

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
MESTRADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GERIATRIA**

**Polimorfismo da Apolipoproteína E e Perfil de
Distribuição de Subfrações de Lipoproteínas**

PATRICIA DE MORAES COSTA

**Porto Alegre
2004**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
MESTRADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GERIATRIA**

**Polimorfismo da Apolipoproteína E e Perfil de
Distribuição de Subfrações de Lipoproteínas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em
Geriatrics, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul, para a obtenção do título de Mestre

PATRICIA DE MORAES COSTA

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz da Costa Vieira

Coorientador:

Prof. Dr. Emílio Hideyuki Moriguchi

**Porto Alegre
2004**

C837p **Costa, Patrícia de Moraes**

Polimorfismo da apolipoproteína E e perfil de distribuição de subfrações de lipoproteínas / Patrícia de Moraes Costa; orient. José Luiz da Costa Vieira; co-orient. Emílio Hideyuki Moriguchi. Porto Alegre: PUCRS, 2004.

70f.: il. táb.

Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Geriatria.

1. APOLIPROTEINAS E. 2. POLIMORFISMO (GENÉTICA). 3. IDOSO. 4. ENVELHECIMENTO. 5. HIPERLIPIDEMIA. 6. GERIATRIA. 7. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Costa, José Luiz da. II. Moriguchi, Emílio Hideyuki. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo e para minha formação e, em especial, agradeço:

- Ao meu orientador Professor Dr. José Luiz da Costa Vieira por toda orientação, paciência, disponibilidade, atenção, ensinamentos e apoio ao longo desta caminhada e ao meu coorientador Professor Dr. Emílio Hideyuki Moriguchi pelos ensinamentos e apoio;

- Ao Professor Yukio Moriguchi, pelo legado, pioneirismo e criação do Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS;

- Aos Professores do IGG-PUCRS, Dr. Antônio Carlos Araújo de Souza, Dr. Newton Terra e Dr. Rodolfo H. Schneider, pelos ensinamentos e apoio;

- Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS pelos conhecimentos e vivências transmitidos;

- À equipe do Laboratório do IGG-PUCRS, em especial à colega e bióloga Graziela Oliveira, por todo trabalho e auxílio;

- Aos idosos de Gravataí pela disponibilidade em participar do projeto, pelos exemplos e sorrisos;

- Aos meus pais Potyguara Silveira da Costa e Anabela Bragança de Moraes Costa por tudo que sou, pelo exemplo, confiança, apoio e carinho de todas as horas;

- Aos meus avós José Francisco Pinto de Moraes, Florisbela Cecília Bragança de Moraes, Polydoro Albuquerque Costa e Alda Silveira da Costa, pelos exemplos de vida, carinho e apoio;

- À minha irmã Gabriela de Moraes Costa pela ajuda, carinho e estímulo;

- Ao Tiago José Nardi Gomes, meu namorado e amigo, por estar ao meu lado a cada instante, pelo amor, compreensão, dedicação e companheirismo;

- À minha amiga e colega Adriana de Melo Gomes, que participou e incentivou cada etapa, nos bons e nos difíceis momentos;

- Aos amigos e colegas Adriana Fornari, Bárbara Agra Louzada, Daniel Zanchet, Evelise de Oliveira Silveira, Felipe Nardi Gomes, Júlio César Rigo, Luciano Diogo, meu irmão Marcelo de Moraes Costa, Milton H. Santos, Neli Corrêa dos Santos e Raquel Pessoa pelo apoio recebido das mais diversas formas;

- À secretária do Curso Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS, Sônia Mantovani, pelo apoio, dinamismo e dedicação;

- Ao órgão financiador Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelo auxílio e incentivo ao Ensino e à Pesquisa;

- À Universidade Federal de Santa Maria, berço de minha vida acadêmica;

- À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, onde realizei minha Pós-Graduação;

- À Prefeitura Municipal de Gravataí e funcionários pelo apoio logístico e organização do Projeto Gravataí;

- A Deus, por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 LIPÍDIOS, ATROSCLEROSE E RISCO CORONARIANO.....	6
2.1.1 <i>Lipídios e Risco Cardiovascular</i>	6
2.1.2 <i>Metabolismo Lipídico</i>	13
2.2 SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS.....	18
2.3 DETERMINAÇÃO DAS SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS	20
2.4 APOLIPOPROTEÍNA “E”.....	22
2.5 APOLIPOPROTEÍNA “E” E SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	28
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	28
4. HIPÓTESES.....	29
4.1 HIPÓTESE CONCEITUAL.....	29
4.2 HIPÓTESE OPERACIONAL.....	29
5. POPULAÇÃO E MÉTODOS.....	30
5.1 DELINEAMENTO.....	30
5.2 POPULAÇÃO DA PESQUISA E POPULAÇÃO EFETIVAMENTE PESQUISADA	30
5.3 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS	30
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	31
5.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	31
5.6 TÉCNICAS LABORATORIAIS	33

5.6.1	<i>Determinações Bioquímicas</i>	33
5.6.2	<i>Dosagem das Subfrações das Lipoproteínas</i>	34
5.6.3	<i>Dosagem da apolipoproteína E (Apo E):</i>	34
5.7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	37
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6.	RESULTADOS	38
6.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASAIS	38
6.2	ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA APOLIPOPROTEÍNA “E”	38
6.3	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E GENÓTIPOS DA APOLIPOPROTEÍNA “E”	40
6.4	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E GRUPOS DA APOLIPOPROTEÍNA “E”	41
6.5	PERFIL LIPÍDICO BASAL E GRUPOS DE APOLIPOPROTEÍNA “E”	42
6.6	DISTRIBUIÇÃO DAS SUBFRAÇÕES CONFORME OS GRUPOS DE APOLIPOPROTEÍNA “E”	43
7.	DISCUSSÃO	45
7.1	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA APOLIPOPROTEÍNA “E”	45
7.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E GRUPOS DA APOLIPOPROTEÍNA “E”	45
7.3	MÉDIA DO COLESTEROL TOTAL, PERFIL LIPÍDICO E GRUPOS DE APOLIPOPROTEÍNA “E”	46
7.4	LIMITANTES NA RELAÇÃO DO POLIMORFISMO DA APO E COM O PROCESSO DE ATEROSCLEROSE	47
7.5	PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DAS SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS	48
7.6	POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA “E” E PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DE SUBFRAÇÕES	48
7.7	LIMITAÇÕES	50
7.8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
8.	CONCLUSÕES	52
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
10.	ANEXO	59
10.1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da apolipoproteína

Figura 2 – Fenótipos homozigóticos da apolipoproteína E e seqüência de aminoácidos

Figura 3 – Efeitos dos alelos da apolipoproteína E nos parâmetros lipídicos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros das lipoproteínas medidos pela RNM

Tabela 2 – Freqüências alélicas e genóticas da população estudada

Tabela 3 – Características clínicas e genótipos da apolipoproteína E

Tabela 4 – Características clínicas e grupos da apolipoproteína E

Tabela 5 – Perfil lipídico e grupos da apolipoproteína E

Tabela 6 – Tamanho das partículas de acordo com os grupos da apolipoproteína E

Tabela 7 – Número de partículas de acordo com os grupos da apolipoproteína E

Tabela 8 - Distribuição das subfrações de lipoproteínas conforme grupos da apolipoproteína E

LISTA DE ABREVIATURAS

Apo E	- Apolipoproteína E
CT	- Colesterol total plasmático
DAC	- Doença arterial coronariana
€2, €3, €4	- Epsilon 2, - Epsilon 3, - Epsilon 4 – alelos da apo E
HDL	- Lipoproteína de alta densidade (<i>high density lipoprotein</i>)
HDL-C	- HDL-colesterol (colesterol da lipoproteína de alta densidade)
IDL	- Lipoproteína de densidade intermediária (<i>intermediate density lipoprotein</i>)
IGG	- Instituto de Geriatria e Gerontologia
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
LDL-C	- LDL-colesterol (colesterol da lipoproteína de baixa densidade)
PCR	- Polymerase Chain Reaction
PUCRS	- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RNM	- Ressonância nuclear magnética
TG	- Triglicerídeos
VLDL	- Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>very low density lipoprotein</i>)

RESUMO

Introdução – As doenças cardiovasculares são a quinta causa de óbito em todo o mundo e projeções mostram que serão a primeira causa em 2020 se medidas preventivas não forem realizadas. Um dos principais fatores de risco para doença arterial coronariana é a dislipidemia, com a intensidade de sua participação como fator de risco dependendo de componentes ambientais e características genéticas de cada indivíduo. Dentre os fatores genéticos influenciando a aterosclerose, o polimorfismo da apolipoproteína E é o mais estudado, associando-se a alterações nos níveis basais de lipoproteínas conforme o alelo envolvido. Com os avanços no conhecimento do metabolismo lipídico, passou-se a pesquisar o papel das subfrações de lipoproteínas na aterogênese e quais os fatores que poderiam alterar seu perfil de distribuição, dentre estes, a influência genética.

Objetivo - Correlacionar o polimorfismo da apolipoproteína E e o perfil de distribuição das subfrações de lipoproteínas de indivíduos portadores de dislipidemia.

População e Métodos – Estudo transversal, descritivo e analítico. Foram avaliados 35 indivíduos com idades de 50 a 79 anos, portadores de dislipidemia. A história clínica e os dados antropométricos foram obtidos através de entrevista estruturada e avaliação laboratorial. Foram avaliados perfil lipídico por reação enzimática colorimétrica e imunoinibição, perfil de subfrações de lipoproteínas pelo método de espectroscopia por Ressonância Nuclear Magnética e polimorfismo da apolipoproteína E através da técnica de Polymerase Chain Reaction – Random Fragment Length Polymorphism.

Resultados - As freqüências genótípicas encontradas foram semelhantes ao padrão encontrado para a população adulta caucasiana em geral, com predomínio do genótipo E3E3. Para a análise das variáveis foram agrupados os genótipos da apolipoproteína E E2E3 e E3E3 (grupo E3) e os genótipos E3E4 e E4E4 (grupo E4). Não houve a presença dos genótipos E2E2 e E2E4 na população estudada. Avaliando-se o perfil de distribuição de subfrações de lipoproteínas conforme os grupos de apo E, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das variáveis.

Conclusão - No presente estudo em pacientes portadores de dislipidemia não encontrou-se associação entre o polimorfismo da apolipoproteína E e o padrão de distribuição das subfrações de lipoproteínas.

ABSTRACT

Background – Cardiovascular diseases are the fifth cause of death all over the world and projections show that they will be the first cause in the year 2020 if preventive measures are not provided. Dislipidemia is among the main risk factors to coronary disease, with its participation intensity as a risk factor depending on environmental components and genetic characteristics of each individual. Among the genetic factors that influence atherosclerosis, apolipoprotein E is the most studied one and is associated with changes in lipoprotein levels depending of the respective allele involved. With the recent advances in the lipid metabolism study, researches have been started regarding the roll of lipoproteins subfractions and the genetic influence, specially the apolipoprotein E polymorphism, in the development of atherosclerosis.

Objective – To correlate the apolipoprotein E polymorphism and the lipoprotein subfraction distribution profile of dislipidemic individuals.

Population and methods – Cross-sectional, descriptive and analytical study. Thirty-five individuals with dislipidemia were analyzed. Their ages were between fifty and seventy-nine years-old. The data were obtained through structured interview and laboratorial evaluation. Lipid profile were evaluated using enzymatic method and lipoproteins subfractions profile were evaluated by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy method and apolipoprotein E polymorphism using Polymerase Chain Reaction - Random Fragment Length Polymorphism technique.

Results – The genotypic frequencies found were similar to the pattern found in the adult caucasian population in general, with predominance of the $\epsilon 3\epsilon 3$ genotype. The lipid profile and the lipoprotein subfractions showed a normal pattern of distribution, except for the VLDL size. Analyzing this varieties according to the apolipoprotein E group (group three: $\epsilon 2\epsilon 3$ and $\epsilon 3\epsilon 3$, group four: $\epsilon 3\epsilon 4$ and $\epsilon 4\epsilon 4$), statistically significant differences were not found to any of the variables.

Conclusion – In the present study with dislipidemic patients we did not find association between the apolipoprotein E polymorphism and the lipoprotein subfraction distribution profile .

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam importante problema de saúde pública em todo o mundo, visto que constituem uma das principais causas de morbi-mortalidade e representam os mais altos custos em assistência médica. Com o aumento da idade média de sobrevivência, essas doenças assim como outras doenças crônico-degenerativas estarão cada vez mais presentes (1).

As doenças cardiovasculares, em especial a doença arterial coronariana (DAC), representam a quinta causa de óbito em todo o mundo e há previsão de serem a primeira causa de morte em 2020 se medidas preventivas não forem adotadas (1).

Dados do Ministério da Saúde, baseados em estatísticas do SUS de 2003, mostram que as três doenças que mais matam no Brasil são infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca, demonstrando a importância da morbidade das doenças cardiovasculares em nosso meio (2).

Alguns principais fatores de risco para doença arterial coronariana são conhecidos e comprovados, como hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, obesidade, sedentarismo, diabetes melitos, antecedentes familiares e dislipidemia. No entanto, a intensidade da participação destes fatores de risco no

desenvolvimento da doença coronariana depende de componentes ambientais e de características genéticas de cada indivíduo ou de uma população(1, 3, 4).

O estilo de vida sedentário e a sobrecarga metabólica com dietas hipercalóricas e ricas em gordura têm aumentado a incidência de obesidade e de pacientes com perfil lipídico adverso, importantes fatores de risco para DAC. Devido à alta prevalência dessa patologia, impõe-se a necessidade de medidas preventivas. A eficácia dessas medidas advém da identificação prévia dos fatores de risco da população e da implementação de programas educativos.

A hipercolesterolemia é fator de risco independente para a aterosclerose e a sua associação com os outros fatores de risco aumenta o papel de seu potencial de risco. Em estudo realizado na Campanha Nacional de Alerta Sobre o Colesterol Elevado publicado em 2003, a média do colesterol da população estudada foi de 199 mg/dL, sendo que 40% da população apresentava níveis sanguíneos de colesterol total acima de 200 mg/dL (5). O risco relativo de eventos cardiovasculares aumenta na população cujos níveis sanguíneos de colesterol sejam maiores que 200 mg/dL. No estudo de Framingham, a média dos níveis do colesterol foi de 225 mg/dL na população acometida de infarto do miocárdio (5, 6).

As associações das principais lipoproteínas – lipoproteína de alta densidade (HDL: *high density lipoprotein*), lipoproteína de baixa densidade (LDL: *low density lipoprotein*) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL: *very low density lipoprotein*) – com risco coronariano estão bem estabelecidas há décadas.

Com o avanço nos últimos anos do conhecimento do metabolismo lipídico, observou-se que cada uma dessas lipoproteínas são constituídas por partículas bastante heterogêneas, que diferem entre si na associação com doença arterial coronariana. A partir disso, além dos fatores de risco lipídicos clássicos, passou-se a estudar o padrão de distribuição das subclasses de lipoproteínas, com identificação de um padrão aterogênico, chamado padrão B, caracterizado pelo predomínio de partículas de LDL pequenas e densas, que está relacionado com aumento do risco cardiovascular independente dos níveis de LDL colesterol (LDL-C) (7-11). Desta forma, pacientes com um mesmo nível de LDL-C podem estar em níveis de risco cardiovascular bastante diversos, dependendo se apresentarem predomínio de partículas de LDL grandes e flutuantes (menor risco) ou pequenas e densas (maior risco).

Na última década intensificaram-se os estudos sobre a influência genética na aterosclerose. Pela complexidade envolvida no processo da aterosclerose, os genes inicialmente estudados foram aqueles fortemente relacionados com os principais fatores de risco para a DAC, em especial a hipertensão arterial e as dislipidemias. O polimorfismo mais estudado em relação à doença coronariana é o polimorfismo da apolipoproteína E (apo E) que é associado com importantes variações no perfil lipídico, influenciando os níveis de colesterol total (CT), LDL-C, HDL colesterol (HDL-C) e triglicerídeos (TG).

A possibilidade do polimorfismo da apolipoproteína E também influenciar o perfil de distribuição de subfrações de lipoproteínas foi avaliada em alguns estudos, com resultados conflitantes (3, 12-15).

O presente estudo avalia a associação entre o polimorfismo da apolipoproteína E e o perfil de distribuição de subfrações em uma população de indivíduos portadores de dislipidemia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LIPÍDIOS, ATEROSCLEROSE E RISCO CORONARIANO

2.1.1 Lipídios e Risco Cardiovascular

Nas últimas décadas o papel do colesterol como fator de risco coronariano ficou bem demonstrado por meio de estudos epidemiológicos. Um dos estudos pioneiros foi o estudo de Framingham, de 1948, que evidenciou a importância do nível de colesterol em indivíduos normais no desenvolvimento de complicações da doença aterosclerótica. Neste estudo pela primeira vez uma grande coorte de homens e mulheres saudáveis foi estudada prospectivamente e os resultados demonstraram que o risco de desenvolver DAC clinicamente manifesta foi proporcional à curva dos níveis de colesterol total (16, 17).

Nas décadas seguintes, vários estudos confirmam e estendem os achados de Framingham, envolvendo tanto prevenção primária quanto secundária.

Os estudos de prevenção primária podem ser divididos em dois grupos quanto ao modo de intervenção:

- 1) Modificações de hábitos ou vícios, sem interferência de drogas hipolipemiantes, procurando assim modificar o “estilo de vida” de indivíduos livres de DAC;
- 2) Uso de drogas hipolipemiantes, associado à manutenção das restrições dietéticas.

A estratégia de prevenção primária por meio de intervenção farmacológica tem como um de seus marcos fundamentais os dados do estudo de intervenção

Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial (LRC-CPPT) em 1984 (18). Neste, 3806 pacientes do gênero masculino, com idades entre 35 e 59 anos, hipercolesterolêmicos, com níveis de CT maiores que 265 mg/dL e LDL-C maior que 190 mg/dL, foram tratados com colestiramina, 24 g/dia; a dose média efetivamente tomada foi 14 g/dia em virtude da intolerância à droga. O tempo de acompanhamento foi em média 7,4 anos (7 a 10 anos). O CT sofreu redução de 8,5% e o LDL-C de 12,6% quando comparado ao grupo placebo e, surpreendentemente, o HDL-C teve aumento de 1,5%. Ao final do estudo observou-se diminuição da mortalidade por DAC de 19% ($p < 0,05$) no grupo tratado.

A partir desses dados estabeleceu-se uma regra entre diminuição de CT e diminuição de risco coronariano: 1% de diminuição de CT equivalendo a 2% de redução no risco de DAC. Esta relação fundamenta os dados do Estudo de Framingham que apontam um aumento de 2% de DAC para cada 1% de aumento de CT para homens e mulheres de todas as idades.

O LRC-CPPT permitiu também obter outros dados secundários de benefícios como a redução no número de testes ergométricos positivos, de casos de angina de peito e cirurgias de revascularização miocárdica em cerca de 20 a 25% no grupo tratado.

Três anos depois foram publicados os resultados do importante estudo Helsinque (19), que utilizou um fibrato – o genfibrozil – na dose de 1200 mg/dia, em comparação com placebo; incluiu 4081 homens portadores de colesterol não-HDL (CT menos o HDL-C) acima de 200 mg/dL com idades entre 40 e 55 anos, em seguimento por 5 anos. No grupo tratado ($n=2051$), os dados finais mostraram as seguintes modificações: diminuição do CT em 10%, de TG em

35%, LDL-C em 11%, HDL-C em 11% e do risco relativo de DAC em 34%. O maior benefício foi verificado nos pacientes com dislipidemia do tipo IIb (aumento de CT e TG) na classificação de Fredrickson das dislipidemias.

A mortalidade total por todas as causas não foi afetada tanto no estudo LRC-CPPT quanto no Helsinque.

O Estudo de Intervenção Multifatorial MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial de 1986 demonstrou associações positiva e negativa de DAC com níveis de LDL-C e HDL colesterol (HDLc), respectivamente (20).

O “Estudo dos sete países” , de 1990, demonstrou a correlação entre níveis médios de colesterol de diferentes populações e índices de mortalidade por DAC (21).

A partir de 1990 foram publicadas diversas metanálises avaliando os resultados dos principais estudos existentes até então.

Até 1990, Muldoon et al (22), comparando o total de 12457 homens tratados com 12390 controles, observaram que para uma redução média de 10% do CT, a morbimortalidade por DAC diminuiu em 26%.

Rossumv et al (23), em análise conjunta de quatro estudos (Administração de Veteranos de Los Angeles, Lipid Research Clinics, Helsinque e Estudo Europeu com clofibrato), verificaram que a diminuição de 10% do CT correspondeu às seguintes reduções de eventos: infarto do miocárdio não-fatal – 25%, infarto do miocárdio fatal – 12%, todos os infartos – 22%.

Análise de Crigui (24), abrangendo os estudos Lipid Research Clinics, Helsinque e Oslo, obteve redução média da mortalidade por DAC de 35% e menor que 1% para a mortalidade absoluta.

Holme (25) em 1993, analisando em conjunto nove estudos, observou menor incidência de eventos coronarianos nos indivíduos tratados com fármacos, sem avaliar a mortalidade total. O mesmo autor, dois anos depois, concluiu que populações com incidência moderada ou alta de DAC podem apresentar redução de mortalidade total com a redução dos níveis de CT (26).

Já na era das estatinas, dois grandes estudos de prevenção primária merecem citação: Estudo do Oeste da Escócia (WOSCOPS) e o Estudo do Texas (Airforce Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study – AFCAPS/TexCAPS).

O WOSCOPS incluiu 6595 homens hipercolesterolêmicos (CT médio de 272 mg/dL), com idades entre 45 e 64 anos, dos quais 95% não apresentavam DAC clínica. Do total, 3302 foram tratados com pravastatina na dose de 40 mg/dia, durante 4,9 anos em média; comparados ao grupo placebo, apresentaram redução de CT de 20% e de LDL-C de 26%, aumento de HDL-C de 5%, acompanhados de diminuição significativa de infarto do miocárdio não-fatal (31%), da mortalidade global cardiovascular (32%), da necessidade de coronariografia (31%) e de procedimentos de revascularização, incluindo angioplastia (37%). Observaram-se ainda redução da mortalidade por DAC em 28%, não-cardiovascular em 11%, total em 22% e por neoplasias malignas em 11%, além de menor risco de acidentes cerebrovasculares fatais e não-fatais (11%). Após ajuste para outros fatores de risco, o grupo tratado exibiu diminuição significativa da mortalidade total (24%). O número de suicídios e óbitos violentos não diferiu nos dois grupos. É importante assinalar que os benefícios do tratamento se fizeram notar a partir do sexto mês de seguimento e estiveram presentes no final do estudo nos seguintes subgrupos: fumantes e não

fumantes, pacientes com menos e mais de 55 anos de idade, portadores de outros fatores de risco e naqueles com diferentes valores de CT, LDL-C e HDL-C. Não houve correlação entre os diferentes percentuais de redução de LDL-C e de freqüência de eventos, embora esta fosse mais acentuada (redução de 45%) quando o LDL-C diminuiu em 24%. As modificações de TG (12%) e de HDL-C (7%) não afetaram o risco. A intervenção com pravastatina, na dose empregada, provocou redução de 35% no risco de eventos considerados em conjunto, resultado que superou a expectativa baseada no modelo resultante do Estudo de Framingham, que seria de 24%. Deve-se observar que o nível de LDL-C atingido neste estudo foi de 142 mg/dL, superior portanto àquele preconizado pelo National Cholesterol Education Program – ATP III e pelas Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias. Entretanto, houve benefício clínico significativo nesta amostra de alto risco, mais expressivo quando a redução de LDL-C atingiu 24%, sem que reduções maiores trouxessem mais benefícios.

O estudo AFCAPS/TexCAPS incluiu homens (5608, com idades entre 45 e 73 anos) e mulheres (997, com idades entre 55 e 73 anos) portadores de CT e LDL-C pouco elevados (CT entre 180 e 264 com média de 221 e LDL-C entre 130 e 190 com média de 150 mg/dL), porém com HDL-C inferior a 45 e 47 mg/dL respectivamente para homens e mulheres. O seguimento médio foi de 5,2 anos e o grupo tratado (2805 homens e 499 mulheres) recebeu lovastatina na dose de 20 ou 40 mg/dia, mantendo dieta da fase I da American Heart Association. A lovastatina reduziu o LDL-C para 115 mg/dL (-25%) e aumentou o HDL-C em 6%. Os parâmetros de segurança foram similares nos dois grupos. A intervenção farmacológica foi responsável pelas reduções: primeiro evento coronariano em 37%, primeiro infarto do miocárdio em 35%, infarto do miocárdio

fatal e não-fatal em 40%, angina instável em 32%, procedimentos de revascularização em 33%. Os subgrupos beneficiados foram: mulheres, pacientes com mais de 57 anos (homens) e 62 anos (mulheres), hipertensos, diabéticos, aqueles com antecedentes familiares de DAC e os pertencentes a diferentes valores basais de LDL-C (menor 142, entre 142 e 156 e maior que 157 mg/dL) e HDL-C (menor que 34, entre 35 e 39 e maior que 40 mg/dL). O conjunto de eventos coronarianos maiores (angina instável, infarto do miocárdio fatal e não-fatal) mostrou redução de 43% a partir do primeiro ano de tratamento correspondente a uma redução de 25% de LDL-C, permanecendo durante o estudo: redução de 30% para o terceiro ano, de 41% para o quarto ano e de 49% para o quinto ano. A mortalidade não diferiu nos grupos tratado e placebo (80 e 77 óbitos respectivamente), o mesmo ocorrendo quanto à incidência de câncer. Com base nesses resultados, pode-se deduzir que se 1000 pacientes, homens e mulheres, fossem tratados com lovastatina poderiam ser evitados 19 eventos coronarianos maiores (12 infartos e 7 anginas instáveis) e 17 procedimentos de revascularização miocárdica, além de 28% de redução de custos hospitalares). Estes dados acentuam a necessidade de intervenção terapêutica adequada em indivíduos clinicamente livres de DAC, com alterações lipídicas moderadas, apoiam a inclusão do HDL-C na determinação dos fatores de risco, confirmam o benefício da redução do LDL-C para um nível alvo e apontam para os benefícios da prevenção primária de DAC por meio de intervenção farmacológica.

Dentre os estudos de prevenção secundária destacam-se o Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), o Cholesterol and Recurrent Events Study

(CARE) e o Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID).

O estudo 4S (27) abrangeu pacientes portadores de angina de peito ou infarto do miocárdio, hipercolesterolêmicos, submetidos a dieta e divididos em grupos placebo e grupo sinvastatina. Após seguimento médio de 5,4 anos, observou-se no grupo tratado significativa redução do CT e do LDL-C e elevação de HDL-C, com poucos efeitos adversos. Este grupo apresentou, em relação ao grupo placebo, redução de 42% de mortalidade coronariana, não tendo ocorrido aumento de outras causas de morte, o que produziu diminuição da mortalidade total de 30%. Análises de subgrupos desse estudo mostraram benefícios para os idosos, as mulheres e os diabéticos, na incidência de acidente vascular cerebral, angina de peito, claudicação intermitente, necessidade de revascularização miocárdica, internações hospitalares, entre outros.

O estudo CARE (28) envolveu homens e mulheres após infarto do miocárdio, que apresentaram colesterolemia semelhante à média da população. Foram divididos em dois grupos, os que receberam placebo e os que foram tratados com pravastatina 40 mg/dia, com acompanhamento médio de 5 anos. O grupo pravastatina apresentou reduções estatisticamente significativas de CT e LDL-C, o que foi associado a menor mortalidade por doença coronária e menor incidência de infartos não-fatais, bem como a menor necessidade de cirurgia de revascularização miocárdica. Do mesmo modo que o estudo 4S, as análises de subgrupos do CARE mostraram benefícios para as mulheres, diabéticos e sobre a incidência de acidentes vasculares cerebrais.

O estudo LIPID (29) abrangeu população também com valores de colesterolemia na média da população americana. A randomização foi efetuada

para grupo placebo ou grupo pravastatina 40mg/dia. Após 5 anos, os pacientes tratados com pravastatina apresentaram menor incidência de todos os eventos cardiovasculares, incluindo acidentes vasculares cerebrais, bem como menor mortalidade coronária e total.

A hipercolesterolemia como fator de risco se confirma também para a população idosa, destacando-se o estudo PROSPER (Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease) que avaliou 5804 indivíduos com idades entre 70 e 82 anos, divididos em grupo placebo e grupo pravastatina, seguidos em média por 3,2 anos, obtendo uma redução de risco relativo de 15% para desfechos primários (morte por DAC, infarto do miocárdio não-fatal e acidente vascular cerebral fatal e não-fatal) no grupo tratado (30).

2.1.2 Metabolismo Lipídico

Bem definido o papel do colesterol como fator de risco, grandes avanços ocorreram na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos no processo aterosclerótico.

Os lipídios, por serem substâncias hidrófobas, necessitam de um sistema de transporte que lhes possibilite o deslocamento na corrente sanguínea. Compostos denominados lipoproteínas são os encarregados dessa tarefa.

As lipoproteínas são formadas por um núcleo contendo triglicerídeos e ésteres de colesterol envolto por uma superfície polar constituída por fosfolipídios, colesterol livre e por um componente protéico, denominado apolipoproteína ou apoproteína (apo).

Na **Figura 1**, vemos a ilustração da estrutura das lipoproteínas.

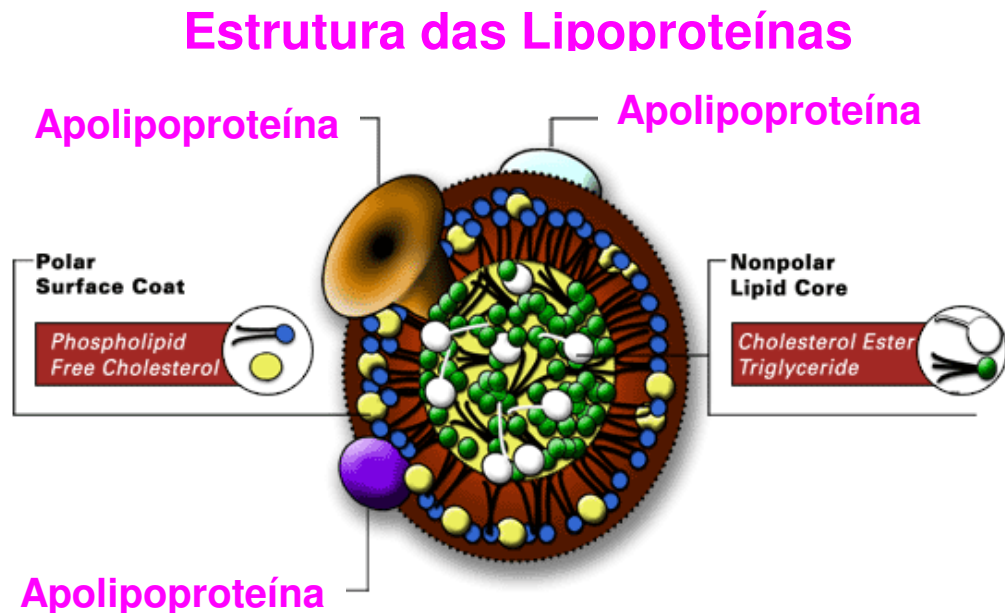


FIGURA 1 – Estrutura da lipoproteína (adaptado de LipoScience (31)).

As lipoproteínas plasmáticas apresentam diferentes densidades, de acordo com a quantidade de proteína que compõem os seus complexos. Através da ultracentrifugação, podem-se identificar cinco tipos principais de lipoproteínas plasmáticas: quilomícrons, VLDL, lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), LDL e HDL.

O metabolismo lipídico compreende um ciclo exógeno, com o transporte de lipídios da dieta pelos quilomícrons, um ciclo endógeno, com o transporte de lípidos de origem hepática através das VLDL e LDL e o transporte reverso do colesterol, desempenhado fundamentalmente pelas HDL (32).

O ciclo exógeno inicia-se pela absorção intestinal das gorduras ingeridas e sua transformação local em quilomícrons, os quais são levados para a corrente sanguínea através do ducto torácico. Nos capilares, os quilomícrons sofrem ação

de uma enzima, a lipase lipoproteica, que age especificamente sobre os TG, hidrolisando-os em ácidos graxos livres e glicerol. Essa ação reduz o conteúdo de TG dos quilomícrons, tornando-os partículas menores (remanescentes de quilomícrons). Os remanescentes de quilomícrons dispõem na sua estrutura de apoproteínas (apoB-48 e apo E), identificadas por receptores presentes nas células hepáticas. Assim os quilomícrons são retirados da circulação e seu catabolismo fornece às células colesterol, triglicerídeos e ácidos graxos provenientes do meio exterior.

O ciclo endógeno é representado pela síntese de gorduras e sua posterior incorporação a lipoproteínas, que ocorre sobretudo no fígado (70%), onde acontece a maior parte da síntese de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios.

A síntese de colesterol se inicia com a utilização de moléculas da acetilcoenzima A e três dessas dão origem à 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima (HMG-CoA). A HMG-CoA que, por sua vez, se transforma em ácido mevalônico por ação da enzima HMG-CoA redutase e, a partir dele, sucede uma cascata de reações que dá origem ao colesterol. A atividade desta enzima é importante na regulação da biossíntese do colesterol, pois o bloqueio de sua ação resulta em redução na síntese do esteróide.

A síntese dos triglicerídeos no fígado resulta da esterificação do glicerol pelos ácidos graxos de cadeia longa presentes nos hepatócitos. Os ácidos graxos derivam de três fontes: da síntese no próprio hepatócito, via metabolismo dos hidratos de carbono contidos na dieta; dos que circulam ligados à albumina (provenientes do tecido adiposo, após lipólise); dos derivados da hidrólise dos triglicerídeos presentes nos quilomícrons.

Os fosfolípidios compreendem extensa variedade de compostos: glicerofosfatos são os de estrutura mais simples, sintetizados a partir de ácidos graxos ou aldeídos, ácido fosfórico e uma base, em adição ao glicerol. Há compostos complexos que, além desses componentes, são formados também por aminoácidos complexos como a esfingosina (esfingomielina).

A síntese das lipoproteínas endógenas se inicia pela formação das VLDL, lipoproteínas que têm em sua estrutura apoproteínas B100 e E e transportam sobretudo TG produzidos no fígado (TG endógenos). As VLDL na circulação também sofrem ação da lipase lipoproteica e, como consequência, após diminuição do conteúdo de TG, se transformam em partículas mais densas, denominadas remanescentes de VLDL, também conhecidas como lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). As IDL, por possuírem as apoproteínas B-E, podem ser reconhecidas pelo fígado, sendo então removidas da circulação (60 a 70%). Os TG das IDL restantes sofrem ação de outra lipase particular existente na superfície dos hepatócitos (lipase hepática), o que as transforma em LDL, lipoproteínas com alta concentração de colesterol.

Os hepatócitos e células de outros tecidos são dotados de receptores específicos que têm afinidade de reconhecer e incorporar as LDL nas células. Isso ocorre particularmente pela presença da apoproteína B100 nesta lipoproteína. Após a incorporação das LDL, as gorduras se separam da parte proteica, por hidrólise lisossomal, com liberação intracelular do colesterol.

O aumento da concentração de colesterol livre dentro da célula após o catabolismo das LDL, ativa mecanismos importantes que objetivam:

a) Reduzir a síntese de colesterol intracelular, por inibição da HMG-CoA redutase;

b) Armazenar o excesso de colesterol sob a forma de ésteres, o que se faz através da atividade de uma enzima, a acil-colesterol-acil transferase (ACAT);

c) Diminuir a formação de receptores de LDL, evitando maior influxo de colesterol para o espaço intracelular, que é sensível a sobrecargas do esteróide.

Na fase do transporte metabólico reverso, o colesterol não utilizado pelas células periféricas necessita ser removido pois seu excesso nos tecidos é prejudicial. A sua remoção é feita pelas HDL, através de dois mecanismos:

a) Realizando o seu transporte para o fígado, onde será metabolizado;

b) Através da “proteína de transferência” (CETP), que o leva para outras lipoproteínas mais rapidamente removidas pelo próprio fígado.

Algumas partículas de HDL podem ser removidas via receptores, mas tal mecanismo é ainda discutível.

Uma vez no fígado, o colesterol pode participar de outras vias metabólicas ou ser excretado através da bile (única maneira que o organismo dispõe para eliminá-lo). A maior parte é reabsorvida no ciclo entero-hepático (33).

Alterações no metabolismo dos lipídios têm implicações diretas na fisiopatologia da doença aterosclerótica. O risco de eventos cardiovasculares aumenta progressivamente com o aumento dos níveis de LDL-C e está inversamente relacionado aos níveis de HDL-C.

Partículas de LDL pequenas e densas são particularmente aterogênicas, sendo que as partículas de LDL causam lesão no endotélio e no músculo liso subjacente, especialmente após sofrer oxidação, glicação (no Diabete Melito) ou incorporação a imunocomplexos. Sua migração através do endotélio e posterior internalização por macrófagos desencadeia uma cascata inflamatória responsável pela progressão da lesão aterosclerótica (34).

2.2 SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS

Sabe-se que o colesterol total plasmático não é o melhor indicador para avaliação do risco cardiovascular por representar a soma do colesterol constituinte das principais lipoproteínas, que têm diferentes associações com risco de DAC. O HDL-C apresenta associação negativa, relacionando-se à “proteção” e o VLDL-C e o LDL-C têm associações positivas.

Porém, cada uma dessas classes de lipoproteínas não são homogêneas, constituindo-se de subfrações que diferem entre si em tamanho, densidade, número, composição química e função, tendo também diferenças na associação com risco cardiovascular.

No estudo “The Air Force-Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study” (AFCAPS/TexCAPS), os níveis de LDL-C falharam em predizer o risco de doença cardiovascular e o número de partículas de LDL, avaliado pelo nível plasmático de apolipoproteína B, foi o preditor mais consistente e significativo para primeiros eventos coronarianos agudos em homens e mulheres adultos e idosos (35).

Outros estudos evidenciaram que o padrão de distribuição de subclasses de lipoproteínas relaciona-se com risco de DAC e de progressão de aterosclerose podendo fornecer informação adicional sobre nível de risco além dos tradicionais fatores de risco (36).

Através da associação dos níveis das diferentes subfrações medidas com os desfechos clínicos avaliados, foi possível descrever um perfil lipoprotéico aterogênico chamado padrão B.

O padrão B constitui-se de perfil lipídico com predomínio de LDLs pequenas e densas, estando relacionado com elevação de triglicerídeos, IDL e VLDL, diminuição nos níveis de HDL e aumento da lipemia pós-prandial, da suscetibilidade oxidativa e da resistência à insulina (37).

Já no padrão A ocorre o predomínio de LDLs grandes e flutuantes, menos aterogênicas e associadas com menor risco cardiovascular. Este padrão associa-se a níveis maiores de HDL-C menores de TG.

A primeira evidência prospectiva de que LDLs pequenas e densas estão associadas ao aumento do risco de desenvolver doença cardíaca isquêmica foi demonstrada pelos resultados do Quebec Cardiovascular Study (38). Outros estudos transversais também já haviam mostrado relação de partículas de LDLs pequenas e densas com risco aumentado de DAC (39-46).

As LDLs pequenas e densas são captadas em menor velocidade pelos receptores hepáticos de LDL e por isso permanecem mais tempo na circulação, além do que penetram mais rápido na parede arterial, possuem maior afinidade pelos proteoglicanos arteriais e são oxidadas mais rapidamente. Outros mecanismos propostos para explicar sua associação com risco aumentado de DAC incluem sua associação com outras lipoproteínas aterogênicas, incluindo aumento dos TG plasmáticos e VLDLs grandes (ricas em TG) e diminuição nos níveis de HDL-C. Este perfil lipoproteico aterogênico está associado à presença de resistência à insulina e síndrome metabólica (44, 47, 48).

Outras partículas também já foram relacionadas com risco de DAC, como aumento nos níveis de IDL e HDL pequenas (HDL_{3b} e _{3c}, medidas pela técnica de eletroforese) (49-51).

Há poucos estudos conduzidos em faixas etárias elevadas. Em idosos o tamanho da LDL poderia não ser preditor de risco talvez porque o padrão B parece estar relacionado com DAC prematura (52).

2.3 DETERMINAÇÃO DAS SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS

Para a determinação destas subclasses, os métodos tradicionais empregados na separação e quantificação incluem técnicas de eletroforese, cromatografia ou ultracentrifugação, técnicas estas demoradas e onerosas (53-55).

Atualmente dispõe-se de método validado, mais rápido, menos oneroso e com adequada precisão, que emprega espectroscopia por ressonância nuclear magnética de prótons (RNM) (50, 56-60).

A RNM espectroscópica por próton mede as concentrações das partículas de 10 subclasses de VLDL, LDL e HDL no plasma fresco ou congelado a -70°C ou em amostras de soro.

O método de RNM explora o fato de que cada partícula de subclasse de lipoproteína no plasma, possui um grupo metil que transmite um sinal próprio característico, associado ao tamanho da partícula. As amplitudes medidas desses sinais são diretamente proporcionais às concentrações das partículas de cada subclasse. Em adição aos níveis de subclasses, a RNM fornece também valores médios do diâmetro das partículas de VLDL, LDL e HDL.

Este método foi recentemente aperfeiçoado com o uso de um novo algoritmo computacional que possibilita a inclusão de um grande número de subpopulações de lipoproteínas (> 30) no modelo de análise espectral, dando

uma melhor representação do continuum de subespécies de partículas atualmente presentes no plasma.

Através de agrupamento adequado dos níveis das várias subpopulações, são obtidas concentrações de 10 subclasses de lipoproteínas (VLDL, LDL e HDL grandes, médias e pequenas, mais IDL).

Ao invés de reportar os níveis de subclasses em unidades de concentração de sua massa lipídica de colesterol ou TG, os resultados são fornecidos em unidades de concentração de partículas (em nanomoles de partículas por litro para VLDL e LDL e em micromoles por litro para o HDL) para melhor refletir o que a RNM está realmente medindo.

Os tamanhos médios das partículas de VLDL, LDL e HDL (em nanômetros) são computados como um somatório dos diâmetros das subpopulações individuais multiplicado pela percentagem de massa relativa conforme estimado pelas amplitudes dos sinais do grupo metil na RNM.

A **tabela 1** traz os diâmetros aproximados das partículas de VLDL, HDL, IDL e LDL..

TABELA 1 - Diâmetros das subclasses de lipoproteínas na RNM (31).

Subclasses de lipoproteínas	Diâmetro
VLDL	
VLDL grande	>60 nm
VLDL média	35-60 nm
VLDL pequena	27-35 nm
IDL	23-27 nm
LDL	
LDL grande	21.2-23 nm
LDL média-pequena	19.8-21.2 nm
LDL muito pequena	18-19.8 nm
HDL	

HDL grande	8.8-13 nm
HDL média	8.2-8.8 nm
HDL pequena	7.3-8.2 nm

2.4 APOLIPOPROTEÍNA “E”

A apolipoproteína E (apo E) foi descoberta nos anos 70 como uma apoproteína componente das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (61, 62).

Sua síntese e secreção ocorre em muitos tecidos, como fígado, cérebro, pele, macrófagos, baço, adrenais, rins, ovários, testículos, coração e pulmões. Seu maior sítio de síntese e secreção vem das células parenquimais do fígado, as quais secretam apo E em associação com partículas de VLDL (61, 63-65).

A apo E é uma glicoproteína de 299 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 34.000 daltons (61, 66).

O gene da apo E humana foi mapeado no cromossomo 19 e tem três alelos polimórficos: epsilon 2, epsilon 3 e epsilon 4 (€2, €3 e €4), que codificam três isoformas da apoproteína: €2, €3 e €4. Indivíduos herdam um alelo da apo E por meio de pareamento mendeliano simples com os genótipos resultantes. Esses três alelos são responsáveis por seis genótipos, denominados €2/2, €3/3, €4/4, €2/3, €3/4 e €2/4 conforme a nomenclatura atual, que diferem na seqüência de aminoácidos nas posições 112 e 158. Apo E3 possui cisteína no resíduo 112 e arginina no resíduo 158, enquanto apo E4 possui arginina e apo E2 cisteína em ambas posições (na **figura 2** pode-se ver os fenótipos homozigóticos da Apo E e seus resíduos de aminoácidos). Estes alelos codificam seis fenótipos: E2/2, E3/3, E4/4, E2/3, E2/4 e E3/4 (61, 65, 67, 68).

O fenótipo E3/3 é o mais comum, ocorrendo em 60% da população. Portanto, a apo E3 é considerada a forma original e as outras, suas variantes (61, 62, 69).

Em populações brancas adultas, a frequência estimada dos alelos E2, E3 e E4 são, respectivamente, 8%, 78% e 14% (65, 70).

Os valores de referência da apo E no soro ou plasma em adultos com alimentação normal podem variar de 1 mg/dl a 9 mg/dl (65).

Os alelos da apo E são importantes marcadores genéticos para dislipidemia e doença coronariana (70).

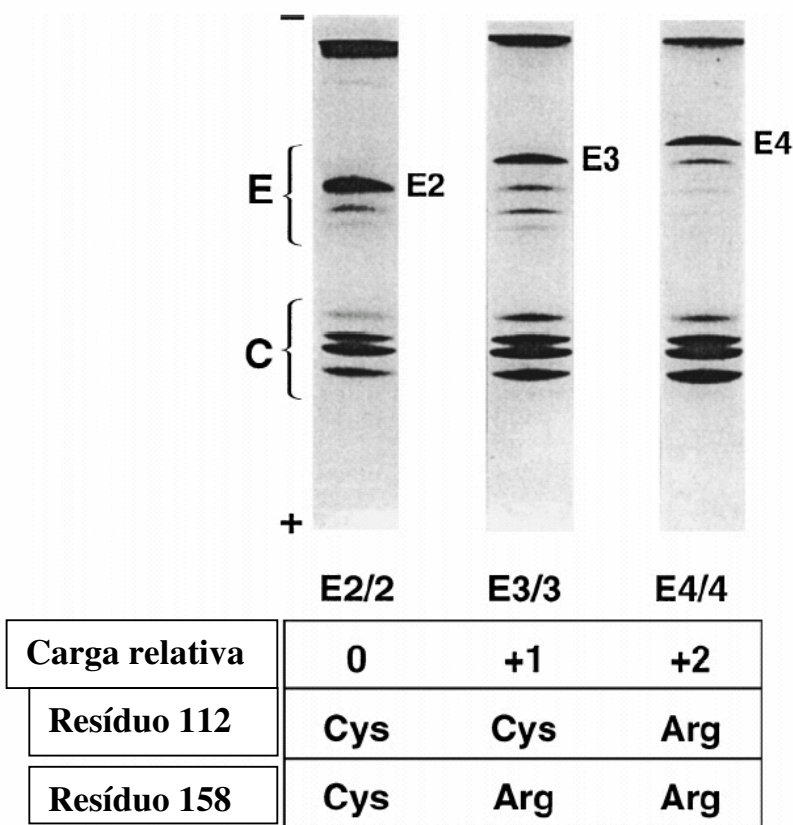


FIGURA 2 – Fenótipos homocigóticos da Apo E e seus resíduos de aminoácidos (Adaptado de Mahley, et al (61)).

Dados da literatura mostram uma contribuição de 4 até 15% do polimorfismo da apo E na variação dos níveis de colesterol na população em geral (61, 71, 72).

Vários mecanismos foram descritos sobre como as diferentes isoformas da apo E influenciam as concentrações plasmáticas de colesterol: influenciando a absorção de colesterol, a síntese endógena de colesterol, eliminação do colesterol através dos ácidos biliares, a remoção dos quilomicrons remanescentes, a conversão do IDL em LDL, a cinética do LDL, a depuração hepática das gorduras da dieta, através de propriedades imunorregulatórias, pela afinidade aos receptores de lipoproteínas e participando no transporte reverso do colesterol (65, 72, 73).

A apo E desempenha seu papel no transporte do colesterol fundamentalmente através de dois receptores de lipoproteínas, servindo como ligante: ao receptor de LDL (ou apo B/E) e ao receptor hepático de apo E ou receptor relacionado à proteína (LRP) (61, 65).

A afinidade pelo receptor depende do polimorfismo HhaI (exon 4) no gene apo E e é isoforma específica. In vitro apo E3 e apo E4 demonstraram afinidade similar pelo receptor de LDL, enquanto que apo E2 apresentava 2% ou menos de capacidade de ligação (61, 74).

Da mesma forma há evidência de que a distribuição das isoformas de apo E entre as partículas de lipoproteínas é isoforma específica, com apo E4 com maior associação com lipoproteínas ricas em triglicerídeos que apo E3 e apo E2 (61, 72).

A depuração dos remanescentes de quilomicrons ocorre de forma mais rápida nas isoformas apo E4 do que nas apo E3. Este fato, associado à

absorção elevada de colesterol nos indivíduos E4, aumenta o aporte intra-hepático de colesterol, diminuindo a síntese hepática de colesterol e a atividade do receptor de LDL, conseqüentemente elevando os níveis plasmáticos de LDL-C. A baixa afinidade da apo E2 pelo receptor de LDL leva ao aumento da atividade deste e aumento na depuração de LDL (72).

Os indivíduos portadores do alelo E4 apresentam níveis mais elevados de colesterol total, LDL-C e apolipoproteína B, enquanto que os portadores do alelo E3 apresentam níveis intermediários e os portadores do alelo E2 níveis menores. O alelo E2 foi relacionado também com aumento nos níveis séricos de triglicerídeos (61, 65, 70, 75, 76). Na **figura 3** podemos ver os efeitos dos diferentes alelos da Apo E nos parâmetros lipídicos.

Diversos estudos mostraram a associação do alelo E4 com risco aumentado de doença cardiovascular, especulando que a razão seja pela associação preferencial com as lipoproteínas ricas em triglicerídeos, embora o mecanismo não esteja totalmente elucidado (61, 62, 64, 70, 75-81).

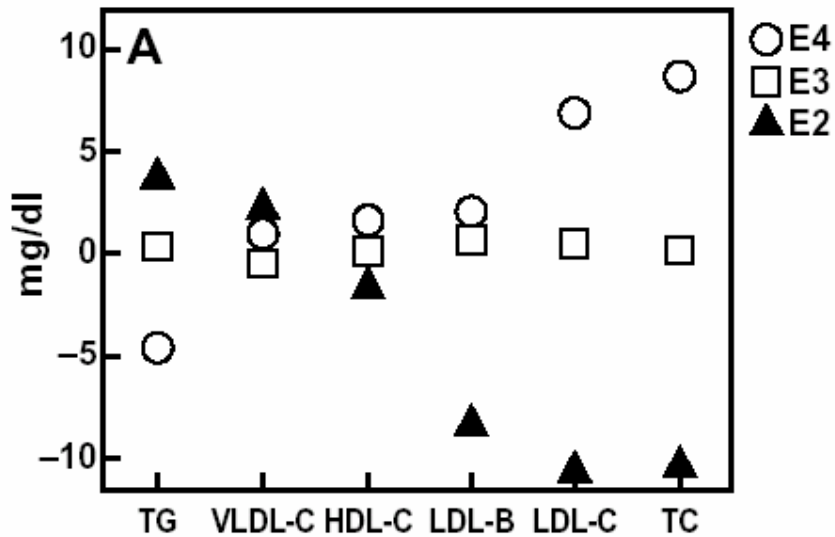


FIGURA 3 – Efeito dos alelos da apolipoproteína E nos parâmetros lipídicos - LDL-B:=LDL-apolipoproteína B (Adaptado de Mahley, et al (61)).

Em idosos há poucos estudos, sendo que o alelo E4 foi menos freqüente em populações de nonagenários e centenários, estando talvez relacionado com mortalidade precoce e o alelo E2 associado com longevidade (71, 82-86).

2.5 APOLIPOPROTEÍNA “E” E SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS

Existem poucos estudos e os dados na literatura são conflitantes sobre a influência do polimorfismo genético da apo E no perfil de distribuição de subfrações de lipoproteínas.

Alguns estudos revelaram associação entre o polimorfismo da apo E e o tamanho das partículas de lipoproteínas, estando o alelo E4 relacionado com partículas menores de HDL e o alelo E2 com partículas menores de LDL, sendo esta relação independente dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (87, 88). Outros estudos não encontraram associação, no entanto, a maioria foi realizado

em pacientes com dislipidemia familiar, já apresentando um perfil de partículas de LDLs pequenas e densas característico (89).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Correlacionar o polimorfismo da apolipoproteína E com o perfil de distribuição das subfrações de lipoproteínas.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Descrever as frequências genóticas da apolipoproteína E;

Descrever o perfil de distribuição das subfrações de lipoproteínas;

Avaliar a existência de associação entre o polimorfismo da apolipoproteína E e o perfil de distribuição das subfrações de LDL, HDL e VLDL;

4. HIPÓTESES

4.1 HIPÓTESE CONCEITUAL

Há associação entre o polimorfismo da apolipoproteína E e o perfil de distribuição das subfrações de lipoproteínas.

4.2 HIPÓTESE OPERACIONAL

Não há associação entre o polimorfismo da apolipoproteína E e o perfil de distribuição das subfrações de lipoproteínas.

5. POPULAÇÃO E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Estudo transversal, observacional, descritivo e analítico.

5.2 POPULAÇÃO DA PESQUISA E POPULAÇÃO EFETIVAMENTE PESQUISADA

A população estudada foi de idosos participantes do Projeto Gravataí, desenvolvido em parceria pelo Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e Prefeitura Municipal de Gravataí. O Projeto teve início em 1998 e participam pessoas a partir dos cinquenta anos de idade, de ambos os gêneros, cadastradas na secretaria de Cidadania e Ação Social deste município.

Dentre esta população, foram selecionados 35 portadores de dislipidemia, com indicação de tratamento com hipolipemiante oral para participarem deste estudo.

5.3 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS

Foram aplicados questionários estruturados com coleta de dados de identificação, investigação de presença de fatores de risco coronariano, medicações em uso (incluindo terapia de reposição hormonal e terapia hipolipemiante), história prévia e atual de tireoidopatia, doenças cardiovasculares, tabagismo, etilismo.

Foi realizada aferição das variáveis pressão arterial, peso e altura com cálculo do índice de massa corporal e medida da circunferência abdominal.

Foi realizada coleta sangüínea com medidas laboratoriais padrão de CT, HDL-C, TG, creatinina, TSH e glicemia de jejum; dosagem de subfrações de lipoproteínas e genotipagem da apolipoproteína E.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos indivíduos portadores de dislipidemia, com idade acima de 50 anos, de ambos os gêneros, excluindo-se os pacientes portadores de dislipidemia secundária, com relato de infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral recentes (menos de três meses), com doença hepática ativa e severa, doença renal severa, dependência alcoólica, doenças crônicas descompensadas como insuficiência cardíaca, diabete melito e hipertensão arterial sistêmica e com relato de terapia de reposição hormonal atual. Também foram excluídos os indivíduos que apresentaram níveis séricos de triglicerídeos acima de 400 mg/dL e em uso atual ou recente (últimos três meses) de hipolipemiante oral.

5.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A pressão arterial foi medida com os indivíduos sentados após, no mínimo, 5 minutos de repouso, com um esfigmomanômetro *Tycos* aneróide, previamente calibrado. Eram considerados hipertensos os que estivessem usando anti-hipertensivos, apresentassem níveis pressóricos médios acima de 140/90 mmHg em pelo menos duas medidas ou relatassem diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica dado por médico.

Eram considerados diabéticos os participantes que se identificassem como tal, estivessem utilizando medicação antidiabética ou tivessem concentração sérica elevada de glicose (acima de 126 mg/dL em jejum).

O índice de massa corporal (o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros) foi calculado pelo peso medido para o decigrama mais próximo (0,1 kg) e a altura medida para o centímetro mais próximo.

Para classificação através do índice de massa corporal (IMC) foram considerados obesos os indivíduos com $IMC > 30$ para ambos os gêneros.

Hábito de tabagismo, ingestão de bebidas alcoólicas e medicações em uso foram analisados por entrevista.

O tabagismo compreendia as seguintes classificações: fumante atual ou fumante no passado e não fumante.

A ingestão de bebidas alcoólicas foi classificada como rara se sua frequência fosse inferior a uma vez por semana e eventual ou freqüente se fosse, respectivamente, até 3 ou mais de 3 dias por semana. Qualquer quantidade de bebida alcoólica ingerida foi considerada para a classificação.

5.6 TÉCNICAS LABORATORIAIS

A genotipagem da apolipoproteína E foi realizada no laboratório do Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS e o perfil lipídico e outras dosagens bioquímicas foram dosados no laboratório do Hospital São Lucas da PUCRS. Foram coletadas amostras separadas para dosagem das subfrações de lipoproteínas. Após a coleta do sangue, este era centrifugado por 15 minutos a 1.600 G e separavam-se alíquotas de soro com “back-up” que eram congeladas em *freezer* especial a temperatura de -80°C em biotubos de 1 ml para posterior realização das análises de subfrações no Laboratório LipoScience Inc. em Raleigh, Carolina do Norte, Estados Unidos.

5.6.1 Determinações Bioquímicas

As medidas laboratoriais incluíram a determinação plasmática por reação enzimática colorimétrica de CT, TG, glicose e creatinina. O CT foi medido através de método enzimático utilizando a colesterol esterase e a colesterol oxidase. A absorbância do complexo formado é medida em 505 nm (reação de ponto final). O coeficiente de variação é 1,6%. Os TG foram medidos através do método GPO (Glicerol-3-Fosfato-Oxidase) O método é enzimático e utiliza a glicerol kinase. A absorbância do complexo formado é medida em 505 nm (reação de ponto final). O coeficiente de variação é 1,62%. O HDL-C foi medido através do método por imunoinibição, com coeficiente de variação de 4,3%. O LDL-C foi calculado através da fórmula de Friedewald (90). O CT, TG e HDL-C

foram dosados em equipamento da Bayer, ADVIA 1650, pertencente ao laboratório do Hospital São Lucas da PUCRS.

5.6.2 Dosagem das Subfrações das Lipoproteínas

A análise de subclasses de lipoproteínas foi realizada por espectroscopia, em de um analisador de RNM, que quantifica as diferentes subclasses de lipoproteínas. Essa técnica explora diferenças naturais de espectros de RNM de prótons exibidas por partículas de lipoproteínas de diferentes tamanhos, conforme descrito anteriormente, sem requerer reagentes e utilizando mínima manipulação. A quantificação é obtida em um processo de três etapas constituídas por medida do espectro lipídico de RNM do plasma, seguida por desdobramento e cálculo realizados por computador utilizando um *software* especial. Todo o processo leva cerca de um minuto, tendo demonstrado excelente acurácia e precisão em testes de validação (50, 56-60).

As dosagens foram realizadas pela LipoScience Inc., Raleigh, Carolina do Norte, Estados Unidos da América, utilizando o protocolo NMR LipoProfile – II Subclass Particle Analysis com espectrômetro Bruker WM 250. (31).

5.6.3 Dosagem da apolipoproteína E (Apo E):

As amostras sanguíneas foram obtidas de veia periférica e colocadas em tubos contendo EDTA 0,1%, mantidas a 4°C até a extração do DNA.

Extração do DNA: a técnica utilizada pelo laboratório do Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS é a descrita por Debomoy (91) e compreende as seguintes etapas:

- 1) Centrifugação das amostras a 5000 rpm por 5 minutos,
- 2) Retirada da camada de leucócitos com transferência para tubos de 1,5 ml, com lavagem com PBS (tampão fosfato-salino, pH 7,5).
- 3) Extração do DNA dos leucócitos (em 200 µl PBS) com adição de 100 µl de tampão de lise (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 0,5% SDS, 200 µg/ml proteinase K), SDS a 2,5%, 25 mM de EDTA pH 8,0, seguido de incubação a 55°C por 3 horas.
- 4) Após a incubação, o DNA da amostra é extraído a partir de duas lavagens com solução de fenol.
- 5) O DNA presente na porção aquosa é precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio e 0,7 volume de isopropanol e incubado a -20°C.
- 6) O DNA pode ser observado como um sedimento gelatinoso e translúcido, sendo dissolvido em 50 µl de água Mili-Q e mantido a -20°C para posterior uso na Polymerase Chain Reaction (PCR).

Reação de amplificação do gene: a PCR seguiu o método descrito por James et al (92), utilizando os primers apo EF 5'- TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3' (25-mer) e apo ER 5'- ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3' (26-mer). A mistura da reação (50 µl total) foi preparada com 10 pmol de cada primer, 100 µM de dNTPs, 1 U de Taq Polimerase (CenBiot-RS), tampão

contendo 1,5 mM de $MgCl_2$, DMSO 1% e 2 μl do DNA da amostra. A amplificação ocorreu com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 1 minuto, extensão a 70°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (2%) com brometo de etídio, com presença de fragmento de DNA sob luz ultravioleta.

Genotipagem da apo E pela técnica do Randon Fragment Lengh Polymorphism (RFLP): a genotipagem foi realizada pela digestão do produto da PCR (20 μl) com 5 U da enzima de restrição Hha I (Gibco) em tampão específico. A digestão foi incubada a 37°C, por três horas e, a seguir, analisada em gel de poliacrilamida (15%), utilizando-se um marcador de peso molecular de 10 pb ladder. As bandas características de cada alelo são então analisadas e identificadas.

5.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo faz parte da linha de pesquisa sobre doenças crônico-degenerativas desenvolvida pelo IGG-PUCRS dentro do Projeto Gravataí, com apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, seguindo as recomendações da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O nível de significância para todos os testes foi menor ou igual a 0,05.

Para a análise dos genótipos de apo E foram agrupados os genótipos E3E3 e E3E3 (grupo E3) e os genótipos E3E4 e E4E4 (grupo E4). Não houve a presença dos genótipos E2E4 e E2E2 na população estudada.

Foram utilizados os testes do qui-quadrado e de Kolmogorov-Smirnov para análise das diversas variáveis.

Para a análise das variáveis com distribuição paramétrica foi utilizado o teste t de Student e para a análise não-paramétrica foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Foram utilizados os programas estatísticos StatView – SAS – Versão 5.0.1 e SPSS versão 11.0.1 para análise dos dados.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASAIS

Os participantes do estudo apresentavam idades entre 50 e 79 anos de idade, com idade média de 68,02 anos.

Dentre os 35 indivíduos avaliados, 25 eram mulheres e 10 homens.

Dentre a amostra, seis indivíduos apresentavam diabetes compensado, 21 foram considerados hipertensos controlados e nove apresentavam história prévia de doença arterial coronariana. Foram encontrados 12 indivíduos obesos. Na amostra avaliada existiam oito ex-fumantes e nenhum fumante atual. Nenhum indivíduo pesquisado apresentava relato de alcoolismo.

6.2 ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA APOLIPOPROTEÍNA “E”

Dos seis genótipos possíveis da apolipoproteína E, somente quatro foram observados nesta população: $\epsilon 3/3$, $\epsilon 4/4$, $\epsilon 3/4$, $\epsilon 2/3$.

As frequências alélicas e genotípicas podem ser vistas na **tabela 2** abaixo. O genótipo mais frequente foi o $\epsilon 3\epsilon 3$, seguido pelo $\epsilon 3\epsilon 4$ em segundo lugar e $\epsilon 2\epsilon 3$ e $\epsilon 4\epsilon 4$ em menor frequência.

TABELA 2 – Frequências alélicas e genóticas da população estudada.

Genótipos	Frequências	N
€2€2	0	0
€2€3	8,6%	3
€2€4	0	0
€3€3	65,7%	23
€3€4	20%	7
€4€4	5,7%	2
Alelos	Frequências relativas	
€2	0,04	
€3	0,80	
€4	0,16	

6.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E GENÓTIPOS DA APOLIPOPROTEÍNA “E”

A **tabela 3** apresenta a correlação entre as características clínicas dos indivíduos pesquisados e os diferentes genótipos da apolipoproteína E.

TABELA 3 – Características clínicas e genótipos da apo E.

Total n (%)	Total (n= 35)	€3€3 (n= 23)	€2€3 (n= 3)	€3€4 (n= 7)	€4€4 (n= 2)
Idade Média (anos)	68,02	68,69	60	69	69
Homens	10	8	0	2	0
Mulheres	25	15	3	5	2
Obesos (IMC >30)	12(34,3%)	9 (39,1%)	1 (33,3%)	2 (28,6%)	0
Hipertensos	21 (60%)	16 (69,6%)	2 (66,7%)	2 (28,6%)	1 (50%)
Diabéticos	6 (17,1%)	5 (21,7%)	1 (33,3%)	0	0
História Prévia DAC	9 (25,7%)	7 (30,4%)	2 (66,7%)	0	0
Circunferência abdom.média (cm)		103,7	98,0	103,4	94,5
Ex-fumantes					
	8 (22,9%)	4 (17,4%)	1 (33,3%)	2 (28,6%)	1 (50%)

6.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E GRUPOS DA APOLIPOPROTEÍNA “E”

Agrupando os genótipos encontrados em dois grupos distintos, grupo 3 (abrangendo os genótipos E3E3 e E2E3) e grupo 4 (abrangendo os genótipos E3E4 e E4E4), comparamos as características clínicas de cada grupo conforme descrito na **tabela 4**.

TABELA 4 – Características clínicas e grupos da apo E.

	Total (n=35)	Grupo E 3 (n=26)	Grupo E 4 (n=9)
Idade Média (anos) (± DP)	68,0	67,7 (± 1,6)	69,0 (± 1,8)
Homens – n (%)	10 (28,6%)	8 (30,8%)	2 (22,2%)
Mulheres – n (%)	25 (71,4%)	18 (69,2%)	7 (77,8%)
Obesos (IMC>30) – n (%)	12 (34,3%)	10 (38,5%)	2 (22,2%)
IMC médio (± DP)	29,1 (± 5,6)	29,8 (± 6,1)	27,1 (± 3,4)
Hipertensos – n (%)	21 (60%)	18 (69,2%)	3 (33,3%)
Diabéticos – n (%)	6 (17,1%)	6 (23,1%)	0
História prévia DAC – n (%)	9 (25,7%)	9 (34,6%)	0
Circ.Abd. média homens (cm)	104,1	103,7	105,5
Circ. Abd. média mulheres (cm)	102	102,7	100
Ex-fumantes – n (%)	8 (22,9%)	5 (19,2%)	3 (33,3%)

6.5 PERFIL LIPÍDICO BASAL E GRUPOS DE APOLIPOPROTEÍNA “E”

Os níveis médios de colesterol total, TG, HDL-C e LDL-C para os indivíduos estudados, separados conforme o grupo de apolipoproteína E, encontram-se na **tabela 5**.

TABELA 5 – Perfil lipídico e grupos da apo E.

Perfil lipídico (mg/dL)	Total N=35	E3 N=26	E4 N=9	p*
CT (média ± DP)	246 ± 45	248 ± 52	241 ± 15	0,41
HDL-C (média ± DP)	52 ± 14	52 ± 15	52 ± 14	0,92
LDL-C (média ± DP)	163 ± 43	166 ± 49	154 ± 16	0,48
TG (média ± DP)	152 ± 60	145 ± 51	172 ± 79	0,25

DP = Desvio Padrão * Teste t de Student

6.6 DISTRIBUIÇÃO DAS SUBFRAÇÕES CONFORME OS GRUPOS DE APOLIPOPROTEÍNA “E”

Nas tabelas 6, 7 e 8 temos a distribuição das subfrações conforme os grupos da apolipoproteína E.

TABELA 6 – Tamanho das partículas de acordo com os grupos da apo E

Tamanho da partícula (nm)	E3 (n=26) Média ± DP	E4 (n=9) Média ± DP	p*
VLDL	50,7 ± 7,9	48,9 ± 7,0	0,55
LDL	20,9 ± 0,6	21,2 ± 0,9	0,27
HDL	8,8 ± 0,4	9,0 ± 0,3	0,13

DP = Desvio Padrão *Teste t de Student

TABELA 7 –Número de partículas de acordo com os grupos da apo E

Número de partículas (nmol/L)	E3 (n=26) Média ± DP	E4 (n=9) Média ± DP	p*
VLDL	109,5 ± 33,3	98,6 ± 21,3	0,36
LDL	1744,4 ± 472,8	1501,5 ± 361,3	0,17
HDL	31,4 ± 4,6	30,1 ± 5,9	0,50

DP = Desvio Padrão *Teste t de Student

TABELA 8 –Distribuição das subfrações de acordo com os grupos da apo E

Partículas	E3 (n=26) Média ± DP	E4 (n=9) Média ± DP	p*
VLDL grande	5,0 ± 3,3	4,9 ± 6,9	0,95
VLDL média	37,0 ± 15,4	31,5 ± 15,3	0,35
VLDL pequena	67,4 ± 22,5	62,1 ± 16,3	0,52
IDL	76,4 ± 60,8	62,0 ± 39,4	0,51
LDL grande	596,9 ± 198,4	649,3 ± 271,5	0,53
LDL pequena	1071,0 ± 522,1	790,1 ± 540,3	0,17
LDL média-pequena	213,0 ± 100,4	161,5 ± 103,5	0,19
LDL muito pequena	857,9 ± 422,5	628,6 ± 437,7	0,17
HDL grande	5,9 ± 3,4	6,5 ± 2,7	0,65
HDL média	2,9 ± 2,7	1,8 ± 1,6	0,27
HDL pequena	22,6 ± 3,2	21,8 ± 4,4	0,55

DP = Desvio Padrão *Teste t de Student

7. DISCUSSÃO

7.1 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA APOLIPOPROTEÍNA "E"

As frequências genotípicas encontradas são semelhantes ao padrão encontrado para a população adulta caucasiana em geral, com predomínio do genótipo $\epsilon\epsilon$.

A população estudada reside no município de Gravataí-Rio Grande do Sul fundado principalmente por europeus de origem portuguesa e mesclado a indígenas (em sua maioria tupis-guaranis), com alta taxa de migração, tendo sido escolhido para implementação do Projeto Gravataí por ser considerado representativo da composição étnica mista da população gaúcha.

Vários estudos mostram que a influência dos alelos da apolipoproteína E varia conforme a composição étnica e região geográfica da população avaliada (61).

Ainda não há dados disponíveis de grandes estudos sobre as frequências da apolipoproteína E na população brasileira que possibilitem comparação e sendo a população brasileira tão heterogênea, poderia o Rio Grande do Sul não ser representativo de todas as regiões.

7.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E GRUPOS DA APOLIPOPROTEÍNA "E"

Avaliando-se as características clínicas basais, percebe-se que o grupo $\epsilon\epsilon$ (que compreende os indivíduos com genótipos $\epsilon\epsilon$ e $\epsilon\epsilon$) apresentou uma prevalência maior de obesidade, um predomínio de indivíduos do gênero feminino e número mais elevado de fatores de risco, com maior número de

hipertensos e diabéticos e maior número de indivíduos com história prévia de DAC. Já os indivíduos do grupo E4 (que compreende os genótipos E3E4 e E4E4) não apresentaram diagnóstico de diabetes melito, nem história prévia de DAC e apresentaram índice de massa corporal médio menor em comparação com os indivíduos do grupo E3.

7.3 MÉDIA DO COLESTEROL TOTAL, PERFIL LIPÍDICO E GRUPOS DE APOLIPOPROTEÍNA “E”

Sendo a amostra constituída de indivíduos portadores de dislipidemia, a média do colesterol total foi 246 mg/dL, sendo que 89% dos indivíduos apresentaram nível de colesterol total acima de 200mg/dL (n=31).

A média nacional em estudo de 2003 (5) encontrou 199mg/dl para o colesterol total em indivíduos da população em geral.

Comparando-se as médias do perfil lipídico (CT, HDL-C, TG e LDL-C) conforme o grupo da apolipoproteína E, ao contrário dos achados da literatura, o grupo E4 apresenta níveis mais baixos de colesterol total e LDL-C em média que os indivíduos do grupo E3.

Estes achados podem ter sofrido influência das características clínicas basais dos indivíduos do grupo E3, com perfil de risco mais elevado para DAC.

Estes indivíduos do grupo E3 eram portadores de dislipidemia com indicação de tratamento medicamentoso com estatina, configurando um grupo particular de indivíduos sob risco mais elevado.

Não foi avaliada a dieta dos indivíduos estudados, o que pode ter influenciado o nível sérico basal dos lipídios. O estudo “The Cardiovascular Risk in Young Finns Study” mostrou que o efeito dos alelos da apolipoproteína E nos níveis de CT, LDLc, HDLc e TG foi influenciado pela dieta (73).

7.4 LIMITANTES NA RELAÇÃO DO POLIMORFISMO DA APO E COM O PROCESSO DE ATEROSCLEROSE

- a) Diferença na frequência dos genótipos da apo E conforme os diferentes grupos étnicos;
- b) Evidências sobre interação entre genes, sugerindo que haja efeito sinérgico entre o alelo da apo E e outros genes como do angiotensinogênio, da enzima de conversão da angiotensina, do receptor AT1 da angiotensina e das apolipoproteínas A1 e B. Além dos genes envolvidos no processo aterosclerótico, também há os envolvidos no processo da trombogênese, como os polimorfismos da protrombina, da glicoproteína IIb/IIIa e fibrinogênio, entre outros;
- c) O estilo de vida com hábitos como tabagismo, consumo alcoólico e tipo de dieta devem influenciar os efeitos da apo E;
- d) Uso de certas drogas sabidamente afetam a expressão genotípica da apo E. Por exemplo, os pacientes com infecção pelo HIV frequentemente apresentam dislipidemia tipo III, porém não necessariamente relacionada à isoforma E2E2 e sim à interferência dos inibidores da protease, usados no tratamento destes pacientes, no receptor de lipoproteína relacionado;
- e) A presença de fatores de risco cardiovasculares e certas condições clínicas também influenciam a expressão da apo E. Uma das evidências mais marcadas ocorre nos pacientes submetidos à transplante hepático que podem mudar seu genótipo de apo E.

7.5 PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DAS SUBFRAÇÕES DE LIPOPROTEÍNAS

Dos seis diabéticos, apenas dois apresentaram um padrão de distribuição de subclasses com predomínio de LDL pequenas e densas e dos nove indivíduos com história prévia de DAC, apenas cinco também apresentaram concomitantemente o mesmo padrão.

O fato da amostra ser composta predominantemente por mulheres pode ter afetado o perfil de distribuição das subfrações pois estudos demonstraram que as mulheres possuem um tamanho maior e menos aterogênico de partícula de LDL comparado com os homens (88). Dos 10 indivíduos do gênero masculino avaliados, seis apresentaram um perfil de LDL pequena; lembrando que apenas dois indivíduos dentre os 10 do gênero masculino pertenciam ao grupo E4.

7.6 POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA “E” E PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DE SUBFRAÇÕES

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de apolipoproteína E e o perfil de distribuição das subfrações de lipoproteínas.

Este resultado deve ser discutido à luz de algumas características inerentes à amostra avaliada:

- amostra composta predominantemente por mulheres; os dados da literatura ainda são controversos sobre a diferença do efeito do polimorfismo da

apo E conforme o gênero. Na maioria dos estudos realizados o alelo E4 foi um forte preditor de risco para eventos coronarianos em homens, mas não em mulheres. Também em alguns estudos não foram observados efeitos significativos do polimorfismo da apo E nos níveis séricos de lipídios em mulheres saudáveis;

- na amostra estudada há o predomínio absoluto de idosos e encontra-se na literatura relatos de menor prevalência do alelo E4 em idades avançadas (apesar de numa população de dislipidêmicos termos a tendência a superestimar o alelo E4); Estes achados sugerem que na idade avançada outros fatores de risco para DAC que não o polimorfismo da apo E devem desempenhar papel primordial no processo aterosclerótico.

- não dispomos da descrição da dieta em uso e vários estudos demonstraram efeitos da dieta no perfil de distribuição de subfrações de lipoproteínas;

- o grupo E4, que geralmente estaria associado com um pior perfil lipídico e risco maior para o desenvolvimento de DAC, apresentou características clínicas basais diversas do grupo E3, com menor prevalência de fatores de risco, obesidade e indivíduos do gênero masculino.

Foram realizadas análises em separado excluindo-se os indivíduos diabéticos primeiramente e após refeita a análise excetuando-se os indivíduos com história prévia de DAC. Mesmo sem a presença dos indivíduos de risco cardiovascular mais elevado, não foi encontrada associação entre os diferentes grupos de apo E e o perfil de distribuição das subfrações de lipoproteínas.

Também foi avaliada a presença do padrão B, caracterizada por LDL's pequenas, conforme as variáveis em estudo e os diferentes grupos de apo E,

sem ter sido encontrada associação. O ponto de corte estabelecido para a análise foi 20,5 nm para o tamanho médio da LDL.

Apesar da não existência de associação neste estudo, outros estudos também não encontraram correlação entre as isoformas da apo E e os níveis de subfrações de lipoproteínas (89, 93).

7.7 LIMITAÇÕES

Este estudo apresenta algumas limitações que podem prejudicar a generalização de seus resultados para outras populações, dentre as quais:

- tamanho pequeno da amostra com poder do estudo também pequeno, podendo não ter sido encontrada associação por erro beta;

- indivíduos portadores de dislipidemia, levando a uma superestimativa do alelo $\epsilon 4$;

- não apresenta todos os genótipos possíveis da apolipoproteína E, com presença inexpressiva do alelo $\epsilon 2$.

7.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ideal seria a realização de estudos envolvendo vários centros de pesquisa, possibilitando englobar várias regiões do Brasil, evitando estudos com número muito reduzido de participantes e análise de populações isoladas em que pode não se encontrar equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estudos multicêntricos permitiriam também a análise de um espectro maior dos polimorfismos em vez de polimorfismos isolados. A genotipagem da apo E necessita tornar-se mais

rápida, barata e com maior facilidade técnica para possibilitar seu emprego em maior escala nas pesquisas.

Talvez no futuro a principal aplicação da genotipagem da apo E não seja para avaliação de risco cardiovascular mas sim para avaliação de resposta a tratamentos específicos, como a resposta ao tratamento com estatinas como as novas evidências vêm demonstrando.

Da mesma forma a análise de subfrações de lipoproteínas encontra seu papel em nível de pesquisa.. Apesar da melhora na metodologia com a RNM diminuindo custos, tempo e incrementando a análise das partículas sua determinação ainda não é empregada na prática clínica diária. A grande relevância clínica encontra-se na possibilidade de identificar indivíduos em risco que apresentam um perfil basal de lipídios dentro dos valores considerados normais.

O fato do processo aterosclerótico ser multifatorial e dinâmico nos estimula a continuar pesquisando os mecanismos envolvidos para tentar entender sua complexidade e as respostas individuais observadas na nossa prática clínica diária.

8. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem que se estabeleçam as conclusões abaixo:

Houve o predomínio do genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$, conforme encontrado na literatura para a população adulta caucasiana em geral.

Não houve associação entre o polimorfismo da apolipoproteína E e o perfil de distribuição das subfrações de lipoproteínas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gus I, Fischmann A, Medina C. Prevalência dos Fatores de Risco da Doença Arterial Coronariana no Estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2002;478-483.
2. DataSUS. Ministério da Saúde, Informações de Saúde. In; 26 jul 2004; Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2003/c04.def>.
3. Mansur AdP. Análise do Componente Genético da Doença Coronariana. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2000;74(6):531-533.
4. Yusuf S, Ôurpuu S, Hawkerr S, Dans T, Avezum A, Lanas F. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries "The Interheart Study": case-control study. *Lancet* 2004;364:937-952.
5. Martinez TLR, Santos RD, Armaganijan D, Torres KP, Loures-Vale A, Magalhães EM, et al. Campanha Nacional de Alerta Sobre o Colesterol Elevado. Determinação do Nível de Colesterol de 81.262 Brasileiros. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2003;80(6):631-634.
6. Wong ND, Wilson PWF, Kannel WB. Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine* 1991;115:687-693.
7. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willet WC, Krauss RM. Low-Density Lipoprotein Subclass Patterns and Risk of Myocardial Infarction. *JAMA* 1988;260(13):1917-1921.
8. Austin MA, Mykkänen L, Kuusisto J, Edwards KL, Nelson C, Haffner SM, et al. Prospective Study of Small LDLs as a Risk Factor for Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus in Elderly Men and Women. *Circulation* 1995;92(7):1770-1778.
9. Johansson J, Walldius G, Carlson LA. Close correlation between high-density lipoprotein and triglycerides in normotriglyceridaemia. *Journal of Internal Medicine* 1992;232:43-51.
10. Johnson JL, Slentz CA, Duscha BD, Samsa GP, McCartney JS, Houmard JA, et al. Gender and racial differences in lipoprotein subclass distributions: the STRRIDE study. *Atherosclerosis* 2004;176:371-377.
11. Tulenko TN, Sumner AE. The physiology of lipoproteins. *Journal of Nucl Cardiology* 2002;9(6):638-649.
12. Rainwater DL, Martin LJ, Comuzzie AG. Genetic Control of Coordinated Changes in HDL and LDL Size Phenotypes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001;21:1829-1833.
13. Gibbons GH, Liew CC, Goodarzi MO, Rotter JI, Hsueh WA, Siragy HM, et al. Genetic Markers. *Circulation* 2004;109(suppl IV):47-58.
14. Breslow JL. Genetics of Lipoprotein Abnormalities Associated with Coronary Heart Disease Susceptibility. *Annual Rev. Genet.* 2000;34:233-254.
15. Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E, Fischer RM, Olivecrona G, Hamsten A, Karpe F. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. *Atherosclerosis* 2003;167:311-317.

16. Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease and death. The Framingham study. *Archives of Internal Medicine* 1981;141(9):1128-1131.
17. Kannel WB. The Framingham Study: It's 50 years legacy and future promise. *Journal of Atherosclerosis, Thrombosis* 2000;6:60-66.
18. LRC-CPPT. Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. Results I: Relation in incidence of coronary heart disease. Results II: The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease x cholesterol lowering. *JAMA* 1984;251:351-374.
19. Frick MH, Ello O, Haapa K. Helsinki Heart Study: primary prevention trial with genfibrozil in middle-aged men with dislipidemia. *New England Journal of Medicine* 1987;317:1237-1245.
20. Group TMRFITR. Mortality rates after 10,5 years for participants in the MRFIT. Findings related to a priori hypothesis of the trial. *JAMA* 1990;263:1795-1801.
21. Menotti A, Lanti M, Puudu PE, Kromhout D. Coronary heart disease incidence in northern and southern European populations: a reanalysis of the seven countries study for a European coronary risk chart. *Heart* 2000;84:238-244.
22. Muldoon MF, Maninck SB, Mattens KA. Lowering cholesterol concentrations and mortality: a quantitative review of primary prevention trials. *British Medical Journal* 1990;301:309-314.
23. Rossomv J, Lewis B, Rifkind BM. The value of lowering cholesterol after myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 1990;323:1112-1119.
24. Crigui MH. Cholesterol primary and secondary prevention and all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine* 1991;115:973-976.
25. Holme I. Relation of coronary heart disease incidence and total mortality to plasma reduction in randomised trials: use of meta-analysis. *Br Heart Journal* 1993;69:542-547.
26. Holme I. Cholesterol reduction and its impact on coronary artery disease and total mortality. *American Journal of Cardiology* 1995;76:10c-17c.
27. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized Trial of Cholesterol Lowering in 4.444 Patients with Coronary Heart Disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389.
28. Sacks FM, Pfeffer MA, Move LA. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels: The Cholesterol And Recurrent Events Trial (CARE). *New England Journal of Medicine* 1996;335:1001-1009.
29. Hunt D, Young P, Simes J, Hague W, Mann S, Owensby D. Benefits of pravastatin on cardiovascular events and mortality in older patients with coronary heart disease are equal to or exceed those seen in younger patients: results from the LIPID Trial. *Annals of Internal Medicine* 2001;134:931-940.
30. Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen ELEM, Buckley BM, Cobbe SM. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *The Lancet* 2002;360:1623-1630.
31. LipoScience. NMR LipoProfile - II Subclass Particle Analysis - Technical Bulletin. In; 17 jan 2005; Disponível em: http://www.lipoprofile.com/print_control.cfm?id=174.
32. Moriguchi EH. Metabolismo das Lipoproteínas. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* 2001:12-18.
33. Giannini SD. *Aterosclerose e Dislipidemias*. Primeira ed. Sao Paulo: B G Cultural; 1998.

34. Pimentel M, Biolo A, Clausell N. Dislipidemias. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul* 2001;5:11.
35. Gotto AM, Whitney E, Stein EA, Shapiro DR, Clearfield M, Weis S, et al. Relation Between Baseline and On-Treatment Lipid Parameters and First Acute Major Coronary Events in the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Circulation* 2000;101(5):477-.
36. Robenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of Lipoprotein Subclass Levels and Low-Density Lipoprotein Size to Progression of Coronary Artery Disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) Trial. *American Journal of Cardiology* 2002;90:89-94.
37. Superko HR. What can we learn about dense low density lipoprotein and lipoprotein particles from clinical trials? *Current Opinion in Lipidology* 1996;7:363-368.
38. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais G, Lupien PJ, et al. Small, Dense Low-Density Lipoprotein Particles as a Predictor of the Risk of Ischemic Heart Disease in Men: Prospective Results From the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997;95(1):69-75.
39. Williams PT, Superko HR, Haskell WL, Alderman EL, Blanche PJ, Holl LG, et al. Smallest LDL Particles Are Most Strongly Related to Coronary Disease Progression in Men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003;23:314-321.
40. Blake GJ, Otvos JD, Rifai N, Ridker PM. Low-Density Particle Concentration and Size as Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as Predictors of Cardiovascular Disease in Women. *Circulation* 2002;106:1930-1937.
41. Koba S, Hirano T, Yoshino G, Sakai K, Sakaue T, Adachi M, et al. Remarkably high prevalence of small dense low-density lipoprotein in Japanese men with coronary artery disease, irrespective of the presence of diabetes. *Atherosclerosis* 2002;160:249-256.
42. Coresh J, Kwiterovich PO, Smith HH, Bachorik PS. Association of plasma triglyceride concentration and LDL particle diameter, density, and chemical composition with premature coronary artery disease in men and women. *Journal of Lipid Research* 1993;34:1687-1697.
43. Crouse JR, Parks JS, Schey HM, Kahl FR. Studies of low density lipoprotein molecular weight in human beings with coronary artery disease. *Journal of Lipid Research* 1985;26:566-574.
44. Krauss RM. Dietary and Genetic Effects on Low-Density Lipoprotein Heterogeneity. *Annual Rev. Nutr.* 2001;21:283-295.
45. Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer J-C, Aubin F, Rattier S, Foucher C, et al. Relationships Between Low-Density Lipoprotein Particle Size, Plasma Lipoproteins, and Progression of Coronary Artery Disease. *Circulation* 2003;107:1733-1737.
46. Mack WJ, Krauss RM, Hodis HN. Lipoprotein Subclasses in the Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1996;16:697-704.
47. Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD. Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance. *Current Opinion in Lipidology* 1994;5:395-403.
48. Vieira JLdC. Influências da terapia de reposição hormonal no perfil de lipoproteínas e suas subfrações em mulheres na pós-menopausa [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Fundação Universitária de Cardiologia; 1999.
49. Buring JE, O'Connor GT, Goldhaber SZ, Rosner B, Herbert PN, Blum CB, et al. Decreased HDL2 and HDL3 Cholesterol, Apo A-I and Apo A-II, and Increased Risk of Myocardial Infarction. *Circulation* 1992;85:22-29.

50. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Barboriak JJ, Anderson AJ, Walker JA. Relation of Lipoprotein Subclasses as Measured by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1998;1998(18):1046-1053.
51. Krauss RM, Williams PT, Brensike J, Detre KM, Lindgren FT, Kelsey SF, et al. Intermediate-Density Lipoproteins and Progression of Coronary Artery Disease in Hypercholesterolaemic Men. *The Lancet* 1987(July, 11):62-66.
52. Mykkänen L, Kuusisto J, Haffner SM, Laakso M, Austin MA. LDL Size and Risk of Coronary Heart Disease in Elderly Men and Women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999;19:2742-2748.
53. Zhao S-P, Bastiaanse EML, Hau M-F, Smelt AHM, Leuven JAG, Van der Laarse A, et al. Separation of VLDL subfractions by density gradient ultracentrifugation. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 1995;125:641-649.
54. O'Neal D, Harrip P, Dragicevic G, Rae D, Best JD. A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light-scattering methods. *Journal of Lipid Research* 1998;39:2086-2090.
55. Scheffer PG, Bakker SJL, Heine RJ, Teerlink T. Measurement of LDL particle size in whole plasma and serum by high performance gel-filtration chromatography using a fluorescent lipid probe. *Clinical Chemistry* 1998;44(10):2148-2151.
56. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Method for Determining Plasma Lipoprotein Concentrations and Subspecies Distributions from a Single, Rapid Measurement. *Clinical Chemistry* 1992;38(9):1632-1638.
57. Krauss RM, Blanche PJ. Detection and quantitation of LDL subfractions. *Current Opinion in Lipidology* 1992;3:377-383.
58. Ala-Korpela M, Korhonen A, Keisala J, Hörkkö S, Korpi P, Ingman LP, et al. H NMR-based absolute quantitation of human lipoproteins and their lipid contents directly from plasma. *Journal of Lipid Research* 1994;35:2292-2304.
59. Otvos JD. Measurement of Lipoprotein Subclass Profiles by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: Press A, editor. *Handbook of Lipoprotein Testing*; 1997. p. 497-508.
60. Kuller L, Arnold A, Tracy R, Otvos JD, Burke G, Psaty B, et al. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Lipoproteins and Risk of Coronary Heart Disease in the Cardiovascular Health Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002;22:1175-1180.
61. Mahley RW, Rall SC, Jr. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Rev. Genomics Hum. Genet.* 2000;1:507-537.
62. Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E Alleles and Risk of Coronary Disease: A Meta-analysis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1996;16:1250-1255.
63. Driscoll DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *Journal of Lipid Research* 1984;25:1368-1379.
64. Smith JD. Apolipoprotein E4: an allele associated with many diseases. *Annals of Medicine* 2000;32(2):118-127.
65. Martinez TLR, Janovich H, Lopes IL, Pinto LESA, Silva EP, Relvas G. Apolipoproteína E, dislipidemia e aterosclerose. *Dislipidemia Today* 2001;Ano 2 Maio(2):3-7.
66. Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, Brewer HB, Jr. Apolipoprotein E metabolism in normolipoproteinemic human subjects. *Journal of Lipid Research* 1984;25:1167-1176.

67. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *Journal of Lipid Research* 1982;23:911-914.
68. Wardell MR, Suckling PA, Janus ED. Genetic variation in human apolipoprotein E. *Journal of Lipid Research* 1982;23:1174-1182.
69. Oliveira HCF. Bases moleculares das dislipidemias e da aterosclerose. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo* 1995;5(2):200-208.
70. Wilson PWF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E Alleles, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease: The Framingham Offspring Study. *JAMA* 1994;272(21):1666-1671.
71. Kolovou G, Daskalova D, Mikhailidis D. Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. *Angiology* 2003;54(1):59-71.
72. Dreon DM, Fernstrom HA, Miller B, Krauss RM. Apolipoprotein E Isoform Phenotype and LDL Subclass Response to a Reduced-Fat Diet. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1995;15(1):105-111.
73. Lehtimäki T, Moilanen T, Porkka K, Akerblom HK, Rönnemaa T, Räsänen L, et al. Association between serum lipids and apolipoprotein E phenotype is influenced by diet in a population-based sample of free-living children and young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Journal of Lipid Research* 1995;36:653-661.
74. Forti N, Salazar LA, Diament J, Giannini SD, Hirata MH, Hirata RDC. Alterações Genéticas e Colesterolemia: Recentes Estudos Brasileiros. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2003;80(5):565-571.
75. Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. Apo E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiology of Genomics* 2000;4:101-108.
76. Peña R, Lahoz C, Mostaza JM, Jiménez J, Subirats E, Pintó X, et al. Effect of apo E genotype on the hypolipidaemic response to pravastatin in an outpatient setting. *Journal of Internal Medicine* 2002;251:518-525.
77. Lahoz C, Schaefer EJ, Cupples LA, Wilson PWF, Levy D, Osgood D, et al. Apolipoprotein E Genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001;154:529-537.
78. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-Analysis: Apolipoprotein E Genotypes and Risk for Coronary Heart Disease. *Annals of Internal Medicine* 2004;141:137-147.
79. Ballantyne CM, Herd JA, Stein EA, Ferlic LL, Dunn JK, Gotto AM, et al. Apolipoprotein E Genotypes and Response of Plasma Lipids and Progression-Regression of Coronary Atherosclerosis to Lipid-Lowering Drug Therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 2000;36(5):1572-1578.
80. Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen C, Hansen PS, et al. The Apolipoprotein ϵ 4 Allele Determines Prognosis and the Effect on Prognosis of Simvastatin in Survivors of Myocardial Infarction. *Circulation* 2000;101:1366-1371.
81. Eichner JE, Kuller L, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, et al. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology* 1993;71:160-165.
82. Schwanke CHA, da Cruz IBM, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Análise da Associação entre Polimorfismo do Gene da Apolipoproteína E e Fatores de Risco Cardiovasculares em Idosos Longevos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2002;78(6):561-570.
83. Rea IM, Dowell IM, McMaster D, Smye M, Stout R, Evans A, et al. Apolipoprotein E alleles in nonagenarian subjects in the Belfast Elderly Longitudinal

- Free-Living Ageing Study (BELFAST). Mechanisms of ageing and development 2001;122:1367-1372.
84. Pablos-Méndez A, Mayeux R, Ngai C, Shea S, Berglund L. Association of Apo E Polymorphism With Plasma Lipid Levels in a Multiethnic Elderly Population. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997;17:3534-3541.
85. Schwanke CHA. Interação Genético-Ambiental nos Fatores de Risco Cardiovasculares em Idosos de Veranópolis: Papel do Polimorfismo da Apolipoproteína E [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2000.
86. Schneider RH. Declínio cognitivo em idosos socialmente ativos e sua associação com indicadores de saúde e o polimorfismo da apolipoproteína E [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2003.
87. Dart AM, Cooper B. Independent Effects of Apo E Phenotype and Plasma Triglyceride on Lipoprotein Particle Sizes in the Fasting and Postprandial States. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999;19:2465-2473.
88. Nikkilä M, Pitkälä T, Koivula T, Solakivi T, Lehtimäki T, Laippala P, et al. Women have a larger and less atherogenic low density lipoprotein particle size than men. *Atherosclerosis* 1996;119:181-190.
89. Bredie SJH, Vogelaar JM, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotypic expression, but not the low density lipoprotein subfraction distribution in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1996;126:313-324.
90. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972;18:499-502.
91. Debomoy KL, Nurnberger JL, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid Research* 1991;19:5444.
92. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *Journal of Lipid Research* 1990;31:545-548.
93. Palmer RH, Nichols AV, Dell RB, Ramakrishnan R, Lindgren FT, Gong EL, et al. Lack of relationship in humans of the parameters of body cholesterol metabolism with plasma levels of subfractions of HDL or LDL, or with Apo E isoform phenotype. *Journal of Lipid Research* 1986;27:637-644.

10. ANEXO

10.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O projeto de pesquisa “Projeto Gravataí-RS”, tem como objetivo geral avaliar os fatores de risco a doenças associadas a idade, através de análises clínicas e bio-psico-sociais (exame físico, perfil lipídico, glicemia, fatores genéticos e entrevista), pois o aparecimento de muitas doenças pode depender não somente dos genes, mas também do modo de vida que a pessoa possui. Esta pesquisa faz parte do Programa Genesis que realiza um estudo no qual, daqui para frente, você será voluntário (a).

As análises serão feitas no Laboratório de Bioquímica e Genética Molecular do IGG-PUCRS. Todos os resultados obtidos na avaliação clínica e bioquímica ficarão sob a tutela e total responsabilidade dos pesquisadores deste laboratório, podendo a qualquer momento ser consultados e/ou eliminados da pesquisa caso haja desistência da sua participação como voluntário (a). Você tem a liberdade de abandonar a pesquisa, sem que isto leve a qualquer prejuízo posterior.

Os benefícios imediatos serão muitos, já que os resultados desta avaliação servem como uma revisão médica gratuita além de aquisição de conhecimentos sobre envelhecimento bem sucedido (prevenção). No caso de detecção de qualquer alteração na sua saúde, nós o (a) encaminharemos para atendimento médico apropriado, através dos órgãos de saúde ligados à Secretaria Municipal de Saúde de Gravataí-RS.

Os pesquisadores envolvidos no Projeto garantem a você o direito a qualquer pergunta e/ou esclarecimentos mais específicos dos procedimentos realizados e/ou interpretação dos resultados obtidos nos exames.

Esta pesquisa será de grande importância para a população gaúcha e brasileira já que a cidade de Gravataí-RS apresenta um perfil de cidade metropolitana similar a outras cidades do RS propiciando o estabelecimento de programas de saúde que visem melhorar a qualidade de vida da população.

Após ter recebido todas as informações relacionadas ao estudo eu, _____ portador da CI _____ certifico que o Dr. _____ respondeu a todas as minhas perguntas sobre o estudo e minha condição, e eu, voluntariamente, aceito participar dele, pois reconheço que:

1º) Foi-me fornecida uma cópia das informações ao paciente, a qual eu li e compreendi por completo.

2º) Fui informado dos objetivos específicos e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos riscos ou desconfortos previstos, tanto quanto os benefícios esperados.

3º) Está entendido que eu posso retirar-me do estudo a qualquer momento, e isto não afetará meus cuidados médicos ou de parentes meus no presente e no futuro.

4º) Entendi que ao participar do estudo responderei a um questionário adicional, serei examinado (a) clínica e laboratorialmente. O desconforto que poderei sentir é o da picada da agulha e a formação de um pequeno hematoma.

5º) Todas as informações a meu respeito serão confidenciais.

6º) Fui informado que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

7º) Foi-me garantido que não terei gastos em participar do estudo.

8º) Foi-me dada a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou qualquer dúvida acerca dos riscos e benefícios da pesquisa e o meu tratamento. Caso tiver novas perguntas sobre este assunto, poderei chamar os Pesquisadores integrantes da equipe de pesquisa do Programa Gênese pelo telefone 3391-322 ramal 2660. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado (a) pela minha participação, poderei chamar Professor Dr. Yukio Moriguchi no telefone 3368-153.

Concordo que os meus dados clínicos obtidos neste estudo sejam documentados.

Declaro ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome _____ do _____ paciente:

Assinatura _____ do _____ Paciente/Representante Legal:

Data: _____

Coordenadora Geral do Programa Gênese: Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz _____ assinatura:

Data: _____

Este formulário foi lido para _____ em ____/____/____, Porto Alegre-RS, pela Coordenadora do Programa Gênese: Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, enquanto eu estava presente.

Nome da testemunha: _____

Assinatura _____ da _____ testemunha:

Data: _____

Sendo este estudo longitudinal, cada vez que ocorrer a minha participação em novas atividades de investigação, os pesquisadores responsáveis me informarão o tipo de trabalho a ser desenvolvido com um breve resumo que será assinado por mim e anexado a este Consentimento Informado.