colesterol e das gorduras na circulação sanguínea ou seja, a capacidade do organismo de remover as gorduras da circulação. Para isso, serão utilizadas emulsões lipídicas artificiais.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os estudos serão realizados a partir das 8:00 horas, sendo que todos os participantes deverão encontrar-se em jejum de 12 horas. Inicialmente, serão colhidas amostras de sangue para determinação de concentrações plasmáticas de colesterol total e frações e apolipoproteínas A1 e B.

Após a coleta acima mencionada, serão injetados cerca de 100 uL de emulsão lipídica artificial, contendo lípides radioativos (148 kBq (4uci) de ^3H -trioleína e 74 kBq (2uCi) de ^{14}C -oleato de colesterol). Serão colhidas amostras de sangue (6,0 mL), em intervalos de tempo pré-estabelecidos (2, 4, 6, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos), mantendo-se a cateterização venosa com soro fisiológico 0,9%.

AValiação DO GRAU DE RISCO

Todos os procedimentos da pesquisa não acarretarão riscos de contaminação para o participante, nem qualquer tipo de problema para sua saúde.

A dose de radioatividade que será injetada corresponde a 10 vezes menos que a de um raios-X simples de pulmão. A dose equivalente da emulsão incorporada no corpo inteiro da emulsão foi estimada em 0,04 mSv, conforme avaliado pelo método MIRD (Medical Internal Radiological Dosimetry), sendo muito inferior ao que a Comissão Nacional de Energia Nuclear permite que é de 50 mSv por ano. Portanto, estamos realizando esse estudo obedecendo todas as normas de proteção para não expor os participantes a nenhum risco decorrente da utilização de material radioativo.

Os métodos de injeção de emulsão na circulação já foram utilizados em estudos anteriores em centenas de pacientes, não tendo ocorrido nenhum tipo de problema que pudesse prejudicar a saúde dos participantes.

BENEFÍCIOS DO ESTUDO

A pesquisa levará a um melhor entendimento da sua doença.

Eu, abaixo assinado, de nome _____

confirmando que fui informado por _____

quanto aos riscos, vantagens, e possíveis efeitos adversos que possam ser resultantes da pesquisa.

Apresento pois, meu livre consentimento para participar deste estudo. Posso, a qualquer momento, optar por abster-me dele, sem motivo especial, e sem qualquer prejuízo aos cuidados que tenho o direito de receber.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Investigador:

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do paciente, com assinatura do médico, com os dizeres "Lido e Aprovado" escritos acima na mesma

Testemunha(se necessário)

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

D A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091

SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.10.99, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 329/99, intitulado: "Lipoproteínas artificiais na investigação das dislipidemias e no tratamento do câncer.", apresentado pelo(a) pesquisador(a) *Raul Maranhão*, do Departamento de Córdio-Pneumologia, bem como o Termo de Consentimento Pós-Informação.

CAPPesq, 3 de novembro de 1999.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa.

OBSERVAÇÃO: *Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")*

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO