

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA C-III (APOC-III) E
NÍVEIS DE TRIACILGLICERÓIS EM JAPONESES RESIDENTES
NO SUL DO BRASIL**

Tese de Doutorado

Leandro Parzianello

Porto Alegre, 2007
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Pós-Graduação em ciências Biológicas – Bioquímica

**POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA C-III (APOC-III) E
NÍVEIS DE TRIACILGLICERÓIS EM JAPONESES RESIDENTES
NO SUL DO BRASIL**

Leandro Parzianello

Orientadora: Prof^a. Janice Carneiro Coelho

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande
do Sul – como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Bioquímica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, grande arquiteto do universo.

Aos meus pais, Nivaldo e Marines, meios irmãos, Leonardo e Marsel, incentivo e apoio durante o trabalho.

À Vanessa Carolina Spada Parzianello, pela paciência e tolerância durante estes anos que estamos juntos.

Ao “giganti” Lorenzo Parzianello, meu filho, que há 4 meses encanta as nossas vidas.

À Janice Carneiro Coelho, pela oportunidade a mim confiada e disponibilidade em me auxiliar nas dúvidas que tive .

Ao Serviço de Genética do Hospital de Clínicas, pelo convívio agradável durante os anos que passamos convivendo juntos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica pela oportunidade de realização deste doutorado.

Ao Laboratório Parzianello, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	12
I.1. Aspectos Gerais	13
I.2. Aspectos Gerais sobre o Colesterol	13
I.3. Absorção Intestinal dos Lipídios	14
I.4. Metabolismo das lipoproteínas	16
I.4.1. Quilomicras	17
I.4.2. VLDL	19
I.4.3. IDL	20
I.4.4. LDL	21
I.4.4.1. Subfrações da LDL	21
I.4.4.2. Receptores da LDL	22
I.4.5. HDL	23
I.4.5.1. Subclasses da HDL	25
I.4.5.2. Transporte Reverso do colesterol	25
I.5. Apolipoproteínas	26
I.5.1. Apolipoproteína A	26
I.5.2. Apolipoproteína B	28
I.5.3. Apolipoproteína C	29
I.5.3.1. Apolipoproteína CIII	29
I.5.3.1.1. Mutações da Apolipoproteína CIII	30
I.5.4. Apolipoproteína D	30
I.5.5. Apolipoproteína E	31

I.6. Deficiência da Lipoproteína Lipase	31
I.7. Doença inflamatória – Aterosclerose	31
I.8. Significado clínico das dosagens referidas neste trabalho	33
I.8.1. Triacilgliceróis	33
I.8.2. Colesterol total	33
I.8.3. HDL-colesterol	34
I.8.4. LDL-colesterol	34
I.9. Valores referenciais das dosagens	34
I.10. Significado clínico de alterações no metabolismo lipoprotéico	35
I.11. Pesquisa do padrão lipídico na população japonesa	38
II. JUSTIFICATIVA	39
II. Justificativa do Estudo	40
III. OBJETIVOS	41
III.1. Objetivo Geral	42
III.2. Objetivos específicos	42
IV. MATERIAL E MÉTODOS	43
IV.1. Amostra	44
IV.2. Coleta de amostras	44
IV.3. Análise das amostras	45
IV.4. Métodos utilizados	45
IV.4.1. Dosagem de Triacilgliceróis	45
IV.4.2. Dosagem de Colesterol total	46
IV.4.3. Dosagem de HDL-colesterol	47
IV.4.4. Dosagem de LDL-colesterol	49
IV.4.5. Extração de DNA	50

IV.5. Análises estatísticas	50
V. CAPÍTULO	52
VI. DISCUSSÃO	60
VII. CONCLUSÕES	67
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema ilustrativo da lipoproteína 16
- Figura 2. Esquema demonstrando os principais caminhos 19
envolvendo o metabolismo das quilomicras pelo intestino e
síntese de VLDL pelo fígado
- Figura 3. Esquema de reação para a dosagem de triacilgliceróis em 46
aparelho Cobas Mira
- Figura 4. Esquema de reação para a dosagem de colesterol total em 47
aparelho Cobas Mira
- Figura 5. Esquema de reação para a dosagem de HDL-colesterol em 48
aparelho Cobas Mira
- Figura 6. Esquema de reação para a dosagem de LDL-colesterol em 49
aparelho Cobas Mira

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Comparação dos processos Lipoprotêicos	18
Tabela 2.	Classificação das Apolipoproteínas	28
Tabela 3.	Valores referenciais das dosagens referidas neste trabalho, de acordo com a Organização Mundial da Saúde	35
Tabela 4.	Classificação das Hiperlipoproteinemias	36
Tabela 5.	Classificação das Hipolipoproteinemias	37

ABREVIATURAS

ACAT	Acil-COA colesterol acil transferase
ATP	Adult Treatment Program
ANOVA	Análise de variância
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
FFA	Ácido graxo livre
HDL-c	Lipoproteína de densidade alta
HTG	Grupo de indivíduos com alto nível de triacilgliceróis
HL	Lípase hepática
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LCAT	Lecitina colesterol acil transferase
LDL-c	Lipoproteína de densidade baixa
LPL	Lipoproteína lípase
NCEP	Programa Nacional Educacional de Colesterol
NHLBI	Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue
NTG	Grupo de indivíduos com nível de triacilgliceróis dentro da normalidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
rpm	Rotação por minuto
TG	Triacilgliceróis
VLDL-c	Lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

A apolipoproteína CIII (Apo CIII) participa na regulação do metabolismo das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (TG). Hipertrigliceridemia (HTG) é conhecida como um fator de risco para doença arterial coronariana (DAC). Neste trabalho foi analisada a relação entre o polimorfismo SstI da Apo CIII (genótipos CC, CG, GG) e níveis plasmáticos de TG em 159 indivíduos japoneses que residem no Sul do Brasil. Nós analisamos as concentrações plasmáticas de TG e colesterol total (TC) por método enzimático. Também foram determinadas as concentrações plasmáticas das lipoproteínas HDL-c e LDL-c por método direto. As análises de DNA foram realizadas por reação de cadeia da polimerase (PCR), seguido pela digestão da SstI. Os produtos da PCR digeridos foram visualizados em 5% de gel em agarose usando brometo de etídio. Embora raros os alelos G, foram altamente prevalentes em nosso estudo populacional (0.416), em comparação com os caucasianos (0.00 - 0.11). A distribuição genotípica estava de acordo com o equilíbrio de Hardy - Weinberg. O alelo G foi quase duas vezes mais prevalente no grupo HTG (N = 51) em comparação com o grupo NTG (N = 108) ($p < 0,001$). O nosso estudo demonstra uma significativa associação entre a presença do alelo G a HTG em indivíduos japoneses que residem no Sul do Brasil.

ABSTRACT

Apolipoprotein CIII (Apo CIII) participates in the regulation of the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. Hypertriglyceridemia (HTG) is a known risk factor coronary artery disease (CAD). In the present study we examined the relationship between Apo CIII SstI polymorphism (CC, CG, GG genotypes) and plasma TG levels in a group of 159 Japanese individuals living in the South of Brazil. We analyzed TG and total cholesterol (TC) levels by enzymatic method. We also determined the lipoprotein HDL and LDL by a direct method. DNA samples were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) followed by SstI digestion. Digested PCR products were run on 5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Rare G allele was highly prevalent in our study population (0,416) as compared to the Caucasians (0.00 – 0.11). The genotypic distribution was in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium. G allele was almost two times more prevalent in the HTG group (N = 51) as compared to NTG group (N = 108) ($p < 0,001$). Our study shows a significant association between rare G allele and HTG in Japanese individuals living in the South of Brazil.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos Gerais

Os lipídios biológicos constituem um grupo de compostos que, apesar de quimicamente diferentes entre si, exibem a sua insolubilidade em água como característica definidora e comum a todos (*Lehninger et al., 1995*). Os lipídios têm um papel importante praticamente em todos os aspectos da vida, servindo como hormônios ou precursores de hormônios, auxiliando na digestão e como depósitos de fonte de energia metabólica, agindo como componentes estruturais das biomembranas, formando isolamento para permitir a condução nervosa e evitar perdas de calor (*Voet et al., 1995*).

A maioria dos lipídios contém ácidos graxos em sua estrutura. O colesterol é um álcool monoídrico não saturado da classe dos esteróides. Ácidos graxos são os combustíveis de alta energia metabólica e são armazenados na forma de triacilglicerídios. Os principais locais de metabolismo de ácidos graxos são os músculos e o fígado, enquanto que seu armazenamento ocorre no tecido adiposo (*Rifai et al., 1997*).

I. 2. Aspectos gerais sobre o Colesterol

O colesterol, encontrado praticamente em todas as células e líquidos orgânicos, é um álcool contendo 27 átomos de carbono, e que possui o esqueleto tetracíclico do ciclopentanoperidrofenantreno. É precursor de vários compostos, como a vitamina D, os hormônios esteróides e os ácidos biliares.

A dieta média da população contém 400 a 700 mg de colesterol. Uma quantidade semelhante existe no intestino, proveniente da secreção biliar e da renovação das células da mucosa. Praticamente todo o colesterol no intestino está presente na forma não-esterificada (livre), pois o colesterol esterificado na

dieta é rapidamente hidrolisado por colesterol esterases nas secreções do pâncreas e do intestino delgado (*Wilson e Rudell, 1994*).

Para ser absorvido, o colesterol não esterificado deve inicialmente ser emulsionado, o que é obtido pela formação de micelas mistas, que contém ácidos graxos, monoglicerídeos, fosfolípidos e ácidos biliares conjugados. A máxima absorção ocorre no intestino. Após a absorção pelas células da mucosa, o colesterol juntamente com os triacilgliceróis, fosfolípidos e várias apolipoproteínas específicas são acondicionada em uma grande micela, chamada quilomicra (*Ross, 2000*).

Embora uma parte do colesterol do organismo seja derivada da ingestão alimentar, a maior parte é sintetizada pelo fígado e outros tecidos a partir de moléculas mais simples. A síntese hepática pode ser inibida pelo colesterol recém absorvido (*Dietschy et al., 1993*). Uma vez sintetizado ele é transportado através do sangue por lipoproteínas. Neste trajeto ele é esterificado a éster de colesterol. (*Lehninger et al., 2007*)

Após penetração nas células, os ésteres são hidrolizados por lipases. Cerca de um terço da produção diária de colesterol é catabolizada para ácidos biliares, cuja síntese é de 200 a 400 mg/dia. Os ácidos biliares primários são conjugados com a glicina e penetram nos canalículos biliares (*Wilkvall, 1990*). Após atingir o intestino delgado, exercem um papel ativo na absorção do colesterol e lipídios (*Stravitz et al., 1993*).

I.3. Absorção intestinal dos lipídios

Para o organismo fazer uso dos lipídios da dieta, estes necessitam primeiro, ser absorvidos do intestino delgado. Como, essas moléculas são

apolares, são essencialmente insolúveis no ambiente aquoso do intestino. Para absorção do lúmen para as células da mucosa, os lipídios devem ultrapassar duas barreiras funcionais, a camada hidrofílica e a membrana em escova do intestino (*Thomson et al., 1993*). A entrada de produtos lipídicos na membrana em escova pode ocorrer por um processo passivo, de baixo gradiente (*Zakim, 1996*) ou ser carregado por proteínas ligadoras associadas à membrana (*Stremmel et al., 1992*).

No processo de digestão das gorduras da dieta, lipases pancreáticas (lipase e fosfolipase A₂) são secretadas pelo pâncreas (*Carrier et al., 1993*). Neste processo são gerados ácidos graxos livres e uma mistura de mono e diglicerídios da dieta (*Marleen et al., 1998*). Lipases pancreáticas degradam os triacilgliceróis nas posições 1 e 3 sequencialmente, para gerar 1,2 diacilglicerídios e 2 monoacilgliceróis. Os produtos das lipases pancreáticas são difundidos para dentro das células epiteliais intestinais, onde ocorre a re-síntese dos triacilgliceróis (*Lehner, 1995*).

Os triacilgliceróis e o colesterol da dieta e aquele sintetizado pelo fígado são solubilizados em complexos lipídios-proteínas. Esses complexos contêm gotículas lipídicas de triacilgliceróis e ésteres de colesterol envolvidos por fosfolipídios polares e proteínas identificadas como apolipoproteínas (*Mahley et al., 1984*). Estes complexos variam no conteúdo de lipídios e proteínas, e são chamados de lipoproteínas. Na figura 1, podemos observar um desenho esquemático de uma lipoproteína.

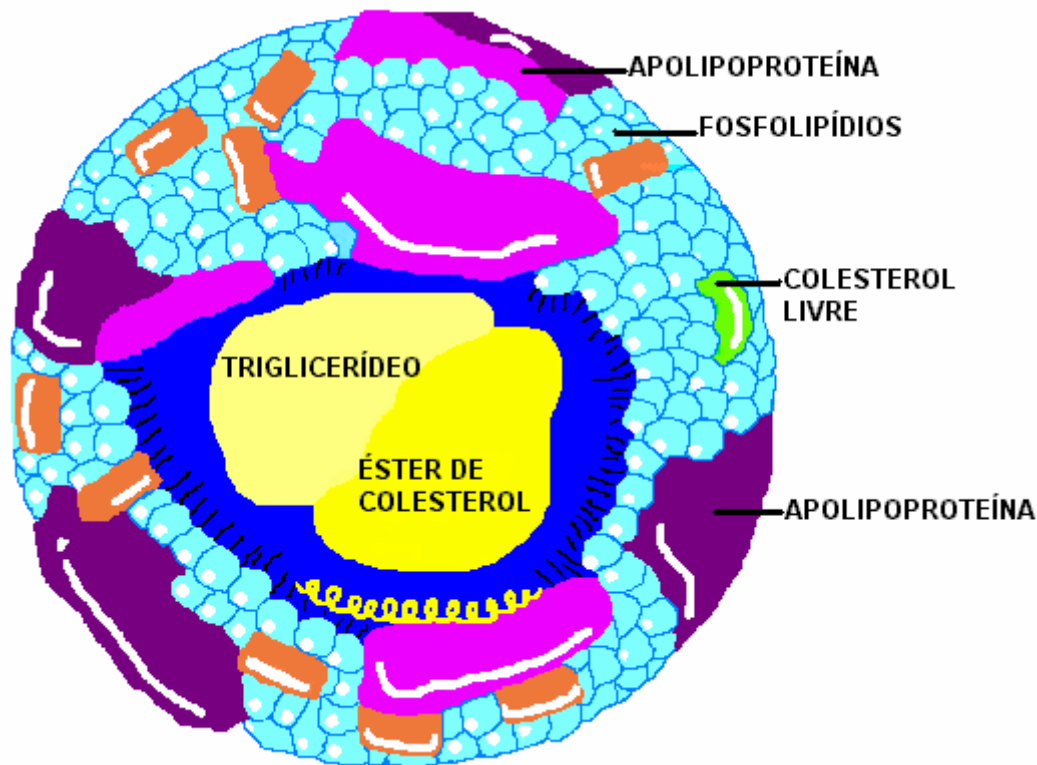


Figura 1. Esquema ilustrativo da lipoproteína.

I.4. Metabolismo das Lipoproteínas

Os lipídios são transportados por uma série de lipoproteínas.

As lipoproteínas (*Quilomicra*, *HDL-Lipoproteína de alta densidade*, *LDL-Lipoproteína de baixa densidade*, *IDL-Lipoproteína de densidade intermediária*, *VLDL-Lipoproteína de muito baixa densidade*) são partículas esféricas constituídas por um núcleo de lipídios neutros não polares (ésteres de colesterol e triacilgliceróis), envolvidos por substâncias relativamente polares (fosfolípidios, colesterol livre e proteínas).

As funções fisiológicas das lipoproteínas envolvem uma série de processos metabólicos, nos quais ocorrem continuamente alterações e trocas entre as várias lipoproteínas, sendo referido como a cascata das lipoproteínas.

Segundo *Waitzberg (2002)*, o metabolismo das lipoproteínas é extremamente complexo e inclui várias etapas importantes: 1) síntese de apolipoproteínas e sua modificação intracelular e secreção, 2) modificação extracelular de apolipoproteínas e lipoproteínas, 3) hidrólise de triacilgliceróis e fosfolipídios pelas enzimas lipase-lipoprotêica (LPL) e lipase-hepática (HL), 4) transporte reverso de colesterol das células às lipoproteínas e 5) esterificação do colesterol pela enzima lecitina colesterol acil transferase (LCAT).

I.4.1. Quilomicra

As quilomicra são sintetizadas na mucosa intestinal como forma de transporte dos triacilgliceróis e do colesterol exógeno para o resto do organismo. Quilomicra são, portanto, as partículas formadas para transporte dos lipídios exógenos (*Shiau et al.,1985*). Os lipídios predominantes nas quilomicra são os triacilgliceróis (Tabela 1). As apolipoproteínas que predominam antes da entrada das quilomicra nascente na circulação sanguínea são: apo B-48, apo A-I, apo A-II e apo-IV (*Gordon,1997*).

As quilomicra deixam o intestino via sistema linfático e entram na circulação através da veia subclávica esquerda (*Hussain et al.,1996*). Na corrente sanguínea, as quilomicra adquirem a apo C-II e a apo E das HDLs plasmáticas.

Tabela 1. Comparação dos Complexos Lipoprotéicos.

Complexo	Fonte	d (g/mL)	% Prot	% TG	% PL	% CE	% C	% FFA
Quilomicra	Intestino	< 0.95	1-2	85-88	8	3	1	0
VLDL	Fígado	0.95-1.006	7-10	50-55	18-20	12-15	8-10	1
IDL	VLDL	1.006-1.019	10-12	25-30	25-27	32-35	8-10	1
LDL	VLDL	1.019-1.063	20-22	10-15	20-28	37-48	8-10	1
* HDL ₂	Quilomicra VLDL	1.063-1.125	33-35	5-15	32-43	20-30	5-10	0
* HDL ₃	Quilomicra VLDL	1.125-1.210	55-57	3-13	26-46	15-30	2-6	6
Albumina	Tecido adiposo	> 1.281	99	0	0	0	0	100

Prot - Proteínas; TG - Triacilgliceróis; PL - Fosfolipídios; CE - Ésteres de colesterol; C – Colesterol livre; FFA – Ácido graxo livre.

* HDL₂ e HDL₃ são derivados do HDL nascente, resultado da aquisição de ésteres de colesterol

Fonte: Adaptado de Waitzberg, R,W,: Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica 2002, p 57.

Nos capilares do tecido adiposo e músculos, os ácidos graxos são removidos dos triacilgliceróis pela ação da lipoproteína lipase (LPL), a qual se encontra na superfície das células endoteliais dos capilares. Sob condições fisiológicas normais, as quilomicra são rapidamente hidrolisadas e reduzidas significativamente de tamanho: 40nm a 70 nm (*Mamo, 1995*). A apo C-II ativa a LPL na presença de fosfolipídios. Os ácidos graxos são então absorvidos pelos tecidos e o esqueleto de glicerol dos triacilgliceróis retorna, via corrente sangüínea, para o fígado e rins. O glicerol é convertido à diidroxiacetona fosfato, um intermediário da via glicolítica. Durante a remoção dos ácidos graxos, uma porção substancial de fosfolipídios, apo A e apo C é transferida para as HDLs. A perda da apo C-II previne as quilomicra remanescentes de futura degradação pela LPL. (*Olivecrona et al., 1997*)

As quilomicra remanescentes, contendo principalmente colesterol, apo E e apo B-48, são entregues e utilizadas pelo fígado através do reconhecimento

dos receptores da célula hepática à apo E. Um esquema do metabolismo das quilomicra é demonstrado na figura 2. A função das quilomicra resume-se, portanto, na entrega dos triacilgliceróis exógenos para o tecido adiposo e músculos, e do colesterol ao fígado (Marleen et al.,1998). Um esquema do metabolismo das quilomicras é demonstrado na figura 2.

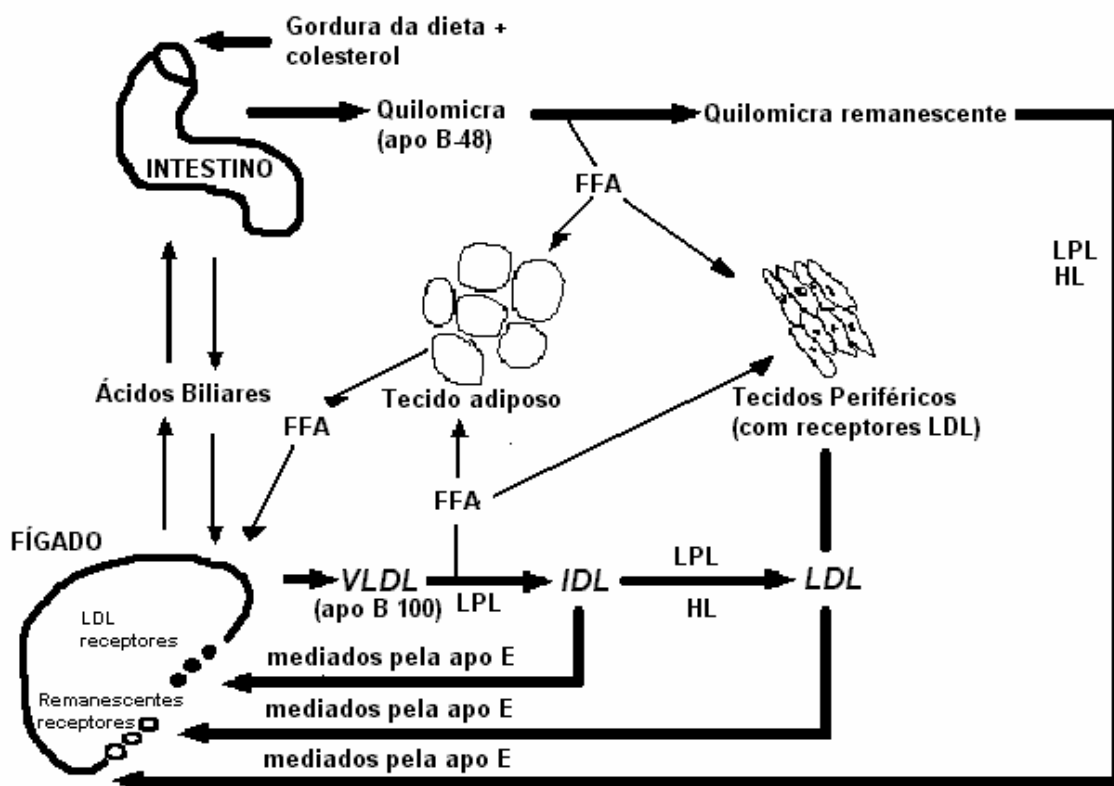


Figura 2. Esquema demonstrando os principais caminhos envolvendo o metabolismo das quilomicra pelo intestino e síntese de VLDL pelo fígado

FFA - ácido graxo livre; LPL - lipoproteína lipase; HL - lipase hepática Fonte: Adaptado de Mahley, R,W,: Biochemistry and physiology of lipid and lipoprotein metabolism 1995, p 1369

I.4.2 VLDL

A ingestão de uma dieta rica em gorduras e carboidratos, necessários pela demanda do organismo, leva à conversão dos mesmos em triacilgliceróis

no fígado. Esses triacilgliceróis são empacotados e liberados na circulação e entregues a vários tecidos (principalmente músculos e tecido adiposo) para armazenamento ou produção de energia através da β -oxidação mitocondrial e peroxissomal.

Em adição aos triacilgliceróis, as VLDLs contém colesterol, ésteres de colesterol e apolipoproteínas (B-100, C-I, C-II, C-III e E). Como as quilomicra, as VLDLs adquirem apo C e apo E das HDLs plasmáticas. A porção do ácido graxo das VLDLs é liberada ao tecido adiposo e músculos da mesma maneira que as quilomicra, através da LPL. A ação da LPL unida à perda de certas apolipoproteínas (C) converte a VLDL a IDL, também denominada de VLDL remanescente. (*Hu et al. 2008*)

A VLDL é, portanto, a partícula formada para transportar principalmente o triglicerídio endógeno para as tecidos extra-hepáticos. Um esquema do metabolismo das VLDL é demonstrado na figura 2.

I.4.3 IDL

As IDLs são formadas pela perda de triacilgliceróis das VLDLs. O destino da IDL é a conversão em LDL ou absorção direta pelo fígado. A IDL é convertida a LDL pela remoção de triacilgliceróis. O fígado utiliza a IDL após a interação com receptores de LDL formando complexos, os quais sofrem endocitose pela célula. Para os receptores hepáticos da LDL reconhecerem a IDL é requerido a presença de ambas as apo B-100 e apo E. (*Zulewski et al, 1998*)

I.4.4 LDL

As LDLs são as principais carreadoras plasmáticas de colesterol a todos os tecidos.

As LDLs são absorvidas pelas células via receptores de LDL (Apo E). A absorção da LDL ocorre predominantemente no fígado (75%), glândulas adrenais e tecido adiposo. Como nas IDLs, as LDLs interagem com os receptores da LDL requerendo a presença da apo B-100, a apolipoproteína exclusiva da LDL. As vesículas da membrana endocíticas (endossomo) fundem-se com os lisossomos, pela quais as apolipoproteínas são degradadas e os ésteres de colesterol são hidrolizados para formar colesterol livre. O colesterol é então incorporado nas membranas plasmáticas dependendo da necessidade (*Schneider, 1993*). Excesso de colesterol intracelular é reesterificado pela acil-CoA colesterol acil transferase (ACAT) para armazenamento intracelular. A ACAT, é uma enzima intracelular que catalisa a formação de ésteres de colesterol a partir de colesterol e ácidos graxos de cadeia longa (*Chang et al., 1997; Burnett et al., 1999*) e a sua atividade está aumentada na presença de colesterol intracelular. Os receptores de LDL voltam para a membrana plasmática.

I.4.4.1 Subfrações da LDL

Foram identificadas por ultracentrifugação e por eletroforese seis principais subclasses da lipoproteína LDL.

-Padrão A: São as duas maiores e menos densas das seis subclasses da LDL (*McNamara et al., 1992*).

-Padrão B: São as duas menores e mais densas das subclasses, sendo denominadas como as mais aterogênicas das subclasses da LDL (*Austin et al., 1994, Krauss, 1995*).

-Padrão AB: São formadas por partículas de tamanho e densidade intermediária às duas anteriores.

A conversão da LDL densa (padrão B) para a menos densa (padrão A) justifica uma regressão de 50% na aterosclerose (*Gardner et al., 1996*). A LDL densa é um fator de risco para doenças cardiovasculares, mesmo em pacientes que possuem níveis normais de colesterol.

I.4.4.2 Receptores da LDL

O receptor da LDL é uma proteína da superfície celular que regula o transporte do colesterol plasmático, por absorção das partículas de LDL da corrente circulatória (*Smilde et al., 2001*). A absorção de colesterol da LDL ocorre devido à interação da LDL com seus receptores (também chamado de receptor apo B-100/apo E) (*Yamamoto, 1996*). A apo B-100, presente na LDL, é necessária para a interação, lipoproteína-receptor.

O receptor é um polipeptídeo de 839 aminoácidos que atravessa a membrana plasmática. Um sítio extracelular é responsável pela ligação entre a apo B-100/apo E. O sítio intracelular é responsável pelo agrupamento dos receptores da LDL em regiões da membrana plasmática denominadas “coated pit” (regiões revestidas com clatrina) Esses “poços” invaginam para dentro da células com a finalidade de originar vesículas revestidas, sendo que a fusão dessas origina o endossomo. Uma vez a LDL ligada ao receptor, o complexo é rapidamente internalizado. A bomba de próton dependente de ATP diminui o

pH dos endossomos, o que resulta na dissociação da LDL do receptor. O colesterol sob a forma de LDL é liberado e entregue a um lisossomo e assim, libera o colesterol livre ao citoplasma para ser utilizado. Já o receptor é reciclado e retorna a superfície da membrana. Hidrolases ácidas dos lisossomos degradam as apolipoproteínas liberando ácidos graxos e colesterol. O colesterol livre é tanto incorporado à membrana plasmática ou esterificada (pela ACAT) e armazenado na célula. (*Defesche 1994*)

O nível de colesterol intracelular é regulado pela supressão da síntese de receptores da LDL e da síntese de colesterol endógeno, ambas inibidas por excesso de colesterol. O aumento do nível intracelular do colesterol resultado da absorção de LDL possui efeito de ativação da ACAT, assim permitindo o armazenamento de colesterol nas células. Porém, o efeito na diminuição da síntese de receptores da LDL causa um declínio na taxa de remoção da LDL e IDL da circulação. Isto pode levar a um aumento dos níveis plasmáticos de colesterol e ésteres de colesterol. O excesso de colesterol tende a ser depositado na pele, tendões e mais gravemente nas artérias, levando a aterosclerose. (*Freeman et al. 2005*).

Um defeito nos genes que codificam o receptor da LDL resulta em uma remoção prejudicada de lipoproteínas contendo apo B da circulação, aumentando as concentrações de LDL (*Smilde et al., 2001*).

I.4.5. HDL

A HDL é sintetizada *de novo* no fígado e intestino delgado. Essas HDLs nascentes são praticamente destituídas de colesterol e ésteres de colesterol. As principais apolipoproteínas da HDL são: A-I, C-I, C-II e E (*Rader, 1996*). De

fato, a maior função da HDL é atuar como estoque circulante de apo C-I, C-II e E.

As HDLs são convertidas em partículas esféricas pela acumulação de ésteres de colesterol. Esta acumulação converte a HDL nascente em HDL₂ e HDL₃. Qualquer presença de colesterol livre nas quilomocras e VLDL remanescentes (IDL), pode ser esterificado pela ação de uma enzima associada a HDL, a LCAT. A LCAT é sintetizada no fígado e assim chamada devido à transferência de ácido graxo da posição C-2 da lecitina para o C-3-OH do colesterol, gerando o éster de colesterol e a liolecitina. A atividade da LCAT requer interação com a apo A-I, a qual é encontrada na superfície da HDL. (Zannis *et al.*, 2008)

A HDL rica em colesterol retorna ao fígado, onde é endocitada. A absorção hepática da HDL, pode ser mediada através de um receptor da apo A-I específico da HDL ou através de interações entre os lipídios. Os macrófagos também absorvem a HDL por interações entre receptores da apo A-I, podendo a HDL adquirir colesterol e apo E destas células. (Wang *et al.*, 2007) A adição de apo E na HDL leva a um aumento na sua absorção e catabolismo pelo fígado.

Os ésteres de colesterol da HDL também podem ser transferidos para a VLDL e LDL pela ação da enzima CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol) (Tall, 1995). Esta proteína permite que o excesso de colesterol celular retorne ao fígado através de receptores da LDL e da HDL (Bagdade *et al.*, 1991).

I.4.5.1. Subclasses da HDL

A lipoproteína HDL compreende quatro subclasses variando em tamanho e composição, e a existência dessas várias partículas está relacionada a um sistema de transporte lipídico organizado que representa o remodelamento e provável reciclagem das macromoléculas em resposta a ação de enzimas lipolíticas e proteínas transferidoras de lipídios (*Fidge, 1999*).

As duas maiores subclasses que compõem a HDL foram identificadas por ultracentrifugação:

-HDL₂: Esta é a maior e mais leve das duas subclasses da HDL, é a que protege mais contra riscos para doenças coronarianas (*Franceschini et al., 1987; Lamarche et al., 1997*).

-HDL₃: Esta é a menor e mais densa e protege menos o organismo quando comparado a HDL₂ (*Drexel et al., 1992*).

Outras subclasses foram identificadas por eletroforese. Estão relacionadas em ordem de aumento de densidade e diminuição no tamanho: HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a} e HDL_{3c}. (*Jia et al., 2007; Yan et al., 2004; Xu et al., 2003*)

I.4.5.2 Transporte reverso do colesterol

As HDLs nascentes captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos, formando as HDL maduras. Estas levam o colesterol para o fígado por duas vias: diretamente ou transferindo os ésteres de colesterol para outras lipoproteínas (principalmente as VLDL). Uma vez no fígado, o colesterol proveniente dos tecidos pode ser reaproveitado, participando de outras vias metabólicas, ou excretado na bile, neste caso, com reabsorção de cerca de dois terços do mesmo (ciclo êntero-hepático).

Resumidamente *Brites et al. (2000)* demonstraram quatro principais caminhos mais relevantes no transporte reverso do colesterol; (1) efluxo do colesterol livre das células extrahepáticas, (2) esterificação do colesterol livre pela LCAT, (3) transferência dos ésteres de colesterol sintetizados pela HDL para lipoproteínas contendo apo B e troca com os triacilgliceróis, transportado pela CETP e (4) absorção hepática dos ésteres de colesterol formados. (*Wang et al., 2007*).

I.5. Apolipoproteínas

Associadas às lipoproteínas, há o componente protéico chamado de apolipoproteínas (apo). Estas se classificam em cinco grupos principais e numerosos subgrupos. São eles: apo A (A-I, A-II e A-IV), apo B (B-100 e B-48), apo C (C-I, C-II e C-III), apo D e apo E (*Kastelein et al., 2008*).

Os principais grupos e subgrupos diferem em suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, no comportamento físico-químico, em sua função e distribuição nas várias formas de lipoproteínas (tabela 2), bem como seus níveis no plasma. Cada uma destas etapas envolve uma ação coordenada por várias proteínas. Assim, qualquer mutação em uma destas proteínas pode resultar em padrões lipoprotéicos anormais e contribuir para o aparecimento de doenças, como arterosclerose.

I.5.1. Apolipoproteína A

As apolipoproteínas A constituem as principais proteínas encontradas na HDL. Os genes que codificam a apo A-I, A-II, A-IV estão localizados no braço longo do cromossomo 10 e 11. (*Birchbauer et al. 1993*).

A síntese da apo A-I é predominantemente hepática e intestinal, atua estimulando o efluxo de colesterol das células periféricas e fornecendo substrato para ação da LCAT. Ela está envolvida na transformação de HDL nascente em maduro. Vários estudos epidemiológicos e clínicos revelaram uma associação entre os baixos níveis de HDL e apo A-I e o aumento de infarto do miocárdio (*Kazumi et al., 1997*).

A apo A-II é exclusivamente sintetizada no fígado. As funções propostas para a apo A-II em relação à ativação da LPL e inibição da LCAT ainda estão para serem confirmadas (*Mietus-Snyder et al., 1990*).

A apo A-IV é um constituinte da quilomicra e sua síntese é controlada por fatores hormonais (insulina) e nutricionais (gorduras).

Tabela 2. Classificação das Apolipoproteínas

Apolipoproteína	Peso molecular (DA)	Associações	Funções e comentários
Apo A-I	29.016	Quilomicra, HDL	Maior proteína da HDL Ativa a LCAT
Apo A-II	17.400	Quilomicra, HDL	Principalmente na HDL Aumenta a atividade da HL
Apo A-IV	46.000	Quilomicra, HDL	Presentes em lipoproteínas ricas em triacilgliceróis
Apo B-48	241.000	Quilomicra	Exclusivamente encontrada nas Quilomicra
Apo B-100	513.000	VLDL, IDL, LDL	Maior proteína da LDL Liga-se a receptores da LDL
Apo C-I	7.600	Quilomicra, VLDL, IDL, HDL	Pode também ativar a LCAT
Apo C-II	8.916	Quilomicra, VLDL, IDL, HDL	Ativação da LPL
Apo C-III	8.750	Quilomicra, VLDL, IDL, HDL	Inibição da LPL
Apo D	33.000	HDL	Estreitamente associada com LCAT
Apo E	34.000	Quilomicra remanescente, VLDL, IDL, HDL	Ligação aos receptores da LDL

Fonte : Adaptado de *Lima et al., 2006*.

I.5.2. Apolipoproteína B

A apo B é a principal porção protéica em todas as lipoproteínas diferentes da HDL. O gene que codifica os dois subgrupos de apo B está localizado no cromossomo 2 (*Teng et al., 1990*).

A apo B-100 faz parte das lipoproteínas hepáticas (VLDL, IDL e LDL), sendo expressa e secretada pelos hepatócitos. (*Cladaras et al., 1986*).

A apo B-48, sintetizada pelas células intestinais é um importante componente para secretar a quilomicra, sendo a apo B-48 exclusivamente encontrada nesta lipoproteína.

I.5.3. Apolipoproteína C

O fígado é o principal local para a síntese dessas apolipoproteínas. O gene que as codifica está localizado no cromossomo 19 (*Das et al., 1987*).

A apo C-I é o componente principal da VLDL, sendo capaz de ativar moderadamente a LCAT. (*Cucuianu et al., 2007*)

A apo C-II é um cofator da LPL extra-hepática, a enzima responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis das VLDL e quilomicra. Na ausência de apo C-II, a atividade da LPL é prejudicada. (*Talmud 2001*).

A apo C-III é componente da quilomicra e da VLDL, e é capaz de inibir a LPL (*Jeanpierre et al., 1984*).

I.5.3.1 Apolipoproteína CIII

A apo CIII é componente da quilomicra e da VLDL e está presente em pequena quantidade na HDL, LDL e IDL, sendo o fígado o principal local de síntese e, em menor grau, o intestino. No plasma normal a apo CIII apresenta três isoformas (apo CIII-0, apo CIII-1 e apo CIII-2) (*Harake et al., 1991*), que diferem entre si pelo número de ligações dos ácidos siálicos. A apo CIII, *in vitro*, é capaz de inibir as lípases lipoprotéica e hepática. (*McConathy et al., 1992*)

I.5.3.1.1 Mutações da Apolipoproteína CIII

No ser humano, há duas condições caracterizadas por deficiência severa de apo CIII e HDL plasmáticos, associadas com aterosclerose prematura: uma, resultado da deleção no loci do complexo apo AI-CIII-AIV (*Gao et al., 2005*); outra, da inversão apo AI-CIII (*Karathanasis et al., 1987*)

Alguns polimorfismos tem sido detectados em torno do gene da apo C-III, que está localizado no cromossomo 11, região q23.1-q23.2. O mais amplamente estudado é o polimorfismo SstI, devido a uma substituição de uma C por uma G, na posição do nucleotídeo 3238, na região 3' não traduzida do gene. Esta substituição gera dois alelos: C e G. O genótipo normal é CC, sendo considerados alterados o CG e GG.

Alelos variantes da região não codificante do gene da apo CIII (complexo AI-CIII-AIV) tem sido validados como marcadores genéticos de hipertrigliceridemia, inclusive em nosso meio, apesar do mecanismo desta associação permanecer um enigma.

I.5.4 Apolipoproteína D

Foi sugerido que a apo D possa funcionar como uma proteína de transferência, auxiliando no movimento de ésteres de colesterol e triacilgliceróis entre a VLDL e HDL. O gene que codifica a apo D está localizado no cromossomo 3 (*Drayna et al., 1987*).

I.5.5. Apolipoproteína E

O local de síntese primária da apo E é o fígado, em menor extensão o intestino e cérebro. O gene responsável pela sua síntese está localizado no cromossomo 19 (*Lin-Lue et al., 1985*).

A apo E, é incorporada na HDL nascente, sob a influência da LCAT (*Scott, 1985*). A HDL acumula colesterol, e a apo E é, então rapidamente transferida para a VLDL e para a quilomicra, onde permanece enquanto a lipoproteína é catabolizada para IDL ou quilomicra remanescente, respectivamente.

1.6. Deficiência da Lipoproteína Lipase (LPL)

A deficiência familiar da LPL é uma doença rara, estimada, na população, em 1:1.000.000 de indivíduos. É uma deficiência autosômica recessiva caracterizada pela acumulação excessiva de quilomicra no plasma, juntamente com aumento na concentração da VLDL. Esta doença manifesta-se na infância e se dá através de episódios de dores abdominais. Metade dos pacientes com esta deficiência apresenta xantomas eruptivos na pele devido a presença de quilomicronemia (*Scriver et al., 2001*).

A LPL está presente nas células endoteliais vasculares dos tecidos extra-hepáticos e é essencial para a hidrólise das quilomicra e VLDL, produzindo ácidos graxos que serão utilizados, pelos tecidos, como energia.

I.7. Doença inflamatória - Aterosclerose

Aterosclerose é um doença inflamatória, que não está relacionada somente com a acumulação de lipídios nas paredes arteriais (*Ross, 1999*).

As lesões da aterosclerose representam uma série de respostas específicas celulares e moleculares (Ross,1993) e as lesões ocorrem principalmente nas artérias.

O primeiro passo da aterosclerose é a disfunção endotelial, tendo como causa possível, o aumento do LDL-colesterol, radicais livres, hipertensão, alterações genéticas, entre outras.

A disfunção endotelial, resultado de danos, leva a respostas compensatórias que alteram as propriedades homeostáticas normais. Deste modo, as diferentes formas de dano aumentam a aderência ao endotélio de leucócitos e plaquetas, alterando a permeabilidade do mesmo. O dano induz também propriedades procoagulantes ao invés de anticoagulantes, e formação de moléculas vasoativas, citocinas e fatores de crescimento. Se não houver resposta ao processo inflamatório que neutralize ou remova os agentes agressores, o processo pode continuar indefinidamente. Ao contrário, a resposta estimula a migração e proliferação de células musculares lisas que interagem com a área inflamada, formando uma lesão intermediária. Não havendo combate ao processo, poderá haver engrossamento da parede arterial, sendo compensado por uma dilatação gradual. A resposta é mediada por monócitos e linfócitos T específicos em todas as fases da doença, migrando do sangue para a lesão.

Deste modo, a acumulação de células mononucleares, leva a um alargamento e reestruturação da lesão, tornando-a recoberta por uma camada fibrosa, que consiste de um núcleo lipídico e tecido necrosado. Em certo ponto, a parede arterial dilatada altera o fluxo sanguíneo.

A maior causa de dano ao endotélio, é a modificação da lipoproteína LDL por oxidação, glicação, agregação ou incorporação a imunocomplexos (Navab et al. 1996).

Quando as partículas de LDL são capturadas pela artéria, elas podem sofrer progressiva oxidação e serem internalizadas por macrófagos através de receptores na superfície destas células (Steinberg, 1997). A internalização leva à formação de peróxidos de lipídios facilitando a acumulação de ésteres de colesterol, resultando em células “espumosas” (Griendling & Alexander, 1997).

I.8. Significado clínico das dosagens referidas neste trabalho

I.8.1. Triacilgliceróis

A determinação dos triacilgliceróis ocupa lugar de destaque porque é um dado importante e necessário para a classificação e fenotipagem das hiperlipoproteinemias (Patsch et al., 1992). A elevação dos níveis de triacilgliceróis pode estar relacionada a várias doenças chamadas hiperlipidemias, sendo de causa primária ou secundária. Os principais fenótipos descritos por Fredrickson (1964), que relacionam uma elevação nos triacilgliceróis são os tipos I, IIb, III, IV e V.

I.8.2. Colesterol-total

O grande dilema da arteriosclerose é que ela é um processo assintomático. Está ativa em todos os indivíduos e permanece sem qualquer manifestação por décadas. Estudos demonstraram uma correlação positiva

entre os níveis de colesterol, mais especificamente do LDL-colesterol e o risco de doença arterial coronariana (*Castelli et al., 1986; Giannini, 1989*). Ao mesmo tempo foi evidenciado que os níveis de HDL-colesterol, são inversamente proporcionais ao risco de doença arterial coronariana (DAC).

I.8.3. HDL-colesterol

A HDL-colesterol tem um efeito protetor contra a prevalência da DAC (*Kalofoutis et al., 1999*). Estudos demonstram que os níveis são inversamente proporcionais à prevalência da DAC. Baixos níveis de HDL-colesterol é um forte fator de risco para DAC (*Castelli et al., 1986; Jacobs et al., 1990*).

I.8.4. LDL-colesterol

A LDL-colesterol está envolvida no transporte do colesterol para as células periféricas. Ela contribui para a formação de placas ateroscleróticas e está fortemente associada com a DAC (*Austin et al., 2000*).

I.9. Valores referenciais dos exames

Cada dosagem possui um valor referencial dentro dos quais os mesmos são considerados normais ou alterados. Esses valores são preconizados pela Organização Mundial da Saúde sendo os mesmos adotados neste trabalho.

Na tabela 3, apresentamos os valores referenciais para cada exame.

Tabela 3. Valores referenciais das dosagens referidas neste trabalho, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)

	VALORES REFERENCIAIS (mg/dL)
Triacilgliceróis	Normal: abaixo de 200 Limítrofe: de 201 a 500 Elevado: acima de 501
Colesterol total	Normal: abaixo de 200 Limítrofe: de 201 a 239 Elevado: acima de 240
HDL-colesterol	Normal: acima de 35
VLDL-colesterol	Normal: abaixo de 40
LDL-colesterol	Normal: abaixo de 130 Limítrofe: de 131 a 159 Elevado: acima de 160

I.10. Significado clínico das alterações no metabolismo lipoprotéico

Existem erros inatos do metabolismo que podem levar a hiper ou hipolipoproteinemias. Uma classificação atual destas dislipoproteinemias é mostrada nas tabelas 4 e 5.

A classificação destes distúrbios baseia-se em Fredrickson (1964) e no NHLBI (National Heart, Lung and Blood Institute).

Tabela 4. Classificação das Hiperlipoproteinemias

Lipoproteína (Aumento)	Aspecto do Plasma *	Colesterol Total	Triglicerídio	LDL	HDL	Apolipoproteína	Eletroforese Lipoproteína	Fenótipo**
Quilomicra	Camada cremosa, infranadante límpido ou levemente turvo	Normal a moderadamente elevado	Pronunciadamente elevado	Normal	Normal a diminuído	↑ B-48 ↑ A-IV ↓↑ C-II	Faixa intensa na origem	Tipo I
LDL	Límpido, possível aumento de tom amarelo – alaranjado	Geralmente elevado	Normal	Elevado	Normal a diminuído	↑ B-100	Faixa β aumentada	Tipo IIA
LDL, VLDL	Límpido a levemente Turvo	Elevado	Elevado	Elevado	Normal a diminuído	↑ B-100	Faixa β e pré-β aumentadas	Tipo IIB
IDL	Turvo a opaco	Elevado	Elevado	Normal a diminuído	Normal a diminuído	↑ E-II ↓ E-III ↓↓ E-IV	Faixa β larga	Tipo III
VLDL	Turvo a opaco	Normal a levemente elevado	Moderado a pronunciadamente elevado	Normal	Normal a diminuído	↑↓ C-II ↑ B-100	Faixa pré-β aumentada	Tipo IV
VLDL, Quilomicra	Camada cremosa, infranadante turvo a opaco	Leve a moderadamente elevado	Pronunciadamente elevado	Normal	Normal a diminuído	↑↓ C-II ↑ B-48 ↑ B-100	Faixa intensa na origem, faixa pré-β aumentada	Tipo V
HDL	Límpido	Normal a moderadamente elevado	Normal	Normal	Elevado	↑ A-I ↑ A-II	Faixa α aumentada	Hiperalfalipoproteinemia

* Após 16 horas a 4º C. ** Segundo Fredrickson (1964). ↑= aumento ↓=diminuição
Fonte: Adaptado de Burtis e Ashwood (1998).

Tabela 5. Classificação das Hipolipoproteinemias

Lipoproteína	Aspecto do Plasma *	Colesterol Total	Triglicerídio	LDL	HDL	Apolipoproteína	Eletroforese Lipoproteína	Fenótipo**
LDL	Límpido	Pronunciadamente diminuído	Diminuído	Ausente	Normal	↓↓ B-100	Faixa β ausente e pré-β diminuída	Abetalipoproteinemia
LDL	Límpido	Leve a pronunciadamente diminuído	Normal	Diminuído	Normal	↓ B-100	Faixa β diminuída	Hipobetalipoproteinemia
HDL	Límpido diminuído	Normal a	Normal	Normal	Ausente	↓↓↓ A-I ↓↓ A-II ?↓ C-III	Faixa α ausente	Analfalipoproteinemia
HDL	Límpido	Normal, diminuído ou aumentado	Normal a diminuído	Normal a aumentado	Diminuído	↓ A-I ↓↓ A-I	Faixa β ausente	Hipoalfalipoproteinemia

* Após 16 horas a 4° C. ** Segundo Fredrickson (1964). ↑= aumento ↓=diminuição
 Fonte: Adaptado de Burtis e Ashwood (1998).

I.11. Pesquisa do padrão lipídico na população japonesa

Parzianello et al. (2005) demonstraram a existência de níveis significativamente aumentados de TG em uma população de indivíduos japoneses residindo no sul do Brasil (Cascavel – PR). Foram analisados os hábitos alimentares destes indivíduos e os mesmos não influenciaram as concentrações plasmáticas dos TG. Indivíduos descendentes de japoneses possuíam um nível de TG plasmático significativamente maior que indivíduos não descendentes.

Yamada et al. (2007), pesquisaram em um estudo com japoneses residindo no Japão, polimorfismos na apo A-IV, apo C-III, apo A-I, apo E, ACAT e LPL e observaram que os polimorfismos da apo A-IV, apo C-III, Apo A-I e LPL são determinantes de hipertrigliceridemia e aqueles da Apo A-IV e apo E são determinantes de baixos níveis de HDL-colesterol e alto nível de LDL-colesterol, respectivamente. Já *Arai et al. (2005)*, associaram as baixas concentrações plasmáticas de HDL-colesterol e os níveis aumentados de TG com o polimorfismo da SstI da apo C-III em uma população de indivíduos japoneses.

Outro trabalho abordando o perfil lipídico de indivíduos descendentes de japoneses vivendo no Brasil, foi recentemente publicado por *Schwengel et al. (2007)*. Neste trabalho eles investigaram se imigrantes japoneses no Brasil e suas gerações subseqüentes mantêm a proteção associada com os altos níveis de HDL-colesterol. Seus resultados mostraram que os brasileiros descendentes de japoneses que vivem em São Paulo apresentam níveis mais baixos de HDL-colesterol quando comparado com descendentes de japoneses de outras regiões do Brasil e aqueles residindo no Japão.

II. JUSTIFICATIVA

II. Justificativa do Estudo

Após a observação das dosagens bioquímicas de colesterol total, triglicerídios, HDL-colesterol e LDL-colesterol em um grupo de descendentes de japoneses do estado do Paraná, sul do Brasil, constatamos que as mesmas, na maioria das vezes, encontravam-se fora dos limites dos referenciais preconizados pela NHLBI (National Heart, Lung and Blood Institute).

A dosagem bioquímica que se mostrava mais alterada era a dos níveis de triacilgliceróis.

Num primeiro trabalho (*Parzianello et al., 2005*), verificamos que indivíduos descendentes de japoneses possuíam níveis de triacilgliceróis significativamente aumentados quando comparados com aqueles dos não descendentes. Assim, optamos em continuar o estudo pesquisando uma das alterações que provavelmente está associada ao aumento de triacilgliceróis séricos.

Dessa maneira decidimos estudar o polimorfismo da apolipoproteína CIII em um grupo de indivíduos japoneses, para podermos associar este genótipo com níveis aumentados dos triacilgliceróis.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi demonstrar a relação entre os diferentes genótipos da apolipoproteína CIII e os níveis de colesterol total, triglicerídios, HDL-colesterol e LDL-colesterol em uma população de indivíduos descendentes de japoneses vivendo no sul do Brasil.

III.2. Objetivos específicos

Estabelecer os níveis de triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, para os três diferentes genótipos da apolipoproteína CIII: CC,CG, GG.

Comparar os níveis de triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol de indivíduos com ascendência japonesa e diferentes genótipos da apolipoproteína CIII, juntamente com dados da literatura, levando em consideração os níveis estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Demonstrar se há relação entre o genótipo GG e o aumento dos níveis de triacilgliceróis nesta população de indivíduos descendentes de japoneses.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1. Amostra

Para este trabalho foram utilizados 159 indivíduos descendentes de japoneses que possuíam níveis de glicose abaixo de 110 mg/dL e não possuíam aterosclerose ou doença coronariana conhecida. Estes indivíduos eram provenientes da cidade de Cascavel (PR).

Estes indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com os níveis de triacilgliceróis: 51 indivíduos descendentes de japoneses com níveis de triacilgliceróis acima de 200 mg/dL (HTG), e 108 indivíduos descendentes de japoneses com níveis de triacilgliceróis abaixo de 200 mg/dL (NTG). 51,6% eram do sexo feminino e 48,4% do sexo masculino. A média da pressão sistólica e diastólica (mmHG) no grupo HTG foi 143/85 e no grupo NTG foi 139/82.

IV.1.1. Coleta das Amostras

Ambos os grupos, foram contatados previamente sobre a necessidade de os mesmos estarem em jejum num período de 12 a 14 hs. As coletas foram realizadas entre as 7:00 e 9:00 h da manhã sob supervisão do doutorando, no laboratório Parzianello em Cascavel (PR).

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Científica de Pesquisa e Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os indivíduos que participaram desta pesquisa foram informados sobre o motivo pelo qual eles estariam doando material (sangue) e assinaram o termo de consentimento informado.

Foi coletado 20 ml de sangue, através de punção venosa. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 min e o soro armazenado em

recipientes adequados, sendo logo após congelado a -40° C para posterior análise. Além disso, 4,5 mL de sangue foram coletados em tubo de *vacutainer* com EDTA para extração de DNA através da técnica descrita por Miller *et al.* (1988).

IV.1.2 Análises das amostras

As amostras permaneceram 10 dias congelados a -40° C, sendo descongeladas um dia antes das análises laboratoriais.

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do HCPA nos aparelhos automatizados Cobas Mira (Roche) e Termociclador Térmico. Através do espectrofotômetro Cobas Mira, foram determinados os níveis de triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol. No aparelho de Termociclador foram realizadas as análises em PCR para os diferentes genótipos para apolipoproteína CIII e polimorfismo SstI.

IV.2 Métodos utilizados

IV.2.1 Dosagem de Triacilgliceróis

Este método foi desenvolvido de acordo com o preconizado pelo kit da Labtest-Diagnostica (2001). Baseia-se em um sistema enzimático com reação de ponto final, em amostras de soro. O glicerol liberado na hidrólise dos triacilgliceróis, catalisada pela lipase da lipoproteína é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento que ocorre entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e ESPAS é catalisada pela peroxidase produzindo a quinoneimina que tem

máximo de absorvância em 540 nm. A intensidade da cor violeta formada é diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra.

O reagente de cor é formado por uma solução tampão e enzimas; tampão 50 mmol/L, pH 6.5, acetato de magnésio 5 mmo/L, ESPAS 1 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,7 mmol/L, ATP 0,3 mmol/L, glicerolquinase > 800 U/l, glicerolfosfato > 2500 U/l, lipase de lipoproteína > 100 KU/l, peroxidase > 350 U/l e azida sódica 1,54 mmol/L.

As determinações segundo o esquema da figura 3 , foram realizadas no aparelho Cobas Mira.

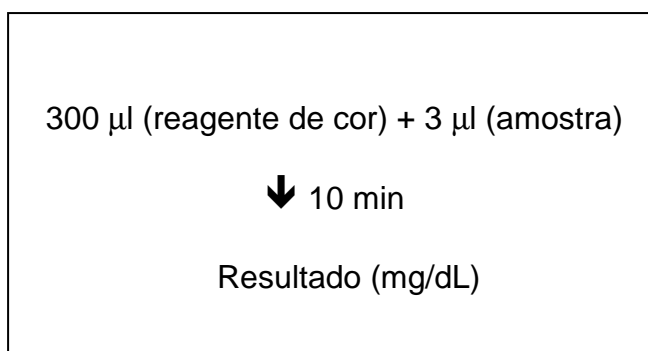


Figura 3. Esquema de reação para a dosagem de triacilgliceróis em aparelho Cobas Mira.

IVI.2.2. Dosagem de Colesterol total

A dosagem de colesterol total também se baseia em um sistema enzimático com reação de ponto final, em amostras de soro e foi desenvolvido como preconizado pelo kit da Labtest-Diagnostica (2001). Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-enona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o

fenol e a 4 aminoantipirina são oxidados formando antipirilquinonimina que tem absorção máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

O reagente de cor contém tampão 50 mmol, pH 7,0, fenol 24,0 mmol/L, colato de sódio 0,5 mmol/L, azida sódica 1,5 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, colesterol esterase > 250 U/l, colesterol oxidase > 150 U/l e peroxidase > 1000 U/L.

A dosagem do colesterol total, segundo o esquema da figura 4, foi realizada no aparelho Cobas Mira.

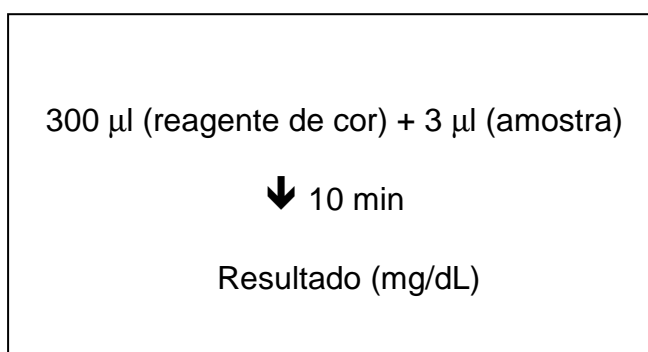


Figura 4. Esquema de reação para a dosagem de *colesterol total* em aparelho Cobas Mira.

IV.2.3. Dosagem de HDL- colesterol

Este método foi desenvolvido de acordo com o preconizado pelo kit da Labtest-Diagnóstica (2001). Constitui-se em um sistema homogêneo direto do HDL-colesterol no soro. Este sistema utiliza dois reagentes que possibilitam a dosagem seletiva do colesterol ligado à HDL. O primeiro reagente contém um

poliânion que forma complexos estáveis com a superfície da LDL, VLDL e Quilomicra. Por outro lado, os complexos formados com as partículas da HDL não permanecem estabilizados e se solubilizam por ação de um detergente, permitindo a reação com as enzimas presentes no segundo reagente. Como somente o colesterol HDL fica sujeito à ação das enzimas, a cor resultante da segunda reação é diretamente proporcional à concentração do colesterol HDL da amostra.

Os reagentes são formados por um poliânion e enzimas. O poliânion contém 3,4 mmol/L de tungstofosfato de sódio, 2 mmol de 4 aminoantipirina e 50 mmol/L de íons magnésio. As enzimas contêm 10 g/L de polioxietileno lauril éster, > 812 U/L de colesterol esterase, > 1000 U/l colesterol oxidase, > 4000 U/L de peroxidase e 1 mmol/L de N,N-bis (4-sulfobutil)- m toluidina.

As determinações, segundo o esquema da figura 5, foram realizadas no aparelho Cobas Mira.

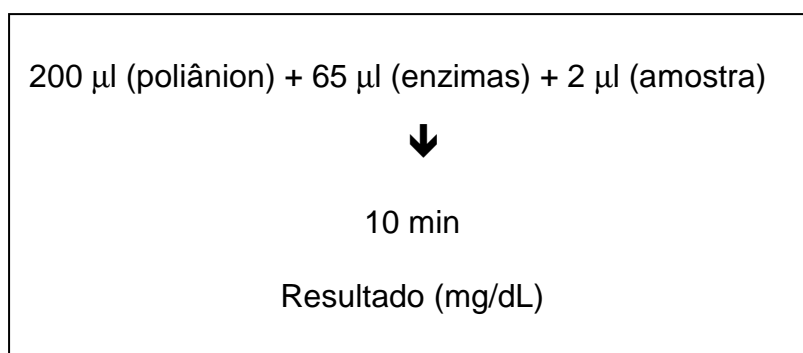


Figura 5. Esquema de reação para a dosagem de HDL-colesterol em aparelho Cobas Mira.

IV.2.4. Dosagem de LDL-colesterol

A determinação do LDL-colesterol baseia-se em um sistema de inibição seletiva direta no soro e foi desenvolvido como preconizado pelo kit da Diasys-Diagnostic Systems International (2001). É um método homogêneo sem centrifugação para a medição direta do LDL-colesterol. No primeiro passo, a LDL é seletivamente protegida (reagente 1), enquanto as lipoproteínas não LDL são enzimaticamente processadas. Num segundo passo (reagente 2), a LDL é liberada e seletivamente determinada por uma reação enzimática com produção de cor.

O reagente 1 contém 22 mmol/L de tampão, pH 6,8, > 2 kU/L de colesterol esterase, > 2 kU/L de colesterol oxidase, 0,43 mmol/L de N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina e > 400 kU/L de catalase. O reagente 2 é composto por 22 mmol/L de solução tampão, pH 7,0, 0,68 mmol de 4-aminoantipirina, > 3 kU/L de peroxidase e azida sódica.

O aparelho Cobas Mira foi utilizado para realizar as determinações, segundo o esquema da figura 6.

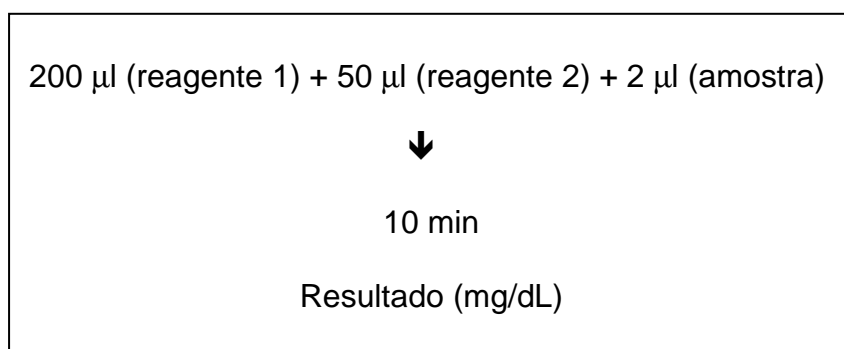


Figura 6. Esquema de reação para a dosagem de LDL-colesterol em aparelho Cobas Mira.

IV.2.5. Extração de DNA

A extração do DNA nuclear para a genotipagem do polimorfismo do gene APOC III foi realizada segundo a técnica descrita por Miller *et al.*, (1988). Foi realizada uma amplificação do DNA por técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) utilizando-se os *primers sense* e *antisense* 5´ GGT GAC CGA TGG CTT CAG TTC CCT GA 3´ e reverse 5´CAG AAG GTG GAT AGA GCG CTG GCC T 3´, respectivamente. A reação foi preparada com 2,0µL de DNA , 0,5 µL de cada *primer* em concentração de 40pmol, 1,0mM de MgCl₂ , 2,5 µL de DMSO, e 1U de *Taq* DNA polimerase, para um volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas a 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 1 minuto a 55°C e posteriormente a 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 40 segundos a 58°C e 40 segundos a 72°C.

A genotipagem foi realizada através da técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando-se 10 µL do produto de PCR, 5U da enzima de restrição *Sst*I em tampão específico, com incubação a 37°C, *overnight*. Os fragmentos oriundos da digestão foram visualizados em gel de agarose a 2% os quais foram classificados como alelo G, os que apresentaram um tamanho de 269 pares de base (pb) e 159 pb e como alelo C, os que apresentaram um tamanho de 428pb.

I.12. Análise estatística

Para detectarmos uma diferença significativa entre os grupos (descendentes japoneses e sem ascendência oriental), o nível de significância para os testes foi $p < 0,05$. O teste estatístico utilizado foi o de análise de

variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Turkey quando houvesse diferenças significativas.

V. CAPÍTULO 1

O artigo resultante deste capítulo foi aceito para publicação na revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research, em 30 de abril de 2008.

Apolipoprotein CIII polymorphism and triglyceride levels in a Japanese population living in Southern Brazil

Leandro Parzianello^{a,b}, Graziela de Oliveira^c, Janice C. Coelho^{a, d,*}

^a *Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

^b *Laboratório Parzianello, Cascavel, PR*

^c *Instituto de Geriatria, Hospital da PUC, RS, Brasil*

^d *Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.*

VI. DISCUSSÃO

Segundo *The International Committee for Evaluation of Hypertriglyceridemia* (1991), a hipertrigliceridemia é definida por níveis plasmáticos de TG acima de 200mg/dL. Embora as recomendações americanas (*NCEP-ATP III, 2001*) e européias (*Wood et al., 1998*) sugiram um limite para os níveis de TG de 200 mg/dL, *Miller et al. (1998)* preconizam que níveis acima de 100 mg/dL já possam estar associados a doenças cardiovasculares (DCV). Em nosso estudo, escolhemos os níveis descritos pelo 2º Congresso Brasileiro sobre Dislipidemias (1996) da Sociedade Brasileira de Cardiologia, o qual é adotado pela maioria dos laboratórios bioquímicos-clínicos e pelos médicos, para fins de diagnosticar, juntamente com os dados clínicos, as DCV.

Valores de TG acima de 200 mg/dL também são citados na literatura por vários autores como relacionados às DCV (*Criqui et al., 1993; Ginsberg et al., 1995; Jeppensen et al., 1998; Sakata et al., 1998*).

Não há na literatura muitos trabalhos comparando níveis de TG da população japonesa com aqueles de indivíduos ocidentais residindo no Brasil. Em 2005, nós publicamos o resultado de nosso primeiro trabalho com indivíduos japoneses e observamos que 18,7% dos indivíduos japoneses possuíam níveis de TG maiores que 200 mg/dL, e apenas em 8,4% dos indivíduos sem ascendência japonesa haviam concentrações acima deste nível (*Parzianello et al., 2005*). Este ano, *Schwingel et al. (2007)*, publicaram um trabalho onde comparam as concentrações de HDL-colesterol em indivíduos japoneses residentes no Brasil com aquelas de japoneses residentes no Japão. Eles concluíram que os brasileiros com ascendência japonesa possuem concentrações significativamente

menores de HDL-colesterol quando comparados com japoneses que vivem no Japão

Em 1996, *Namekata et al.*, compararam os níveis de TG em japoneses americanos com aqueles de trabalhadores japoneses do Japão e observaram que estes últimos possuíam níveis menores de TG bem como de colesterol total e maiores de HDL-colesterol que os primeiros. *Namekata et al. (1997)*, sugerem como explicação para esta diferença, o fato dos japoneses que vivem no Japão serem mais ativos fisicamente devido a vários fatores como: acesso limitado a automóveis, uso freqüente de transporte público e hábitos de caminhar nas áreas metropolitanas do Japão, assim como às modificações no hábito alimentar dos orientais quando de sua mudança para a América.

A Apo CIII fornece uma forte carga negativa na superfície das lipoproteínas prevenindo interações inespecíficas com células superficiais (*Shelburne et al., 1980*) e com outras lipoproteínas. Isso serve para reduzir ciclos inúteis no transporte dos TG, como interações com a lipoproteína lípase (LPL) ou, por exemplo, receptores específicos da superfície das células, como as vinculativas para Apo E ou Apo B.

As concentrações plasmáticas de Apo CIII estão correlacionadas com os níveis de TG (*Waterworth et a., 2000*). In vivo, a Apo CIII inibe a captação hepática de VLDL remanescentes (*Winder & Havel, 1985*).

A alteração genética causada pela deficiência da Apo CIII, causa um aumento de 6 a 7 vezes nos níveis plasmáticos do TG (*Ginsberg et al., 1986*). Segundo *Huang et al (2006)* o sistema fisiológico responsável pelo transporte dos TG é particularmente determinados pelas concentrações plasmáticas da Apo C III.

O gene que expressa a Apo CIII é controlado por elementos positivos e negativos que se encontram espalhados no braço curto do cromossomo 11 que agrega os genes da Apo AI-CIII-AIV (*Hubacek et al.,2001*)

No presente trabalho estudamos o polimorfismo “SstI” da apolipoproteína CIII. Foram analisados 159 indivíduos japoneses residentes no Sul do Brasil. A distribuição está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Focamos o nosso estudo na associação entre o polimorfismo SstI e os níveis plasmáticos dos TG.

A hipertrigliceridemia está associada com o aumento da LDL-colesterol, pelo enriquecimento desta LDL pelos TG vindos da VLDL (*Deckelbaum et al., 1982*). Além de comentar o mesmo que *Deckelbaum et al. (1982)*, *Jeppensen et al. (1998)*, acrescentam que o aumento dos níveis de TG está também associado a uma diminuição nos níveis de HDL-colesterol.

Os indivíduos da nossa amostra foram divididos em dois grupos. Os indivíduos que possuíam concentrações plasmáticas de TG menores ou iguais a 200 mg/dL foram denominados de NTG e aqueles com concentrações plasmáticas acima de 200 mg/dL de HTG.

A média de idade, pressão sanguínea e o índice de massa corporal entre os dois grupos foram praticamente semelhantes. Também podemos observar que não houve diferença significativa entre os níveis de glicose dos dois grupos.

Os níveis plasmáticos de TC, TG e VLDL-c no grupo HTG foram significativamente diferentes quando comparados com aqueles indivíduos do grupo NTG. Os níveis plasmáticos do HDL-c no grupo HTG foram estatisticamente menores daqueles do grupo NTG. Também podemos observar que as relações TG/HDL-c e TC/HDL-c são diferentes estatisticamente entre os dois grupos.

A hipertrigliceridemia está associada com aumento da LDL-colesterol, pelo enriquecimento desta LDL pelos TG vindos da VLDL (*Deckelbaum et al., 1982*). Além de comentar o mesmo que *Deckelbaum et al. (1982)*, *Jeppensen et al. (1998)*, acrescentam que o aumento dos níveis de TG plasmáticos está também associado a uma diminuição nos níveis de HDL-colesterol.

O *National Cholesterol Education Program (1993)* define que valores de HDL menores que 35 mg/dL são o principal fator de risco para doenças coronarianas e valores maiores que 60 mg/dL protegem contra as mesmas. Outros trabalhos também afirmam que níveis aumentados de HDL-colesterol estão relacionados inversamente com doenças cardiovasculares (*Ross, 1993; Sich et al., 1998*). A HDL possui propriedades anti-aterogênicas importantes, incluindo efeitos antioxidantes e capacidade em inibir agregação das lipoproteínas aterogênicas (*Zhong et al., 1996*). Observamos neste trabalho que indivíduos que possuíam níveis de TG mais altos, eram os mesmos que possuíam concentrações plasmáticas de HDL-c menores.

Arai et al. (2005) descrevem que pacientes hipertrigliceridêmicos frequentemente apresentam valores diminuídos de HDL-colesterol e *Kazumi et al. (1997)* afirmam que níveis de triacilgliceróis são significativamente maiores em indivíduos com concentrações mais baixas de HDL-colesterol.

Cullen et al. (2000) relatam que nem todos os níveis aumentados de VLDL são aterogênicos, devem-se levar em consideração as subfrações: a VLDL pequena (IDL) está relacionada com risco para DCV, e a VLDL nascente não está associada à DCV. A relação descrita acima, pode ser observada no nosso trabalho. As concentrações de VLDL nos indivíduos do grupo HTG foram

significativamente maiores que no grupo NTG. Os indivíduos com o alelo G foram os que obtiveram as maiores concentrações de VLDL.

Os indivíduos japoneses do grupo HTG, com a frequência genotípica GG possuíam as maiores concentrações plasmáticas de TG seguidos por aqueles que possuíam a frequência genotípica CG e CC (tabela 4 do artigo).

Foi verificada uma frequência significativamente maior do alelo G no grupo HTG (27,6%), quando comparado com o grupo NTG (9,3%). Estas associações já foram descritas em estudos com caucasianos (*Tybjaerg et al., 1993*), chineses (*Ko et al., 1997*), japoneses (morando no Japão) (*Bai et al., 1995*), coreanos (*Hong et al., 1997*) e indianos (*Chhabra et al., 2002*).

O presente estudo constatou a frequência do alelo G no grupo NTG e HTG de 0,347 e 0,559, respectivamente. A frequência do alelo G está em equilíbrio com os intervalos de populações como; chineses (0,30 - 0,43) , japoneses (0,25 - 0,48) e indianos (0,36), mas é mais elevado que em caucasianos (0,00 - 0,011) (*Dammerman et al., 1993*).

O significado clínico de possuir este alelo foi demonstrado em alguns estudos de casos-controles, que demonstraram aumento de 2 a 5 vezes na frequência em pacientes com doença coronariana prematura e doença vascular periférica, em comparação com o grupo controle (*O'Connor et al., 1988, Price et al. 1989*).

As bases bioquímicas para a associação entre o alelo G e a hipertrigliceridemia, ainda não esta bem elucidada. *Dallinga - Thie et al. (1996)* e *Shoulders et al. (1996)*, relataram uma associação entre níveis de Apo CIII e o alelo G. O polimorfismo SstI está localizado na região 3` do gene da Apo CIII,

portanto é mais provável que o alelo G não seja etiológico, mas esteja em desequilíbrio com outra causa desconhecida de mutação no gene da Apo CIII que determina os níveis de TG.

Foi sugerido que alguns haplótipos gerados através do polimorfismo SstI, podem proteger ou predispor à hipertrigliceridemia. Além disso, o polimorfismo SstI pode também influenciar a estabilidade do mRNA (*Hong et al., 1997*).

Neste estudo nós encontramos uma alta prevalência do alelo G da apolipoproteína CIII em indivíduos japoneses com concentrações plasmáticas de TG acima de 200 mg/dL. Este alelo G estava mais freqüente no nosso estudo quando comparados com caucasianos. Como a hipertrigliceridemia é considerado um fator de risco para doença cardiovascular, sugerimos que haja mais pesquisas relacionando o alelo G da apolipoproteína CIII e níveis de TG em outras populações.

VII. CONCLUSÕES

Estudando a população de indivíduos japoneses residentes no Paraná, região Sul do Brasil, podemos chegar as seguintes conclusões:

- Indivíduos com níveis de triacilgliceróis acima de 200 mg/dL possuem concentrações plasmáticas de colesterol total, VLDL-colesterol e relações TG/HDL-c e TC/HDL-c significativamente maiores que os indivíduos com níveis de triacilgliceróis menores ou iguais a 200 mg/dL.

- Indivíduos com níveis de triacilgliceróis acima da normalidade possuíam níveis de HDL-colesterol significativamente menores que os indivíduos sem esta alteração

- A freqüência do alelo C e G da apolipoproteína CIII foram 0.584 e 0.416, respectivamente.

- Observamos que indivíduos com a freqüência genotípica dos alelos GG da apolipoproteína CIII, estavam três vezes maior na população com níveis aumentados de triacilgliceróis que aqueles com níveis normais.

- Os indivíduos com níveis normais de triacilgliceróis, possuíam freqüência do alelo C duas vezes maior que aqueles com níveis aumentados de triacilgliceróis.

- Quando analisados os indivíduos hipertrigliceridêmicos, observamos que aqueles com a frequência genotípica GG foram os indivíduos que possuíam as maiores concentrações plasmáticas de colesterol total, VLDL-colesterol, seguidos dos alelos CG e CC.
- Observamos uma significativa relação entre os níveis aumentados de triacilgliceróis e o alelo G da apolipoproteína CIII.
- Sugerimos que seja feita a pesquisa do genótipo GG, para os indivíduos de origem japonesa com níveis de triacilgliceróis acima da normalidade (200 mg/dL).

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson AJ, Sobocinski KA, Freedman DS, Barboriak JJ, Rimm AA, Gruchow HW. **Body fat distribution, plasma lipids, and lipoproteins.** *Atherosclerosis* 1988, 8:88-94.

Austin MA, Rodriguez BL, Naknight B, Mcneely MJ, Edwards KL, Curb JD, Sharp DS. **Low-density lipoprotein particle size, triglyceride, and high-density lipoprotein cholesterol as risk factors for coronary heart disease in older Japanese American men.** *Am J Cardiol* 2000, 86:412-416.

Austin MA, et al. **Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodological approaches and clinical relevance.** *Curr Opin Lipidol* 1994,5(6):395-403.

Bai H, Saku K, Liu R, Imamura M, Arakawa K. **Association between coronary heart disease and the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV complex in a Japanese population.** *Hum Genet* 1995,95;102-104.

Bagdade JD, Ritter MC, Subbaiah PV. **Accelerated cholesteryl ester transfer in plasma of patients with hypercholesterolemia.** *J Clin Invest* 1991,87:1259-1265.

Berenson GS, Wattigney WA, Tracy RE. **Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factor in persons aged 6-30 years**

and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). Am J Cardiol 1992,70:851-858.

Birchbauer A, Knipping G, Juritsch B, Aschauer H, Zechner R. **Characterization of the apolipoprotein AI and CIII genes in the domestic pig.** Genomics 1993,15(3):643-652.

Brites FD, Bonavita CD, Cloes M, Yael MJ, Fruchart JC, Castro GR. **VLDL compositional changes and plasma levels of triglycerides and high density lipoprotein.** Clin Chim Acta 1998,269:107-124.

Brites FD, Bonavita CD, Geitere C, Cloes M, Delfly B, Yael MJ, Fruchart JC, Wikinski RW, Castro GR. **Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels.** Atherosclerosis 2000,152:181-192.

Buring JE, O'Corner GT, Goldhaber SZ, Rosner B, Herbert PN, Blum CB, Breslow JL, Hennekens CH. **Decreased HDL₂ and HDL₃ cholesterol, apo A-I and apo A-II, and increased risk of myocardial infarction.** Circulation 1993,38:1-29.

Burnett JR, Wilcox LJ, Huff MW. **Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibition and hepatic apolipoprotein B secretion.** Clin Chim Acta 1999,286:231-242.

Burchfiel CM, Abbott RD, Sharp DS, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K. **Distribution and correlates of lipids and lipoproteins in elderly japanese-american men.** Arter Throm Vasc Biol 1996,16:1356-1364.

Burtis CA, Ashwood ER. **Tietz – Fundamentos de Química Clínica.** 4 ed. Guanabara Koogan, 1998, Rio de Janeiro – RJ

Carrier F, Barrwman JA, Verger R, Laugier R. **Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans.** Gastroenterology 1993,105:876-878.

Castelli WP, Garisson RJ, Levy D. **Incidence of coronary heart disease and lipoprotein in cholesterol levels. The Framingham Study.** JAMA 1986;256:2835-2838.

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. **Incidence os coronary disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study.** J Am Med Assoc 1986,256(20):2835-2838.

Chhabra S, Narnag R, Krishman LR, Vasisht S, Agarwal DP, Srivastava LM. **Apolipoprotein CIII SstI polymorphism and triglyceride levels in Asian Indians.** BMC Genet 2002;3;9.

Chang TY, Chang CCY, Cheng D. **Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase**. Annu Rev Biochem 1997,66:613-638.

Cladaras C, Hadzopoulou M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI. **The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: Relationship between apo B-100 and apo B-48 forms**. EMBO J 1986,5:3495-3507.

Contois JH, Gillmor RG, Moore RE, Contois LW, Macer JL, Wu AHB. **Quantitative determination of cholesterol in lipoprotein fractions by electrophoresis**. Clin Chim Acta 1999,282:1-14.

Criqui MH, Golomb BA. **Epidemiologic aspects of lipid abnormalities**. Am J Med 1998,105(1A):48S-57S.

Criqui MH, Heiss G, Cohn R, Cowan LD, Suchindran CM, Bangdiwala S, Kritchevsky S, Jacobs DR, O'Grady, Davis CE. **Plasma triglyceride level and mortality from coronary disease**. N Eng J Med 1993,328:1220-1225.

Cucuianu M, Coca M, Hâncu N. **Reverse cholesterol transport and atherosclerosis. A mini review**. Rom J Intern Med. 2007, 45:17-27.

Cullen P. **Evidence that triglyceride are an independent coronary heart disease risk factor**. 2000,86:943-949.

Dallinga-Thie GM, Bu XD, van Linde-Sibenius MT, Rotter JL, Lusic AJ, de Bruin TWA. **Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoprotein B and C-III.** J Lipid Res 1996;37:136-147.

Dallinga-Thie GM, van Linde-Sibenius MT, Rotter JL, Cantor RM, Bu XD, Lusic AJ, de Bruin TWA. **Complex genetic contribution of the Apo AI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes.** J Clin Investig 1997;99:953-961.

Dammerman M, Sandkuijil LA, Hallas JL, Chung W, Breslow JL. **An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3`untranslated region polymorphisms.** Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:4562-4566.

Das HK, Jackson CL, Miller DA, Leff T, Breslow JL. **The human apolipoprotein CII gene sequence contains a novel chromosome 19-specific minisatellite in its third intron.** J Biol Chem 1987;262(10):4787-4793.

Deckelbaum RJ, Eisenberg S, Oschry Y, Butbul E, Sharon I, Olivecrona T. **Reversible modification of human plasma low density lipoproteins toward triglyceride-rich precursors. A mechanism for losing excess cholesterol esters.** J Biol Chem 1982;257:6509-6517.

Dietschy JM, Turkey SD, Spady DK. **Role of the liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animals species, including humans.** J Lipid Res 1993,34:1637-1659.

Defesche JC. **Low-density lipoprotein receptor – its structure, function, and mutations.** Semin Vasc Med 2004,4:5-11.

Drayna DT, Mclean JW, Wion KL, Trent JM, Drabkin HA, Lawn RM. **Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha 2u-globulin superfamily.** DNA 1987,6(3):199-204.

Drexel H, Amann FW, Rentsch K, Neuenschwander C, Luethy A, Khan SI, Follath F. **Relation of the level of high-density lipoprotein subfractions to the presence and extent of coronary artery disease.** Am J Cardiol 1992,70(4):436-440.

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001,285:2486-2497

Fidge NH. **High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands.** J Lipid Res 1999,40:187-201.

Franceschini G, Bondioli A, Granta D, Mercuri V, Negri M, Tosi C, Sirtori CR. **Reduced HDL2 levels in myocardial infarction patients without risk factors for atherosclerosis.** *Atherosclerosis* 1987,68(3):213-219.

Fredrickson DS. **Handbooks on the dietary management of Hyperlipoproteinemia.** *Lipid Metabolism and Genetics Disease* 1953-1974.

Freeman NE, Rusinol AE, Linton M, Hachey DL, Fazio S, Sinensky MS, Thewke D. **Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase promotes oxidized LDL/oxysterol-induced apoptosis in macrophages.** *J lipid Res* 2005, 46:1933-1943.

Frontini MG, Srinivasan SR, Elkasabany A, Berenson GS. **Distribution and cardiovascular risk correlates of serum triglycerides in young adults from biracial community The Bogalusa Heart Study.** *Atherosclerosis* 2001:155,201-209.

Gao J, Wei Y, Huang Y, Liu D, Liu G, Wu M, Wu L, Zhang Q, Zahng Z, Zhang R, Liang C. **The expression of intact and mutant human apo AI/CIII/AIV/AV gene cluster in transgenic mice.** *J Biol Chem.* 2005,280:12559-12566.

Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. **Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women.** *JAMA* 1996,276(11):875-881.

Giannini SD. **Doença coronariana aterosclerótica e colesterol.** Rev Bras Med 1989,46:31-38.

Ginsberg HN, Jones J, Blaner WS.# **Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate response with newly diagnosed exercise-induced myocardial ischemia in middle-age men and women.** Atheroscl Thromb Vasc Biol 1995,15:1829-1838.

Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wanglverson P, Norum R, Brown WV. **Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoprotein CIII and A.** J Clin Invest 1986;78:1287-1295

Gordon DA. **Recent advances in elucidating the role of the microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein B lipoprotein assembly.** Curr Opin Lipidol 1997,8:131-137.

Griedling KK, Alexander RW. **Oxidative stress and cardiovascular disease.** Circulation 1997,96:3264-3265.

Harake B, Caines PS, Thibert RJ, Cheung RM. **A simple micromethod for rapid assessment of the distribution of apolipoprotein C isoforms in very-low-density lipoprotein.** Clin Biochem. 1991,24:255-260.

Hong SH, Park WH, Lee CC, Song JH, Kim JQ. **Association between genetic variations of apo AI-CIII-AIV cluster gene and hypertriglyceridemia subjects.** Clin Chem 1997;43:13-17.

Hu L, Van der Hoogt CC, Espirito Santo SM, Out R, Kypreos KE, Van Vlijmen BJ, Van Berkel TJ, Romijin JA, Havekes LM, Willems van Dijk K, Rensen PC. **The hepatic uptake of VLDL in *Irp- Idlr-/- vldlr-/-* mice is regulated by LPL activity and involves proteoglycans and SR-BI.** J Lipid Research 2008, 49:1553-1561.

Huang MC, Wang TN, Liu YL, Pa TH, Tu HP, Huang YC, Chang WT, Ko YC. **Effect of SstI polymorphism of the apolipoprotein CIII gene and environmental factors on risks of hypertriglyceridemia in Taiwan Aborigines.** Circ J 2006;70:1030-1036.

Hubacek JA, Waterworth DM, Poledne R, Pitha J, Skodova Z, Humphries SE, Talmud PJ. **Genetic determination of plasma lipids and insulin in the Czech populations.** Clin Biochem 2001;34:113-118.

Hussain MM, Kancha RK, Zhou ZY, Luchoomun J, Zu HY, Bakillah A. **Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors .** Biochim Biophys Acta 1996,1300:151-159

Jacobs DR, Mebane IL, Bangdiwala SI, Criqui MH, Tyroler HÁ. **High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in**

men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. Am J Epidemiol 1990,131(1):32-47.

Jeanpierre M, Weil D, Hors-cayla MC, Willianson R, Jumien C, Humphries SE. **Gene for apolipoprotein CII is on human chromosome 19.** Somat Cell Mol Genet 1984,10(6):645-649.

Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. **Relation of high TG-low HDL cholesterol and LDL cholesterol to the incidence os ischemic heart disease.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997,17:1114-1120.

Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. **Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study.** Circulation 1998,97:1029-1036.

Jia L, Fu M, Tian Y, Xu Y, Gou L, Tian H, Tian L. **Alterations of high-density lipoprotein subclasses in hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia.** Int J Cardiol. 2007,120:331-337.

Kalofoutis A, Papapanagiotou A, Tzivras M. **Clinical significance of plasma HDL subfractions (HDL2,HDL3) in patients with peripheral arterial disease (PAD) in the Greek population.** Clin Biochem 1999,32(2):149-152.

Karathanasis SK, Ferris E, Haddad IA. **DNA inversion within the apolipoproteins AI/CIII/AIV-encoding gene cluster of certain patients with premature atherosclerosis.** Proc Natl Acad Sci USA 1987,84:7198-7202.

Kastelein JJ, van der Steeg WA, Holme I, Gaffney M, Cater NB, Barter P, Deedwania P, Olsson AG, Boekholdt SM, Demicco DA, Szareck M, LaRosa JC, Pedersen TR, Grundy SM, TNT Study Group; IDEAL Study Group. **Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment.** Circulation 2008,117:3002-3009

Kazumi T, Kawaguchi A, Hozumi T, Ishida Y, Yoshino G. **Serum HDL cholesterol values are associated with apoB-containing lipoprotein metabolism and triglyceride-body fat interrelation in young Japanese men.** Atherosclerosis 1997,130:93-100.

Krauss RM. **Dense low density lipoproteins and coronary artery disease.** Am J Cardiol 1995,75(6):53B-57B.

Ko YL, KO YS, WuSM, Teng MS, Cheng FR, Hsu TS. **Interaction between obesity and genetic polymorphisms in the apolipoprotein CII gene and lipoprotein lipase gene on the risk of hypertriglyceridemia in Chinese.** Hum Gent 1997;100:327-333.

Lamarche B, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. **Associations of HDL2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from Quebec Cardiovascular Study.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997,17(6):1098-1105.

Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, Cantin B, Bernard PM, Dagenais GR, Despres JP. **Apolipoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study.** Circulation 1996,94:273-278.

Lamarche B, Shirya R, Lewis GF. **HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview.** Clin Chim Acta 1999,286:145-161.

Lehner R, Kuksis A. **Triacylglycerol synthesis by purified triacylglycerol synthetase of rat intestinal mucosa.** J Biol Chem 1995,270:13630-13636.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. **Princípios de Bioquímica.** Savier São Paulo,1955.

Lima ES, Couto RD. **Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade.** J Bras Patol Med Lab 2006,42:168-178.

Lin-Lue YC, Kao FT, Cheung P, Chan L. **Apolipoprotein E gene mapping and expression: localization of the structural gene to human chromosome 19 and**

expression of apo E mRNA in lipoprotein- and non-lipoprotein- producing tissues. Biochemistry 1985, 24(14):3751-3756.

Maeda N, Li H, Lee D, Oliver P, Quarfordt SH, Osada J. **Targeted disruption of the apolipoprotein c-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia.** J Biol Chem 1994;269:23610-23616.

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. **Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function.** J Lipid Res 1984,25:1277-1294.

Marleen MJVG, Tjerk WAB. **Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo.** Atherosclerosis 1998,141(1):S9-S16.

Maciejko JJ, Holmes DR, Kottke BA, Zinsmeister AR, Dinh DM, Mao STJ. **Apolipoprotein A-I as marker of angiographically assessed coronary-artery disease.** N Engl J Med 1983,309:385-389.

Mamo JCL. **Atherosclerosis as a postprandial disease.** Endocrinol Metab 1995,2:229-244.

McConathy WJ, Gesquiere JC, Bass H, Tartar A, Fruchart JC, Wang CS. **Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III.** J Lipid Res. 1992, 33:995-1003.

McNamara JR, Jenner JL, Li Z, Wilson PWF, Schaefer EJ. **Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration.** Arterioscler Thromb 1992,12:1284-1290.

Mietus-Snyder M, Charmley P, Korf B, Ladas JA, Gatti RA, Karathanasis SK. **Genetic linkage of human apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster and the neural cell adhesion molecule (NCAM) gene.** Genomics 1990,7(4):633-637.

Miller M, Seidler A, Moaleni A, Pearson TA. **Normal triglyceride levels and coronary disease events: The Baltimore Coronary Observational Long-Term Study.** J Am Coll Cardiol 1998,31:1252-1257.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucleic Acids Res 1988,16:1215.

Namekata T, Moore DE, Suzuki K, Mori M, Knop RH, Marcovina SM, Perrin EB, Hughes DA, Hatano, Hayashi C. **Biological and lifestyle factors, and lipid and lipoprotein levels among Japanese americans in Seattle and Japanese men in Japan.** Int J Epidemiol 1997,26(6):1203-1213.

Namekata T, Moore DE, Knopp RH. **Cholesterol levels among Japanese americans and other populations: Seattle Nikkei Health Study.** J Atherosclerosis Thromb 1996,2:101-109.

Navab M, Berliner JA, Watson AD. **The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996,16:831-842.

Noma A, Yokosuka T, Kitamura K. **Plasma lipids and apolipoproteins as discriminators for presence and severity of angiographically defined coronary artery disease.** Atherosclerosis 1983,49:1-7

Olivecrona G, Beisiegel U. **Lipid binding of apolipoprotein of CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997, 17: 1545-1549.

O'Connor G, Stocks J, Lumley J, Galton DJ. **A DNA polymorphism of the apolipoprotein C-III gene in extra coronary atherosclerosis.** Clin Sci (Lond) 1988,74:289-292.

Parzianello L, Parzianello NA, Coelho JC. **Increased triglyceride levels in a Japanese population living southern Brazil.** Arch Med Res 2005,36:59-64.

Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, Muhlberger V, Knapp E, Kay Dunn. **Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease.** Arterioscler Thromb 1992,12:1336-1345.

Price WH, Morris SW, Kitchin AH, Wenham PR, Burgon PR, Donald PM. **DNA restriction fragment length polymorphisms as markers of familial coronary heart disease.** Lancet 1989;1:1407-1411

Rader DJ, Hoeg JM, Brewer HB. **Quantification of plasma apolipoprotein in the primary and secondary prevention of coronary artery disease.** Ann Intern Med 1994,120:1012-1025.

Rader DJ, Ikemaki K. **Unravelling high-density lipoprotein-apolipoprotein metabolism in human mutants and animal models.** Curr Opin Lipidol 1996,7:117-123.

Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH. **Handbook of lipoprotein testing.** 1997

Robertson TL, Tillotson J, Nichaman MZ. **Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: coronary heart disease risk factors in Japan and Hawaii.** Am J Cardiol 1977,39:244-249.

Ross E. **Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk.** Atherosclerosis 2000,151:357-379.

Ross R. **The pathogenesis of atherosclerosis: a prospective for the 1990's.**

Nature 1993,362:801-809.

Ross R. **Atherosclerosis - an inflammatory disease.** N Eng J Med 1999,340:115-

126.

Sakata K, Miho N, Shirotani M, Yoshida H, Takada Y, Takada A. **Remnant like-particle cholesterol is a major risk for myocardial infarction in vasospastic angina with nearly normal coronary artery.** Atherosclerosis 1998,136:225-231.

Sakurabayashi I, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Goto Y. **Reference intervals for serum apolipoproteins A-I, A-II, B, C-II, C-III, and E in healthy Japanese determined with a commercial immunoturbidimetric assay and effects of Sex, age, smoking, drinking, and Lp(a) level.** Clin Chim Acta 2001,312:87-95.

Schneider WJ, Nimpf J. **Lipoprotein receptors: old relatives and new arrivals.**

Curr Opin Lipidol 1993,4:204-209.

Scott J, Knott TJ, Shaw DJ, Brook JD. **Localization of genes encoding apolipoproteins CI, CII, and E to the p13----cen region of human chromosome 19.** Human Genet 1985,71(2):144-146.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. **The metabolic & molecular bases of inherited disease.** 8 ed. VII, MacGraw-Hill, New York, 2001:2789-2819.

Shekelle RB, Shryock AM, Paul O.# **Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease: the Western Electric Study.** N Engl J Med 1981,304:65-70.

Shelburne F, Hanks J, Meyers W, Quarfordt S. **Effect of apolipoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsion in the rat.** J Clin Invest 1980;65:652-658.

Shiau YF, Popper DA, Reed M, Umstetter C, Capuzzi D, Levine GM. **Intestinal triglycerides are derived from both endogenous and exogenous sources.** Am J Physiol 1985,248:164G-169G.

Shoulders CC, Grantham TT, North JD, Gaspardone A, Tomai F, de Fazio A, Versaci F, Gioffre PA, Cox NJ. **Hypertriglyceridemia and apolipoprotein CIII gene locus: lack of association with variant insulin response element in Italian school children.** Hum Genet 1996;98:557-566.

Sich D, Saidi Y, Giral P, Lagrost L, Dallongeville J, Federspiel MC, Cherfils C, Raisonnier A, Trupin G, Beucler. **Characterization of two HDL subfractions and LpA-I, LpA-I:A-II distribution profiles and clinical characteristics of hyperalphalipoproteinemic subjects without cholesterol ester transfer protein deficiency.** Atherosclerosis 1998,138:351-360.

Smilde TJ, Wissen S, Wollersheim H, Kastelein JJP, Stalenhoel AFH. **Genetic and metabolic factors predicting risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia.** The Netherl J Med 2001,59:184-195

Sniderman AD, Cianflone K. **Lipids and vascular disease: what we do and do not know.** Clin Chim Acta,1999:7-22.

Steinberg D. **Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance.** J Biol Chem 1997,272:20963-20966.

Stravitz RT, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. **The catabolism of cholesterol.** Curr Opin Lipidol 1993,4:223-229.

Stremmel W, Kleinert H, Fitscher BA, Gunawan J, Klaassen CS, Moller K, Wegener M. **Mechanism of cellular fatty acid uptake.** Biochem Soc Trans 1992,20:814-820.

Syvanne M, Kahri J, Virtanen KS, Taskinen MR. **HDLs containing apolipoproteins A-I and A-II (LpAI:A-II) as markers of coronary artery disease in men with non-insulin dependent diabetes mellitus.** Circulation 1995, 92:364-370.

Tall AR. **Plasma cholesteryl transfer protein and high density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies.** J Internal Med 1995, 237:5-12.

Talmud PJ. **Genetic determinant of plasma triglycerides: impact of rare and common mutations.** Curr Atheroscler Rep. 2001, 3:191-199.

Teng B, Verp M, Salonen J, Davidson NO. **Apolipoprotein B messenger RNA editing is developmentally regulated and widely expressed in human tissue.** J Biol Chem 1990,265:2616-2620.

The International Committee for Evaluation of Hypertriglyceridemia as a Vascular Risk Factor. **The hypertriglyceridemias: risk and management.** Am J Cardiol 1991,68:1A-42A.

Thomson ABR, Schoeller C, Keelan M, Smith L, Clandinin MT. **Lipid absorption; passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond.** Can J Physiol Pharmacol 1993,71:531-555

Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Gerdes LU, Faergeman O, Humphries SE. **Genetic markers in the apo AII-CIII-AIV gene cluster for combined hyperlipidemia, hypertriglyceridemia, and predisposition to atherosclerosis.** Atherosclerosis 1993;100:157-169.

Verghese PB, Arrese EL, Soulages JL. **Stimulation of lipolysis enhances the rate of cholesterol efflux to HDL in adipocytes.** Mol Cell Biochem. 2007,302:241-248.

Xu Y, Fu M, Liu B, Xu Y, Yao J, Zhang X. **Subclasses of serum HDL in hyperlipidemia.** Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2003,34:238-241.

Waitezberg DL. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica.** 3 ed. Atheneu, São Palo, 2002:55-78.

Wang X, Rader DJ. **Molecular regulation of macrophage reverse cholesterol transport.** Curr Opin Cardiol. 2007,22:368-372.

Waterworth DM, Talmud PJ, Bujac SR, Fischer RM, Miller GJ, Humphries SE. **Contribution of apolipoprotein C-III gene variant to determination of triglyceride and interaction with smoking in middle-aged men.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:2663-2669

Wikvall K. **Conversion of cholesterol into bile acids.** Curr Opin Lipidol 1990,1:248-254.

Wilson MD, Rudel LL. **Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol.** J Lipid Res 1994,35:943-955.

Windler E, Havel RJ. **Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver.** J Lipid Res 1985;26:556-565.

Wood D, De Backer G, Faergemann O, Graham I, Mancina G, Pyorala K. **Prevention of coronary heart disease in clinical practice .Recommendations of the second joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention.** Eur Heart J 1998,19:1434-1503.

Yan BY, Fu MD, Yang YY, Xu YH, Liu Y, Yang LC. **The interrelationships between serum triglyceride, total cholesterol and HDL subpopulations.** Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2004,35:327-329.

Yamamoto T, Bujo H. **Close encounters with apolipoprotein E receptors.** Curr Opin Lipidol 1996,7:298-302.

Yamamoto A, Horibe H, Mabuchi H, Kita T, Matsuzawa Y, Saito Y, et al. **Analisis of serum lipid levels in Japanese men and women according to body mass index. Increase in risk of atherosclerosis in postmenopausal women.** Atherosclerosis 1999,143:55-73.

Zakim D. **Fatty acids enter cells by simple diffusion.** Proc Soc Exp Biol Med 1996,212:5-10.

Zannis VI, Koukos G, Drosatos K, Vezeridis A, Zanni EE, Kypreos KE, Chroni A. **Discrete roles of apo A-I and apo E in the biogenesis of HDL species:**

lessons learned from gene transfer studies in different mouse models. Ann Med. 2008,40:14-28.

Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall A. **Increased coronary heart disease in Japanese American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels.** J Clin Inves 1996,97:2817-2923.

Zulewski H, Ninnis R, Miserez AR, Baumstark MW, Keller U. **VLDL and IDL apolipoprotein b-100 kinetics familial hypercholesterolemia due to impaired LDL receptor function or to defective apolipoprotein B-100.** J Lipid Res 1998, 39 :380-387.