



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

WILLIE OLIVEIRA PINHEIRO

Associação do polimorfismo da Lipase Lipoproteica e do Neuro Peptídeo Y com o perfil lipídico de indivíduos com e sem evidência de Doença Arterial Coronária

**ILHÉUS-BAHIA
2014**

WILLIE OLIVEIRA INHEIRO

Associação do polimorfismo da Lipase Lipoproteica e do Neuro Peptídeo Y com o perfil lipídico de indivíduos com e sem evidência de Doença Arterial Coronária

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia molecular à Universidade Estadual de Santa Cruz.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Rios Santos

Co- Orientador: Dr. Marcilio Delan Baliza Fernandes

**ILHÉUS – BAHIA
2014**

P654 Pinheiro, Willie Oliveira.
Associação do polimorfismo da Lipase Lipoproteica e do neuro peptídeo y com o perfil lipídico de indivíduos com ou sem evidência de doença arterial coronária / Willie Oliveira Pinheiro. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

38 f. : il.

Orientador: Fabrício Rios Santos.
Co-orientador: Marcílio Delan Baliza Fernandes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Referências: f. 35-38.

1. Polimorfismo (Genética). 2. Sistema cardiovascular. 3. Doenças cardiovasculares. I. Título.

CDD 572.8

DEDICATÓRIA

À minha família, de maneira especial meu pai, Valdeci e minha esposa Lalinha, que com muito amor, carinho e apoio, não mediram esforços para que eu cumprisse mais esta etapa em minha vida, à memória da minha mãe que sempre acreditou em mim e me incentivou a buscar a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização do curso, mediante a concessão da bolsa.

Aos meus orientadores Professores Dr. Fabrício Rios Santos e Dr. Marcílio Delan Baliza Fernandes pelas orientações, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade.

Aos Professores Dra. Sibeles Tozetto e Dr. Djanilson Barbosa dos Santos, pelas revisões de escrita e análises dos dados.

Aos meus colegas do programa de Pós- Graduação em Genética e Biologia molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), por compartilhar comigo momentos riquíssimos de aprendizagem e crescimento, assim como, partilhar das angústias e medo.

Às voluntárias que participaram do projeto que em simplicidade se dispuseram a Colaborar.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. De maneira toda especial a Fabrícia e Mara.

A todos os amigos que sentiram minha ausência durante esses dois difíceis anos. Agradeço por não deixarem de me apoiar em nenhum momento assim como os familiares que sempre me estimularam e ajudaram em especial a minha esposa Larisse que suportou comigo a distância e o stress inerentes do processo, meu pai seu Valdeci e minha sogra dona Helena que sempre estiveram comigo suprindo todas as necessidades materiais e emocionais.

A Deus pela vida, e por todas as bênçãos recebidas.

A ideia de que existe simplicidade no complexo e complexidade no simples é quase sempre prazerosamente convidativa na reflexão. (...) Parece, de fato, haver uma simplicidade no complexo. Mas, ao mesmo tempo, uma enorme complexidade em tudo que se apresenta como simples (CAPOZZOLI, 2012).

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Doenças cardiovasculares, suas modalidades e fatores de risco.....	13
2.2 Descrições e funções dos marcadores LPL e NPY e sua associação com DAC.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Casuística.....	22
3.1.1 Definição e seleção de casos.....	22
3.1.2 Definição e seleção de controles.....	22
3.1.3 Definição da exposição.....	23
3.2 Instrumentos e Técnicas de Coletas de Dados.....	23
3.3 Avaliação Bioquímica.....	23
3.4 Extração de DNA Genômico.....	23
3.4.1 Quantificação do DNA.....	25
3.5 Amplificação de DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase.....	25
3.6 Análise do Polimorfismo do Genes LPL e NPY por PCR-RFLP.....	26
3.7 Tamanho da amostra.....	26
3.8 Análise Estatística dos Resultados.....	26
4 RESULTADOS.....	28
5 DISCUSSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	35

RESUMO

As doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte no mundo, sendo responsáveis por cerca de 29% das mortes por causas conhecidas. Dentre as enfermidades do aparelho circulatório, destaca-se a doença arterial coronária (DAC), caracterizada pela formação da placa aterosclerótica. Por se tratar de uma doença multifatorial, vários aspectos ambientais e genéticos estão envolvidos em sua etiogênese. Entre os fatores genéticos relacionados a doenças cardíacas, os polimorfismos genéticos merecem relevância por alterarem a expressão gênica, e conseqüentemente as funções dos seus respectivos produtos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar possíveis associações entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) S447X e Leu7Pro dos genes *LPL* e *NPY* respectivamente e suas associações com o perfil lipídico e a DAC, em pacientes atendidos no Instituto de cardiologia do recôncavo, ou indivíduos que moram no recôncavo baiano. Em um estudo de caso-controle as genotipagens dos polimorfismos da *LPL* e *NPY* foram realizadas em uma amostragem de 172 indivíduos pelo método PCR-RFLP. As variáveis contínuas foram comparadas através do teste *t* de Student e variáveis categóricas através do teste χ^2 -quadrado. Parâmetros descritivos foram dados como média \pm (Desvio Padrão) e em porcentagens para as variáveis com distribuição normal. As comparações foram feitas para detectar significância entre grupos de médias. A análise de regressão logística foi realizada para encontrar a associação entre o desfecho (DAC) e a exposição principal (os polimorfismos). Um valor *P* bicaudal menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados mostraram diferenças entre casos e controles nas concentrações de colesterol total ($p < 0,001$) LDL-C ($p < 0,001$) e circunferência do quadril ($p = 0,034$). Não foi encontrada uma diferença entre portadores e não portadores tanto para o *LPL* quanto para o *NPY* entre casos e controles. Porém observou-se uma tendência dos portadores do alelo 447X da *LPL*, possuírem médias de triglicérides menores e médias de HDL-C maiores. Uma significância estatística foi encontrada entre portadores e não portadores do 447X somente nos casos quanto à concentração de HDL-C ($p = 0,018$). Em relação ao *NPY*, esta mesma análise foi realizada e não houve diferença estatística entre os grupos.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares. DAC. *LPL*. *NPY*. PCR-RFLP.

ABSTRACT

Cardiovascular disease is the leading cause of death worldwide, accounting for about 29 % of deaths from known causes. Among the diseases of the circulatory system, stands out the coronary artery disease (CAD), characterized by the formation of the atheromatous plaque. Because it is a multifactorial disease, multiple environmental and genetic factors are involved in its origin. Among the genetic factors related to heart disease, genetic polymorphisms deserve relevance by altering gene expression, and consequently the functions of their products. Thus, the present study aimed to evaluate possible associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) S447X and Leu7Pro of the LPL and NPY genes respectively and their association with dyslipidemia and CHD in patients treated at the Institute of Cardiology of recôncavo or individuals who live in Bahia recôncavo . In a case- control genotyping of polymorphisms of the *LPL* and *NPY* were performed on a sample of 172 individuals by PCR - RFLP method. The continuous variables were compared using the Student's t test and categorical variables using the χ^2 -square test. Descriptive parameters were given as mean \pm (standard deviation) and percentages for variables with normal distribution. Comparisons were made to detect significance between groups of means. Multivariate logistic regression was performed to find the association between the outcome (DAC) and the main exposure (polymorphisms). A two-tailed P less than 0.05 value was considered statistically significant. The results showed differences between cases and controls in rates of total cholesterol ($p < 0.001$), LDL-C ($p < 0.001$) and hip circumference ($p = 0.034$) . There is a difference between carriers and noncarriers for both LPL and for NPY between cases and controls were found. However it was observed a tendency for the 447X allele carriers LPL, having smaller average mean HDL-C and triglycerides greater. A statistical significance was found between carriers and noncarriers of the 447X only in cases, in the HDL-C concentration ($p = 0.018$). In relation to *NPY*, this same analysis was performed and there was no statistical difference between the groups.

Keywords: Cardiovascular Diseases. CAD. *LPL*. *NPY*. PCR-RFLP.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) fazem parte do grupo das enfermidades crônicas não transmissíveis e constituem a principal causa de morte no mundo. São definidas como um conjunto de distúrbios que afetam o aparelho circulatório. Dentre estas, destaca-se a doença arterial coronária (DAC), principal causa de mortalidade no mundo. Segundo a organização mundial de saúde (WHO, 2013) em média ocorrem cerca de 17,3 milhões de mortes por ano atribuídas a estas doenças, no qual, aproximadamente 7 milhões são devidas à DAC. Estima-se que no futuro estes números sejam ainda maiores, e ocorrerão principalmente em países industrializados de baixa e média renda. No Brasil, as DCV, em especial a doença coronariana, estão em primeiro lugar, nas causas de mortes naturais, sendo responsáveis por 286 óbitos a cada 100 mil habitantes (SCHMIDT et al. 2011).

Um agravante desse quadro é que aproximadamente um terço dos óbitos por doenças do coração ocorrem precocemente em adultos na faixa etária de 35 a 64 anos (ISHITANI, 2006), atingindo a população economicamente ativa. Segundo Alves e Marques, (2009) a aterosclerose coronariana é caracterizada pelo estreitamento das artérias coronárias em decorrência do acúmulo de placas gordurosas. Em geral, as manifestações clínicas da DAC são angina estável e infarto do miocárdio, tendo início a partir da meia idade.

Pioneiramente, um estudo denominado *Framingham Heart Study*, ocorrido nos Estados Unidos a partir de 1948, identificou os principais fatores de risco para as doenças cardíacas como aumento da pressão arterial, tabagismo, obesidade, *diabetes mellitus* e sedentarismo, posteriormente a dislipidemia e fatores genéticos também foram identificados como fatores de risco para aterosclerose (DÓREA; LOTUFO, 2001).

Os fatores de risco podem ser divididos em modificáveis e não modificáveis. Os modificáveis são os que podem receber a atenção no sentido das intervenções preventivas, dentre estes se destacam: tabagismo, sedentarismo e obesidade. Os não modificáveis estão relacionados à herança genética, ao gênero e a idade. Por se tratar de uma doença cuja etiologia é complexa, sendo influenciada por aspectos ambientais e hereditários, a DAC é conhecida como uma doença multifatorial. Quanto maior o número de fatores de riscos presentes, maior a chance de um indivíduo apresentar um evento cardiovascular (ALVES; MARQUES, 2009).

Com relação aos fatores de risco genéticos para DAC, muitos marcadores têm sido associados a quadros mais severos de dislipidemia e aterosclerose, de fato, mutações podem promover alterações no produto gênico em importantes vias que envolvem o metabolismo lipídico, o comportamento alimentar, a resposta ao processo inflamatório ou a coagulação sanguínea (FILHO, 2009; VIEIRA, 2005) predispondo seus portadores a DAC.

Dentre os genes candidatos, destacam-se os genes da enzima Lipase Lipoproteica (*LPL*), e do neurotransmissor neuropeptídeo Y (*NPY*) por estarem envolvidos na homeostase circulatória. A *LPL* desempenha um papel chave no metabolismo das triglicérides, pois aderida na superfície endotelial dos capilares sanguíneos é capaz de hidrolisar os triglicerídeos (TG) contidos em lipoproteínas como os quilomícrons e a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). A diminuição na atividade da *LPL* pode influenciar as concentrações de lipídeos plasmáticos causando graus variados de hipertrigliceridemia isolada ou associada a hipercolesterolemia (ALMEIDA, 2007). Vale destacar que um dos principais mecanismos de ação farmacológicos dos fibratos decorre da ativação da *LPL*, sendo por isso indicada, no tratamento da dislipidemia. As ações dos fibratos no metabolismo lipídico decorrem de sua capacidade de imitar a estrutura e as funções biológicas dos ácidos graxos livres (AG), ligando-se a fatores de transcrição específicos, os receptores ativados pelo proliferador de peroxissomos (PPARs) expressos primariamente em fígado, rins, coração e músculo. Assim portadores do S447X podem responder melhor ao tratamento com fibratos, em pacientes com triglicérides plasmáticos elevados e HDL-C baixo. No entanto essa informação requer confirmação em estudos prospectivos (XAVIER et al., 2013).

O *NPY* é um polipeptídeo que ocorre principalmente no sistema nervoso, onde tem função de neurotransmissor e está envolvido em diversas funções regulatórias de processos fisiológicos, vários estudos tem avaliado polimorfismos do *NPY* e sua relação na resposta ao stress (ZHOU, 2008), diabetes tipo 2 (JAAKKOLA, 2007), alcoolismo (MOTTAGUI-TABAR, 2005), dentre outros. Os achados de Kaipo (2009) mostram que o *NPY* está associado ao controle do apetite, cujas mutações influenciam na ingestão de alimentos e na obesidade (KARVONEN, 2006), constituindo em fatores de risco para aterosclerose.

Desse modo, a presente pesquisa analisou a associação do polimorfismo genético da Lipase Lipoproteica e do Neuro Peptídeo Y, em pacientes atendidos no município de Santo Antonio de Jesus – Bahia, com o perfil lipídico e a Doença Arterial Coronária. Especificamente verificou-se a ocorrência dos SNPs S447X e Leu7Pro dos genes *LPL* e

NPY, e suas respectivas associações com a DAC, além disso, analisou-se a distribuição dos alelos 447X da *LPL* e Leu7Pro do *NPY*, segundo as características bioquímicas (perfil lipídico) e socioeconômicas da população de estudo.

Assim, o estudo em questão torna-se de grande relevância, pelo seu caráter inédito na região do recôncavo baiano, ressaltando que não há na literatura um estudo com a análise concomitante destes dois marcadores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As doenças cardiovasculares constituem a primeira causa de morte no mundo. Aproximadamente 17,3 milhões de pessoas morreram em 2008 por doenças cardíacas, representando 29% de todas as mortes. Destas, 7,2 milhões foram devido a Doença Coronária e 5,7 milhões devido a Acidente Vascular Cerebral. Estima-se que em 2030 em cerca de 23,6 milhões de pessoas morrerão de doenças cardiovasculares, principalmente por doença coronariana e acidente vascular cerebral, sendo que cerca de 80% ocorrerão em países de baixa e média renda (WHO, 2013).

No Brasil, as doenças do aparelho circulatório são responsáveis por 29,4% das mortes com causas conhecidas (BUENO et al, 2012). Quando são excluídos os óbitos por causas mal definidas e a violência, esse índice cresce ainda mais 37% (LOTUFO, 2005). Um fato agravante desse quadro é que aproximadamente um terço dos óbitos por doenças cardiovasculares ocorrem precocemente em adultos na faixa etária de 35 a 64 anos (ISHITANI, 2006), ou seja, em idade economicamente ativa. De acordo com Nolte (2004) essas mortes são em grande parte evitáveis se houver assistência ou prevenção oportuna.

Com avanços tecnológicos e científicos, assim como, um maior acesso às informações por parte da população, houve uma lenta e constante redução das concentrações de mortalidade cardiovascular. A doença cerebrovascular teve redução anual das concentrações ajustadas por idade de 1,5% para homens e 1,6% para mulheres. O conjunto das doenças do coração, hipertensão, doença coronária e insuficiência cardíaca também tiveram concentrações anuais decrescentes de 1,2% para homens e 1,3% para mulheres. No entanto, apesar do declínio, a mortalidade no Brasil ainda é elevada em comparação a outros países, tanto para doença cerebrovascular como para doenças do coração (BRASIL, 2006).

Schmidt et al. (2011) afirmam que, dentre as doenças crônicas não transmissíveis como: diabetes, doenças respiratórias, câncer e outras, as doenças cardiovasculares tiveram um maior declínio, devido sobre tudo, ao maior acesso da população brasileira aos serviços de saúde e implantação de políticas de prevenção. Considerando que muitas destas patologias compartilham fatores de risco comuns, a Organização Mundial de Saúde propõe ações integradas de prevenção e controle para essas doenças baseada na

redução da hipertensão arterial, tabagismo, uso de álcool, inatividade física, dieta inadequada, obesidade e hipercolesterolemia (PEREIRA, 2009).

Todavia, segundo esta mesma pesquisa, as DCV continuam sendo a principal causa de morte no Brasil. Em 2007 foram registrados 1.157.509 internações em consequência das doenças do aparelho circulatório, com um custo maior que 1,4 bilhão de reais aos cofres públicos (ROSA, 2009).

2. 1. Doenças cardiovasculares, suas modalidades e fatores de risco

Conceitua-se como doenças cardiovasculares (*cardio*=coração e *vasculares* = vasos sanguíneos) o conjunto de enfermidades que afetam o aparelho circulatório. Existem diferentes modalidades destas. Segundo a organização mundial de saúde (2013), as DCV constituem um grupo de desordens do coração e vasos sanguíneos que incluem:

- a) doença cérebro vascular: doença dos vasos sanguíneos que irrigam o cérebro;
- b) doença arterial periférica: doença dos vasos sanguíneos que suprem sangue para os braços e pernas;
- c) cardiopatia reumática: danos ao músculo do coração e válvulas cardíacas devido à febre reumática, causada pela bactéria estreptococos;
- d) cardiopatia congênita: malformações da estrutura do coração existentes desde o nascimento;
- e) trombose venosa profunda e embolia pulmonar: coágulos de sangue nas veias das pernas, que pode desalojar e deslocar para o coração e os pulmões;
- f) doença arterial coronariana (DAC): doença dos vasos sanguíneos que irrigam o músculo cardíaco.

Dentre este grupo de doenças, destaca-se a DAC, a de maior incidência no mundo, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. É uma doença complexa com componentes genéticos e ambientais bem documentados. O risco genético para DAC não está baseado sobre um único gene, mas sobre interações múltiplas entre ambiente e aspectos genéticos que devem ser alvo das pesquisas. Esta enfermidade tem forte relação com o processo aterosclerótico, caracterizada pela deposição de placas de gordura na parede dos vasos sanguíneos das artérias coronárias. A aterosclerose coronariana, tem como algumas manifestações clínicas a angina estável, dor no peito em decorrência da oclusão parcial das artérias (Figura1) e o infarto agudo do miocárdio, devido a obstrução total das coronárias. Entre os fatores de risco para enfermidades do aparelho circulatório relacionadas com a aterosclerose, incluem a hipertensão arterial,

idade, sexo, tabagismo, diabetes melitus, sedentarismo, obesidade, histórico familiar, níveis elevados de colesterol, lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos e níveis diminuídos de HDL-C (lipoproteína de alta densidade), (ISHITANI, 2006; TAVARES, 2000).

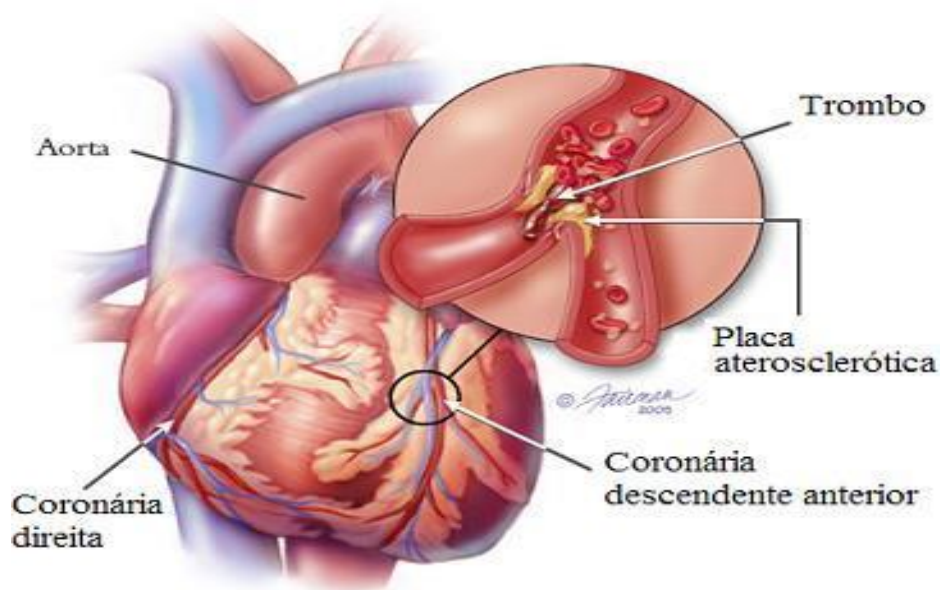


FIGURA 1: Coração e o processo aterosclerótico na artéria coronária

FONTE: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2007/11/06/menopausa-doenca-arterial-coronaria>.

A hiperlipidemia tem sido demonstrada como um fator de risco importante na mortalidade pela DAC (CANTOS, 2006), assim, o excesso de peso corporal, alta ingestão de gorduras e bebidas alcoólicas, tabagismo, sedentarismo e estresse, por exemplo, estão relacionados com aumento no risco da doença (SISAKI; SANTOS, 2006).

Etimologicamente aterosclerose vem do grego “athero” (papa, mingau) e “sclerosis” (endurecimento), caracteriza-se pela formação de ateromas (placas constituídas principalmente de colesterol e fibras), (SISAKI; SANTOS, 2006), esta placa enrijece e diminui a luz do vaso, processo denominado estenose, que compromete a circulação normal do sangue e suprimento de oxigênio, um processo isquêmico então se desenvolve, podendo eventualmente causar angina estável, e evoluir para uma oclusão total e conseqüentemente o infarto do miocárdio.

A enfermidade inicia-se nos primeiros anos de vida do indivíduo, e suas manifestações clínicas geralmente ocorrem na idade adulta, o processo inicia-se após a instalação de uma lesão inicial no endotélio do vaso, esta lesão facilita a infiltração de LDL-C e a liberação de citocinas, que sinalizam para que os macrófagos entrem na camada íntima do vaso, e passem a englobar lipoproteínas, principalmente LDL-C aderidas na parede vascular. Neste estágio, estes macrófagos constituem-se em corpos espumosos, o acúmulo destas células em resposta à inflamação culminam na formação

do ateroma (Figura 2), estas placas, podem gerar eventos trombóticos que terão como consequências, disfunções no aparelho circulatório. (GIROLDO; ALVES; BAPTISTA, 2007).

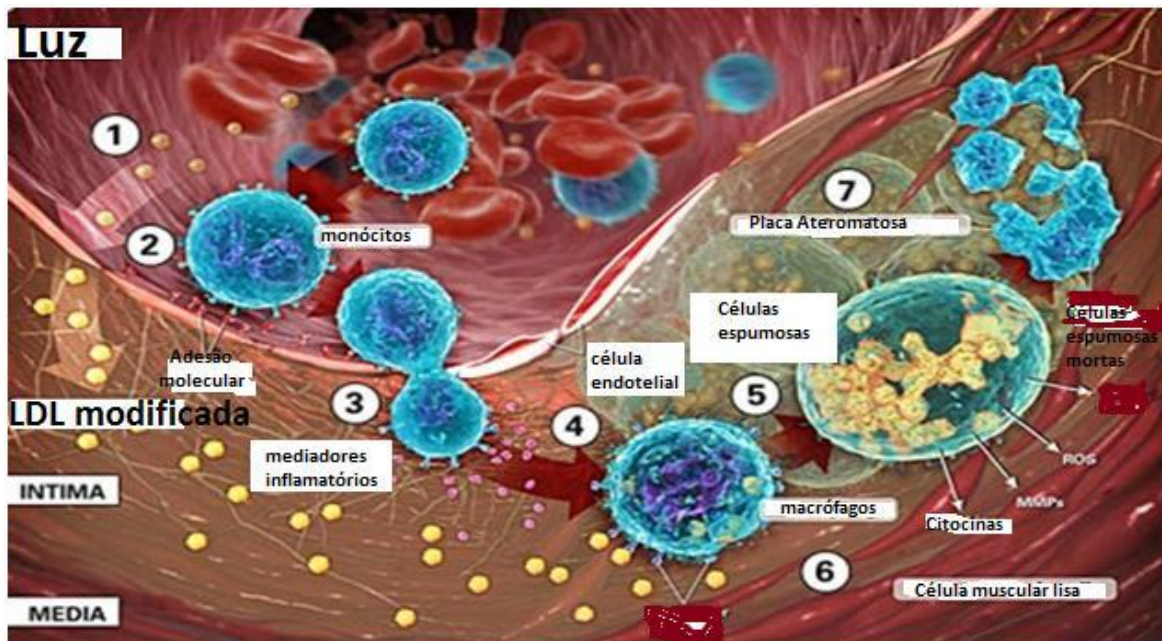


Figura 2. Desenho ilustrativo da formação da placa aterosclerótica
Fonte: <http://arteriosclerose.blogspot.com.br/2011/07/aterosclerose.html>.

As dislipidemias são anormalidades na concentração das lipoproteínas circulantes no sangue, são classificadas como: hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e HDL-C baixo fato que predispõe os indivíduos ao aparecimento da aterosclerose. Associação de níveis elevados de LDL-C com o desenvolvimento de doença cardiovascular parece estar relacionada à maior facilidade da lipoproteína em se oxidar na presença de sua subfração pequena e densa. Por outro lado, o nível sérico de HDL-C elevado é um fator de proteção do indivíduo para doença cardiovascular, pois retira o colesterol das células espumosas e o transporta para o fígado onde será metabolizado (ROSINI, 2005).

O principal fator de risco para DAC é a hipercolesterolemia, que quando associada a outros fatores biológicos e/ou ambientais, leva à formação da placa ateromatosa aumentando o risco de morte por infarto do miocárdio (VIEIRA, 2005).

Além das diversas causas já citada, estudos epidemiológicos mostram probabilidade de 6% para indivíduos com 50 anos, sem fatores de riscos conhecidos, desenvolverem um evento coronariano em 10 anos e que indivíduos de 60 anos passam a ter probabilidade de 9% em desenvolver o mesmo evento. Isso sugere que a idade e

outros fatores, como os genéticos, estejam implicados na susceptibilidade do indivíduo desenvolver o evento cardíaco (TAVARES, 2000).

Sabe-se, que com o avanço em genética e biologia molecular, tornou-se conhecido que a variação da expressão dos genes contribui para a patogênese de anormalidades da fisiologia humana, incluindo as doenças do coração e do sistema vascular (PEREIRA, 2004). Assim, mutações podem resultar em padrões lipoproteicos anormais e contribuir para o aparecimento de doenças, como a aterosclerose (NOVAK, 1996).

O sequenciamento do genoma humano permitiu o conhecimento da existência de pelo menos um polimorfismo a cada 300 pares de bases, em um genoma de aproximadamente 3,12 bilhões de nucleotídeos (KE *et al.* 2008). Polimorfismos genéticos são mutações genéticas não letais que ocorrem em $\geq 1\%$ da população. Doenças denominadas *multifatoriais* são causadas por um grande conjunto de fatores ambientais e pelo somatório de vários polimorfismos de genes relacionados, aumentando a predisposição do indivíduo para uma enfermidade (SCHUCH *et al.*, 2010).

Nos últimos anos as publicações em genética cardiovascular, que relatam a descoberta de novos polimorfismos, aumentaram consideravelmente. Estes estão relacionados com o processo inflamatório, coagulação e metabolismo de lipídeos e são usados como marcadores que contribuem para o conhecimento dos aspectos mais peculiares da aterosclerose. Novos conhecimentos geram uma perspectiva na avaliação cardíaca, e criam técnicas inovadoras, possibilidades terapêuticas e de diagnóstico extraordinárias. Assim, o conhecimento de polimorfismos genéticos ou até mesmo de mutações raras que predispõe ou agravam a DAC, são instrumentos relevantes para prevenção, diagnóstico, tratamento personalizado e aconselhamento em cardiologia (SÁ, 2010).

Estudos sobre genes mostram que os polimorfismos podem ocorrer em regiões reguladoras, alterando sua estrutura molecular e influenciando a função de seus respectivos produtos, sendo a maioria deles do tipo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (FRANCESCHI, 2009). Este polimorfismo é definido como diferenças de nucleotídeo entre homólogos em um determinado *locus* nos genomas de indivíduos de uma população geral (GRIFFITHS *et al.*, 2008). Ziegler *et al.*, (2008) corroboram com o conceito acima citado, definindo SNP como a variação de um único nucleotídeo dentro de um gene ou sequência não-codante.

Fatores genéticos podem ser definitivos quando há mutações em genes, que codificam para proteínas que desempenham papéis importantes no metabolismo dos lipídeos. Dessa forma, muitos marcadores tem sido identificados por sua associação a

quadros clínicos mais severos desta enfermidade, por provocar alterações no metabolismo lipídico, no processo inflamatório ou na coagulação sanguínea (FILHO; LUCENA 2009; VIEIRA, 2005).

Em confirmação com os expostos acima, Tripathi *et al.*(2012) utilizaram diversos marcadores em um estudo de caso-controle com 668 indivíduos no norte da Índia. Os genes *ACE*, *MTHFR*, *APO B* e *APO E* foram genotipados pelo método PCR- RFLP e suas respectivas associações com DAC estabelecidas. Os resultados sugeriram que o alelo T de *MTHFR* (C677T) e o alelo D (com uma deleção de 287 pares de base no íntron 16) de *ACE*, podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da DAC, enquanto que mutações no alelo *APO B* e *APO E* podem desempenhar papel de proteção.

Além destes, outros marcadores tem mostrado importância na suscetibilidade a doenças. Nesta pesquisa, foram utilizadas como objeto de estudo, os polimorfismos S447X e o Leu7Pro, da *LPL* e *NPY* respectivamente, por estarem associados a dislipidemia e doença cardiovascular.

2.2 Descrições e funções dos marcadores LPL e NPY e sua associação com DAC.

A lipase lipoproteica (LPL) é uma enzima, produzida abundantemente pelo tecido muscular e adiposo, está aderida por meio de moléculas de proteoglicanos, na superfície endotelial dos capilares sanguíneos, e desempenha papel fundamental no metabolismo das gorduras, pois hidrolisa os triglicérides dos quilomícrons e das VLDL. Lipoproteínas ricas em triglicérides, como as citadas, ligam-se à lipase por meio da apolipoproteína (apo) CII, presente na superfície da lipoproteína, a qual também estimula a ação enzimática. Os produtos de degradação das triglicérides, ácidos graxos e glicerol, são absorvidos por tecidos como o adiposo e o muscular, onde são reesterificados e armazenados como fonte e reserva de energia (Figura 3) (ALMEIDA, 2007).

Foi mostrado que a LPL pode promover a troca de lipídeos entre lipoproteínas, atuando na cinética da maioria das partículas de lipoproteínas do plasma. É um membro da família do gene da lipase TG de proteínas que inclui lipase hepática (LH), a lipase pancreática (LP), lipase endotelial (LE) (WANG; ECKEL, 2009).

Digestão, Transporte e Armazenamento

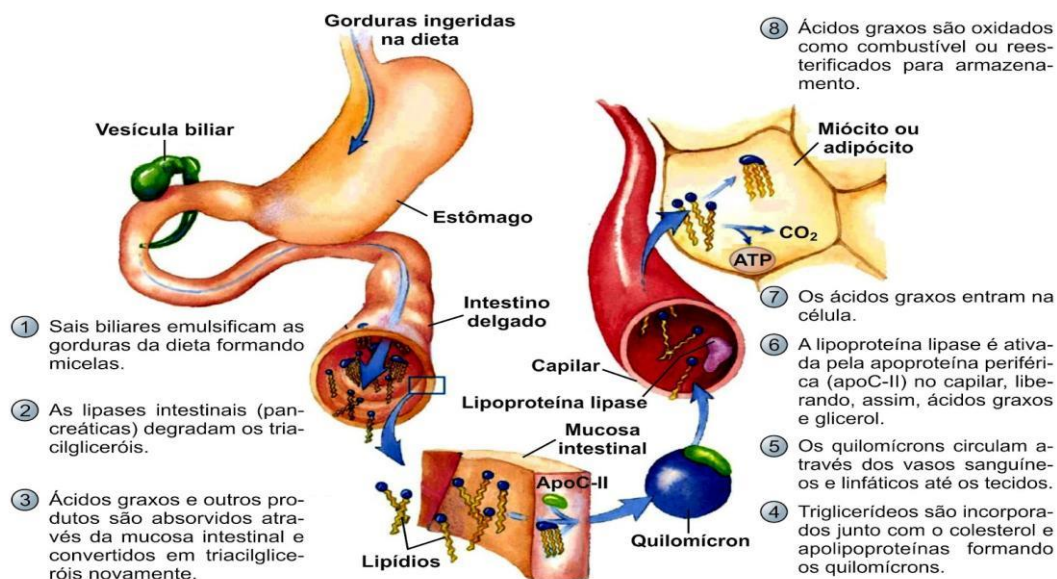


Figura 3. Ilustração do Metabolismo das gorduras

Fonte: <http://biobioaterosclerose.blogspot.com.br/2013/07/metabolismo-de-lipideos.html>

A diminuição na atividade da LPL pode influenciar as concentrações de lipídeos plasmáticos causando graus variados de hipertrigliceridemia isolada ou associada à hipercolesterolemia. (ALMEIDA, 2007).

A *LPL* está localizado no cromossomo 8 p 22 sendo composto por 10 éxons, interrompidos por 9 íntrons, com massa molecular de aproximadamente 35 kb, codificando uma proteína com 448 aminoácidos. O polimorfismo S447X ocorre no éxon 9 do gene *LPL*, havendo a substituição de citosina (C) por guanina (G) na posição (1595) rs 328. Das várias mutações descritas no gene, a *LPL* Asp9Asn, Asn291Ser e a S447X são as mais importantes pela maior frequência e influência na suscetibilidade à aterosclerose (ALMEIDA, 2007).

Estudo recente mostrou associação entre polimorfismo Asp9Asn e infarto do miocárdio em pacientes com Diabetes melito 2. Polimorfismo Asn291Ser foi um importante fator predisponente para pacientes hipertrigliceridêmicos na população da Irlanda do Norte. No entanto, o polimorfismo S447X (G1595C) no gene da *LPL* gera um códon de parada prematura, truncando os dois últimos aminoácidos, resíduos de serina e glicina, na região final carboxila da proteína, associado com efeitos opostos (de proteção) quando comparado com polimorfismo Asp9Asn e Asn291Ser (VASUDEVAN, 2009).

Em trabalho realizado por Thu et al. (2006) no Vietnam, com 351 crianças do gênero feminino, entre 7 e 9 anos de idade, encontraram frequência alélica de 2,0% para polimorfismo *LPL* 447XX e 19,7% para polimorfismo *LPL* 447SX, resultando numa frequência alélica de 11,9%. Quando avaliado polimorfismo *LPL* S447X e concentração

plasmática de lipídeos os autores encontraram diferentes concentrações para TG entre alelos *LPL* 447SS e alelos *LPL* 447SX/XX). A concentração plasmática de HDL-C foi alta em indivíduos com alelos *LPL* 447SX/XX em comparação ao alelo *LPL* 447SS, contudo, fatores ambientais também influenciaram na concentração plasmática de HDL-C. No geral, a concentração plasmática de HDL-C foi de 7,4% mais elevada e a concentração plasmática de TG foi 13,6% menor em portadores do alelo *LPL* 447X do que os portadores do alelo *LPL* 447S. Apesar de alguns estudos sugerirem que o alelo 447X exerce um fator de proteção, testada *in vitro*, a atividade da *LPL* em relação à presença do polimorfismo S447X, tem sido descrita tanto como muito aumentada quanto como ligeiramente diminuída, ou não alterada, conforme a maioria dos estudos, gerando controvérsia (ALMEIDA, 2007).

Outro gene também associado com doenças cardiovasculares é o Neuropeptídeo Y (NPY). O NPY é um neurotransmissor que se caracteriza por ser um peptídeo de 36 aminoácidos cujo gene está localizado no cromossomo 7q 15.1 com cerca de 8 kb de extensão abrangendo 04 éxons interrompidos por 03 íntrons, com um terminal carboxílico amidado e muitos resíduos de tirosina (isto explica o “Y” da sua denominação). É amplamente distribuído nos mamíferos e abundantes no sistema nervoso central e Periférico (MASOUDI-KAZEMABAD et al, 2012). O NPY foi isolado primeiramente em cérebro de porco, (TATEMOTO, 1982), pertence a uma família de peptídeo que abrangem: o peptídeo YY (PYY) e o polipeptídeo pancreático (PP). Seu precursor é o propeptídeo constituído por 97 aminoácidos que sofre processos sucessivos de clivagem passando a Pro-NPY que sob a ação de enzimas como enzima carboxipeptidase B (CPB) e peptil-glicina-amino-monoxigenase (PAM), se converte no NPY₁₋₃₆ amidado, que é a forma biologicamente ativa. A função do NPY depende dos receptores ligados à proteína G, conhecidos como: Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅ e Y₆, sendo o penúltimo ligado à regulação do apetite (MICHEL et al., 1998). Esse neurotransmissor está presente em grande concentração nas fibras nervosas do cérebro, coração, vasos sanguíneos e trato gastrointestinal (PESONEN, 2008; ALDANA, 2000), envolvido em diversas funções fisiológicas como controle do apetite (estimulando a ingestão de alimentos ou com papel regulatório no eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal), propriedades regulatórias da pressão sanguínea e no ritmo circadiano (KAIPPIO, 2009). O NPY é o peptídeo mais abundante no miocárdio e existe em grandes concentrações nas fibras nervosas simpáticas perivasculares. Funciona simultaneamente como um hormônio ubíquo (ZUKOWSKA et al., 1998) e como um neurotransmissor simpático, com atividade pleiotrópica na homeostase cardiovascular (ZUKOWSKA et al., 2003). Desta forma, polimorfismos no

NPY tem sido relacionados a diversas desordens, como por exemplo, sua relação com diferenças na resposta ao stress (ZHOU, 2008), comportamento depressivo (KOEFOED et al. 2012) alcoolismo (MOTTAGUI-TABAR, 2005), diabetes tipo 2 (JAAKKOLA et al, 2007; UKKOLA, 2007), ingestão de alimentos e obesidade (KARVONEN, 2006) e hipertensão (WALLERSTEDT, 2004), sendo estes últimos fatores de risco para DAC. O mecanismo de controle do comportamento alimentar envolve a ação da leptina, hormônio que é secretado em resposta ao excesso de ingestão alimentar, inibindo a produção de *NPY*, cuja alta concentração no plasma sanguíneo, estimula o consumo de alimento (WANDERLEY; FERREIRA, 2010).

Segundo Marchi-Alves et al. (2010) a alta concentração de *NPY*, causa também hipersecreção de insulina e de glicocorticoides com secreção subsequente de leptina. Portanto, a ineficiência em reduzir a produção de *NPY*, gera um fenótipo marcado pela deposição de gordura ou obesidade, e o excesso de peso está associado a complicações metabólicas e hemodinâmicas que levam à hipertensão e conseqüentemente à doença aterosclerótica cardíaca. Além disso, o Neuropeptídeo Y estimula a migração de monócitos e regula o metabolismo do colesterol, influenciando os níveis séricos de colesterol LDL e a deposição destas partículas na parede arterial. Contribui, assim, para a formação de células espumosas. Este neuropeptídeo promove também a ativação de plaquetas, a migração e ativação de monócitos, acelerando a progressão do processo aterosclerótico (KUO et al., 2007). Dessa forma, mutações que aumentem a concentração de *NPY* no sangue podem predispor os seus portadores à DAC.

O polimorfismo Leucina7Prolina é um polimorfismo de nucleotídeo único, (SNP) no gene do *NPY* e tem sido associado a níveis séricos elevados de lipídios e doenças cardiovasculares. O polimorfismo é resultante da alteração de uma timina por uma citosina (T1128C), rs 16139 que culmina na troca de uma leucina por prolina na posição do sétimo aminoácido (Leu7Pro), caracterizando uma mutação pontual do tipo não sinônima e de transição, que sugere a alteração da síntese, transporte ou secreção deste neuropeptídeo no plasma sanguíneo (MITCHELL, 2008). Entretanto, devido a poucos estudos realizados, não se sabe ao certo se o alelo Pro7 está associado com o aumento ou diminuição do risco a DAC.

Ilveskoski et al (2008) investigaram a associação do polimorfismo Leu7Pro com aterosclerose coronária em 410 homens caucasianos que faleceram subitamente. Foram analisados áreas de aterosclerose coronariana, estreitamento das artérias coronárias, presença de infarto do miocárdio e / ou trombose coronariana. Os pesquisadores encontraram distribuição de 89,8% para o genótipo Leu7/Leu7, Leu7/Pro7 igual a 10% e

Pro7/Pro7 igual a 0,2%. Embora o alelo Pro7 tenha sido associado com hipertensão arterial referida ($p=0,03$), os homens portadores do alelo Pro7 apresentaram menor área de estrias gordurosas, lesões de fibrose e lesões complexas na artéria coronária esquerda descendente anterior do que os homens com o genótipo Leu7/Leu7. Os autores concluem que substituição Pro7 no gene *NPY* protege homens de meia idade da aterosclerose coronária e pode diminuir o risco de eventos coronarianos agudos.

Desta forma tanto o polimorfismo S447X da *LPL* como o Leu7Pro do *NPY* foram analisados neste presente estudo e sua associação com níveis lipídicos e DAC estabelecidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

O presente estudo foi planejado sob a forma de um desenho do tipo caso-controle, onde os casos foram comparados com controles de vizinhança.

3.1.1 Definição e seleção de casos:

Foram considerados casos os pacientes, com Doença Arterial Coronária, atendidos no Instituto de Cardiologia do Recôncavo (INCAR), com a doença documentada angiograficamente ou com episódio de infarto do miocárdio e presença de alterações eletrocardiográficas características, diagnosticados entre os meses de janeiro de 2010 e dezembro 2013. Os casos elegíveis para o estudo foram selecionados por ordem cronológica de ingresso no INCAR, até o completo número previsto para o tamanho da amostra. O procedimento inicial foi o cadastramento dos casos e mapeamento dos respectivos locais de residência, onde foram realizada uma entrevista padronizada. Em situações que impediram a entrevista do caso selecionado, como óbito, não localização do endereço ou recusa em participar do estudo, foi feita substituição, priorizando-se para a entrevista um caso com data de ingresso próxima àquela do caso excluído.

3.1.2 Definição e seleção de controles.

A cada semana foi confeccionada uma listagem contendo a distribuição por sexo e faixa etária dos casos entrevistados. Cada caso foi emparelhado por sexo e faixa etária (intervalo de 5 anos) com um controle de vizinhança, tendo sido previamente estabelecido que, para fazer parte do grupo-controle, foram incluídos no estudo indivíduos sem história clínica de DAC com avaliação clínica, cardiológica e eletrocardiograma de repouso e de esforço normais. Os controles de vizinhança foram selecionados a partir dos subdistritos de residência dos respectivos casos. Não foram selecionados controles da mesma residência do caso ou que apresentassem, em relação a este, algum grau de parentesco.

3.1.3. Definição da exposição.

Os participantes desse estudo foram avaliados quanto aos polimorfismos da enzima Lipase Lipoproteica e do Neuropeptídeo Y, bem como dados clínicos, antropométricos, sócio-demográficos e de consumo alimentar.

Foram excluídos deste estudo portadores de doenças reumáticas, hepáticas, renais, endócrinas e neurológicas.

Todos os participantes deste estudo foram voluntários e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2. Instrumentos e Técnicas de Coletas de Dados

O questionário sócio-demográfico, clínico e antropométrico para obtenção dos dados sócio-demográficos e clínicos, foi aplicado por meio de entrevista, adaptado do estudo realizado por Di Pietro et al. (2007).

3.3. Avaliação Bioquímica

Foram coletadas amostras sanguíneas em dois tubos a vácuo (15 mL) através de punção da veia intermédica do braço, por um profissional capacitado da área da enfermagem do INCAR ou da UFRB. Um dos tubos, contendo as amostras foi utilizado para dosagem de triglicérides, colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL colesterol e concentração de glicose no sangue, segundo protocolos descritos pelos fabricantes dos conjuntos diagnósticos. O outro tubo com as amostras coletadas, contendo EDTA, foi transportada em recipiente térmico, com gelo, até o Laboratório de Imunopatologia e Genética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia para extração de DNA genômico conforme as recomendações do fabricante.

3.4. Extração de DNA Genômico

Três mililitros de sangue periférico foram obtidos juntamente na coleta inicial em tubos contendo EDTA. As amostras de sangue foram encaminhadas ao Laboratório de Imunopatologia e Genética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia onde o DNA

genômico foi extraído. Foi utilizado o conjunto para diagnóstico de extração kiagen flexigene 250. O procedimento obedeceu ao protocolo do fabricante adaptado ao laboratório local obedecendo aos seguintes passos:

- a) Limpeza da bancada com hipoclorito de sódio e álcool 70%, Ligar o banho-maria para que esteja na temperatura desejada (64°C);
- b) Coleta de cerca de 3mL de sangue periférico e centrifugar por 10 min a 3000g;
- c) Com o auxílio de uma ponteira de 1000uL (com ponta cortada) retirar 1mL do *buffy coat* (aglomerado de leucócitos localizados entre plasma e hemácias) e transferir para um tubo tipo *ependorf* de 2mL;
- d) Adicionar 1mL do reagente FG1 (tampão de lise) no tubo *ependorf* de 2mL com o *buffy coat*;
- e) Homogeneizar por inversão 5 vezes e centrifugar a 11000g por 3 min;
- f) Descartar o sobrenadante;
- g) Repetir os passos 3 a 5 diminuindo a quantidade de FG1 para 0,5mL
- h) Adicionar ao *pellet* resultante a mistura de 500uL do reagente FG2 + 5uL de proteinase K;
- i) Dissolver totalmente o pellet no Vortex;
- j) Levar ao banho-maria à temperatura de 60-65°C por 20 min;
- k) Acrescentar 1mL de isopropanol 100%;
- l) Homogeneizar por inversão 5 vezes e centrifugar a 11000g por 3min;
- m) Descartar sobrenadante e decantar o restante em papel absorvente;
- n) Acrescentar 1mL de etanol 70%;
- o) Homogeneizar por inversão 5 vezes e centrifugar a 11000g por 3min;
- p) Descartar sobrenadante e decantar o restante em papel absorvente;
- q) Adicionar 350uL do reagente FG3;
- r) Transferir o conteúdo para um tubo *ependorf* devidamente identificado com número e iniciais do paciente. Separar uma alíquota de 50uL no tubo *ependorf* de 0,5mL;
- s) Armazenar o DNA extraído em freezer -20°C;
- t) Limpar a bancada novamente com hipoclorito de sódio e álcool 70% e fechar o descarte com papel metro identificando-o com o nome, data e laboratório para que depois possa ser autoclavado.

3.4.1 Quantificação do DNA

As bases púricas e pirimídicas que constituem o DNA absorvem preferencialmente radiação de comprimento de onda de cerca de 260 nm. (Stryer, 1995) O DNA obtido foi quantificado por um espectrofotômetro, (Smart Spec™ Plus, BioRad) através da leitura da absorbância a 260 nm. Considerou-se que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 50 µl/mL de DNA de dupla cadeia. A concentração de DNA foi calculada segundo a fórmula: [DNA] = D.O. A 260nm x constante da dupla hélice (µg/mL).

3.5. Amplificação de DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase:

Os genes da LPL e NPY foram amplificados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se 50ng de DNA genômico em 25 µL de reação, contendo Tris-HCl 10mM pH 8,3, KCL 50mM, MgCL2 1,5mM, dNTP, 0,5µg de cada primer: LPL1-forward, 5'- TAC ACT AGC AAT GTC TAG CTG A-3' e LPL2 – reverse, 5'-TCA GCT TTA GCC CAG AAT GC-3', e 1,25U de TaqDNA-polimerase. A mistura foi submetida a 90°C /5min de pré-tratamento seguido por 35 ciclos de 94°C/1min, 60°C/30seg, 72°C/45seg, e concluído com 72°C/2min, gerando um produto de PCR de 488pb. As condições para o gene NPY são as seguintes: primer NPY1, 5'-CCCGTCCGTTGAGCCTTCTG-3' e NPY2, 5'-CGGTCCCGCGGTCCC-3'. A mistura foi submetida a 94°C/5min de pré tratamento seguido por 30 ciclos de 94°C/1min, 69°C/1min, 72°C/1min, e concluído com 72°C/10min, gerando um produto de PCR de 238pb. Todo este tratamento foi realizado em Termociclador da amplitherm (Tabela 1).

Quadro1. Sequência dos Primers, condições da PCR e produtos e enzimas de restrição usadas.

Gene	Sequência dos primers	Condições da PCR tamanho do amplicom	Enzima de Restrição
LPL	Forward 5'- TACTACTAGCAA GTCTA CTG A-3' Reverse 5'-TCA GCT TTA GCC CAG AAT GC-3'	90°C /5m/ 94°C/1min, 60°C/30seg, 72°C/45seg, 72°C/2min, 488pb.	<i>MNLI</i>
NPY	Forward 5'-CCCGTCCGTTGAGCCTTCTG-3' Reverse 5'-CGGTCCCGCGGTCCC-3'	94°C/5m 30 ciclos de 94°C/1min, 69°C/1min, 72°C/1min, 72°C/10m, 238pb	<i>BSIEI</i>

3.6. Análise do Polimorfismo do Genes LPL e NPY por PCR-RFLP

Após amplificação, os produtos de PCR (1 a 3 uL) foram purificados em sistema QIAquick PCR Purification Kit QIAGEN® Spin Columns. Em seguida 2uL de DNA amplificado da *LPL* foi digerido com 1,25U de *MnLI* a 37°C por 18 horas, sendo os fragmentos resultantes separados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com corante Red. A presença dos fragmentos de 285 e 203 pb indica homozigose do alelo selvagem (CC), enquanto a presença dos produtos de 250, 200 e 38 pb indica homozigose do alelo mutante (GG) e dos produtos de 288, 250, 200 e 38 pb indica heterozigose (genótipo CG). Os alelos selvagens e mutantes foram expressos como S447 e X447, respectivamente.

Para o gene *NPY*, 2uL de DNA amplificado foi digerido com 1,25U de *BsiEI* a 37°C por 18 horas, sendo os fragmentos resultantes separados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com gel Red. A presença de fragmento de 238pb indica homozigose do alelo selvagem (Leu7/Leu7), enquanto a presença dos produtos de 190 e 48pb indica homozigose do alelo mutante (Pro7/Pro7) e dos produtos de 238, 190 e 48pb indica heterozigose (Leu7/Pro7).

Os resultados foram registrados por fotos digitalizadas através de sistema digital de armazenamento (EDAS 290, Kodak: cat. No.8486045). Os alelos que não tiverem as mesmas características dos já descritos na literatura (comprimento e padrões de restrição) foram sequenciados em sequenciador ABI 377.

3.7 Tamanhos da amostra

Utilizou-se os seguintes parâmetros: erro tipo I (α) de 5%, presença dos polimorfismos da enzima Lipase Lipoprotéica e do Neuropeptídeo Y de 50% a 70%, proporção de expostos entre controles de 70 e 90%, e poder de teste de 80% e 90%. O cálculo foi de 100 casos pareados para um a quatro controles.

3.8 Análise Estatística dos Resultados

Foi realizada a descrição dos casos e controles segundo as variáveis de estudo presença dos polimorfismos da enzima Lipase Lipoprotéica e do Neuropeptídeo Y, sexo, etc. Variáveis contínuas comparadas através do test *t* de Student e variáveis categóricas

através do teste χ^2 -quadrado. Análise estratificada: associação entre o desfecho (dislipidemia e Doença Arterial Coronária) e presença dos polimorfismos da enzima Lípase Lipoproteica e do Neuropeptídeo y para toda a população e em subgrupos, estimando o *Odds Ratio* (OR) bruto (não ajustado).

Parâmetros descritivos foram dados como média \pm (Desvio Padrão) e em porcentagens para as variáveis com distribuição normal. As comparações foram feitas para detectar significância entre grupos de médias, um teste t- amostras independentes foram utilizadas para analisar as diferenças de médias para as variáveis com distribuição normal.

A análise de regressão logística foi realizada para encontrar a associação entre o desfecho (DAC) e a exposição principal (os polimorfismos). Um valor P bicaudal menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Todas as frequências dos alelos, dos genótipos e dos fenótipos identificadas foram representados como valores percentuais. A equação de Hardy-Weinberg foi utilizada para o cálculo de frequência entre alelos mutantes e selvagens.

4. RESULTADOS

Este estudo teve uma amostragem de 175 indivíduos com um desenho do tipo caso-controle onde 79 (45.14 %) dos indivíduos faziam parte dos casos e apresentavam uma média de idade de 64,8 anos e 96 (54.86%) dos indivíduos faziam parte dos controles, com média de idade de 63,0 anos, especificando ainda mais, obteve-se entre os casos 25 mulheres e 54 homens e entre os controles 34 mulheres e 62 homens. Todos os participantes eram indivíduos que residiam em algum município do Recôncavo baiano ou, foram atendidos no Instituto de cardiologia do recôncavo. Foram analisados o perfil lipídico e antropométricos entre casos e controles (tabela 1), quando as médias foram comparadas as concentrações de colesterol total e de LDL colesterol no plasma sanguíneo, tiveram uma significativa diferença estatísticas entre casos e controles se mostrando reduzidas nos casos em relação aos controles ($p < 0.001$). Além destas, a medida da circunferência foi significativamente maior nos casos em relação aos controles ($p = 0,034$).

Tabela 1. Características dos participantes do estudo quanto ao perfil lipídico e antropométrico.

Variáveis	Pacientes com DAC (n= 79)	Controles (n= 96)	significância, p
Idade (anos)	64,8± 8, 8	63,0 ± 9, 2	0,177
Sexo F/M	25/54	34/62	0,599
CT (mg/dl)	161,3 ± 44,4	190,7 ± 44,8	<0,001
HDL-C (mg/dl)	43, 1 ± 8, 9	41, 6 ± 9, 0	0,280
LDL-C (mg/dl)	89, 8 ± 33, 1	115, 4 ± 39, 6	<0,001
TG (mg/dl)	146, 1 ± 102, 5	175, 6 ± 103,	0,063
VLDL (mg/dl)	30, 7 ± 20, 9	34, 9 ± 20, 6	0,191
IMC (kg/m ²)	27, 1 ± 3, 9	26, 1 ± 4, 4	0,117
CQ (cm)	97, 8 ± 7, 8	95, 1 ± 8, 7	0,034
CA (cm)	97,3 ± 10, 2	94,5 ± 11, 8	0,111

Diferenças entre grupos foram avaliadas por Student's t-test; CT- colesterol total; HDL-C- colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-C- colesterol de lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C- colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade; ICM- índice de massa corpórea; CQ- circunferência do quadril; CA-circunferência abdominal;

A distribuição do perfil lipídico e antropométrico entre os portadores, constituídos por indivíduos heterozigotos (CG) e homozigotos mutantes (GG), para o polimorfismo da *LPL* (S447X), e não portadores constituídos por homozigotos selvagens (CC). Num total de 172 indivíduos genotipados, 30 (17.44%) eram portadores e 142 (82.56 %) eram homozigotos selvagens. Entre os portadores 06 eram do gênero feminino e 24 do gênero masculino, já nos não portadores 53 indivíduos do gênero feminino e 89 do gênero masculino. Não houve significância estatística entre os grupos, todavia, houve uma maior

média das concentrações de triglicerídeos e de colesterol total, assim como uma menor média das concentrações de HDL colesterol no grupo dos não portadores em relação aos portadores (tabela 2).

Tabela 2. Distribuição do perfil lipídico e antropométrico, quanto aos portadores e não portadores do polimorfismo S447X.

Variáveis	S447X + 447X (n = 30) (Portadores)	S447 (n = 142) (Não Portadores)	significância, p
Idade (anos)	64,5 ± 9, 6	63,7 ± 9,0	0, 653
Sexo F/M	6 /24	53/89	0, 069
CT (mg/dl)	175, 2 ± 46, 1	178, 9 ± 47, 4	0, 697
HDL-C (mg/dl)	43, 5 ± 7, 3	42, 2 ± 9, 8	0, 500
LDL-C (mg/dl)	102, 9 ± 38, 1	104, 7 ± 39, 2	0, 818
TG (mg/dl)	145, 6 ± 96, 2	166, 8 ± 106, 4	0, 315
VLDL (mg/dl)	31, 74 ± 20, 1	33, 5 ± 21, 2	0, 678
IMC (kg/m ²)	26, 6 ± 4, 2	26, 5 ± 4, 2	0, 880
CQ (cm)	95, 4 ± 9, 3	96, 5 ± 8, 2	0, 536
CA (cm)	97, 3 ± 13, 1	95, 4 ± 10, 8	0, 405

Diferenças entre grupos foram avaliadas por Student's t-test; CT- colesterol total; HDL-C- colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-C- colesterol de lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C- colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade; ICM- índice de massa corpórea; CQ- circunferência do quadril Circunferência abdominal;

A distribuição dos portadores e não portadores em relação ao polimorfismo S447X entre casos e controles (tabela 03), em um total de $n = 30$ (17, 44%) para os portadores, distribuídos com $n= 13$ (7,5%) portadores nos casos e $n= 17$ (9, 8%) nos controles, para os não portadores $n=142$ (82, 56%) distribuídos com $n= 65$ (37, 7%) nos casos e $n= 77$ (44, 7%) nos controles, as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste do Qui-Quadrado com p valor = 0,807.

Tabela 3. Distribuição quanto aos portadores e não portadores do polimorfismo S447X entre Casos e controles.

Variáveis	S447X + 447X (n = 30)	S447 (n = 142)
Casos	13	65
Controles	17	77

Diferenças entre grupos foram avaliadas pelo teste Qui-Quadrado com o p valor = 0, 807.

Foi feita uma análise do perfil lipídico somente com os casos (pacientes) entre portadores e não portadores do polimorfismo S447X (tabela 04), a comparação das médias mostraram níveis de triglicerídeos menores nos portadores do polimorfismo S447X da *LPL* em relação aos não portadores ($p= 0, 086$), verificou-se também uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações médias de HDL entre

portadores e não portadores, apresentando níveis maiores entre os portadores quando comparados com os não portadores ($p=0,018$).

Tabela 4. Distribuição do perfil lipídico dos casos entre portadores e não portadores do polimorfismo S447X.

Lipídios (mg /dl)	S447X + 447X (n =13)	S447 (n = 65)	P
HDL	49,0 ± 4.1	42,7 ± 8.3	0,018
TG	103,2 ± 48.4	165,8 ± 116.2	0,086
CT	176,2 ± 28.5	167,5 ± 45.8	0,549
LDL	106,9 ± 25.9	91,7 ± 33.6	0,164

Diferenças entre grupos foram avaliadas por Student's t-test; LPL S447X ? 447X grupo com o gene polimórfico; S447 grupo sem o gene polimórfico; TG -triglicérido; HDL-C- Lipoproteína de alta densidade; LDL-C- Lipoproteína de baixa densidade ; CT- colesterol total.

Com relação ao segundo marcador, o NPY, a ocorrência do polimorfismo se mostrou rara na população. Dos 175 indivíduos que participaram da pesquisa e foram genotipados, apenas 06 (3,4%) dos indivíduos apresentaram o polimorfismo em heterozigose (Leu7Pro). Não foi encontrado o polimorfismo em homozigose nos indivíduos participantes. Foi analisada a distribuição da população estudada em relação aos portadores (Leu7Pro) e não portadores Leu7Leu do NPY (tabela 5). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste do Qui- Quadrado com ($p= 0,151$) não havendo portanto uma significância entre os mesmos.

Tabela 5. Distribuição quanto aos portadores e não portadores do polimorfismo Leu7Pro entre Casos e controles

Variáveis	Leu7Pro (n = 6) (Portadores)	Leu7Leu (n = 166) (Não Portadores)
Casos	01	77
Controles	05	89

Diferenças entre grupos foram avaliadas pelo teste Qui-Quadrado com o p valor = 0,151.

Assim como a LPL, foi realizada neste estudo, uma análise do perfil lipídico e antropométrico entre portadores e não portadores do polimorfismo Leu7Pro do NPY, (tabela 6), os resultados não mostraram significância estatística entre os grupos, mas revelaram, maiores médias das concentrações de colesterol total e LDL-C colesterol entre os portadores em relação aos não portadores, assim como, menores níveis de triglicérides, VLDL, índice de massa corpórea (IMC) e circunferência do quadril entre os mesmos.

Tabela 6. Distribuição do perfil lipídico e antropométrico, quanto aos portadores e não portadores do polimorfismo Leu7Pro.

Variáveis	Leu7Pro (n = 6) (portadores)	Leu7Leu (n = 166) (não portadores)	significância, p
Idade (anos)	61, 5 ± 7, 4	63, 9 ± 9, 2	0, 517
Sexo F/M	2 /4	57/109	0, 959
CT (mg/dl)	182, 8 ± 26.0	178, 1± 47.7	0, 810
HDL-C (mg/dl)	47, 6 ± 10, 9	42, 3 ± 9, 3	0, 173
LDL-C (mg/dl)	106, 8 ± 25, 0	104, 3 ± 39, 6	0, 877
TG (mg/dl)	141, 8 ± 38, 9	163, 8 ± 106, 0	0, 613
VLDL (mg/dl)	28, 3 ± 7, 9	33, 3 ± 21, 3	0, 566
IMC (kg/m ²)	24, 4 ± 4, 5	26, 6 ± 4, 2	0, 209
CQ (cm)	94, 1 ± 7, 3	96, 4 ± 8, 4	0, 519

Diferenças entre grupos foram avaliadas por Student's t-test; CT colesterol total; HDL-C colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-C colesterol de lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade; ICM índice de massa corpórea; CQ circunferência do quadril;

5. DISCUSSÃO

A LPL, por desempenhar um papel crucial no metabolismo dos lipídeos, é alvo em potencial para pesquisas relacionadas às doenças cardiovasculares. As variações no gene *LPL* têm sido implicadas em um número de condições patofisiológicas associadas a DAC. Desta forma, várias mutações do gene *LPL* têm sido identificadas até agora com diferentes efeitos nas concentrações lipídicas no plasma, e no desenvolvimento de aterosclerose.

Os resultados desta pesquisa, sugerem uma tendência do polimorfismo S447X exercer um fator de proteção na DAC, por aumentar a atividade da enzima LPL (AGIRBASLI et al. 2011), estes achados evidenciam médias lipídicas menores entre portadores em relação aos não portadores deste polimorfismo.

Apesar de haver poucos estudos associando o polimorfismo do gene da LPL com a DAC, os nossos achados corroboram com alguns estudos como o de Jensen et al. (2009), neste estudo foi investigado a associação entre a variante LPL S447X com as concentrações de lipídios e o risco de doença arterial coronariana (DAC) em três estudos prospectivos independentes, com uma amostragem de 245, 258 e 962 respectivamente. Os resultados indicaram diferenças significativas com níveis menores de triglicerídeos e maiores de HDL-C nos portadores em dois estudos, sugerindo que este polimorfismo confere proteção contra DAC.

Um estudo de Agirbasli et al.(2011) desenvolvido com 97 pacientes que constituíram o grupo dos casos e 81 indivíduos que constituíram o grupo controle em Istambul, Turquia, indicou que, o polimorfismo S447X, foi associado com significativa redução da severidade da DAC, apresentando uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de triglicerídeos entre portadores e não portadores do polimorfismo ($p= 0, 042$). Quando foi analisado o perfil lipídico entre portadores e não portadores somente entre os pacientes (casos) houve uma diferença significativa entre quase todas as variáveis lipídicas, com menor média de triglicerídeos entre os portadores ($p= 0, 015$), assim como para colesterol total ($p= 0, 016$) e LDL-C colesterol ($p= 0, 03$) em relação ao não portadores. Em nossos achados encontramos diferença significativa ao fazermos a mesma análise (tabela 4). Um outro estudo realizado na Tunísia também do tipo caso-controle de Jelassi et al. (2011) com uma amostragem de 244 indivíduos, onde 135 indivíduos formaram o grupo dos casos e 109 indivíduos constituíram o grupo dos controles, analisaram três marcadores para o gene da LPL e suas respectivas associações com Dac. O resultado deste estudo demonstrou que a frequência de

mudanças na LPL (P.Asp9Asn e p.Ser447X) não foi significativamente diferente entre indivíduos saudáveis e em pacientes, sugerindo que estas variações não são um fator de risco na população tunisiana. Todavia, a presença maior do polimorfismo Asp9Asn no grupo caso e menor no grupo controle, pode sugerir uma influência deste, no desenvolvimento de DAC. A variação (p.Asn291Ser) não foi encontrada sendo rara na população da Tunísia.

Pasalic et al. (2007), realizaram um estudo onde 132 pacientes e 98 controles submetidos a coroniografia em um hospital especializados em krapinske toplice, na Croácia, tiveram seu DNA analisados, para os haplótipos da LPL S447X e Hind III, com o objetivo de mensurar os efeitos combinatórios destes polimorfismos sobre as concentrações lipídicas no plasma sanguíneo dos indivíduos, de acordo com este estudo a combinação dos polimorfismos S447X e Hind III mostraram diferenças entre os casos e controles e seus achados sugeriram uma associação positiva destes marcadores com a hipertrigliceridemia e DAC. No Brasil Almeida *et al.* (2006) fizeram o primeiro relato da frequência do polimorfismo S447X da lipase lipoprotéica em pacientes com DAC prematura na população brasileira avaliando 313 pacientes com DAC prematura e 150 indivíduos sem história clínica de DAC, encontrando frequência de 23%. Diversos estudos mostram que, 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.

Segundo Filho *et al.* (2009), o polimorfismo S447X reduz o risco do desenvolvimento de patologias cardiovasculares relacionadas com o metabolismo lipídico. Esse polimorfismo foi relacionado com níveis altos de HDL-C e baixas concentrações de Triglicérides, ajudando a prevenir a DAC prematura (THU et al., 2006). O polimorfismo S447X é um dos mais frequentes entre as várias proteínas envolvidas no metabolismo intravascular de lipídios, incidindo em 17% a 22% da população caucasiana.

Além da LPL, foi analisado também o polimorfismo Leu7Pro do NPY em indivíduos do Recôncavo baiano. Em uma amostragem de 175 indivíduos apenas 06 (3,4%) eram portadores do polimorfismo em sua forma heterozigótica, o que indicou se tratar de uma mutação rara nesta população. A frequência do polimorfismo NPY Leu7Pro mostrou diferenças significativas entre algumas populações com diferentes antecedentes genéticos. Em populações caucasianas, a frequência desse polimorfismo tem sido relatada a variar entre 6% e 10% e em populações asiáticas tem sido relatada como rara (DING, 2003). Por exemplo, numa população chinesa de 304 pacientes com DAC um

paciente teve o polimorfismo Leu7Pro (Jia et al., 2005), também tem sido relatada como rara ou ausente em populações de coreanos e japoneses.

A distribuição do polimorfismo Leu7Pro tem um padrão geográfico, a frequência do alelo Leu7Pro mostrou gradiente decrescente no sentido norte para sul. As maiores frequências alélicas foram encontradas nos países nórdicos. O alelo 1128C NPY pode ter sido oriundo no norte da Europa, e depois se espalhou para a região vizinha (DING, 2003). Originalmente, o polimorfismo Leu7Pro foi relatado para estar associado com níveis elevados de lipídeos no plasma (KARVONEN et al. 1998), e estudos têm mostrado estar associada com um risco aumentado de doença cardiovascular (KARVONEN et al, 2001; NISKANEN et al, 2000). Mais recentemente com infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e acelerada progressão da aterosclerose (YU et al. 2010). Apesar de esses estudos indicarem uma associação deste polimorfismo com DAC, em nossos achados, não foram encontradas diferenças significativas entre portadores e não portadores em relação ao perfil lipídico e antropométrico dos indivíduos, uma possível explicação para tal, seria a baixa amostragem, todavia Masoudi-Kazemabad et al,(2012) realizaram um estudo caso-controle, utilizando um total de 1061 participantes no qual, 609 compunha os casos e 452 os controles, em uma população iraniana. Todos os indivíduos tiveram seus genótipos estabelecidos pelo método PCR-RFLP revelando apenas 64 portadores cerca de 6% do total das amostras, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa nas frequências de distribuição de genótipo e de alelos entre pacientes com angiografia positiva e angiografia negativa, nem entre os diferentes subgrupos de pacientes com base no número de vasos estenosadas na amostra como um todo, embora tenha havido uma associação significativa entre o polimorfismo e o grau de CAD entre aqueles que eram <50 anos de idade.

Em conclusão, neste estudo, as observações estão de acordo com a maioria dos achados no qual o polimorfismo S447X da lipase lipoproteica está associado com a diminuição das concentrações de triglicérides assim como o aumento do HDL-C colesterol nos portadores, especialmente nos casos (pacientes). Em relação ao NPY, além de ter sido raro, na população estudada, não houve diferença significativa entre portadores e não portadores, embora as médias de colesterol e LDL-C tenham sido maiores entre os portadores, o que está em conformidade com alguns estudos.

O presente estudo teve o objetivo de analisar os portadores do S447X e do Leu7Pro simultaneamente e sua associação com o perfil lipídico e DAC, porém apenas um indivíduo apresentou este genótipo impossibilitando a análise estatística. Sugere-se, portanto, uma amostragem maior para que resultados mais conclusivos sejam obtidos.

REFERÊNCIAS:

AGIRBASLI, M. et al. **The S447X variant of lipoprotein lipase gene is inversely associated with severity of coronary artery disease.** Heart Vessels. 2011; 26:457–463

ALDANA, I. et al. **New antagonist agents of Neuropeptide Y Receptors.** Química Nova. 2000; 23(6): 737-41.

ALMEIDA, K. A. et al. **Polimorfismo S447X da Lipase Lipoproteica: Influência sobre a Incidência de Doença Arterial Coronariana Prematura e sobre os Lípides Plasmáticos.** Arq Bras Cardiol. 2007; 88(3): 297-303.

ALVES, A. A. S.; MARQUES, I. R. **Fatores relacionados ao risco de doença arterial coronariana entre estudantes de enfermagem.** Rev Bras Enferm. 2009; 62(6):883-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: URL: <http://www.datasus.gov>. Acesso em: janeiro de 2010.

BUENO, C. S.; MOREIRA, A.C.; OLIVEIRA, K. R. **Preço dos medicamentos utilizados nas doenças cardiovasculares no Brasil.** Rev. Panam. Salud Publica. 2012; 31(1): 62–7.

CANTOS, G. A. et al. **Avaliação da intervenção multiprofissional e interdisciplinar na evolução do quadro clínico de pacientes com alto risco de doença arterial coronariana.** RBAC. 2006; 38(3): 159-162.

DING, B. **Distribution of the NPY 1128C allele frequency in different populations.** J Neural Transm. 2003 Nov; 110(11): 1199-204.

DI PIETRO, P.F. et al. **Breast cancer in southern Brazil: association with past dietary intake.** Nutr Hosp. 2007; 22:565-72

DÓREA, E. L, LOTUFO, P. A. **Framingham Heart Study e a teoria do contínuo de Pickering: duas contribuições da epidemiologia para a associação entre pressão arterial e doença cardiovascular.** Rev Bras Hipertens 2001; 8: 195-00.

FILHO, H. M. T.; LUCENA, B. **Biochips – mapeamento da genética individual.** Richet Nouvelles. 2009; Vol.-5.

FRANCESCHI, D. A. S. et al. **Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos genéticos de *TNF* e *IL2*.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2009; 31(4).

GIROLDO, M. L.; ALVES, A. S.; BAPTISTA F. **Doença Aterosclerótica: Uma Patologia Multi - Fatorial.** Campo Mourão, 2007; v. 2 n.1: p. 32-41.

GRIFFITHS, A. et al. **Introdução à genética.** 9 ed- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

IIVESKOSKI, E. et al. **Neuropeptide Y signal peptide Pro7 substitution protects against coronary artery atherosclerosis: the Helsinki Sudden Death Study.** *Atherosclerosis*. 2008; 199(2): 445-50.

ISHITANI, L. H. et al. **Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil.** *Rev. Saúde Pública*. 2006; v.40 n.4.

JAAKKOLA, U. et al. **Impact of the Leu7Pro polymorphism of preproNPY on diurnal NPY and hormone secretion in type 2 diabetes.** *Exp Clin Endocrinol Diabet*. 2007; 115(5): 281-6.

JENSEN, M. K. et al. **S447X variant of the lipoprotein lipase gene, lipids, and risk of coronary heart disease in three prospective cohort studies.** *Am Heart J*. 2009; 157(2): 384–390.

KAIPPIO, K.; KALLIO, J.; PESONEN, U. **The effect of endogenous preproneuropeptide Y leucine 7 to proline 7 polymorphism on growth and apoptosis in primary cultured HUVECs.** *Biol Chem*. 2009; 390(9): 899-905.

KARVONEN, M. K. et al. **Nutrient intake, weight, and Leu7Pro polymorphism in prepro-neuropeptide Y in children.** *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(11): 4664-8.

KOEFOED, P. et al. **Association of the leucine-7 to proline-7 variation in the signal sequence of neuropeptide Y with major depression.** *Acta Neuropsychiatrica*, .2012. 24(2), 81–90.

KUO, L. E.; ZUKOWSKA, Z. **Stress, NPY and vascular remodeling: Implications for stress-related diseases.** *Peptides* 2007; 28 (2): 435-440.

LOTUFO, P. A. **Stroke in Brazil: a neglected disease.** *São Paulo Med J*. 2005: 123(1): 3-4.

MARCHI-ALVES, L.M. et al. **Leptina, hipertensão arterial e obesidade: importância das ações de enfermagem.** *Acta Paul Enferm* 2010; 23(2):286-90.

MASOUDI-KAZEMABAD et al. **Neuropeptide Y Leu7Pro Polymorphism Associated With the Metabolic Syndrome and Its Features in Patients With Coronary Artery Disease.** *Angiology*. 2013. 64(1) 40-45.

MITCHELL, G. C. et al. **A common single nucleotide polymorphism alters the synthesis and secretion of neuropeptide Y.** *J Neurosci*. 2008; 28(53): 1428-34.

MICHEL M. C. et al. **International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors.** *Pharmacol Rev* .1998. XVI 50, 143-150.

MOTTAGUI-TABAR, S. et al. **A novel single nucleotide polymorphism of the neuropeptide Y (NPY) gene associated with alcohol dependence.** *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29(5): 702-7.

NOLTE, E.; MCKEE, M. **Does healthcare save lives? Avoidable mortality revisited.** London: Nuffield Trust. 2004.

NOVAK, E. M.; BYDLOWISKI, S. P. **Biologia Molecular das Dislipidemias. Variação Genética das Apolipoproteínas.** Arq Bras Cardiol volume. 1996; 67(6): 411-17.

PASALIC, D. et. al. **Association of Two Genetic Variations of Lipoprotein Lipase, S447X and Hind III, with Coronary Artery Disease and Hypertriglyceridemia.** Coll. Antropol. 30 (2006) 3: 549–554.

PEREIRA, A. C.; KRIEGER, J. E. **Conceitos Básicos em Cardiologia Molecular.** In: Genética e Coração. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2004; 14(3): 401-10.

PEREIRA, J. C.; BARRETO, S.M.; PASSOS, V.M.A. **Perfil de risco cardiovascular e autoavaliação da saúde no Brasil: estudo de base populacional.** Rev Panam Salud Publica. 2009; 25(6): 491–8.

PESONEN, U. **NPY L7P polymorphism and metabolic diseases.** Regul Pept. 2008; 149(1-3): 51-55.

ROSA, T. E. C. et al. **Integralidade da atenção às doenças cardiovasculares e diabetes mellitus: o papel da regionalização do Sistema Único de Saúde no estado de São Paulo.** Revista Brasileira de Epidemiologia. 2009; 12(2): 158-71.

ROSINI, N. et al. **Prevalência e Associação de Dislipidemias em Pacientes com Três Fatores de Risco Associados para Doença Cardiovascular: Hipertensão, Tabagismo e Histórico Familiar.** 2005. NewsLab - edição 71.

SÁ, A. C. M. **O papel dos polimorfismos genéticos na doença cardíaca isquêmica.** 2010. 34 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) Instituto de Ciências Biomédicas de “Abel Salazar” Universidade do Porto, Ruivães, 2010.

SASAKI, J. E.; SANTOS, M. G. **O papel do exercício aeróbico sobre a função endotelial e sobre os fatores de risco cardiovasculares.** Revista Atualização Clínica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2006. n. 87. p. 227-233.

SCHMIDT, M. I. **Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges.** Lancet. 2011; 377 (9781) :1949-1961.

SCHUCH, J. B.; VOIGT, F.; MALUF, S. W.; DE ANDRADE F. M. **Nutrigenética: a interação entre hábitos alimentares e o perfil genético individual.** Rev. bras. Bioci. 2010, 8: 73-84.

TATEMOTO, K. **Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide.** Proc Natl Acad Sci. U S A 1982. 79, 5485-5489.

TAVARES, A. **Polimorfismos dos genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e as moléstias cardiovasculares.** Rev Bras Hipertens. 2000; 3: 237-42.

THU, N.N. et al. **Plasma Triglyceride and HDL-Cholesterol Concentrations in Vietnamese Girls Are Affected by Lipoprotein Lipase, but Not Apolipoprotein CIII Polymorphism.** The Journal of Nutrition. 2006; 1488-92.

TRIPATHI, R.; TEWARD, S.; AGARWAL, S. **Biomolecular Marker Screening for Coronary Artery Disease in Indian perspective.** Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre, 2012, 4 (1):61-66.

UKKOLA, O.; KESANIEMI, Y. A. **Leu7Pro polymorphism of PreproNPY associated with an increased risk for type II diabetes in middle-aged subjects.** Eur J Clin Nutr. 2007; 61(9): 1102-5.

VASUDEVAN, R. et al. **Analysis of three genetic polymorphisms in Malaysian essential hypertensive and type 2 diabetic subjects.** African Journal of Biotechnology. 2009; 8(10): 2069-2075.

VIEIRA, J. R. S. **Hipercolesterolemia e Risco Genético para Doença Arterial Coronária.** 2005; *NewsLab* - edição 72.

WALLERSTEDT, S.M. et al. **Association analysis of the polymorphism T1128C in the signal peptide of neuropeptide Y in a Swedish hypertensive population.** J Hypertens. 2004; 22(7): 1277-81.

WANG, H.; ECKEL, R. H. **Lipoprotein lipase: from gene to obesity.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 297: E271–E288.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cardiovascular diseases (CVDs).** Geneva: WHO; 2013.

WANDERLEY, E.N.; FERREIRA, V.A. **Obesidade: uma perspectiva plural.** *Ciência & Saúde Coletiva*, 2010; 15(1):185-194.

XAVIER, H. T. et. al. **V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da aterosclerose.** *Arq Bras Cardiol.* 2013; 101(4Supl.1): 1-22.

ZHOU, Z. et al. **Genetic variation in human NPY expression affects stress response and emotion.** *Nature.* 2008; 452(7190): 997-1001.

ZIEGLER, A.; KONIG, I. R. **A statistical approach to genetic epidemiology.** Wiley – VCH.2008.

ZUKOWSKA, Z. D. S. GRANT, E.W. LEE, A. **Novel Mechanism for Ischemic Angiogenesis.** *Trends in Cardiovascular Medicine* 2003; 13 (2). 86-92.

ZUKOWSKA-GROJEC, Z. et al. **A Novel Angiogenic Factor From the Sympathetic Nerves and Endothelium.** *Circulation Research* 1998; 83:187-195 70.