

Hipercolesterolemia e Risco Genético para Doença Arterial Coronária

José Ricardo dos Santos Vieira

Professor de Bioquímica do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Pará

Resumo

A hipercolesterolemia é o principal fator de risco para a doença arterial coronária (DAC) e, apesar de causas exógenas freqüentes, possui um fator genético definitivo quando há mutações nos genes LDLR, APOB, PSCK9, ABC ou ARH (causas monogênicas) que levam aos quadros clínicos mais severos. No entanto, pacientes hipercolesterolêmicos que apresentem mutações em vários outros genes (p.ex.: APOA, APOC, APOE, PON, CETP, LCAT, LPL, EPCR, ACE, MTHFR, IL-6, MMP, TNF, FG, PAI-1) podem ter aumentado o risco para DAC, uma vez que tais mutações promovem alterações no metabolismo lipídico, no processo inflamatório ou na coagulação sanguínea. A identificação de quais mutações estão presentes em pacientes com hipercolesterolemia desponta como importante ferramenta de apoio para uma atualizada abordagem de diagnóstico, tratamento e aconselhamento genético em cardiologia.

Palavras-Chave: Hipercolesterolemia, doença arterial coronária, fatores de risco

Summary

Hypercholesterolemia is the major risk factor to coronary arterial disease (CAD) and, although it could be related to often exogenous causes, it has a definitive genetic factor when there are mutations in the LDLR, APOB, PSCK9, ABC or ARH genes (monogenic causes) that lead to the more severe clinical picture. However, many other genes (e.g.: APOA, APOC, APOE, PON, CETP, LCAT, LPL, EPCR, ACE, MTHFR, IL-6, MMP, TNF, FG, PAI-1) could have mutations that increase the risk for CAD in hypercholesterolaemic patients by interfering the lipid metabolism or the inflammatory and coagulation mechanisms. Identifying which mutation is involved on the hypercholesterolaemia physiopathology is crucial in a modern approach to diagnosis, treatment and genetic counseling in cardiology.

Keywords: Hypercholesterolemia, coronary arterial disease, risk factor

Introdução

A hipercolesterolemia é a principal causa de doença arterial coronária (DAC), pois quando associada a outros fatores biológicos e/ou ambientais, leva à formação da placa aterosclerótica aumentando o risco de morte por infarto do miocárdio (1). Toda hiperlipidemia com hipercolesterolemia isolada, independentemente da origem, é classificada, de maneira geral, como do tipo IIa de acordo com a ainda válida classificação fenotípica de Fredrickson et al. (1967) baseada na determinação eletroforética das lipoproteínas e dosagens dos lipídios plasmáticos (2, 3).

Apesar da origem exógena freqüente, além de outras causas metabólicas endógenas e iatrogênicas, a hipercolesterolemia tem causas genéticas bem definidas que se tornam mais graves dependendo dos fatores de risco (genéticos ou não) associados (Figura 1) (2, 4). Muitos fatores de risco genéticos para DAC têm sido descritos e aqueles relacionados à fisiopatologia da placa aterosclerótica são consi-

derados.

derados candidatos a fatores de risco em pacientes hipercolesterolêmicos (Figura 2) (5).

Uma das abordagens mais utilizadas na pesquisa desses genes candidatos a fatores de risco consiste em estudar os genes envolvidos no processo fisiopatológico da DAC, identificando as variantes genotípicas comuns nas populações que possuem maior frequência em pacientes hipercolesterolêmicos com DAC, podendo-se estabelecer uma possível relação de causa e efeito (Figura 3). Uma outra forma de investigação pode ser feita determinando a frequência de SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) localizados próximos a genes relacionados com a fisiopatologia da DAC e estabelecer a força do equilíbrio de ligação entre esses SNPs e a frequência de DAC na população (5).

Como a determinação da existência de uma causa genética para a hipercolesterolemia pode envolver muitas variáveis biológicas e ambientais, os profissionais envolvidos no diagnóstico clínico-laboratorial devem estar atentos para a necessidade de investigar quais genes podem estar causando ou influenciando a DAC, em uma abordagem moderna e crucial para a total compreensão do quadro clínico, na orientação do tratamento e na prevenção primária de DAC (6).

CAUSAS MONOGÊNICAS DE HIPERCOLESTEROLEMIA

A causa genética mais frequente de hipercolesterolemia é devida a mutações no gene do LDLR (receptor celular de LDL) causando a hipercolesterolemia familiar (HF) (7). No entanto, mutações no gene da APOB (apolipoproteína B) e no gene da PCSK9 (Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina tipo 9) levam a enfermidades com quadro clínico idêntico à HF e mesmo padrão autossômico dominante de hereditariedade (8). Outras mutações levam a graves quadros hipercolesterolêmicos, porém com padrão autossômico recessivo, foram descritas nos genes ABC (transportador ligante de adenosina trifosfato) e ARH (hipercolesterolemia autossômica recessiva) causando as raras sitosterolemia e hipercolesterolemia autossômica recessiva, respectivamente, com frequência em torno de 1/10.000.000 (7). A identificação de mutações em somente um desses genes em pacientes com DAC precoce, além de outros dados clínicos peculiares (p.ex.: xantoma tendinoso), é considerada como definitiva para o diagnóstico da causa genética da hipercolesterolemia, denominada, então, causa monogênica (2).

Mutação no gene LDLR – Hipercolesterolemia Familiar (HF)

A HF é uma doença genética autossômica dominante, com os

homozigotos em frequência baixa de cerca de 0,0001% (1/1.000.000), enquanto que os heterozigotos situam-se na faixa significativa de 0,2% (1/500) (7). O gene do LDLR codifica uma glicoproteína transmembrana que se liga à LDL plasmática, mediando a sua captação pela célula e os valores de hipercolesterolemia e a gravidade do quadro clínico dependem de qual região da proteína é afetada (9). Mais de 700 mutações já foram descritas nos bancos de dados eletrônicos sobre HF, sendo que as mais comuns mutações ocorrem no éxon 4, responsável pela região de ligação da LDL com o LDLR (10, 11).

Como toda doença genética, o espectro das mutações depende de fatores populacionais, porém, no Brasil a epidemiologia molecular da HF tem sido pouco investigada, ao contrário da investigação para genes candidatos a fatores de risco para DAC (12). Vários estudos apontam a mutação C660X no éxon 14 (conhecida como "mutação Libanesa") como muito frequente em pacientes brasileiros com HF com descendência árabe. Várias outras mutações descritas somente em pacientes brasileiros também vêm sendo identificadas, bem como tem sido demonstrado que o gene do LDLR influencia a obesidade em algumas tribos indígenas brasileiras (13, 14).

Mutações no gene APOB – Hipercolesterolemia por Defeito Familiar da APOB (DFB)

É uma desordem genética clinicamente semelhante à HF, cuja principal alteração gênica refere-se a uma mutação de ponto R3500Q onde a substituição de arginina para glutamina induz a uma falha na ligação do LDLR com a LDL (15). No Brasil, até a presente data, nenhum caso de DFB foi identificado. A análise dos polimorfismos do gene da APOB também pode ser utilizada na identificação de marcadores genéticos de DAC e quatro regiões são alvo dessa análise: 1) região de microsatélite na região 5' do gene; 2) sete sítios polimórficos para endonucleases de restrição (ApaLI, HincII, PvuII, AluI, XbaI, MspI e EcoRI); 3) região hipervariável na região 3' do gene; e 4) deleção de nove pares de bases na região 5' do gene (16).

Mutações no gene PCSK9 – FH3

Cerca de 30% dos pacientes clinicamente diagnosticados como FH não apresentam mutações nos genes do LDLR ou da APOB, seja devido ao tipo de abordagem utilizada na investigação de tais mutações, seja pela existência de outros genes responsáveis pela hipercolesterolemia (17). A investigação de gerações de pacientes com diagnóstico de hipercolesterolemia autossômica dominante, porém sem mutações nos genes do LDLR e APOB, permitiu a iden-

tificação de mutações no gene PCSK9 (principalmente a D374Y no éxon 4) diretamente responsáveis pela hipercolesterolemia, desordem frequentemente denominada de "FH3" (8). Esta enzima está envolvida no metabolismo do colesterol induzindo a degradação do LDLR e a super expressão leva ao decréscimo do número de LDLR disponíveis para a captação do colesterol plasmático (18).

Mutações no genes ABC - Sitosterolemia

Os genes homólogos ABCG5 e ABCG8 codificam, respectivamente, as proteínas esterolina-1 e esterolina-2 responsáveis pelo controle da absorção intestinal e excreção hepática do colesterol (19). Mutações nesses genes levam a uma exacerbada captação dietética de colesterol e esteróides vegetais, associado à inabilidade hepática em excretar esses esteróides pela bile (7). O diagnóstico apóia-se em severa hipercolesterolemia associada à identificação de esteróides vegetais no sangue dos pacientes e na identificação de mutações nos genes ABCG5 ou ABCG8 (19).

Mutações no gene ARH – Hipercolesterolemia Recessiva Autossômica

O gene ARH codifica uma proteína que possui um domínio ligante ao domínio citoplasmático do LDLR e favorece a captação do colesterol plasmático. As mutações

descritas estão associadas com a inibição da captação da LDL pelo fígado e a análise do pedigree mostra que os heterozigotos não apresentam hipercolesterolemia, ao contrário do que acontece com pacientes de heterozigotos de HF e DFB que podem apresentar até o dobro dos níveis desejados de colesterol plasmático (20).

GENES CANDIDATOS A FATORES DE RISCO PARA DAC

Apesar de hipercolesterolemias monogênicas serem mais graves, na prática médica, entretanto, é mais comum o achado de alterações genéticas em diferentes genes favorecendo quadros clínicos graves de DAC quando associadas a outra causa de hipercolesterolemia (6). Dentre muitos, os genes APOA, APOC, APOE, PON, CETP, LCAT, LPL, EPCR, ACE, MTHFR, IL-6, MMP, TNF, FG, PAI-1 são grandes candidatos a marcadores de risco para DAC envolvendo quadros hipercolesterolêmicos seja por estarem relacionados ao metabolismo lipídico, seja por influenciarem no processo inflamatório ou da coagulação (21).

Genes envolvidos no metabolismo lipídico

Gene da apolipoproteína A (APOA)

A APOA possui quatro isoformas (A-I, A-II, A-IV e A-V) que fazem parte da constituição da HDL, li-

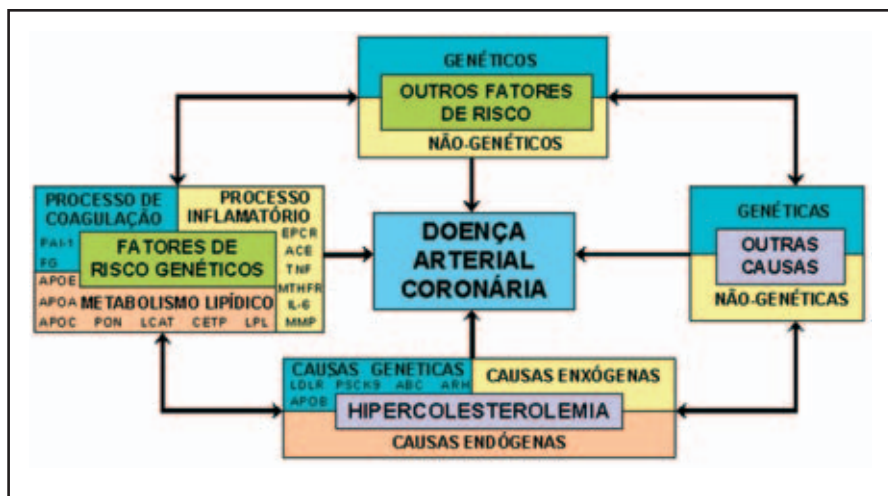


Figura 1 – Apesar de a hipercolesterolemia ser a principal causa metabólica de DAC, uma intrincada rede de interações genéticas e não-genéticas deve ser levada em consideração no estudo de suas causas e fatores de risco.

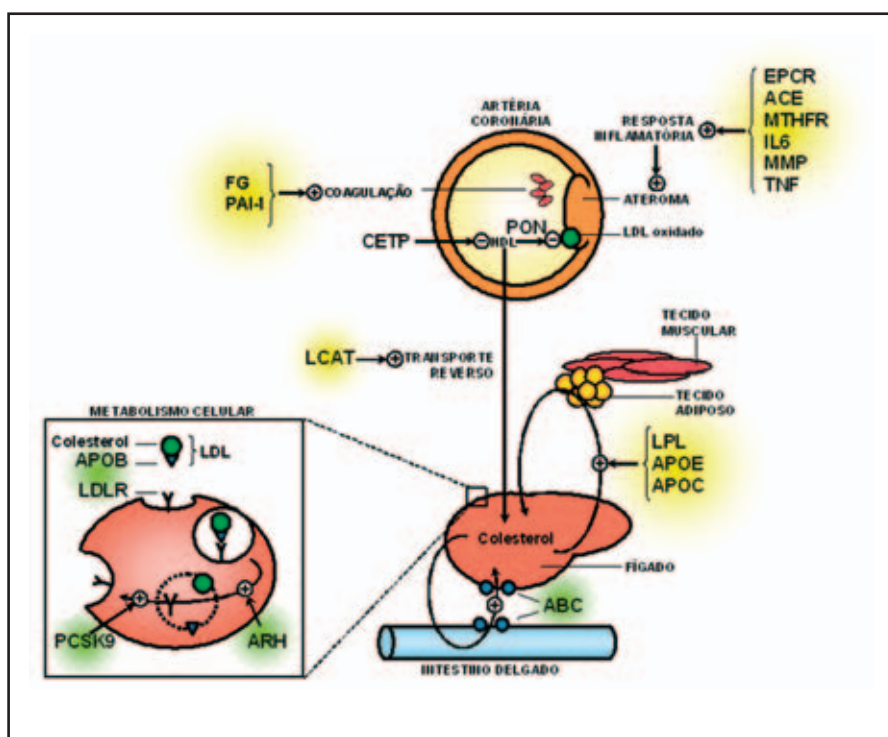


Figura 2 – Papel dos principais genes envolvidos na hipercolesterolemia como causa principal (monogênica) ou como fatores de risco para DAC em pacientes hipercolesterolêmicos.

poproteína com função antioxidante e responsável pelo transporte reverso do colesterol. A APOA-I é co-fator da LCAT (lecitina-acil-

transcefarse, enzima do metabolismo reverso do colesterol) e as mutações estão relacionadas com baixa concentrações de HDL(22).

Mutações no gene da APOA-II estão associadas a distúrbios na concentração de ácidos graxos livres, mas seu papel como fator de risco para DAC ainda não é claro, apesar de bem descrito seu papel na ativação da lipase hepática(23). A APO-IV possui função antioxidante e está presente na HDL e quilomícrons e raros alelos polimórficos no seu gene têm sido investigados como candidatos a marcadores de risco para DAC(24). Polimorfismos na região promotora do gene da APOA-IV vêm sendo associados a casos de hipertriglicéridemia e relatados como importante fator de risco para DAC(25).

Gene da apolipoproteína E (APOE)

O gene da APOE possui três isoformas (E2, E3 e E4) que diferem entre si por uma substituição nos códons 112 e 158 e os fenótipos E3/E3 e E2/E3 são os mais comuns (60% e 25%, respectivamente), onde a isoforma E2 está relacionada com os mais baixos níveis plasmáticos de LDL e a isoforma E4 com níveis mais altos (26). Em pacientes com HF e DFB, a presença de mutações no gene da APOE pode modificar a amplitude do quadro clínico, dado importante no diagnóstico precoce de DAC. A isoforma E4 também está associada como fator de risco para a Doença de Alzheimer, assim como E2 está relacionado à longevidade e proteção à DAC (27).

Gene da apolipoproteína C (APOC)

A APOC2 é responsável pela ativação da lipoproteína lipase (LPL) que, por sua vez, promove a captação celular de triglicérides dos quilomícrons e VLDL. O gene da APOC1 está ligado ao gene da APOE e nenhuma mutação foi descrita relacionada com DAC, porém devido a proximidade entre os genes, mutações no gene da APOC têm sido sugeridas como marcadores de alguns estados de demência associada à idade (28).

Gene da paraoxonase (PON)

A paraoxonase (PON) é uma esterase anti-oxidante presente na HDL que confere proteção contra a DAC em indivíduos hipercolesterolêmicos e os polimorfismos L55M e Q192R no gene da PON1 e S311C no gene da PON2, são importantes marcadores de risco genético para DAC, principalmente em indivíduos fumantes e diabéticos (29).

Gene da CETP (colesterol ester-transferase)

A CETP é uma enzima aterosclerótica que participa da retirada

de colesterol da HDL para a VLDL promovendo a formação de LDL. Polimorfismos para a enzima de restrição TaqI (A277G) têm sido fortemente associados à baixas concentrações de HDL, o que coloca este gene como um importante candidato a marcador de DAC. Outras mutações na região promotora (-629 C>A), no sítio de poliadenilação terminal (-92G>A), no íntron 9 (A29G) e nos éxons 12 (A373P), 14 (I405V) e 15 (R451Q), têm sido investigadas como possíveis marcadoras de

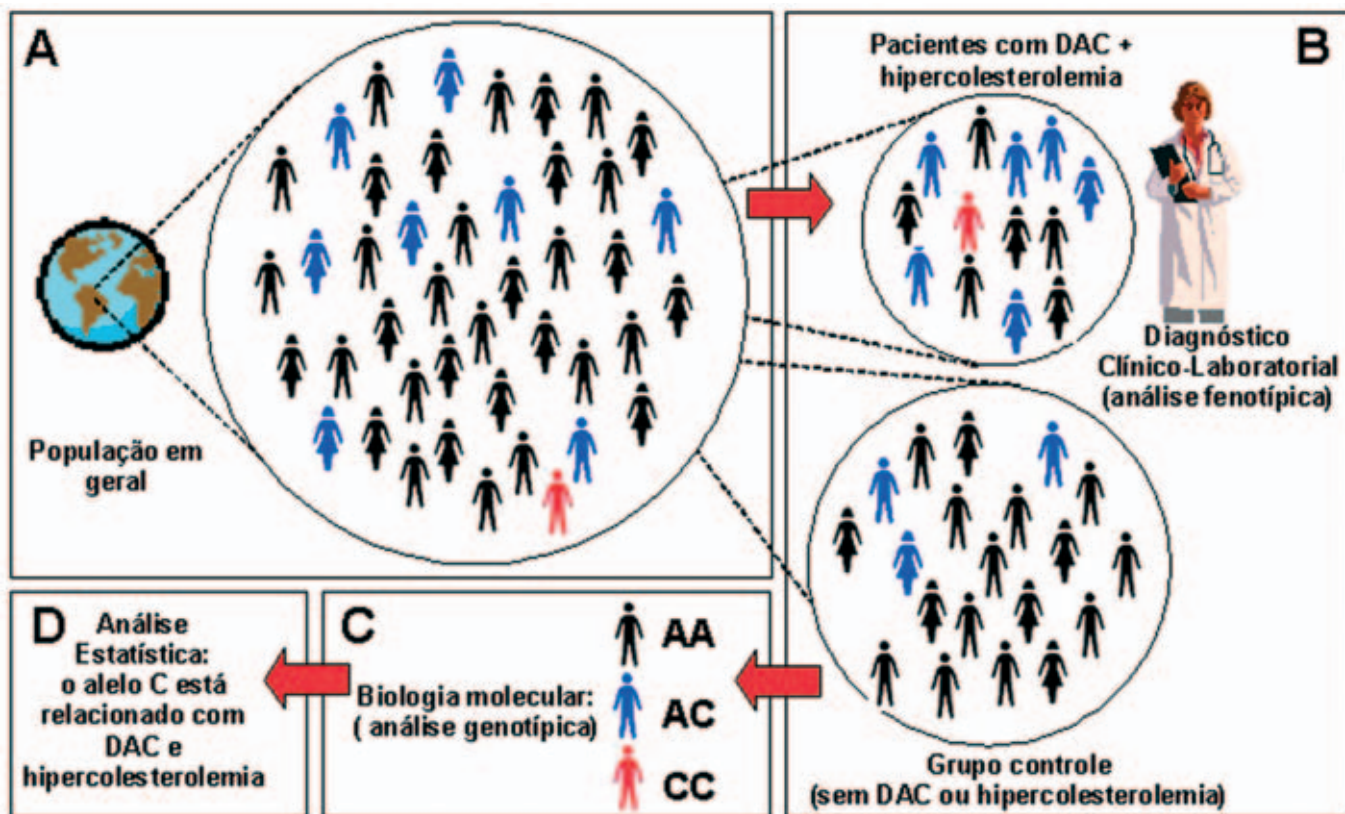


Figura 3 - Abordagem para o estudo da relação de uma variante genotípica com DAC. A determinação da freqüência dos genótipos mais freqüentes e raros em uma população e em um estudo controlado com pacientes de DAC e hipercolesterolêmicos pode permitir uma análise estatística segura da relação da presença de um determinado genótipo com o fenótipo determinado clinicamente. Pode-se expandir a análise fazendo-se o cruzamento de dados com outras variantes (p.ex.: idade, tabagismo, diabetes mellitus, hipertensão arterial, hábitos alimentares, obesidade etc.).

DAC, mas ainda sem resultados conclusivos (30).

Gene da LCAT (lecitina coles-terol-acil transferase)

Esta enzima circula no plasma ligada a HDL e é ativada pela APOA1, promovendo a conversão de colesterol livre e lecitinas a ésteres de colesterol e liso-lecitinas, que se ligam a HDL e podem ser degradadas no fígado no chamado transporte reverso do colesterol. Mutações no gene são responsáveis pela diminuição drástica na concentração plasmática de HDL e são fortemente associadas à DAC como na rara "doença do olho-de-peixe", severa dislipidemia com típica opacidade da córnea devida a deleção do amonácido 300 (Leucina) e a perda do sítio de restrição para a endonuclea-se MlnI (31).

Gene da LPL (lipoproteína lipase)

A LPL hidrolisa os triglicéridos dos quilomícrons e VLDL durante a captação celular ativada pela APOC2 e pela insulina. Mutações no gene da LPL são responsáveis pela elevada hipertrigliceridemia típica da Hiperlipoproteinemia Familiar do Tipo I. A hipertrigliceridemia observada em certos casos de câncer e em pacientes com diabetes mellitus 2 também estão associadas à diminuição da atividade de LPL (32, 33).

Genes relacionados com o processo inflamatório

Em tese, todos os genes que expressam proteínas envolvidas na resposta inflamatória são potenciais candidatos a fatores de risco para DAC quando associados a uma causa endógena ou exógena de hipercolesterolemia e aqueles envolvidos no processo inflamatório da formação da placa aterosclerótica, são os candidatos natos a marcadores de risco para DAC (21).

Gene da EPCR (Receptor celular de Proteína C)

Esse receptor, presente em grande quantidade nas células endoteliais dos vasos cardíacos e pulmonares, participa da ativação da proteína C, processo fundamental na regulação da coagulação sanguínea. Mutações no gene da EPCR levam a um retardo no processo de degradação da fibrina o que leva a um aumento no risco para DAC (34).

Gene da ACE (enzima conversora de angiotensina I)

Uma deleção de 250bp no gene da ACE tem sido utilizada como marcador de DAC onde a esta variante polimórfica está relacionada com níveis aumentados de ACE plasmática, o que pode estar relacionado com aumento da resposta inflamatória durante o processo de formação do ateroma (35).

Gene do MTHFR (5,10 Meta Tetra-Hidroxi-Folato Redutase)

Esta enzima cataliza a remetilização da homocisteína, passo decisivo para evitar o seu acúmulo que, apesar do aumento isolado da homocisteína plasmática não ser reconhecido como fator determinante de CAD, pode ser relacionado como importante fator de risco devido a disfunção endotelial causada durante processos inflamatórios (36). A mutação autossômica recessiva C677T leva à troca de valina por alanina, o que induz à queda da especificidade da MTHFR induzindo ao aumento da homocisteína plasmática e ao aumento da suscetibilidade para CAD principalmente em pacientes diabéticos (37).

Genes da IL (Isoleucina)

As citocinas IL6 e IL1 β estão aumentadas durante a aterogênese e as mutações descritas nos genes podem ser relacionadas com um estímulo da resposta inflamatória aumentando o risco para DAC, principalmente em fumantes (38).

Genes da MMP (Metaloproteínas da matriz celular)

As MMP são responsáveis pela regulação do crescimento do ateroma. Dentre elas, o gene da MMP3, que codifica a enzima estromolisina-1, possui variante polimórfica situada cerca de 1600pb

antes do início da transcrição, que está relacionada com aumento de risco para DAC, principalmente em fumantes. O alelo com seis nucleotídeos adenosina (6A) está relacionado a uma instalação mais rápida de DAC, enquanto que a variante 5A está relacionada com um risco aumentado para infarto do miocárdio (39). O alelo T na região polimórfica -1562 T>C do gene da MMP9, responsável pela expressão da enzima gelatinase B, têm sido considerado como marcador de risco para DAC (40).

TNF (fator de necrose tumoral alfa)

O gene do TNFA expressa uma proteína que participa de vários processos metabólicos, entre eles a coagulação sanguínea, metabolismo lipídico e resistência à insulina. Apesar de não haver evidências de relação diretamente com a fisiopatologia da DAC, o papel de polimorfismos (principalmente o alelo A do sítio polimórfico -308 G>A) vem sendo investigado como possível marcador de risco para DAC devido sua relação com a obesidade e resistência à insulina e a hipersecreção de cortisol (41).

Genes envolvidos no mecanismo do processo de coagulação

Gene do fibrinogênio (FG)

O FG é sintetizado no fígado

e é composto de três subunidades, expressas por três diferentes genes: alfa (FGA), beta (FGB) e gama (FGG). O aumento de FG plasmático aumenta o risco para trombose arterial e é detectado em pacientes diabéticos, fumantes, obesos em mulheres fazendo uso de contraceptivos orais, grávidas e menopausadas (1). Polimorfismos nos genes do FG são descritos como fatores independentes de risco para infarto do miocárdio e, quando presentes em pacientes hipercolesterolêmicos, o risco aumenta de 6 a 12 vezes (42).

Gene do PAI-1 (inibidor da ativação do fibrinogênio)

A presença da variante alélica 4G para o polimorfismo 4G-668/5G presente na região promotora do gene do PAI-1 vem sendo associada como causa de risco para DAC em pacientes hipercolesterolêmicos, principalmente quando associada a presença de outros alelos de risco em outros genes (43).


Considerações finais

A maioria dos métodos de diagnóstico genético ainda está restrita a laboratórios de pesquisa, porém, a popularização do diagnóstico genético

para outras doenças (p.ex.: fibrose cística, hepatite C, AIDS) já realizada rotineiramente em muitos laboratórios clínicos, tem aberto um leque de possibilidades na investigação clínico-laboratorial da DAC, haja vista a utilização de equipamentos similares. A complexidade das interações genótípicas e fenotípicas envolvidas na fisiopatologia da DAC ainda não possibilitam um preciso diagnóstico do verdadeiro componente genético envolvido (44).

No entanto, devido à existência de fatores genéticos causando ou complicando o quadro clínico de pacientes com hipercolesterolemia aliada à difícil caracterização clínica do componente genético, torna-se fundamental uma abordagem mais abrangente para a investigação clínica-laboratorial da DAC, o que justifica o crescente interesse pelo conhecimento da genética da hipercolesterolemia.

Agradecimentos

Ao Dr. Steve Humphries (University College London) pelo apoio no levantamento de dados. O autor é bolsista do Programa Alþan da União Europeia (E03D00851BR). 

Correspondência para:

jrvieira@ufpa.br

Referências Bibliográficas

1. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathways for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47, 1986
2. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.* v.77 supl.3 São Paulo nov. 2001
3. Aronow WS. Management of peripheral arterial disease. *Cardiol Rev.* 2005 Mar-Apr; 13(2): 61-8.
4. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis.* 2003 May;168(1):1-14.
5. Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann SM, Mallet C, Ricard S, Behague I, Hallet V, Blanc H, Loukaci V, Thillet J, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L. Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorders. *Am J Hum Genet.* 1999 Jul; 65(1): 183-91.
6. Hirashiki A, Yamada Y, Murasae Y, Suzuki Y, Kataoka H, Morimoto Y, Tajika T, Murohara T, Yokota M. Association of Gene Polymorphisms With Coronary Artery Disease in Low- or High-Risk Subjects Defined by Conventional Risk Factors. *J Am Col Cardiol,* 42(8): 1429-37, 2003.
7. Goldstein JL, Brown MS. The cholesterol quartet. *Science,* 292 (5520): 1310-12, 2001
8. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003 Jun; 34(2): 154-6.
9. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein LL, Russel DW. The Human LDL receptor: a cystein-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell,* 39:27-38, 1984.
10. Villegier L, Abifadel M, Allard D, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Beroud C, Junien C, Boileau C, Varret M. The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database. *Hum Mutat.* 20(2):81-7, 2002.
11. Heath KE, Gahan m, Whittall RA, Humphries SE. Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolaemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis* 154 (2001) 243-246
12. Dos Santos JE, Zago MA. Familial hypercholesterolemia in Brazil. *Atherosclerosis Supplements* 4 (2003) 1-2
13. Forti N, Salazar A, Diamant J, Gianninni SD, Hirata MH, Hirata RDC. Alterações genéticas e colesterolemia: recentes estudos brasileiros. *Arq Bras Cardiol,* 80():565-71, 2003.
14. Mattevi VS, Coimbra Jr CEA, Santos RV, Salzano FM, Hutz MH. Association of the low-density lipoprotein receptor gene with obesity in Native American populations. *Hum Genet* (2000) 106 :546-552
15. Fouchier SW, Defesche JC, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Familial defective apolipoprotein B versus familial hypercholesterolemia: an assessment of risk. *Semin Vasc Med.* 2004 Aug; 4(3):259-64.
16. Ludwig EH, McCarthy BJ. Haplotype analysis of the human apolipoprotein B mutation associated with familial defective apolipoprotein B100. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 712, 1990.
17. Moorjani S, Roy M, Torres A, Betard C, Gagne C, Lambert M, Brun D, Davignon J, Lupien P. Mutations of low-density lipoprotein-receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet.* 1993 May 22; 341(8856): 1303-6.
18. Kara N, Maxwell, Edward A. Fisher, and Jan L. Breslow. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *PNAS* 102(6): 2069-2074, 2005.
19. Lu K; Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H, Ose L, Stalenhoef AF, Mietinnen T, Bjorkhem I, Bruckert E, Pandya A, Brewer Jr HB, Salen G, Dean M, Srivastava A, Patel SB. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet.* 69(2): 278-90, 2001
20. Berge KE. Sitosterolemia: a gateway to new knowledge about cholesterol metabolism. *Ann Med.* 35(7): 502-11, 2003.
21. Stephens JW & Humphries SE. The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *J Int Med,* 2003; 253: 120-127.
22. Jenner JL, Seman LJ, Millar JS, Lamon-Fava S, Welty FK, Dolnikowski GG, Marcovina SM, Lichtenstein AH, Barrett PH, Deluca C, Schaefer EJ. The metabolism of apolipoproteins (a) and B-100 within plasma lipoprotein (a) in human beings. *Metabolism.* 2005 Mar;54(3):361-9.
23. Boucher J, Ramsamy TA, Braschi S, Sahoo D, Neville TA, Sparks DL. Apolipoprotein A-II regulates HDL stability and affects hepatic lipase association and activity. *J Lipid Res.* 2004 May; 45(5): 849-58.

24. Ferretti G, Bacchetti T, Bicchiega V, Curatola G. Effect of human Apo AIV against lipid peroxidation of very low density lipoproteins. *Chem Phys Lipids*. 2002 Jan; 114(1):45-54.
25. Wung SF, Aouizerat BE. Gender and ethnic differences in a case-control study of dyslipidemia: using the apolipoprotein A-V gene as an exemplar in cardiovascular genetics. *Res Theory Nurs Pract*. 2003 Winter; 17(4): 281-99.
26. Vohl MC, Szots F, Lelievre M, Lupien PJ, Bergeron J, Gagne C, Couture P. Influence of LDL receptor gene mutation and apo E polymorphism on lipoprotein response to simvastatin treatment among adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2002 Feb; 160(2): 361-8.
27. Hoshino T, Kamino K, Matsumoto M. Gene dose effect of the APOE-epsilon4 allele on plasma HDL cholesterol level in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2002 Jan-Feb; 23(1): 41-5.
28. Bartres-Faz D, Clemente IC, Junque C, Valveny N, Lopez-Alomar A, Sanchez-Aldeguer J, Lopez-Guillen A, Moral P. APOE and APOC1 genetic polymorphisms in age-associated memory impairment. *Neurogenetics*. 2001 Oct; 3(4): 215-9.
29. Robertson KS, Hawe E, Miller GJ, Talmud PJ, Humphries SE. Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Nov 20; 1639(3): 203-12.
30. Boekholdt SM, Sacks FM, Jukema JW, Shepherd J, Freeman DJ, McMahon AD, Cambien F, Nicaud V, de Grooth GJ, Talmud PJ, Humphries SE, Miller GJ, Eiriksdottir G, Gudnason V, Kauma H, Kakko S, Savolainen MJ, Arca M, Montali A, Liu S, Lanz HJ, Zwinderman AH, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation*. 2005 Jan 25; 111(3): 278-87. Epub 2005 Jan 17.
31. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1529: 245-256, 2000.
32. Beck SA, Mulliga HD, Tisdale MJ. Lipolytic factors associated with murine and human cancer cachexia. *J Natl Cancer Inst*. 82: 1922-1926, 1990.
33. Pruneta-Deloche V, Sassolas A, Dallinga-Thie GM, Berthezene F, Ponsin G, Moulin P. Alteration in lipoprotein lipase activity bound to triglyceride-rich lipoproteins in the postprandial state in type 2 diabetes. *J Lipid Res*. 2004, 45(5): 859-65.
34. Esmon CT. The Protein C Pathway. *Chest J (supplement)* 124(3), 2003
35. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990 Oct; 86(4):1343-6.
36. Rothenbacher D, Fischer HG, Hoffmeister A, Hoffmann MM, Marz W, Bode G, Rosenthal J, Koenig W, Brenner H. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory, hemostatic, and lipid parameters. *Atherosclerosis*. 2002 May; 162(1): 193-200.
37. Sun J, Xu Y, Xue J, Zhu Y, Lu H. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol*. 2005 Jan 14; 229(1-2): 95-101.
38. de Maat MP, Pietersma A, Kofflard M, Sluiter W, Kluft C. Association of plasma fibrinogen levels with coronary artery disease, smoking and inflammatory markers. *Atherosclerosis*. 1996 Apr 5; 121(2): 185-91.
39. Humphries SE, Martin S, Cooper J, Miller G. Interaction between smoking and the stromelysin-1 (MMP3) gene 5A/6A promoter polymorphism and risk of coronary heart disease in healthy men. *Ann Hum Genet*. 2002 Nov; 66 (Pt 5-6): 343-52.
40. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999 Apr 13; 99(14): 1788-94.
41. Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene promoter and salivary cortisol secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May; 86(5): 2178-80.
42. Grant PJ, Humphries SE. Genetics determinants of arterial thrombosis. *Baillière's Clin Haematol*. 12(3): 505-532, 1999.
43. Pastinen T, Perola M, Niini P, Terwilliger J, Salomaa V, Vartiainen E, Peltonen L, Syvanen A. Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. *Hum Mol Genet*. 1998 Sep; 7(9): 1453-62.
44. Humphries SE, Ridker PM, Talmud PJ. Genetic testing for cardiovascular disease susceptibility: a useful clinical management tool or possible misinformation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Apr; 24(4) :628-36. Epub 2004 Jan 08.