



**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ceilândia  
Curso de Farmácia  
Trabalho de Conclusão de Curso**

**Associação entre variações alélicas clássicas do gene da ApoE com fatores de risco cardiovascular em indivíduos muito idosos**

Aluna: Adriane Dallanora Henriques

Brasília, 2013



**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ceilândia  
Curso de Farmácia**

**Associação entre variações alélicas clássicas do gene da ApoE com fatores de risco cardiovascular em indivíduos muito idosos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade de Brasília - Faculdade de  
Ceilândia como requisito à obtenção do  
título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

Brasília, 2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pela autora

Dallanora, Adriane Henriques

Associação entre variações alélicas clássicas do gene da ApoE com fatores de risco cardiovascular em indivíduos muito idosos / Adriane Dallanora Henriques. - 2013

23f.

Orientação: Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega.

Monografia (Bacharel em Farmácia) – Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, 2013.

1. apolipoproteína
2. interação genética
3. aterosclerose
4. prevenção
5. envelhecimento

**Adriane Dallanora Henriques**

**Associação entre variações alélicas clássicas do gene da ApoE com fatores de risco cardiovascular em indivíduos muito idosos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade de Brasília - Faculdade de  
Ceilândia como requisito à obtenção do  
título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Dr. Otávio de Toledo Nóbrega

**Banca examinadora:**

Professor Dr. Otávio de Toledo Nóbrega (Presidente)  
Universidade de Brasília

Professor Dr. Gerson Cipriano  
Universidade de Brasília

Professor Dr. Eduardo Antônio Ferreira  
Universidade de Brasília

## **Agradecimentos**

À minha família, principalmente ao **meu pai e a minha irmã** pelo apoio, paciência e incentivo para seguir em frente quando duvidei e tive medo das minhas escolhas;

Aos **meus amigos** pelo companheirismo, carinho e pelos momentos de felicidade e sorrisos que compartilhamos;

Ao Prof. **Dr. Otávio de Toledo Nóbrega** pela confiança dedicada a mim todos esses anos, pela oportunidade de integrar sua equipe de trabalho e ainda pelo incentivo às minhas escolhas profissionais;

Às queridas **MSc. Audrey C. Tonet** e **MSc. Andréa Lessa Benedet** por dividirem comigo seus trabalhos e pela confiança na minha atuação no laboratório;

Ao prestativo e excelente companheiro **MSc. Vinícius Carolino Souza** pela receptividade e por compartilhar comigo todo seu conhecimento de bancada;

Ao Prof. **Dr. Andrei Carvalho Sposito** e a Clínica Biocárdios, por disponibilizarem equipamento e instalações da clínica para a coleta de dados desta pesquisa;

## **Lista de abreviações**

ANCOVA – Análises de covariância;

Apo – Apolipoproteína;

CT – Colesterol total;

DCV – Doenças cardiovasculares;

DP – Desvio padrão;

HbA1c – Hemoglobina glicada;

HDL – *high-density lipoprotein*;

IMC – Índice de massa corpórea;

LDL – *low-density lipoprotein*;

SD – Desvio padrão;

SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*;

TG – Triglicerídeos;

TRL – Lipoproteínas ricas em triglicerídeos;

## Sumário

Resumo .....	7
Abstract .....	8
1. Introdução .....	9
2. Justificativa.....	12
3. Objetivos .....	12
Gerais .....	12
Específicos .....	13
4. Materiais e Métodos .....	13
Amostra .....	13
Inspeção clínica.....	13
Extração de DNA e Genotipagem da ApoE .....	13
Análises bioquímicas .....	15
Tomografia Cardíaca Computadorizada .....	15
Análises Estatísticas.....	16
5. Resultados .....	16
6. Discussão.....	17
7. Conclusão .....	19
Referências .....	20

## Resumo

**Introdução:** Levantamentos epidemiológicos indicam a influência de polimorfismos da ApoE sobre níveis plasmáticos de lipídeos e lipoproteínas ricas em triglicerídeos, com impactos sobre fenótipos ateroscleróticos.

**Objetivo:** Estudar a associação dos genótipos clássicos do gene da ApoE com fatores de risco clínicos e bioquímicos para a aterosclerose em um segmento muito idoso da população brasileira, com destaque para o perfil lipêmico.

**Métodos:** Foram realizadas avaliações transversais de parâmetros clínicos e laboratoriais, incluindo tomografia cardíaca computadorizada, dos 208 participantes com base nos alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  do gene da ApoE.

**Resultados:** Quando foram comparados os não-carreadores do alelo  $\epsilon 4$  com os carreadores, níveis plasmáticos mais baixos de ApoB, assim como da razão ApoB/ApoA foram observados no primeiro grupo. A avaliação do polimorfismo da ApoE com outras variáveis e com a calcificação arterial não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

**Conclusão:** O estudo sugere que o papel aterogênico do alelo  $\epsilon 4$  pode, pelo menos em parte, ser atribuído a um aumento na razão ApoB/ApoA, devido aos altos níveis de ApoB em carreadores  $\epsilon 4$  em comparação aos não-portadores.

**Palavras-chave:** apolipoproteína, interação genética, aterosclerose, prevenção, envelhecimento.

## **Abstract**

**Background:** Epidemiological surveys indicate the influence of polymorphisms of the Apolipoprotein (Apo) E on plasma lipids and triglyceride-rich lipoprotein levels, with impact on atherosclerotic phenotypes.

**Objective:** To study the association of classic genotypes of the ApoE gene with clinical and biochemical risk factors for atherosclerosis in a segment of the very old Brazilian individuals, with emphasis to the lipemic profile.

**Methods:** We performed cross-sectional analyses of clinical and laboratory assessments, including cardiac computed tomography, across  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$  carriers of the ApoE gene in 208 participants eligible for primary prevention.

**Results:** When non- $\epsilon 4$  carriers were compared with  $\epsilon 4$  carrying subjects, lower levels of ApoB as well as on the ApoB/ApoA ratio were observed in the former group. Tests between ApoE polymorphisms with other variables and with arterial calcification showed no significant differences between groups.

**Conclusion:** The study suggests that the atherogenic role of  $\epsilon 4$  allele can at least in part be attributed to an increased ApoB/ApoA ratio due to higher levels of ApoB in  $\epsilon 4$  carriers compared to non-carriers.

**Key-words:** apolipoprotein, gene-gene interaction, atherosclerosis, prevention, ageing.

## 1. Introdução

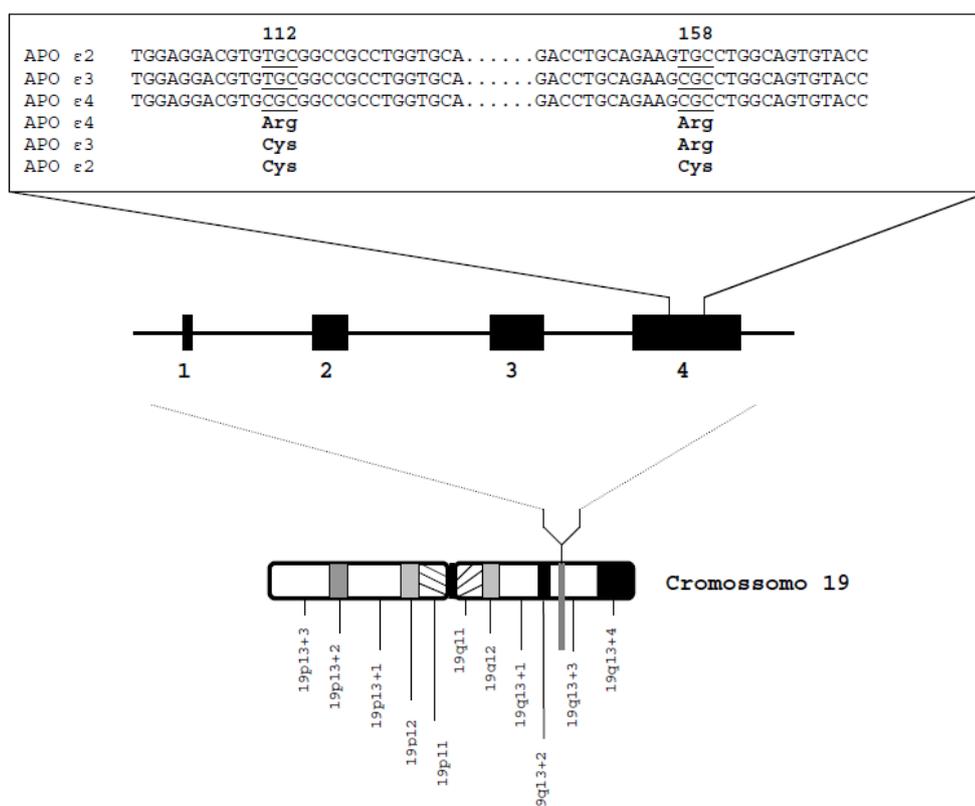
As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por 48% das mortes por doenças não transmissíveis em todo o mundo (FINEGOLD, 2012). No Brasil, cerca de um terço do total de mortes são representadas por DCV (SBC, 2010), sendo a principal causa de morte na população idosa (MANSUR, 2012). O envelhecimento populacional tem elevado a carga das doenças cardiovasculares e de seus fatores de risco (HOFFMEISTER, 1994), sendo a hipertensão e a dislipidemia seus fatores amplamente reconhecidos. Muitos fatores clínicos contribuem para a mortalidade por DCV, além da hipertensão e dislipidemias, são conhecidos a obesidade, diabetes tipo II e ainda contribuintes genéticos (GLASS, 2001). Diferentes polimorfismos genéticos foram associados com a susceptibilidade a doenças cardiovasculares, principalmente aterosclerose, com ênfase importante à variabilidade do gene da Apolipoproteína E (ApoE).

As lipoproteínas possuem um papel central no desenvolvimento de doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DEMANT, 2001). São compostas por núcleo contendo ésteres de colesterol e triglicerídeos, ao redor do qual existe um superfície polar formada por fosfolípidios, fração solúvel do colesterol livre e por um componente protéico denominado apolipoproteína (apo), permitindo a solubilização e transporte dos lipídeos (SPOSITO, 2007). As apolipoproteínas possuem várias funções no metabolismo lipídico, como montagem de partículas (apoB-100 e apoB-48), função ligante a receptores de membrana que as captam para o interior da célula (apoB-100 e apoE) ou co-fatores enzimáticos (apoC-II e apoA-I) (LEHNINGER, 2002).

Em humanos, o locus gênico da ApoE é polimórfico, localizado na posição 19q13.2, apresenta-se na forma de 3 alelos polimórficos: epsilon 2, epsilon 3, o mais freqüente, e epsilon 4, que codificam três isoformas da apolipoproteína:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ , onde  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 4$  são mais raros. Esses produtos se diferenciam pela alternância de cisteína (cys) e arginina (arg) nas posições 112 e 158, sendo a variante  $\epsilon 2$  caracterizada por cys-112 e cys-158, a variante  $\epsilon 3$  por cys-112 e arg-158, enquanto a forma  $\epsilon 4$  por arg-112 e arg-158. As combinações dos três alelos principais podem resultar em seis possíveis genótipos de ApoE, representados tanto pelas formas homozigóticas ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) quanto pelas heterozigóticas ( $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ) (MAHHLEY, 2000). A partir da seqüência da ApoE, é estimado que a estrutura dessa

proteína secundária seja composta por 62% de  $\alpha$ -hélice, 9% de folha- $\beta$ , 11% de  $\beta$ -turns e 18% de forma aleatória. As  $\alpha$ -hélices anfipáticas são provavelmente as responsáveis pela ligação da ApoE nos lipídeos. Existe um agrupamento de cargas positivas geradas pelos aminoácidos 134 a 158, é essa porção da molécula que se liga aos receptores de LDL e também à heparina (DAVIGNON, 1999).

**Figura 1:** O gene ApoE humano está mapeado no cromossomo 19 humano (19q13,2).



Fonte: OJOPI, 2004.

Inquéritos epidemiológicos que avaliam o papel do polimorfismo da ApoE em lipídeos plasmáticos e lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TRL) têm mostrado que a presença do alelo  $\epsilon$ 4 está associado à elevação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), enquanto que a presença de  $\epsilon$ 2 possui o efeito oposto sobre essas partículas (ALVIM, 2012). Isso ocorre em virtude da maior capacidade da Apo $\epsilon$ 4 agir como ligante aos receptores especializados de lipoproteínas, e de maneira oposta, a menor afinidade da Apo $\epsilon$ 2 de interagir com esses receptores (TIRET, 1994), possivelmente devido a uma resposta adaptativa de up-regulation de receptor de LDL para carreadores  $\epsilon$ 2 e down-regulation para  $\epsilon$ 4 (DAVIGNON, 1999; ALVIM,

2010). Isto é importante devido as lipoproteínas terem papel central no desenvolvimento do fenótipo aterosclerótico (TIRET, 1994), sendo a ApoE uma proteína chave na modulação do catabolismo de partículas aterogênicas (ALVIM, 2010). Há evidências de que a ApoE possui um profundo impacto sobre o metabolismo da ApoB (DEMANT, 2001) e sobre as lipoproteínas e lipídeos relacionados com ApoB (DAVIGNON, 1999). Estudos recentes de associação *Genome Wide* confirmaram forte associação estatística entre ApoE e o risco de DCV (WATERWORTH, 2010), principalmente devido à influência nos níveis de LDL-c (SMITH, 2010) e colesterol total (AULCHENKO, 2009). Apesar de estudos prospectivos indicarem que a relação ApoB/ApoA-I como um bom preditor de risco para infarto do miocárdio (IM) e outras DCV (SIERRA-JOHNSON, 2009), ao nosso conhecimento nenhum estudo procurou associar o genótipo da ApoE com esse perfil lipêmico.

## **2. Justificativa**

Pessoas muito idosas pertencem ao grupo etário que cresce mais rapidamente em todo o mundo e há um elevado número de pessoas chegando a esta idade de forma saudável e buscando a prevenção primária das DCV. Apesar das constantes buscas por relações entre a expressão da ApoE com lipídeos e lipoproteínas plasmáticas, poucos estudos procuraram estimar a associação entre os alelos da ApoE com os níveis de uma ou mais apolipoproteínas neste grupo etário.

## **3. Objetivos**

### **Gerais**

O objetivo do trabalho é estudar a associação dos genótipos clássicos do gene da apolipoproteína E com o risco aterosclerótico expresso pelo perfil lipêmico de um segmento muito idoso da população brasileira.

## **Específicos**

Determinar as variantes alélicas de ApoE na amostra estudada.

Realizar uma avaliação clínica e bioquímica da amostra, com ênfase para parâmetros lipêmicos.

Proceder com testes associativos entre os grupos genotípicos e fenótipos detectados.

## **4. Materiais e Métodos**

### **Amostra**

A amostra de estudo é participante do chamado *Brazilian Study on Healthy Aging (BSHA)*, o qual é um estudo de coorte iniciado em Dezembro de 2008, designado a identificar marcadores de risco cardiovascular em indivíduos muito idosos. Para essa proposta, foram incluídos pacientes clinicamente controlados não-institucionalizados com idade de 80 anos ou mais, que procuraram o ambulatório para atendimento de cuidados preventivos e nunca manifestaram infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou doença arterial periférica. Depois de feitas as medidas de referência, todos os pacientes foram encaminhados para o ambulatório para acompanhamento médico e avaliações prospectivas. No entanto, os resultados aqui descritos são derivados de análises transversais com os referidos dados de entrada. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa institucional, e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes do início do estudo.

### **Inspeção clínica**

Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação da massa corporal total (kg), altura (m) e pressão sanguínea (mmHg). O índice de massa corpórea (IMC;  $\text{kg/m}^2$ ) foi definido como o habitual, enquanto a circunferência da cintura (CC) foi medida 2 cm acima da linha do umbigo.

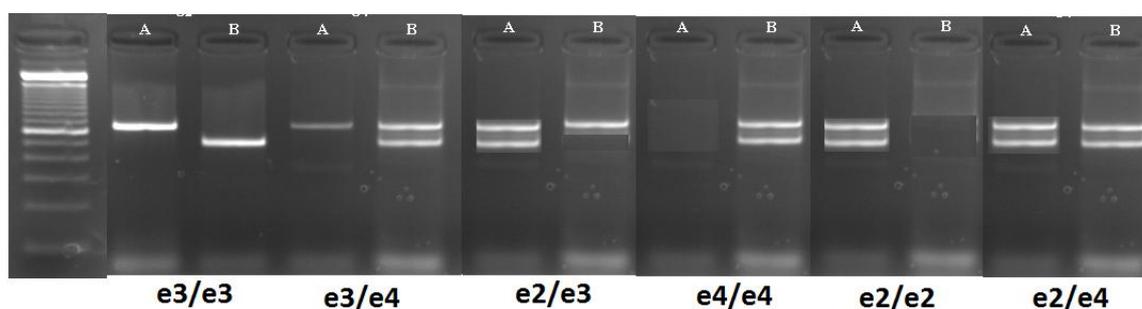
### **Extração de DNA e Genotipagem da ApoE**

Após 12 h de jejum durante a noite, os participantes do estudo foram submetidos à coleta de sangue para análise bioquímica e congelamento de plasma, soro e DNA. Extração de DNA foi realizada utilizando kits de extração padrão

(QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Brasil). Para determinar o genótipo do gene apolipoproteína E (Apo E) e determinar os alelos clássicos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ , um método de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi adaptado a partir Donohoe, 1999. Para a condução deste componente, métodos de genotipagem foram desenvolvidos ou adaptados às nossas condições laboratoriais. A metodologia para genotipagem de ApoE, por exemplo, foi adaptada do sistema multiplex de amplificação pela PCR refratária a mutação (*Refractory Mutation System - ARMS*) para identificação dos alelos. Para tanto, foram desenvolvidas duas reações de PCR independentes, segundo este sistema, primers foram desenhados de modo que cada nucleotídeo da extremidade 3' do respectivo primer pareasse com A ou G codantes dos aminoácidos arginina ou cisteína respectivamente ocupantes das posições 112 e 158 do gene. Assim, foram desenhados os primers Cys158 (5'ATGCCGATGACCTGCAGAATT-3'), Arg158 (5'ATGCCGATGACCTGCAGAATC-3'), Cys112 (5'CGCGGACATGGAGGACGTTT-3') e Arg112 (5'CGCGGACATGGAGGACGTTTC-3'), de modo que os dois primeiros fossem capazes de amplificar as variações da posição 158, enquanto os dois últimos, a região do códon polimórfico 112. Adicionalmente, foi utilizado o primer comum ApoEr (5'-GTTTCAGTGATTGTCGCTGGGCA-3') para compor par com os primers Arg/Cys158 ou Arg/Cys112 e resultar em produtos de amplificação de 588 e 451 pares de base (pb) respectivamente. Cada genótipo foi determinado pela realização simultânea de duas reações de PCR, no qual a primeira (Mix A) era constituída pelos primers Cys158 (25 $\mu$ M) Cys112 (25 $\mu$ M) e ApoEr (25 $\mu$ M). Similarmente, a segunda reação (MixB) continha a combinação de primers Arg158 (25 $\mu$ M), Arg112 (25 $\mu$ M) e ApoEr (25 $\mu$ M). Cada reação utilizou 50 ng de DNA genômico, 200 mmol/L de cada desoxinucleotídeo, 10 mM de tampão Tris-HCl [pH 9,2], 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 25mM de KCl, 80 g/L de dimetilsulfóxido (DMSO), 1 U de Taq Polimerase, 10 mg/ml de ovalbumina e água Milli Q *qsq* compondo um volume final de 25 $\mu$ L de reação. A desnaturação inicial do DNA na amplificação do PCR foi obtida com "hot start" a 80 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 45 segundos, anelamento a 66 °C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 45 segundos, seguido por um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 min. Foram separados os fragmentos da reação da PCR por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,6% contendo 0,2 mg/L de brometo de etídeo e tampão TAE a uma corrente constante de 60 volts, durante aproximadamente 40 minutos. Foi utilizado 8 $\mu$ L de cada reação (Mix A e B)

conjuntamente com 2µL de tampão de amostra (azul bromofenol), sendo que a amplificação foi mensurada usando um marcador *ladder* de peso molecular de 100 pb. O gel foi visualizado sob iluminação ultravioleta seguido de fotodocumentação. A identificação dos genótipos foi realizada em duplicata de acordo com o quadro 1, sendo que as amostras que geravam conflitos eram submetidas a uma PCR de confirmação.

**Quadro 1:** Possíveis genótipos da ApoE em gel de agarose.



### **Análises bioquímicas**

Após coleta de sangue em tubo com EDTA, o material foi centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos à 5°C para separar o plasma e possibilitar as seguintes medições: glicose (GOD-PAP Glicose, *Roche Diagnostics*, Mannheim, EUA), colesterol total (CHOD-PAD, *Roche Diagnostics*, Mannheim, EUA), triglicerídeos (GPO-PAP, *Roche Diagnostics*, Mannheim, EUA), HDL-c (colesterol HDL sem pré-tratamento, a *Roche Diagnostics*, Mannheim, EUA), proteína C-reativa (altamente sensível, *CardioPhase*, Dade Behring, Marburg, EUA), e ApoA e ApoB (*Behring Nephelometer BNII*, Dade Behring, Marburg, Alemanha).

### **Tomografia Cardíaca Computadorizada**

A tomografia computadorizada foi realizada em um scanner de 64 cortes (Aquillion 64, Toshiba, Ottawara, Japão). Cortes axiais de 3 mm de espessura, com 3 milímetros de *table-feed*, foram adquiridos com 70% de intervalo R-R com eletrocardiografia potencial desencadeante. A calcificação da artéria coronária foi definida como um período mínimo de 3 *pixels* contínuos com uma densidade de pico de unidade Hounsfield > 130. As calcificações arteriais coronárias foram determinadas por um radiologista certificado. O escore Agatston foi utilizado para expressar o valor de CAD.

## **Análises Estatísticas**

A possível violação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada através do Teste exato de *Fisher*. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal dos dados de variáveis contínuas em uma abordagem intra-grupo. Sempre que necessário, os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (SD) ou frequência (%). O teste *t de Student* foi utilizado para comparar as médias de idade e de marcadores metabólicos/clínicos entre genótipos. Quando necessário, ANCOVA foi utilizado para analisar a variação dos níveis de marcadores metabólicos entre genótipos com ajustamento para idade, IMC e sexo. Frequências foram comparadas pelo teste do *qui-quadrado*. Todas as análises foram realizadas empregando o *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)* para Windows (versão 17.0). O valor de  $p < 0,05$  foi adotado como limiar de significância.

## **5. Resultados**

Após recrutamento dos pacientes, avaliamos características clínicas e bioquímicas de cada indivíduo no momento da consulta, juntamente com os genótipos do gene da ApoE. As frequências alélicas para  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  em toda a amostra de 208 pacientes admitidos foram 1.0%, 91.3% e 7.7%, respectivamente. Devido ao baixo número de portadores  $\epsilon 2$  na amostra, esses indivíduos foram agrupados com homozigotos para  $\epsilon 3$  (não-carreadores de  $\epsilon 4$ ) para efeito de comparação com carreadores  $\epsilon 4$ . O único paciente com genótipo  $\epsilon 2/\epsilon 4$  foi excluído das análises devido a presença de efeitos opostos produzidos por esses alelos sobre o fenótipo estudado (TIRET, 1994), constituindo a amostra final de 207 pacientes.

A amostra apresentou um padrão homogêneo quanto às características basais, como idade e gênero de acordo com os genótipos. Quanto às variáveis lipêmicas e clínicas, não foram encontradas diferenças em termos de lipídeos plasmáticos (TC, LDL-c e TG) quando indivíduos não-carreadores de  $\epsilon 4$  foram comparados ao carreadores de  $\epsilon 4$ . Apenas quanto aos níveis de ApoB e da razão ApoB/ApoA, os escores médios foram significativos ( $p < 0,05$ ). Não houve outras diferenças clínicas ou laboratoriais observadas entre os dois grupos (Tabela 1). O efeito desse polimorfismo estrutural sobre os níveis quantitativos de ApoB, mas não sobre ApoA, sugere uma interação entre o gene da ApoE com o produto do gene

dessa família das apolipoproteínas. A relação entre o polimorfismo da ApoE com a calcificação da artéria coronária, medida pelo escore de Agatston, não mostrou diferença significativa entre os grupos de carreadores e não-carreadores de  $\epsilon 4$ .

**Tabela 1:** Características dos indivíduos de acordo com o genótipo de ApoE

	<i>Não-portadores de <math>\epsilon 4</math> (n=180)</i>	<i>Portadores de <math>\epsilon 4</math> (n=27)</i>	<i>P</i>
Idade, anos	84,5±4,2	84,1±4,5	0,66
Masculino, %	18,8	35,7	0,13
Índice de massa corpórea, kg/m <sup>2</sup>	26,0±5,0	25,0±4,0	0,09
Circunferência de cintura, cm	94,0±12,0	93,0±12,0	0,65
PAS, mmHg	145,0±19,0	148,0±27,0	0,43
PAD, mmHg	75,0±11,0	75,0±11,0	0,96
Colesterol total, mg/dl	197,0±40,0	204,0±42,0	0,39
HDL colesterol, mg/dL	55,0±14,0	53,0±14,0	0,59
LDL colesterol, mg/dL	112,0±35,0	122,0±38,0	0,15
Triglicerídeos, mg/dL	127,0±56,0	128,0±58,0	0,89
HbA1c, %	6,2±1,0	6,2±1,6	0,84
ApoA, md/dL	151,0±25,0	145,0±23,0	0,22
ApoB, mg/dL	84,0±23,0	94,0±23,0	0,04
ApoB/ApoA	0,6±0,2	0,7±0,2	0,03
Escore de Agatston, ud	63,0±301,0	69,0±331,0	0,92
Proteína C reativa, mg/L	3,8±6,9	4,1±6,8	0,84

Valores dados: média±DP

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HbA1c: hemoglobina glicada; Apo: Apolipoproteína

## 6. Discussão

A amostra composta por pacientes octogenários, com idade média de 85,8 anos, predominantemente por mulheres (78,8%), apresentou elevada prevalência de hipertensão arterial sistêmica (77,4%), sendo a HAS conhecida como o principal fator de risco cardiovascular e ainda a enfermidade crônica mais comum em idosos (FREITAS, 2011), com prevalência igual ou superior a 60% na América Latina e no Caribe (FREITAS, 2011). Quase metade do grupo apresentou altos índices de colesterol (49,3%). Após análise do perfil lipêmico dos pacientes, não foram observadas dislipidemias em relação às lipoproteínas, sendo os seguintes valores

médios encontrados: LDL-c 114mg/dL; HDL 54,7mg/dL; VLDL 29,7mg/dL, TG 127, 1mg/dL e CT 198,3mg/dL.

A associação entre o polimorfismo da ApoE e o perfil lipídico possui impacto já reportado na literatura, principalmente sobre os níveis de colesterol plasmático e de ApoB (DEMANT, 1991). Os nossos resultados sugerem que a ApoE desempenha um papel na modulação da expressão de ApoB, apesar de não observarmos flutuação detectável nas lipoproteínas contendo ApoB. Baixos níveis de ApoB foram encontrados entre os não-carreadores de  $\epsilon 4$ , enquanto que maiores níveis médios foram associados com carreadores de  $\epsilon 4$ . Nesse sentido, o estudo de Boerwinkle e colaboradores encontrou que a concentração total de ApoB (a soma das partículas de lipoproteínas de muito baixa, baixa e intermediária densidade) estava significativamente reduzida em homozigotos para  $\epsilon 2$ , também observado por Luc *et al* em um estudo caso-controle realizado em quatro regiões da Europa.

Apesar de não serem completamente conhecidos, nem a cinética de integração da ApoE sobre as partículas de TRL nem a influência dessa proteína multifuncional no metabolismo da ApoB, Millar *et al* observaram uma correlação negativa entre a produção de ApoE contendo TRL com a produção de ApoB contendo LDL-c (MILLAR, 2001). Além disso, foi demonstrado por alguns estudos que ocorre uma expressão diferencial entre os alelos da ApoE, possuindo os alelos  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 3$  uma maior taxa de expressão em relação ao alelo  $\epsilon 4$  (DAVIGNON, 1999; MILLAR, 2001; DAVIGNON, 1988). Por esta razão, os resultados obtidos no presente estudo podem, pelo menos em parte, derivar da interação competitiva entre os produtos de genes, uma vez que a maior taxa de expressão de  $\epsilon 2$  e  $\epsilon 3$  pode justificar níveis proporcionalmente baixos de partículas ApoB em TRL nos pacientes analisados. Em nossas condições, não foram observadas interações entre os genótipos da ApoE com os níveis plasmáticos de ApoA.

Em estudos realizados com coortes mais novas, carreadores de  $\epsilon 2$  tendem a expressar níveis plasmáticos mais baixos de colesterol total e LDL-c em comparação aos homozigotos  $\epsilon 3$ , enquanto que carreadores  $\epsilon 4$  possuem maiores níveis de colesterol e LDL-c (ALVIM, 2010; DAVIGNON, 1999; YIN, 2008). No entanto, em populações muito idosas, tal como os representantes da nossa amostra, a relação entre as isoformas da ApoE e os níveis de lipídeos plasmáticos torna-se menos evidente. Trabalhos de Davignon *et al*, assim como de Pablos-Mendez e colaboradores (1997), observaram que octogenários carreadores de  $\epsilon 4$  possuem a

mesma média que portadores de  $\epsilon 3/\epsilon 3$  nas concentrações de LDL-c, em contraste com os resultados obtidos em populações mais jovens ou em pacientes jovens com doença arterial coronariana. Desse modo, o gradiente de concentração entre os genótipos da ApoE para o LDL-c ( $\epsilon 4/\epsilon 3 > \epsilon 3/\epsilon 3 > \epsilon 2/\epsilon 3$ ) não é observado em amostras muito idosas.

Em revisão de literatura, Corbo *et al* (1999) analisaram a distribuição alélica da ApoE no mundo, e encontraram como mais freqüente o alelo Apo $\epsilon 3$  (0,49 – 0,91) e o Apo $\epsilon 2$  o mais raro (0,0 – 0,15). A freqüência progressivamente reduzida do alelo  $\epsilon 4$  é notado em todas as fases da vida, ocorrendo uma redução de até 43% após comparação com grupos mais jovens (PABLOS-MENDEZ, 1997). Nosso estudo está em linha com essa menor freqüência de  $\epsilon 4$  em octogenários, provavelmente devido a um aumento da susceptibilidade às DCV, conferida, por exemplo, pela alta razão de ApoB/ApoA nesses indivíduos (SIERRA-JOHNSON, 2009).

O presente trabalho sugere que o polimorfismo da ApoE não está relacionado a calcificação arterial, de acordo com os resultados encontrados por Alvim e colaboradores, em uma amostra da população brasileira (ALVIM, 2010). Como demonstrado em outros trabalhos, o corpo de evidências indica que a variabilidade da ApoE contribui pobremente para os fenótipos de calcificação, estando ou não relacionadas a calcificação ectópica (BAGGER, 2007; KARDIA, 1999). Apesar de todos os cuidados metodológicos, nosso estudo tem limitações potenciais. Por exemplo, não avaliamos o uso de medicamentos hipolipemiantes e nem a possível interferência da dieta, o que poderia confundir as associações observadas. Não temos o conhecimento de estudos anteriores que observaram a relação da ApoE com a relação ApoB e ApoA.

## **7. Conclusão**

Os fatores de risco cardiovasculares clássicos para população adulta parecem não agir da mesma forma na população muito idosa. Após avaliação clínica e bioquímica, testes estatísticos não revelaram a associação do gene da ApoE com parâmetros lipêmicos no grupo etário estudado. Ainda, esse estudo sugere que o papel aterogênico do alelo  $\epsilon 4$  pode ser atribuído, também, pelo menos em parte, a um aumento da razão ApoB/ApoA devido aos maiores níveis de ApoB em carreadores de  $\epsilon 4$  quando comparados aos não-carreadores. Não temos

conhecimento de estudos anteriores que observaram uma interação entre o gene ApoE e outras apolipoproteínas.

## Referências

Finegold JA, Asaria P, Francis DP. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int J Cardiol.* 2012

Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95:1-51.

Mansur AP, Favarato D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. *Arq Bras Cardiol.* 2012;99:755-61.

Hoffmeister H, Mensink GB, Stolzenberg H. National trends in risk factors for cardiovascular disease in Germany. *Prev Med.* 1994; 23(2):197-205.

Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 2001;104:503-16.

Demant T, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J Clin Invest.* 1991;88:1490-501.

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FHA, Bertomali MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, Volume 88, Suplemento I, Abril 2007

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Lehninger Princípios de Bioquímica, 3 ed., São Paulo, 2002.

Mahhley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: Far more than a lipid transport protein. *Annual Rev Genomics Hum Genet.*, 2000;1:507-37

Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta.* 1999;286:115-43.

Ojopi EPB, Bertoncini AB, Dias Neto, E. Apolipoproteína E e a doença de alzheimer. *Rev Psiquiatr Clín.*, 2004;1:26-33

Alvim RO, Freitas SR, Ferreira NE, Santos PC, Cunha RS, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. *Lipids Health Dis.* 2010;9:128.

Demant T, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J Clin Invest.* 1991;88:1490-501.

Tiret L, de Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1617-24.

Waterworth DM, Ricketts SL, Song K, Chen L, Zhao JH, Ripatti S, *et al.* Genetic variants influencing circulating lipid levels and risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2264-76.

Smith EN, Chen W, Kähönen M, Kettunen J, Lehtimäki T, Peltonen L, Raitakari OT, Salem RM, Schork NJ, Shaw M, Srinivasan SR, Topol EJ, Viikari JS, Berenson GS, Murray SS. Longitudinal genome-wide association of cardiovascular disease risk factors in the Bogalusa heart study. *PLoS Genet.* 2010;6.

Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, Pramstaller PP, *et al.* Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet.* 2009;41:47-55.

Sierra-Johnson J, Fisher RM, Romero-Corral A, Somers VK, Lopez-Jimenez F, Ohrvik J, Walldius G, Hellenius ML, Hamsten A. Concentration of apolipoprotein B is comparable with the apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio and better than routine clinical lipid measurements in predicting coronary heart disease mortality: findings from a multi-ethnic US population. *Eur Heart J*. 2009;30:710-7.

Donohoe GG, Salomaki A, Lehtimaki T, Pulkki K, Kairisto V. Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by multiplex amplification refractory mutation system PCR and capillary gel electrophoresis. *Clin Chem*. 1999;45:143-6.

Freitas MPD, Loyola Filho AI, Lima-Costa MF. Dislipidemia e risco de incidência de hipertensão em uma população de idosos brasileiros vivendo em comunidade: Coorte de Idosos de Bambuí. *Cad Saude Pública*, 2011.

Freitas MPD, Loyola Filho AI, Lima-Costa MF. Efeito de coorte de fatores de risco cardiovascular em idosos mais velhos: Coorte de Idosos de Bambuí (1997 e 2008). *Cad Saude Pública*, 2011

Boerwinkle E, Utermann G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet*. 1988;42:104-12.

Luc G, Bard JM, Arveiler D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, Amouyel P, Schaffer P, Ruidavets JB, Cambien F, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1412-9.

Millar JS, Lichtenstein AH, Ordovas JM, Dolnikowski GG, Schaefer EJ. Human triglyceride-rich lipoprotein apo E kinetics and its relationship to LDL apo B-100 metabolism. *Atherosclerosis*. 2001;155:477-85.

Davignon J, Bouthillier D, Nestruck AC, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis: insight from a study in octogenarians. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1988;99:100-10.

Yin R, Pan S, Wu J, Lin W, Yang D. Apolipoprotein E gene polymorphism and serum lipid levels in the Guangxi Hei Yi Zhuang and Han populations. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233:409-18.

Pablos-Mendez A, Mayeux R, Ngai C, Shea S, Berglund L. Association of apoE polymorphism with plasma lipid levels in a multiethnic elderly population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3534-41.

Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE\* 4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet.* 1999;63:301-10.

Bagger YZ, Rasmussen HB, Alexandersen P, Werge T, Christiansen C, Tankó LB, PERF study group. Links between cardiovascular disease and osteoporosis in postmenopausal women: serum lipids or atherosclerosis per se? *Osteoporos Int.* 2007;18:505-12.

Kardia SL, Haviland MB, Ferrell RE, Sing CF. The relationship between risk factor levels and presence of coronary artery calcification is dependent on apolipoprotein E genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:427-35.