

Análise da Associação entre Polimorfismo do Gene da Apolipoproteína E e Fatores de Risco Cardiovasculares em Idosos Longevos

Carla Helena Augustin Schwanke, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Ney Furhmann Leal, Rosane Scheibe, Yukio Moriguchi, Emílio Hideyuki Moriguchi

Porto Alegre, RS

Objetivo - Estabelecer as frequências alélicas e genóticas relacionadas com polimorfismo do gene da apolipoproteína E (ApoE) e a associação dos genótipos com fatores de risco e morbidades cardiovasculares em idosos longevos.

Métodos - Setenta idosos com 80 anos ou mais do Projeto Veranópolis foram analisados. Para a identificação dos genótipos da APOE, foi utilizada técnica de amplificação do gene através de PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) e clivagem pela enzima de restrição Hha I. Os genótipos mais frequentes foram comparados em relação a variáveis biológicas, riscos e morbidades cardiovasculares.

Resultados - As frequências dos alelos E2, E3 e E4 foram respectivamente 0,05, 0,84 e 0,11 enquanto que dos genótipos foram: E3E3 (0,70), E3E4 (0,22), E2E3 (0,06), E2E2 (0,02). Indivíduos E3E4 apresentaram idade média maior do que os E3E3. Não foi observada associação entre os genótipos e as variáveis analisadas, com exceção da obesidade que apresentou associação com o genótipo E3E3. Indivíduos com genótipo E3E4 apresentaram níveis elevados de LDL-colesterol e fibrinogênio do que os indivíduos com o genótipo E3E3.

Conclusão - Os resultados sugerem que o genótipo E4E4 poderia estar associado à mortalidade precoce. Poderia estar ocorrendo um balanço entre fatores protetores ou neutros e os fatores de risco cardiovasculares entre os portadores dos diferentes genótipos, atenuando os efeitos negativos do alelo E4.

Palavras-chave: apolipoproteína E, fatores de risco cardiovascular, idosos seniores

Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Correspondência: Ivana Beatrice Mânica da Cruz - Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS - Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - 90610-000 - Porto Alegre, RS
E-mail: dacruz@puers.br
Recebido para publicação em 12/3/01
Aceito em 8/8/01

Um número cada vez maior de polimorfismos genéticos tem sido associado com suscetibilidade a doenças cardiovasculares, caso do gene da apolipoproteína E (ApoE). Estudos mostram que a variante alélica E4 está associada ao mecanismo do desenvolvimento da aterosclerose, a demências e, mais recentemente, ao risco de fraturas ósseas¹⁻⁵.

Estudos da associação entre o polimorfismo da ApoE e doença arterial coronariana foram dos primeiros entre genética na área da cardiologia⁶ uma vez que a ApoE possui ação no metabolismo das lipoproteínas, desempenhando um papel chave no transporte da molécula de colesterol (1-ligante do receptor de LDL e outros, 2-ativadora de enzimas como a lipase hepática, 3-produção de VLDL – *very low density lipoprotein* – hepáticas)^{7,8}. Esta proteína, adicionalmente, está relacionada com imunorregulação e rotas neurobiológicas (reparo neuronal, remodelamento e proteção). A ApoE é sintetizada principalmente no fígado (>90%), além de outros tecidos, como intestino, cérebro, pulmões, rins e macrófagos, e secretada como uma proteína glicosilada. O polimorfismo do gene da ApoE localiza-se no braço longo do cromossomo 19. Mudanças pontuais são a base molecular deste polimorfismo em bases nitrogenadas, que causam substituição de um aminoácido nas posições 112 e 158 da cadeia peptídica. As três isoformas mais comuns são: E2 (cisteína/cisteína), E3 (cisteína/arginina) e E4 (arginina/arginina). Das três isoformas, a literatura relata que a E3 é a mais frequente na população em geral e a E4 é rara em centenários. A frequência alélica da ApoE é variável nas populações, já que seu locus é polimorfo de 16-53% conforme a população. Assim, existem fenótipos da ApoE, sendo que os mesmos são produtos de seis genótipos: três homocigotos (E2E2, E3E3 e E4E4) e três heterocigotos (E2E3, E3E4 e E2E4). O polimorfismo da ApoE modifica a proteína tanto na sua estrutura quanto na sua função. No caso, a isoforma E2 gera uma proteína cuja ligação com o receptor de LDL é deficiente (pode gerar, quando em homocigose - situação rara -

e na presença de outros fatores como *diabetes mellitus*, a dislipidemia do tipo III de Fredericson ou disbetalipoproteinemia) e, ao contrário, a isoforma E4 terá uma proteína cuja afinidade pelo receptor de LDL é quatro vezes maior que pelo próprio LDL^{1-5,9}. Estudos populacionais têm mostrado que os níveis plasmáticos de LDL-colesterol (LDL-c) e da apolipoproteína B (APOB) são maiores em indivíduos que possuem o alelo E4, intermediários em indivíduos com alelo E3 e menores em indivíduos com alelo E2^{10,11}.

Alguns estudos também têm associado a presença do alelo E2 com maior longevidade, uma vez observada maior frequência deste em nonagenários e centenários^{12,13}. Entretanto, tais resultados não foram reproduzidos em todas as populações investigadas, parecendo não ser um padrão universal. Excluindo os possíveis problemas metodológicos associados a este tipo de estudo revisados por Marian⁵ e Mansur⁶, uma das hipóteses a ser considerada seria de que em doenças crônico-degenerativas de origem multifatorial, o conjunto da variação genética de uma população, associado ao entorno social e ambiental dessa mesma população e aos processos relacionados com a biogerontologia (biologia do envelhecimento), poderiam ser elementos responsáveis pela variação nos resultados, por ora encontrados. Deste modo, investigações adicionais sobre o impacto de determinados polimorfismos genéticos, fatores de risco tradicionais para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e, em especial as coronarianas e envelhecimento, através de investigação em indivíduos longevos (> 80 anos) são ainda necessárias.

A importância deste tipo de investigação baseia-se no fato de que o fenômeno do envelhecimento populacional aumentará sobremaneira a frequência de idosos com mais de 80 anos na população, grupo etário especialmente suscetível a eventos cardiovasculares. Entretanto, estudos recentes, incluindo investigações feitas em Framingham, mostram que fatores de risco tradicionais a doenças cardiovasculares não se aplicam com a mesma intensidade do que a observada em grupos etários mais jovens^{14,15}. Assim, é necessário produzir um conjunto de conhecimento que permita delimitar quais fatores de risco concretamente influenciam a suscetibilidade a doenças cardiovasculares nesta faixa da população.

Com base nestas considerações, investigamos a associação entre genótipos diferenciais da ApoE, fatores de risco e morbidades cardiovasculares em idosos com idade \geq 80 anos residentes no município em Veranópolis-RS, e que participam do Projeto Veranópolis. O respectivo projeto analisa a interação de variáveis genético-ambientais relacionadas com um envelhecimento bem sucedido e com doenças cardiovasculares. O perfil demográfico e epidemiológico básico do município de Veranópolis é apresentado na tabela I¹⁶.

Métodos

O delineamento do estudo foi do tipo transversal, induzido, observacional-analítico¹⁷, realizado numa amostra de 64 idosos com idade \geq 80 anos, escolhidos segundo

Tabela I - Comparação dos dados demográficos e epidemiológicos do município de Veranópolis-RS com o do estado do Rio Grande do Sul e do Brasil, período 1996-97¹⁶

Variáveis	Veranópolis	RS	Brasil
Expectativa de vida ao nascer	77,7	71,8	67,7
Coefficiente de mortalidade infantil	1/1.000	17,5/1.000	26,4/1.000
Mortalidade por doenças cardiovasculares	29	34	27
Mortalidade por doenças infecciosas	0,7	1,7	2,8

critérios de representatividade e randomização, a partir de uma população total de 220 indivíduos de etnia italiana dessa faixa etária residentes no município de Veranópolis em 1998.

Genotipagem da ApoE e exames bioquímicos complementares: as amostras de sangue de veia periférica foram coletadas pelo sistema de venoclise, com aparato descartável a vácuo (Vacutainer) e colocadas em tubos contendo EDTA 0,1% (volume final em concentração 1mg/dl). Após, o material coletado foi mantido a 4°C até 24h entre a coleta e a extração do DNA. A extração do DNA foi realizada segundo a técnica descrita por Debomoy¹⁸. O protocolo geral da extração seguiu as seguintes etapas: 1) as amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 5.000rpm por 5min; 2) após a centrifugação, transferiu-se a camada contendo leucócitos para tubos de 1,5ml e realizou-se, a seguir, uma lavagem com PBS (tampão fosfato-salino, pH 7,5); 3) para a extração do DNA dos leucócitos (em 200µml PBS) foi adicionado 100µml de tampão de lise (10mM Tris, 100mM EDTA, 0,5% SDS, 200µmg/ml proteinase K), SDS a 2,5%, 25mM EDTA pH 8,0 seguido de incubação a 55°C por 3h; 4) após a incubação, o DNA da amostra foi extraído a partir de duas lavagens com uma solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1); 5) o DNA presente na porção aquosa foi então 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, observado como um sedimento translúcido e gelatinoso, foi dissolvido em 50µml de água Milli-Q e mantido a -20°C para posterior uso na reação de amplificação gênica chamada PCR (*polymerase chain reaction*).

A PCR foi executada de acordo com o método descrito por James e cols.¹⁹, utilizando-se 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 (50µml total), foi preparada com 10pmol de cada *primer*, 100µmM dNTPs, 1U de *Taq* Polimerase (CenBiot-RS), tampão contendo 1,5mM MgCl₂, DMSO 1% e 2µml do DNA da amostra.

O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguida de 30 ciclos de desnaturação à 95°C por 1min, anelamento à 61°C por 1min, extensão à 70°C por 1min e uma extensão final a 72°C por 10min.

A eficiência da PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (2%) com brometo de etídio, observando-se a presença de uma banda de 240 pares de base (pb) sob luz ultravioleta.

A genotipagem foi realizada pela digestão do produto

da PCR (20µl) 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 poli-acrilamida (15%), utilizando-se um marcador de peso molecular de 10pb *ladder*. As bandas características de cada alelo foram, então, analisadas e identificadas.

Para as avaliações bioquímicas foram coletadas amostras de sangue venoso, após 12h de jejum. Utilizou-se o sistema de venoclise com aparato descartável a vácuo (Vacutainer). As coletas foram feitas em tubos sem anticoagulante para quantificação do perfil lipídico, da Lp(a), da glicose e do ácido úrico e as coletas para quantificação do fibrinogênio em tubos com citrato de sódio. As amostras sanguíneas foram centrifugadas por 15min numa centrífuga Kubota KC-70 (Japan) a uma velocidade de 3.000rpm para separação do plasma e das demais células. O plasma foi separado com micropipetas em 5 alíquotas de 1,0ml em tubos *Eppendorf*. As alíquotas de plasma foram refrigeradas entre -8 e 4°C por no máximo 24h²⁰.

Para análise do colesterol total, utilizou-se a técnica manual de reação enzimática colorimétrica através do uso de reagente enzimático comercial *Cholesterin/Cholesterol ChodPap* (MPR2, *Boehringer-Mannheim, Germany*). Foram realizadas leituras de padrões de colesterol 50mg/dl, 100mg/dl, 200mg/dl e 400mg/dl do *Preciset Cholesterol Calibrator 125512* (*Boehringer-Mannheim, Germany*), sendo considerado como valor final a média de duas determinações realizadas para cada amostra plasmática²⁰. Para a análise do HDL-colesterol (HDL-c) utilizou-se a técnica de precipitação com Heparina-Mn²⁺ de Gildez com algumas adaptações. As lipoproteínas que continham apolipoproteínas B-100 (as VLDL e LDL) foram precipitadas com heparina-Mn²⁺ (*Sigma Chemical Co, USA*) e depois incubadas e centrifugadas (centrífuga refrigerada *Model RB-1811, Tomy Seiko Co. Ltd, Japan*). Coletou-se, então, o sobrenadante para quantificação das partículas de HDL-c através de reação enzimática colorimétrica para colesterol, sendo considerado como valor final a média de duas determinações realizadas para cada amostra plasmática²⁰. O LDL-c foi obtido através da fórmula de Friedwald, para valores de triglicéridios inferiores a 400mg/dl. As amostras com valores de triglicérides superiores a 400mg/dl foram excluídas²¹.

Utilizou-se a técnica manual de reação enzimática colorimétrica para a quantificação dos triglicérides com *kit* comercial *Labtest TG Gpo-Ana* enzimático (*Argentina*). Foram realizadas leituras de padrões de triglicérides de 150mg/dl e 300mg/dl do *Preciset Triglicéride Calibrator 125512* (*Boehringer-Mannheim, Germany*), sendo considerado como valor final a média de duas determinações realizadas para cada amostra plasmática²⁰. Os níveis acima de 200mg/dl foram considerados aumentados. A tabela II mostra os valores de referência de colesterol total, LDL-c, HDL-c e TG²¹.

A determinação da Lp(a) foi obtida através de sistema nefelométrico *Boehringer* (*Boehringer Nephelometer 100*); empregou-se o *kit* N antisoro contra apoproteína (a) humana e o *kit* reagente N Latex Lp(a). Os níveis de LP(a) acima

Lípides	Valores (md/dl)		
	Desejáveis	Limítrofes	Alterados
CT	< 200	200-239	≥ 240
LDL-c	< 130	130-159	≥ 160
HDL-c	≥ 35	-	-
TG	< 200	-	≥ 200

Fonte: II Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias.

de 30mg/dl foram considerados aumentados²⁰. Utilizou-se o método enzimático colorimétrico, através do kit comercial da Bio Diagnóstica ICQ Ltda (Paraná, Brasil) para a determinação da glicose, sendo considerado como valor final a média de duas determinações realizadas para cada amostra plasmática²⁰. Os níveis acima de 126mg/dl foram considerados aumentados. O fibrinogênio plasmático foi quantificado conforme o método turbidimétrico, utilizando-se espectrofotômetro Tecnow 7000 (Tecnow Instrumentos Científicos, São Paulo). Os níveis acima de 300mg/dl foram considerados aumentados. A dosagem de ácido úrico plasmático foi realizada por método enzimático (*UV, Method GIDH*) através de *kit* comercial Merck (*Germany*). Os níveis acima de 7,0mg/dl foram considerados aumentados²².

Adicionalmente foram feitos exames clínicos complementares e aplicação de entrevista estruturada para a detecção de riscos e morbidades cardiovasculares:

Para a obesidade foram utilizados três parâmetros clínicos: índice de massa corporal, relação cintura-quadril e porcentagem de gordura corporal (% de gordura). Dado que nenhum dos três parâmetros de modo isolado pode indicar níveis de obesidade com grande eficiência, foram considerados obesos os indivíduos que apresentaram classificação de obesidade nos três parâmetros ou a classificação de obesidade em pelo menos dois parâmetros e o terceiro de sobrepeso do índice de massa corporal. O índice de massa corporal foi obtido a partir da quantificação do peso (em quilos) e da altura (em metros), utilizando-se uma balança mecânica de contrapeso (Filizolla, São Paulo). Após, o cálculo do índice de massa corporal foi feito através da fórmula da razão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (kg/m²). A relação cintura-quadril foi obtida através da medida da circunferência abdominal mínima (feita ao nível da crista ilíaca, em metros) e circunferência abdominal máxima (feita ao nível do grande trocânter, em metros). Após, o cálculo da cintura-quadril foi feito através da fórmula da razão da circunferência abdominal mínima pela circunferência abdominal máxima. A % de gordura foi obtida através da quantificação da mesma por bioimpedanciometria elétrica. Para esta quantificação, os idosos deviam estar em posição supina. Para classificação através do índice de massa corporal, foram considerados obesos os indivíduos com índice de massa corporal ≥ 30 e com sobrepeso os indivíduos com índice de massa corporal entre 25 e 30 para ambos os sexos. Para classificação através da cintura-quadril, foram

considerados obesos os indivíduos com valor superior a 0,8cm nas mulheres e 1,0cm nos homens. Para classificação através da % de gordura, foram considerados obesos os indivíduos com valor superior a 30 para ambos os sexos²³.

Para a avaliação e classificação de hipertensão arterial sistêmica, foi utilizado o critério do III Consenso Brasileiro para o Tratamento da Hipertensão Arterial de 1998, no qual foram considerados hipertensos aqueles indivíduos que apresentaram níveis de pressão arterial sistólica >140mmHg e/ou pressão arterial diastólica >90mmHg. Para a classificação dos idosos com hipertensão considerou-se a alteração em pelo menos dois dos três parâmetros investigados: pressão arterial sistólica e/ou pressão arterial diastólica aumentada, relato de hipertensão diagnosticada por um médico, uso de medicamentos anti-hipertensivos. A pressão arterial foi obtida utilizando-se de um esfigmomanômetro de mercúrio (Erka, Germany) com manguito adequado para a circunferência do braço direito. Para tanto, cada participante permaneceu em repouso (sentado) por no mínimo 5min antes do início das medições. Foram tomadas duas medidas, guardando-se intervalos de aproximadamente 30min entre cada uma. O aparecimento dos sons foi utilizado para a identificação da pressão arterial sistólica e o desaparecimento (fase V de Korotkofi) para identificação da pressão arterial diastólica²⁴. Como existe possibilidade de ocorrer pseudo hipertensão causada pelo enrijecimento da artéria braquial pela aterosclerose (que pode elevar a pressão em 30mmHg ou mais), utilizou-se concomitante à medida da pressão arterial sistólica, a manobra de Osler (que é considerada positiva quando a artéria radial permanece palpável ao se insuflar o manguito acima do nível da pressão arterial sistólica)²². Ocorrendo esta situação, estes casos foram excluídos da avaliação²⁵.

O *diabetes mellitus* foi definido pelo relato do voluntário (diagnóstico dado por um médico) e/ou uso de medicação (hipoglicemiantes orais e/ou insulina) e/ou pelos níveis de glicose plasmática de jejum >126mg/dl²⁶.

A morbidade por doenças cardiovasculares foi definida pela presença de história pessoal prévia ou diagnóstico de angina e/ou claudicação intermitente e/ou acidente vascular encefálico, conforme descrição a seguir: 1) dor torácica tipo anginosa e/ou claudicação intermitente, caracterizada por presença de dor torácica tipo anginosa e claudicação intermitente definida através do relato de tais sintomas, conforme o protocolo de Rose; 2) acidente vascular encefálico. A presença de acidente vascular encefálico isquêmico e de infarto agudo do miocárdio foi definida através de relato de tais situações patológicas e exames neurológicos e cardiológicos complementares²⁷.

As variáveis de risco cardiovascular relacionadas com o estilo de vida avaliadas foram atividade física, ingestão alcoólica e tabagismo.

A atividade física foi medida pelo cálculo do gasto energético em quilocalorias por semana (Kcal/sem) despendido na execução de atividades diversas, através da utilização do código de intensidade de Taylor e cols. e/ou Mcardle e cols. como índice de gasto energético específico em Kcal/min

para as diferentes atividades físicas. Para a classificação foi utilizado o ponto de corte de 3.000 Kcal/sem proposto por *Paffenbarger* considerado um nível de atividade física favorável à proteção cardiovascular de indivíduos de meia idade^{27,28}.

A ingestão de bebida alcoólica foi avaliada através do relato da quantidade de bebida alcoólica ingerida por semana. Calculou-se a quantidade de álcool ingerida em gramas por semana, utilizando-se os fatores de correção para o teor alcoólico médio, conforme medidas padronizadas de vinho, cerveja e destilados (dose padrão), adaptados a partir das referências do Serviço de Atenção ao Alcoolismo e Drogadição do Ministério da Saúde¹⁶. Neste, o teor alcoólico do vinho foi estimado em 11% usando como medida padrão 140ml (um copo), o teor alcoólico da cerveja foi estimado em 4% usando como medida padrão 350ml (uma lata ou duas latas equivalendo a uma garrafa) e o de bebidas destiladas, um teor alcoólico estimado de 45%, usando como medida padrão 35ml (equivalente a uma dose)²⁷.

O tabagismo foi avaliado através do relato do consumo ou não de tabaco (cigarros e outros). Considerou-se dois grupos: 1) não tabagistas como sendo indivíduos que nunca fumaram e/ou aqueles que pararam de fumar há pelo menos dois anos antes da data da entrevista, não voltando mais a fumar; 2) tabagistas atuais (fumantes) como sendo indivíduos que fumavam pelo menos um cigarro/dia e/ou aqueles que pararam de fumar há menos de dois anos.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS Versão 9.0, 1999²⁹. Cálculo das frequências gênicas e genotípicas e da presença de desequilíbrio de ligação: após o diagnóstico molecular da amostra, as frequências gênicas (ou alélicas) e genotípicas foram calculadas, utilizando-se o teorema de Hardy-Weinberg³⁰. As frequências genotípicas foram calculadas a partir da equação $p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$, designando-se como p= alelo e3 (mais freqüente nas populações humanas até então estudadas), q=alelo e4 e r= alelo e2. Para o cálculo das frequências gênicas, utilizou-se a equação: $p+q+r=1$, que foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, através de qui-quadrado entre as frequências observadas e as esperadas de cada alelo (teste do qui-quadrado *goodness-fit*).

As seguintes análises estatísticas foram realizadas para verificar a associação entre os genótipos mais freqüentes observados na amostra investigada e as variáveis analisadas no estudo: 1) teste de associação entre variáveis categóricas: foi utilizado o teste univariado não paramétrico do qui-quadrado para amostras independentes. Nos casos em que a freqüência esperada foi menor que cinco em tabela 2x2, foi utilizado o teste exato de Fisher. Em ambos os casos foram utilizados testes bicaudais, por serem mais conservadores, evitando significâncias espúrias; 2) análise multivariada: foi realizada utilizando-se regressão logística. Foram incluídas no teste todas as variáveis que apresentaram significância estatística univariada $p=0,1$. Para averiguação de interação de variáveis associadas aos genótipos ou associação independente de variáveis, foram sendo excluídas da análise cada uma das variáveis. Em caso de perda de signi-

ficância $p=0,05$ de uma variável quando outra fosse excluída da análise, considerou-se associação entre as mesmas; 3) comparação das variáveis contínuas entre genótipos: foi utilizada análise de variância ANOVA *One-Way* (ou ANOVA multifatorial), seguida de teste *t* de *Student* ou Mann-Whitney.

O presente estudo obteve aprovação da Comissão Científica da Faculdade de Medicina da PUCRS e do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS para sua realização, tendo sido encaminhado para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde por pertencer à área temática genética. Foram solicitadas assinaturas dos termos de consentimento para todos voluntários ou familiares e quando da impossibilidade de sua obtenção pelo voluntário solicitamos seu consentimento verbal.

Resultados

Dos seis genótipos possíveis da ApoE, somente quatro foram observados na população: E3E3 (70%), E3E4 (22%), E2E3 (6%) e E2E2 (2%). As frequências gênicas e genotípicas encontram-se na tabela III. Como o tamanho amostral dos genótipos E2E2 e E2E3 foi muito baixo (um indivíduo e quatro indivíduos genotipados), sua estatística descritiva foi incluída nos resultados apresentados, ainda que não tenham sido incluídos nas análises estatísticas comparativas dos genótipos mais frequentes E3E3 e E3E4.

Apesar das frequências estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,97$; grau de liberdade = 1; $p>0,57$), a frequência do alelo E4 na população estudada foi acima de 10%.

A Tabela IV compara os valores médios observados para as variáveis biológicas analisadas no estudo. Entre os indivíduos com os genótipos mais frequentes, E3E3 e E3E4, foram observadas diferenças significativas em relação à idade, índice de massa corporal e pressão diastólica. No caso, indivíduos com o genótipo E3E4 foram significativamente mais idosos do que os E3E3. Apesar da não inclusão estatística dos demais genótipos, o indivíduo E2E2 apresentou uma idade mais próxima à idade média encontrada nos portadores do genótipo E3E3, enquanto que os indivíduos E2E3 tenderam a apresentar uma idade média similar à observada nos portadores do genótipo E3E4.

Gene	n	Frequência	
ApoE	Gênica (Alélica)		
	e2	0,05	
	e3	0,84	
	e4	0,11	
	Genotípica		
	E2E2	1	0,02
	E2E3	4	0,06
	E2E4	0	0
	E3E3	45	0,70
	E3E4	14	0,22
E4E4	0	0	

n= tamanho da amostra.

Quanto ao índice de massa corporal, indivíduos E3E3, em média, tenderam ao sobrepeso, enquanto tanto indivíduos E3E4 quanto E2E3 apresentaram um índice de massa corporal médio dentro da faixa da normalidade. Diferentemente deste padrão, o indivíduo E2E2 apresentou um índice de massa corporal abaixo do normal, considerado como desnutrição.

Surpreendentemente, indivíduos com o genótipo E3E4 foram os únicos que apresentaram uma pressão arterial diastólica considerada dentro da normalidade.

Um total de oito variáveis bioquímicas relacionadas, direta ou indiretamente, com o risco cardiovascular foram comparadas entre os genótipos (tabs. V e VI).

Dessas variáveis, três apresentaram médias significativamente diferentes entre os idosos com diferentes polimorfismos genéticos da ApoE: LDL-c, ácido úrico e fibrinogênio. Tanto indivíduos com genótipo E3E3 quanto indivíduos E3E4 apresentaram valores médios de LDL-c acima do esperado. Idosos com o genótipo E3E4 apresentaram uma concentração média de LDL-c significativamente maior do que indivíduos com o genótipo E3E3. Já os demais genótipos tenderam a apresentar valores dentro do intervalo esperado.

Ao contrário, indivíduos E3E3 apresentaram média de valores das concentrações de ácido úrico significativamente mais alta que indivíduos E3E4. Entretanto, todos tiveram suas médias dentro de valores esperados.

Apesar dos níveis de fibrinogênio serem estatisticamente maiores em indivíduos E3E4, todas as médias observadas nos demais genótipos apresentaram valores, não considerados de risco cardiovascular.

Numa análise multivariada por um modelo de regressão logística, foi observada uma relação significativa entre

	E3E3 Média±DP	E3E4 Média±DP	p
Idade	82,72±3,1	85,36±3,23	0,008
Colesterol total	204,99±39,28	224,91±55,32	0,14
LDL	133,2±32,8	155,56±47,26	0,05
HDL	46,7±12,72	44,8±10,43	0,61
Triglicerídios	136,69±81,29	122,64±49,57	0,54
Ácido úrico	5,82±0,92	4,91±0,59	0,005
Fibrinogênio	194,97±63,99	243,72±60,38	0,04
Lp (a)	30,26±27,86	29,15±28,32	0,91
IMC	27,44±5,14	23,67±3,5	0,02
Gordura	37,33±6,41	33,92±5,68	0,14
C/Q	0,91±0,008	0,86±0,006	0,09
PAS	161,78±25	151,72±28,27	0,2
PAD	88,77±12,95	80,07±13,46	0,03
Atividade física	6406,9±5872,2	4399±2006,2	0,32
Consumo de álcool	178,96±165,1	82,10±111,61	0,2

Legenda: unidades de medidas das variáveis analisadas - idade (anos), atividade física (kcal/sem.); consumo de bebida alcoólica (g/semana), pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), pressão arterial diastólica (PAD, mmHg), IMC- índice de massa corporal; C/Q- índice cintura/quadril, gordura (%); DP- desvio padrão; p- nível de significância obtido por análise de teste *t Student*; n= tamanho da amostra. A comparação estatística foi realizada somente entre os genótipos E3E3 e E3E4.

Tabela V - Comparação das variáveis bioquímicas relacionadas com metabolismo das lipoproteínas e com risco cardiovascular entre os diferentes genótipos da apolipoproteína E

Variáveis (mg/dl)	*E2E2 Média	*E2E3 Média±DP	E3E3 Média±DP	E3E4 Média±DP	p
Colesterol total	147,7	185,15±77,14	204,99±39,28	224,91±55,32	0,14
LDL	80,37	109,2±77,22	133,2±32,8	155,56±47,26	0,05
HDL	47,36	49,96±5,04	46,7±12,72	44,8±10,43	0,61
Triglicerídios	100	129,83±76,4	136,69±81,29	122,64±49,57	0,54
Ácido úrico	4,6	5,36±0,5	5,82±0,92	4,91±0,59	0,005
Glicose	66	85±7,39	94,54±21,74	91,5±20,14	0,64
Fibrinogênio	121,3	194,9±79,1	194,97±63,99	243,72±60,38	0,04
Lp(a)	8,8	26,73±20,8	30,26±27,86	29,15±28,32	0,91

*Variáveis não comparadas estatisticamente devido ao pequeno tamanho amostral; análise estatística: ANOVA seguida de teste t Student.

níveis de LDL-c (130mg/dl), ácido úrico (6mg/dl), fibrinogênio (300mg/dl) e colesterol (220mg/dl) e os genótipos. Entretanto, cabe salientar que, somente o colesterol apresentou um nível de significância entre 0,05 e 0,1. Os demais apresentaram uma relação estatística mais consistente, com níveis de significância, que variaram entre 0,00 a 0,04.

A análise dos valores obtidos no cálculo da razão de chance (*odds ratio*) mostrou que indivíduos com o genótipo E3E4 possuíam duas vezes mais chance de possuir níveis de LDL-c e fibrinogênio acima do esperado do que indivíduos com o genótipo E3E3. Em contrapartida, indivíduos E3E4 possuíam chance menor de terem níveis de ácido úrico mais elevados do que os indivíduos E3E3.

Variáveis do estilo de vida, como tabagismo e atividade física, foram similares entre os genótipos analisados (tab. IV). Quanto ao tabagismo, menos de 3% da população investigada fumava, também não observada associação genótipo-específica ($\chi^2=0,75$, gl=1, p=0,77).

A última análise do estudo envolveu a averiguação da associação entre fatores de risco e morbidades cardiovasculares e os genótipos mais frequentes da ApoE. Uma vez que a frequência de morbidades cardiovasculares foi baixa na população estudada, as mesmas foram agrupadas (acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, claudicação intermitente e angina de peito) para tornar possível a análise estatística.

Os idosos com o genótipo E3E3 tiveram uma tendência a apresentar um maior número de indivíduos afetados por eventos cardiovasculares, obesidade e hipertensão, contudo, somente a obesidade foi, estatisticamente significativa, entre os genótipos investigados. No caso, indivíduos E3E3 foram mais relacionados com obesidade do que os indivíduos com o genótipo E3E4.

Já os idosos com o genótipo E3E4 tiveram uma tendência a apresentar um maior número de indivíduos com morbimortalidade familiar por doenças cardiovasculares, *diabetes mellitus* e dislipidemia. Contudo, tais diferenças não foram estatisticamente significativas (fig. 1).

Discussão

A análise dos resultados sugere a existência de uma interação mais complexa entre o polimorfismo do gene da

ApoE e as variáveis relacionadas com eventos cardiovasculares investigados, podendo existir relações genótipo-dependentes ainda não exploradas.

Quanto às frequências gênicas e genótípicas relacionadas ao polimorfismo do gene da ApoE, é importante salientar que ocorre variação das mesmas conforme a população analisada. Estudos de revisão mostraram que as frequências genéticas relacionadas a esse polimorfismo são altamente variáveis, principalmente no que diz respeito à frequência do alelo E4^{1,2}. Na Europa, este gene apresenta uma distribuição em gradiente, e o alelo E4 mais freqüente na região norte e menos freqüente na região sul. Nas populações asiáticas, tal alelo possui baixa freqüência, contrariamente, ao que ocorre em populações africanas e na Nova Guiné³¹⁻³³. Entretanto, estudos específicos investigando as possíveis causas dessa variação ainda são muito incipientes.

Em geral, as frequências genótípicas observadas no presente estudo foram semelhantes às encontradas por outros autores. O genótipo E3E3 foi o mais freqüente (55%) nas populações até agora investigadas, seguido do genótipo E3E4 (26%)^{3,31}. Os resultados obtidos também foram similares aos da região norte da Itália³³. Uma vez que dados

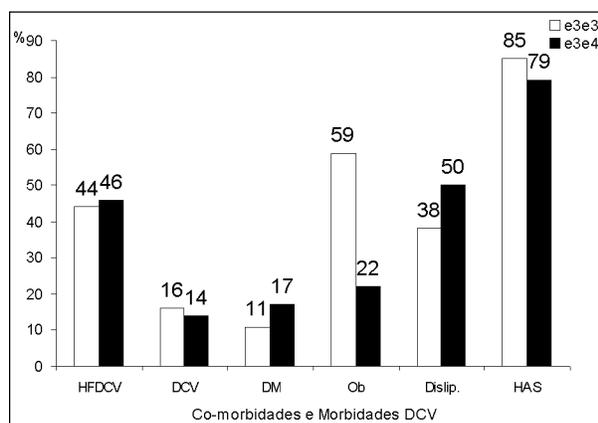


Fig. 1 - Comparação entre riscos para doenças cardiovasculares, co-morbidades e morbidades associadas. HFDCV- história familiar para doenças cardiovasculares; DCV- somatório das doenças cardiovasculares observadas na amostra investigada (acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, claudicação intermitente e angina de peito), DM- *diabetes mellitus*; Ob- obesidade; Dislip- dislipidemia; HAS- hipertensão arterial sistêmica.

Tabela VI - Relação entre genótipo da ApoE de idosos e variáveis do perfil lipídico avaliados por regressão logística simples e suas respectivas razão de chance (odds ratio)

Variáveis	χ^2	P	Razão de chance	Intervalo de confiança 95%
DL-colesterol (130mg/dl)	5,82	0,01	2,61	1,04-6,56
Ácido úrico (6mg/dl)	6,05	0,007	0,09	0,10-0,78
Fibrinogênio (300mg/dl)	12,21	0,04	2,07	1,20-7,88
Colesterol total (240mg/dl)	3,58	0,06	1,23	2,77-5,43

χ^2 - qui-quadrado

da imigração italiana para Veranópolis apontam um maior contingente de indivíduos imigrantes oriundos do norte da Itália, essa similaridade era esperada. Para demonstrar esta afirmativa, a tabela VII foi elaborada de modo a comparar frequências populacionais da ApoE em diferentes populações e/ou grupos etários dessas populações^{3,4,10,31,33,34}. Infelizmente, não existem ainda publicações sobre frequências da ApoE na população brasileira, o que impede sua comparação às frequências obtidas no presente estudo. De um modo geral, chama a atenção a maior frequência de indivíduos com o genótipo E3E4 em Veranópolis em relação às populações italianas. Estudos genéticos adicionais poderão auxiliar no entendimento deste fenômeno.

Apesar da alta frequência do alelo E4 nos idosos, não observamos nenhum com o genótipo E4E4. Diversas investigações realizadas em outros países sugerem a ocorrência de um efeito de dose do alelo E4, ou seja, a presença de duas cópias do alelo E4 estaria associada à mortalidade precoce. Como não foram observados idosos com este genótipo, os dados obtidos corroboram tal hipótese.

Entretanto, surpreendentemente, nos nossos resultados, indivíduos com o genótipo E3E4 apresentaram uma idade média significativamente maior, do que indivíduos E3E3. Diferenças nos achados de frequências da ApoE e longevidade sugerem fortemente que as relações entre determinados genótipos e longevidade também são influenciados por outras variáveis como fatores ambientais e a interação

com outros fatores genéticos. Provavelmente, esta variação seja responsável pela dificuldade de traçarmos um perfil biológico e clínico fortemente correlacionado entre fatores de risco para doenças cardiovasculares em idades avançadas (> 80 anos). Assim, acreditamos que este aspecto possa ter contribuído no resultado obtido.

Dentro das diversas variáveis biológicas investigadas, o índice de massa corporal e a pressão arterial diastólica foram as que apresentaram diferenças significativas entre os genótipos da ApoE mais frequentes. Neste caso, indivíduos com o genótipo E3E3 apresentaram um índice de massa corporal médio classificado como sobrepeso e uma maior pressão arterial diastólica. Não encontramos dados consistentes que permitissem uma comparação ou inferência sobre tais achados em estudos previamente publicados. Como tal característica geralmente está associada ao aumento do risco de doenças crônico-degenerativas, estaria esta característica agindo de modo negativo junto ao genótipo E3E3? Tal questionamento necessita ser melhor investigado, bem como, se há uma relação causal ou potencial entre o índice de massa corporal e o genótipo da ApoE. Não pode também ser descartado que o achado ocorreu devido ao acaso, e determinado pelo pequeno tamanho da amostra.

Quanto à associação entre pressão arterial e os genótipos da ApoE, alguns estudos têm encontrado associação entre pressão arterial sistólica e os genótipos E4E4 e E3E4, sugerindo que o polimorfismo da ApoE poderia ser um fator silencioso que atuaria no aumento da pressão arterial³¹. Entretanto, outros estudos não mostraram tal associação^{32,34}. No nosso estudo, a associação observada foi inversa: pressão arterial diastólica alta em idosos E3E3, enquanto que, na literatura não foi encontrada nenhuma referência a esta possível associação, sugerindo que, possivelmente, exista correlação entre níveis pressão arterial e polimorfismo da ApoE, embora não havendo relação causal genótipo-fenótipo da pressão arterial, indicando que possivelmente outras interações genético-ambientais ainda não identificadas estivessem presentes.

É importante comentar que estudos, como o finlandês, em idosos longevos, mostraram que a mortalidade foi maior no grupo de indivíduos com pressão arterial baixa (tanto sistólica quanto diastólica) do que no grupo de indivíduos com pressão arterial mais alta do que o esperado³⁵. Posteriormente, esse resultado foi confirmado em investigações similares, incluindo Framingham. Nesse último, os indivíduos foram divididos em dois grupos (<75 e ≥75 anos). Foi observado um aumento substancial na taxa de mortalidade tanto em homens quanto em mulheres que possuíam pressão sistólica < 120mmHg. Como neste momento ainda não existe um quadro preciso sobre o papel da hipertensão arterial no idoso, e os resultados aqui obtidos mostram associação entre pressão diastólica alta e o genótipo E3E3, não podemos considerar que a relação represente um risco adicional nos indivíduos com o referido genótipo. Investigações futuras de seguimento de mortalidade em idosos com diferentes genótipos poderiam esclarecer se essa relação é benéfica, neutra ou ruim.

Tabela VII - Comparação entre frequências genéticas da apolipoproteína E em diferentes populações

Frequências	Populações			
	Italianos Veranópolis RS	Italianos ³² Itália R. Central	Italianos ³³ Itália R. Norte	Ingleses ³¹ Cambridge
Genotípicas				
E2/2	0,02	0,013	0,016	0,008
E3/2	0,06	0,009	0,07	0,18
E3/3	0,7	0,79	0,74	0,63
E4/3	0,22	0,095	0,17	0,19
E4/4	0	0	0	0
E4/2	0	0,009	0,004	0
Alélicas (gênicas)				
e2	0,05	0,06	0,04	0,09
e3	0,84	0,88	0,86	0,79
e4	0,11	0,05	0,1	0,12

A análise dos componentes do estilo de vida, como atividade física, consumo alcoólico e tabagismo foram similares nos dois grupos de indivíduos genotipados, descartando-se, assim, o efeito dessas variáveis nos resultados encontrados. Entretanto, estudos adicionais, relacionando o perfil e o comportamento nutricional, poderiam descartar a possibilidade de que tal variável estivesse influenciando positivamente a manutenção de indivíduos E3E4 na população através da adoção de uma dieta saudável por estes indivíduos.

Como a relação metabólica entre o polimorfismo da ApoE está diretamente relacionada ao perfil lipídico e alguns tipos de dislipidemias que levam ao aparecimento da aterosclerose, foi feita uma análise mais aprofundada da associação entre o perfil lipídico e os genótipos da ApoE, uma vez que essa foi primeiramente descrita por Shore e Shore⁷ como um componente do VLDL e, assim, o interesse das pesquisas iniciais esteve centrado na tentativa de entender-se qual o papel desta apolipoproteína na prevalência da hiperlipidemia induzida pelo colesterol^{6,7}. O posterior reconhecimento de que a ApoE é uma proteína que liga-se ao receptor do LDL (proteína-ligante) e que tal afinidade de ligação era dependente de isoformas determinadas geneticamente, acelerou o interesse dos especialistas em elucidar tanto a forma como a função da ApoE. Estudos que acabaram auxiliando no entendimento das rotas endógenas e exógenas do colesterol, bem como acabaram levando à associação dos genótipos e alelos da ApoE com doenças crônico-degenerativas, como as cardiovasculares e as demências^{4,6}. Ao longo destes anos de investigação do papel metabólico da ApoE, uma grande quantidade de artigos foi publicada, mas o tema de investigação ainda está longe de se esgotar⁴.

Quanto ao perfil lipídico, os resultados obtidos neste estudo mostraram uma associação entre níveis maiores de LDL-c com o genótipo E3E4, tanto nas análises das médias, quanto na análise por percentis dos níveis de LDL-c. Já os demais componentes não variaram significativamente entre os grupos dos diferentes genótipos. Os resultados obtidos na literatura foram comparados aos níveis dos componentes plasmáticos observados nos grupos com os diferentes genótipos mais freqüentes da ApoE, publicados recentemente (tab. VIII). Chama a atenção que o nível de LDL-c observado nos idosos de Veranópolis com o genótipo E3E4 (155,6±47,3) foi muito similar ao descrito por Bader³³ para idosos que vivem na Itália (151,4±45,5), sugerindo que uma mesma etnia possa apresentar níveis plasmáticos médios similares, apesar de viverem em condições ambientais diferenciadas e geograficamente isoladas umas das outras, ou seja, um padrão genético com influência ambiental diminuída e/ou manutenção de hábitos e estilo de vida similares entre as duas populações, apesar do evento migratório. Tal afirmação pode ser corroborada se considerarmos os resultados obtidos num estudo multiétnico realizado por Mendez e cols.³⁶ Investigação em 1.068 indivíduos residentes nos Estados Unidos, não institucionalizados, mostrou que a associação entre níveis plasmáticos do LDL-c e de outros componentes lipídicos varia conforme o grupo étnico.

Tabela VIII - Comparação entre parâmetros de lipoproteínas e genótipos da apolipoproteína E

		Veranópolis	Italianos ³²
Colesterol-total (mg/dl)	E3E3	204,99±39,28	217±43,4
	E3E4	224,91±55,32	229±48,2
	E2E3	185,15±77,14	
	E2E2	147,7	212±43,1
LDL-c (mg/dl)	E3E3	133,02±32,8	142,1±37,3
	E3E4	155,56±47,26	151,4±45,5
	E2E3	109,2±77,22	
	E2E2	80,37	138,3±39,7
HDL-c (mg/dl)	E3E3	46,7±12,72	48,5±9,3
	E3E4	44,8±10,43	49,3±12,7
	E2E3	49,96±5,04	
	E2E2	47,36	46,3±7,5
Triglicérides (mg/dl)	E3E3	136,69±81,29	123,2±51,2
	E3E4	122,64±49,57	120,1±48,7
	E2E3	129,83±76,4	
	E2E2	100	123,5±49,8
Lp(a) (mg/dl)	E3E3	30,26±27,86	25,9±26,1
	E3E4	29,15±28,32	30±35,4
	E2E3	26,73±20,8	
	E2E2	8,8	20±15

Ao contrário do LDL-c, não foi observada correlação entre os genótipos da ApoE e HDL-c, principalmente no que diz respeito à presença do alelo E4. Tal resultado também foi descrito em outros estudos populacionais, como o realizado por Mendez e cols.³⁶

Investigações populacionais têm sugerido associação entre o aumento na freqüência da hipertrigliceridemia (tipo IV HLP) em indivíduos com o alelo E2 e indivíduos com o genótipo E4E4; menor freqüência do alelo E2 associada à dislipidemias IIa; aumento na freqüência de dislipidemias do tipo IIb em indivíduos com pelo menos um alelo E4 em seu genótipo³². Entretanto, a associação do efeito da hipocolesterolemia e E2 foi mais forte do que a associação da hipercolesterolemia e o alelo E4³².

Na terceira etapa da análise dos resultados, a associação dos genótipos da ApoE com a presença de morbidades e outros fatores plasmáticos associados às doenças cardiovasculares foram averiguadas.

A análise geral dos resultados não demonstrou associação entre os indivíduos com o alelo E4 e as morbidades e co-morbidades associadas à doença cardiovascular, excetuando a ocorrência de um número significativamente maior de indivíduos obesos com o genótipo E3E3.

A falta de associação com morbidades cardiovasculares não chega a ser surpreendente, uma vez que os dados da literatura são controversos. No grupo de investigações que encontrou relação entre doenças cardiovasculares e os genótipos da ApoE, existem relatos de associação entre o genótipo E3E4 e infarto agudo do miocárdio em idades precoces³¹. Também foram observadas associação entre o alelo E4 e isquemia miocárdica³⁴.

Nos grupos de pesquisas que não encontraram associação consistente entre os genótipos da ApoE e doenças cardiovasculares, encontram-se investigações longitudinais de quatro a seis anos que estudaram a relação entre os

genótipos e a ocorrência de lesões coronarianas³⁷. Nesse grupo, um estudo, realizado na Itália com 15 mil indivíduos, não encontrou associação entre doenças cardiovasculares e genótipos diferenciais da ApoE³³. Como a relação entre ApoE e doenças cardiovasculares ainda é controversa, afirmar que existe ou não associação entre o gene da ApoE e doenças cardiovasculares é precoce. O que podemos inferir é que se tal relação ocorre, ela não é causal (direta) e, possivelmente, está associada à ação de outros fatores, sejam estes genéticos ou ambientais¹⁻⁴.

Resultados encontrados e que também não foram observados em estudos publicados sobre o tema foram a relação entre níveis elevados de fibrinogênio e o genótipo E3E4 e a relação entre níveis mais elevados de ácido úrico e o genótipo E3E3. Quanto ao primeiro achado, cabe salientar que níveis elevados de fibrinogênio estão associados a doenças cardiovasculares²². Contudo, apesar das diferenças observadas entre os dois genótipos, os níveis de fibrinogênio observados encontravam-se dentro dos valores de referência (<400mg/dl) em ambos os grupos. Apenas um único indivíduo de toda amostra apresentava níveis maiores que 400mg/dl. Quanto ao segundo achado, dado que níveis elevados de ácido úrico podem aumentar o risco de doenças cardiovasculares³⁸, tal associação poderia estar funcionando no sentido de diminuir os benefícios relacionados ao genótipo E3E3 quanto ao desenvolvimento da aterogênese.

Nossos resultados corroboram a idéia de que é necessário aumentar as informações a respeito de idosos longevos, uma vez que os dados da literatura apontam que idosos apresentam uma biologia e um conjunto de fatores de risco para doenças cardiovasculares diferenciados de indivíduos mais jovens. Dado que a prevalência de doenças cardiovasculares é muito alta em indivíduos longevos, e que a propor-

ção dessas pessoas aumentará significativamente nas próximas décadas, investigações futuras que determinem um padrão de risco cardiovascular para esse grupo etário serão fundamentais, tanto para a prevenção como para o manejo dos mesmos riscos. Assim, investigações entre o polimorfismo de genes associados a doenças cardiovasculares devem ser feitas comparando populações de indivíduos cardiopatas com populações de indivíduos saudáveis e também em indivíduos acima de 80 anos.

A síntese dos resultados apresentados permite-nos concluir que, apesar de não haver indivíduos com o genótipo E4E4 na população investigada, sugerindo efeito de dose, não foi observada associação com fatores de risco e morbidades relacionadas a doenças cardiovasculares em indivíduos heterozigotos, ainda que os níveis de LDL-c fossem significativamente maiores do que em indivíduos E3E3, sugerindo a influência de fatores ambientais adicionais não investigados no estudo (p.ex. nutrição) ou de interação com outros fatores genéticos que agiriam no sentido de diminuir ou anular os efeitos negativos provocados pelo alelo E4 ou de diminuir os efeitos benéficos do genótipo E3E3 (p.ex. níveis elevados de ácido úrico). Estudos complementares investigando a relação com outros polimorfismos genéticos nesta população poderão auxiliar na elucidação desta hipótese.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Prefeitura Municipal de Veranópolis-RS.

Referências

1. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-30.
2. Curtiss LL. ApoE in Atherosclerosis; a protein with multiple hats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1852-3.
3. Rall SC, Mahley RW. The role of Apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Intern Med* 1992; 231: 653-9.
4. Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Current Opin Lipid* 1999; 10: 207-17.
5. Marian AJ. Genetic risk factors for myocardial infarction. *Current Opin Cardiol* 1998; 13: 171-8.
6. Mansur AP. Análise do componente genético da doença coronariana. *Arq Bras Cardiol* 2000; 74: 531-3.
7. Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins: separation of species differing in protein components. *Biochem* 1973; 12: 502-7.
8. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. In: *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America (lipid disorders)*. WB Saunders Co., 1998; 27: 503-19.
9. Davignon J, Genest J. Genetic of lipoprotein disorders. In: *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America (lipid disorders)*. WB Saunders Co., 1998; 27: 521-50.
10. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
11. Menzel HJ, Kladetzky RG, Asmann G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1983; 3: 310-5.
12. Vaupel JW. Biodemographic trajectories of longevity. *Science* 1998; 55: 1567-9.
13. Christensen K, Vaupel JW. Determinants of longevity: genetic, environmental and medical factors. *J Intern Med* 1996; 240: 333-41.
14. Robine JM, Forette B, Franceschi C, Allard M. *The Paradoxes of Longevity*. Berlin: Springer-Verlag, 1999: 73-80.
15. *Epidemiologia Y Prevencion De Las Enfermedades Cardiovasculares En Los Ancianos*. Organizacion Mundial de la Salud. Informe de un Grupo de Estudio da OMS 1995; 853: 1-12.
16. Núcleo de Informação em Saúde da Secretaria de Saúde e do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. *Estatísticas da Saúde*, 1997: 102p.
17. Pereira MG. *Epidemiologia. Teoria e Prática*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000; 269-88.
18. Debomoy KL, Numberger Jr JJ. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid Research* 1991; 19: 5444.
19. James E, Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-8.
20. Tonks DB. *Quality control in Clinical Laboratories*, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagent Division, Scarborough, Canadá, 1972: 356p.
21. II Consenso Brasileiro sobre Dislipidemia. *Arq Bras Cardiol* 1996; 67: 1-16.
22. Pires AJ. Fibrinogênio, Fator VII e Fatores de Risco Cardiovascular em Idosos Acima de 80 anos de Idade. Porto Alegre: Pontificia Universidade do Rio Grande do Sul, 1996; 1-97.

23. Almeida MSC. Avaliação dos critérios de obesidade em idosos com mais de 80 anos: relação com fatores de risco coronariano. Tese de Mestrado. PUCRS. Porto Alegre, RS, 1997: 123p.
24. III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. Campos do Jordão, SP: BTHA, 1998: 38p.
25. Siegel D, Lonergan ET. Hypertension. In: Geriatrics. Connecticut: Appleton & Lange, 1996: 98-106.
26. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997; 20: 1183-97.
27. Costa AR. Caracterização da distribuição da HDL e suas subclasses em idosos (dissertação). Porto Alegre (RS): PUCRS, 1996.
28. Silva MJPC. Influência da atividade física sobre os níveis plasmáticos dos lipídeos e lipoproteínas em coronariopatias. Arq Bras Cardiol 1988; 50: 231-6.
29. SPSS. SPSS version 9.0. Chicago, Illinois: SPSS Inc.; 1998.
30. Gardner S. Genética de populações e evolução. In: Genética. 7ª ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 403-34.
31. Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. Clin Chem 1995; 41: 1068-86.
32. Gabelli C, Martini S, Barbato GM, et al. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. Arteriosclerosis 1983; 3: 310-5.
33. Bader G, Ziuliane G, Kosner GM, et al. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with longevity or disability in a sample of italian octo-and nonagenarians. Gerontology 1998; 44: 293-9.
34. Katzel L, Fleg JL, Paidi M, et al. APOE polymorphism increases the risk for exercise-induced silent myocardial ischemia in older men. Atheroscler Thromb 1993; 13: 1495-500.
35. Mattila K, Haaviston M, Tajala S, Heikinheimo R. Blood pressure and five year survival in the very old. Br Med J 1988; 296: 887-9.
36. Mendez P, Mayux R, Ngai C, et al. Association of ApoE polymorphism with plasma lipids levels in a multicentric elderly population. Atheroscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 3234-41.
37. Phillips NR, Water D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. Circulation 1993; 88: 2762-70.
38. Fang J, Alderman MH. Serum uric acid and cardiovascular mortality – the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992. JAMA 2000; 283: 2404-10.