

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Projeto Bambuí: Um Estudo Epidemiológico de Base Populacional do Polimorfismo da Apolipoproteína E e sua Associação com Variáveis Demográficas, Biológicas e com a Hipertensão Arterial Prevalente em Idosos.

por

Alberto Kazuo Fuzikawa

Belo Horizonte
Novembro/2007

TESE DSC-CPqRR

A.K. FUZIKAWA

2007

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Projeto Bambuí: Um Estudo Epidemiológico de Base Populacional do Polimorfismo da Apolipoproteína E e sua Associação com Variáveis Demográficas, Biológicas e com a Hipertensão Arterial Prevalente em Idosos.

por

Alberto Kazuo Fuzikawa

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de concentração de Saúde Coletiva.

Orientação: Dra. Maria Fernanda Furtado Lima-Costa.

Co-orientação: Dr. Sérgio William Viana Peixoto.

Belo Horizonte
Novembro/2007

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F949p
2007

Fuzikawa, Alberto Kazuo.

Projeto Bambuí: Um Estudo Epidemiológico de Base Populacional do Polimorfismo da Apolipoproteína E e sua Associação com Variáveis Demográficas, Biológicas e com a Hipertensão Arterial Prevalente em Idosos, ou, The Bambuí Health and Aging Study: An Epidemiological Community-Based Study of the Apolipoprotein E Polymorphism and Its Association with Demographical and Biological Variables and with Prevalent Arterial Hypertension in the Elderly / Alberto Kazuo Fuzikawa. – Belo Horizonte, 2007.

xvi, 46 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 55 – 62

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Saúde Coletiva.

1. Idoso/fisiopatologia 2. Hipertensão/metabolismo 3. Apolipoproteína E2/genética 4. Apolipoproteína E3/genética 5. Apolipoproteína E4/genética I. Título. II. Lima-Costa, Maria Fernanda Furtado (Orientação). III. Peixoto, Sérgio William Viana (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.132

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Projeto Bambuí: Um Estudo Epidemiológico de Base Populacional do Polimorfismo da Apolipoproteína E e sua Associação com Variáveis Demográficas, Biológicas e com a Hipertensão Arterial Prevalente em Idosos.

por

Alberto Kazuo Fuzikawa

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Maria Fernanda Furtado de Lima e Costa (Presidente)

Prof. Dra. Valéria Maria de Azeredo Passos

Prof. Dr. Antonio Luiz de Pinho Ribeiro

Profa. Dra. Celina Maria Modena

Prof. Dr. Alvaro José Romanha

Suplente: Profa. Dra. Virgínia Torres Schall

Tese defendida e aprovada em: 11/12/2007

DEDICATÓRIAS

À Rosamaria, Artur Kazuo e Vitória Aiko;
Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Fernanda F. Lima-Costa, pelos valiosos ensinamentos, orientação e tempo despedido em todas as etapas da elaboração deste trabalho;

Ao Dr. Sérgio William V. Peixoto, pela disponibilidade, ajuda e discussões constantes;

Aos Drs. Emílio Hideyuki Moriguchi e Maristela Taufer pela colaboração e pertinentes sugestões;

Ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo suporte oferecido e oportunidade de realizar este estudo;

Aos membros da banca, pela pronta disponibilidade e contribuições;

À população de Bambuí cuja participação tornou possível esta realização;

À toda equipe do Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica, pela disponibilidade e auxílio;

À Rosamaria por toda ajuda, apoio e paciência;

Aos meus pais, por tudo que foram e sempre serão: berço, baliza, trampolim, farol, porto seguro e abrigo;

Ao Artur e Vitória por alegrias diárias, aprendizados contínuos e desafios constantes;

À Priscila e Agnes, por todo o apoio e ajuda. Em especial à Cíntia, pela amizade e disposição constante em nos ajudar e ensinar;

Aos Drs. Sílvio Monteiro Rezende e Maria Isabel Mendes Barbosa, pela compreensão e ajuda nestes anos;

A todos que de alguma forma participaram do processo de criação deste trabalho.

AGRADECIMENTO

À Agência financiadora - CNPq (Processo No. 470841 / 2004-4).

"No man is an island, entire of itself
Every man is a piece of the continent, a part of the main...
Any man's death diminishes me, because I am involved in mankind
And therefore never send to know for whom the bell tolls
It tolls for thee. "

John Donne (1572-1631) – Meditation XVII.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O envelhecimento populacional no Brasil	18
1.2 A hipertensão arterial	19
1.3 A apolipoproteína E	20
1.3.1 A participação da apolipoproteína E no metabolismo de lípidos	23
1.3.2 Os receptores celulares de apolipoproteína E	24
1.3.3 A evolução molecular e as variações populacionais nas freqüências alélicas da apolipoproteína E	25
1.3.4 A apolipoproteína E e a hipertensão arterial	26
1.3.5 Outras funções da apolipoproteína E no organismo humano	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 População estudada	31
4.2 Variáveis do estudo	32
4.3 Extração do DNA genômico e genotipagem da apoE	34
4.4 Análise estatística	35
5 ARTIGOS	37
5.1 "Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study."	38
5.2 "Association of ApoE polymorphisms with the prevalence of hypertension in 1,406 older adults: the Bambuí Health and Aging Study (BHAS)."	44
6 CONCLUSÕES	53

7	PERSPECTIVAS FUTURAS	54
	REFERÊNCIAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
C	citossina
G	guanina
T	timina
Apo E	apolipoproteína E
Apo E	gene da apolipoproteína E
Arg	arginina
Cys	cisteína
DA	Doença de Alzheimer
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DP	desvio padrão
DNA	ácido desoxirribonucléico
DMSO	dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
HA	hipertensão arterial
HDL colesterol	colesterol de alta densidade
HhaI	enzima de restrição de <i>Haemophilus haemolyticus</i>
HSPG/LRP	receptor de proteoglicanos heparan-sulfato / proteína relacionada ao
receptor de LDL	
IC 95%	intervalo de confiança a 95%
JNC 7	7º Relatório do Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure
LDL colesterol	colesterol de baixa densidade
LDL-R	receptor para lipoproteína de baixa densidade
MG	Minas Gerais
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	odds ratio
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
pb	pares de bases
PCR	"polymerase chain reaction" (reação em cadeia da polimerase)

RFLP	"restriction fragment length polymorphism" (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
SNP	"single-nucleotide polymorphism" (polimorfismo de nucleotídeo isolado)
SUS	Sistema Único de Saúde
TAq	<i>Thermus aquaticus</i>
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade

RESUMO

A apolipoproteína E (**apoE**) é um gene polimórfico, cujo produto protéico tem múltiplas funções no organismo humano, sobretudo no metabolismo lipídico. Tem sido investigado no contexto do envelhecimento, mas existem poucos estudos em populações bem definidas de idosos em países em desenvolvimento. Os objetivos deste trabalho foram (1) descrever a distribuição dos alelos comuns da **apoE** ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) e seus genótipos, numa população de 1.408 idosos (80,8% de todos os idosos com idade ≥ 60 anos) da linha de base da coorte de Bambuí, MG, Brasil, e estudar sua associação com variáveis demográficas (idade, sexo e cor da pele), (2) analisar a associação do polimorfismo da **apoE** com hipertensão arterial prevalente e variáveis biológicas (pressão arterial sistólica, diastólica, HDL colesterol, LDL colesterol e triglicérides), considerando potenciais fatores de confusão como idade, sexo, fatores de risco cardiovascular, ácido úrico e creatinina séricos. As amostras de DNA foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase e posteriormente digeridas com a enzima de restrição **HhaI**. O alelo $\epsilon 3$ predominou (80,0%), seguido pelo $\epsilon 4$ (13,5%) e $\epsilon 2$ (6,5%). Todos os seis genótipos possíveis foram observados, sendo o genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ o mais freqüente (63,4%). Esta distribuição é semelhante à descrita em populações ocidentais. A análise de associação com variáveis demográficas foi feita por regressão logística multinomial, usando como variáveis dependentes os três alelos, seis genótipos e o número de alelos $\epsilon 4$ por indivíduo. O sexo não se mostrou associado ao número de alelos $\epsilon 4$, mas a cor de pele negra apresentou forte associação com a presença de dois alelos $\epsilon 4$ (OR ajustado para idade e sexo = 7,38; IC 95% = 1,93-28,25), mostrando que Afro-brasileiros têm alta prevalência do alelo $\epsilon 4$, como observado em populações negras Africanas. Nenhuma associação foi encontrada entre idade e o polimorfismo da **apoE**, sugerindo ausência de associação entre os genótipos e mortalidade nesta população. Hipertensão arterial, definida como pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e / ou diastólica ≥ 90 mmHg, ou uso de medicação anti-hipertensiva, apresentou prevalência de 61,3%. Nas análises de associação com a pressão arterial e variáveis biológicas, a variável exploratória foi o genótipo da **apoE**, classificada em portadores de $\epsilon 2$ ($\epsilon 2\epsilon 2$ e $\epsilon 2\epsilon 3$) e portadores de $\epsilon 4$ ($\epsilon 4\epsilon 4$ e $\epsilon 3\epsilon 4$), tendo como grupo de referência os $\epsilon 3\epsilon 3$. Foram usados modelos de regressão linear múltipla para avaliar a associação com as variáveis biológicas e modelos de regressão de Poisson para estimar as razões de prevalência da hipertensão. Comparados aos homocigotos $\epsilon 3\epsilon 3$, os portadores de $\epsilon 2$ tinham níveis séricos mais baixos de LDL colesterol ($p < 0,001$) e

mais altos de triglicérides ($p = 0,022$), enquanto os portadores de $\epsilon 4$ tinham níveis séricos mais altos de LDL colesterol ($p = 0,036$). Os portadores de $\epsilon 2$ e de $\epsilon 4$ não mostraram associação com a hipertensão arterial prevalente (razões de prevalência ajustados = 0,94, IC 95% = 0,83-1,07 e 0,98; IC 95% = 0,89-1,07, respectivamente), fornecendo evidência epidemiológica para a ausência de associação entre os genótipos da **apoE** com a hipertensão arterial prevalente entre idosos.

ABSTRACT

Apolipoprotein E (**apoE**) is a polymorphic gene, whose protein product is involved in several key roles in the human body, especially in lipid metabolism. It has been investigated in the context of aging, but there are few studies in well defined populations from developing countries. The objectives of this study were (1) to describe the allelic and genotypic distribution of the common **apoE** polymorphism ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) in a population of 1,408 elderly members (80.8% of all residents ≥ 60 years of age) from the baseline of a cohort from Bambuí city, Brazil, and to evaluate its association with demographic variables such as age, gender and skin color and (2) to analyze the association of the **apoE** polymorphism with prevalent arterial hypertension and biological variables (systolic blood pressure, diastolic blood pressure, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides) in this population, considering potential confounding factors such as age, gender, cardiovascular risk factors, serum uric acid and creatinine. DNA samples were amplified by polymerase chain reaction and then digested with **HhaI** restriction enzyme. The $\epsilon 3$ allele was predominant (80.0%), followed by $\epsilon 4$ (13.5%) and $\epsilon 2$ (6.5%). All six possible genotypes were observed, with $\epsilon 3\epsilon 3$ being the most frequent (63.4%). This distribution is similar to that described in other western populations. Analysis of association with demographic variables was done by multinomial logistic regression, using as dependent variables the three alleles, six genotypes and the number of $\epsilon 4$ alleles per individual. Gender was not associated with the number of $\epsilon 4$ alleles, but black skin color was strongly and independently associated with the presence of two $\epsilon 4$ alleles (OR adjusted for age and gender = 7.38, 95% CI = 1.93-28.25), showing that African-Brazilians have a high prevalence of the $\epsilon 4$ allele, as described in black African populations. No association was found between age and **apoE** polymorphism, suggesting an absence of association between **apoE** genotypes and mortality in this population. Arterial hypertension defined as systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and / or diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg, or use of antihypertensive medication, was present in 61.3% of participants. For the analysis of association with prevalent arterial hypertension and biological variables the exposure variable was the **apoE** genotype, divided as $\epsilon 2$ carriers ($\epsilon 2\epsilon 2$ and $\epsilon 2\epsilon 3$) and $\epsilon 4$ carriers ($\epsilon 4\epsilon 4$ and $\epsilon 3\epsilon 4$), having $\epsilon 3$ homozygotes as the reference group. Multiple linear regression models were used to study association with biological variables and Poisson regression models to estimate prevalence ratios for hypertension. Compared to the $\epsilon 3$ homozygotes, $\epsilon 2$ carriers had lower levels of LDL cholesterol ($p < 0.001$) and higher levels of triglycerides ($p = 0.022$), while $\epsilon 4$ carriers had higher levels of

LDL cholesterol ($p = 0.036$). Neither the $\epsilon 2$ or $\epsilon 4$ carrier status was associated with hypertension (adjusted prevalence ratios = 0.94, 95% CI = 0.83-1.07 and 0.98, 95% CI = 0.89-1.07, respectively), providing epidemiologic evidence for the lack of association of apoE genotype with prevalent hypertension in old age.

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento de um organismo pode ser definido operacionalmente como a perda funcional ligada ao passar do tempo, que se manifesta após o organismo ter atingido sua máxima capacidade reprodutiva. O envelhecimento não é considerado adaptativo, ou seja, não é controlado por um programa genético direcionado como é, por exemplo, o desenvolvimento, e não traz vantagens específicas ao organismo. Possivelmente se origina da tendência da seleção natural de postergar as reações adversas dos genes até a idade avançada (Vijg J, Suh Y 2005).

Já o envelhecimento populacional diz respeito ao aumento proporcional progressivo dos indivíduos de faixas etárias mais avançadas. Este fenômeno observado mundialmente tem implicações para o indivíduo e para as sociedades. Traz consigo uma série de desafios a serem enfrentados, como, por exemplo, uma sobrecarga do sistema de saúde decorrente do aumento de patologias crônico-degenerativas de prevenção e diagnóstico onerosos, tratamento prolongado e morbi-mortalidade acentuada. Preocupações surgem também do ponto de vista judicial e tributário no que diz respeito à necessidade de uma legislação específica para um segmento da população que necessita de cuidados e cuidadores especiais e da precariedade do equilíbrio financeiro de um sistema previdenciário que corre sérios riscos de se tornar inviável (Camarano AA 2002).

Estas dificuldades presentes e futuras justificam a vasta literatura observacional e experimental que se acumula ao longo das últimas décadas, se debruçando sobre as questões ligadas ao envelhecer e ao seu retardamento, e à busca dos fatores ligados à longevidade.

Do ponto de vista da Biologia, hoje se busca de forma acelerada a compreensão de processos moleculares que possam explicar o envelhecimento e iluminar caminhos para estratégias que auxiliem no seu retardamento, "prevenção", ou que levem a formas mais "suaves" de se envelhecer e que, em contrapartida, possam levar à identificação de fatores genéticos associados à longevidade (Vijg J, Suh Y 2005).

1.1 O ENVELHECIMENTO POPULACIONAL NO BRASIL

O envelhecimento populacional é um fenômeno que foi inicialmente observado em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento também tem ocorrido a transição demográfica, que é uma das explicações para o processo do envelhecimento populacional. O Brasil, em particular, tem observado um aumento progressivo da expectativa de vida da sua população, associada a uma drástica redução nas taxas de fecundidade, ocasionando assim um deslocamento progressivo do quantitativo populacional das faixas etárias mais jovens para as mais idosas (Carvalho JAM, Garcia RA 2003; Ramos LR 2002).

No Brasil, este processo de transição demográfica levou cerca de metade do tempo para a sua concretização, quando comparado ao que ocorreu em países europeus. Em 2000 a população idosa do Brasil (com idade ≥ 60 anos) era de 14,5 milhões de pessoas de um total de aproximadamente 169.800.000 (11,7%), sendo cerca da metade dos idosos residente na região Sudeste (Ministério da Saúde – DATASUS 2007). Estima-se ainda que em 2025 o Brasil seja o país com a sexta maior população idosa do mundo – algo em torno de 32 milhões de pessoas (Ramos LR 2002).

Paralelamente à transição demográfica ocorre a transição epidemiológica, que se caracteriza pela redução da incidência das doenças infecto-contagiosas e o aumento das doenças crônico-degenerativas. Como mencionado acima, estas doenças, tais como as patologias cardiovasculares (sendo a mais freqüente a hipertensão arterial – HA) e as doenças neurodegenerativas (por exemplo, demências como Doença de Alzheimer – DA) estão listadas entre as principais causas de morbi-mortalidade entre os idosos. Sua prevenção e diagnóstico requerem a utilização de instrumentos diagnósticos muitas vezes sofisticados e onerosos, além de exigir do indivíduo disciplina no seguimento de um programa dietético e / ou medicamentoso e de hábitos de vida saudável. Seu tratamento é vitalício a partir do momento do seu diagnóstico, e ainda assim sem a garantia absoluta de evitar as temidas complicações a elas associadas. E por fim, as complicações, quando ocorrem, implicam muitas vezes em óbito ou significativa perda funcional, requerendo pesados investimentos pessoais e sociais para a reabilitação individual (Ramos LR 2002).

No Brasil as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade entre os idosos, somando mais mortes que a segunda e terceira causas de morte associadas

(respectivamente as neoplasias e doenças respiratórias) (Ministério da Saúde - DATASUS 2007).

1.2 A HIPERTENSÃO ARTERIAL

As doenças cardiovasculares são patologias altamente prevalentes e de fisiopatogênese complexa. Seu desenvolvimento depende da interação entre genética e meio ambiente. Delas, a mais freqüente é a hipertensão arterial, definida no 7º relatório do Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7) de 2003, como sendo a presença de pressão arterial (PA) sistólica igual ou maior a 140 mmHg e / ou PA diastólica igual ou maior a 90 mmHg (Chobanian AV, et 2003). A prevalência da HA aumenta paralelamente ao aumento da idade, afetando mais da metade dos indivíduos com 60 a 69 anos e cerca de três - quartos daqueles com mais de 70 anos de idade (Chobanian AV, et al 2003). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um em cada oito indivíduos do mundo seja hipertenso, totalizando cerca de um bilhão de pessoas, e que cerca de 7,1 milhões de mortes por ano sejam atribuíveis aos efeitos da HA (World Health Report 2002).

A hipertensão arterial é um dos principais determinantes de risco cardiovascular. Dados de estudos observacionais envolvendo mais de um milhão de indivíduos mostram que o risco de morte devido à doença isquêmica do coração ou acidente vascular cerebral (AVC) aumenta de forma contínua e linear a partir de níveis de PA sistólica e diastólica tão baixos quanto 115/75 mmHg. Este risco afeta todas as faixas etárias dos 40 aos 89 anos. Para cada incremento de 20 mmHg na PA sistólica ou de 10 mmHg na PA diastólica a mortalidade por doença cardíaca isquêmica e AVC aumenta em 100% (Chobanian AV, et al 2003).

A hipertensão arterial faz parte de uma lista de fatores de risco cardiovascular que inclui sexo, idade, alterações lipídicas (dislipidemia e baixos níveis de HDL colesterol), nível sérico de ácido úrico, diabetes mellitus, história familiar de doença cardiovascular, tabagismo e sedentarismo.

O interesse em relação ao componente genético individual que predisporia, contribuiria ou determinaria o surgimento das patologias cardiovasculares, dentre elas a HA, vem de longa data. Entretanto, foi o desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular

que ocorreu ao longo das últimas três décadas que permitiu decisivamente a identificação de vários genes candidatos associados ao desenvolvimento fenotípico das doenças cardiovasculares e da hipertensão arterial em suas várias formas. Dentre estes genes um dos mais estudados é o da apolipoproteína E (**apoE**) (Song Y, et al 2004; Wilson PWF, et al 1996).

A **apoE** possui múltiplas funções metabólicas que podem explicar sua associação tanto com a longevidade quanto com o desenvolvimento de doenças ligadas ao envelhecimento (Mahley RW 1988). Descreveremos a seguir, em maior detalhe, a estrutura molecular da **apoE** e sua participação metabólica.

1.3 A APOLIPOPROTEÍNA E

O gene da apolipoproteína E contém 3,6 kilobases e se encontra localizado no braço longo do cromossomo 19, próximo aos genes das apolipoproteínas C I, C II e C IV. O gene da **apoE** contém quatro exons e três introns que codificam uma proteína que é secretada para o meio extracelular. O produto protéico primário possui 317 aminoácidos e contém um peptídeo sinalizador de 18 aminoácidos na sua extremidade amino-terminal, que direciona a proteína nascente para o retículo endoplasmático. A proteína madura, de 299 aminoácidos é então transportada para o complexo de Golgi, onde sofre glicosilação, com a adição de cadeias glicídicas contendo ácido siálico (Das HK, et al 1985; Greenow K, et al 2005; Paik Y-K, et al 1985).

Análises físicas e bioquímicas mostraram que a **apoE** se constitui por duas regiões funcionais interligadas por uma região de estrutura não ordenada. A região amino-terminal, contendo os resíduos 1 a 191, contém as regiões que mediam a ligação aos receptores das membranas celulares e à heparina (proteoglicanos). Já a região carboxi-terminal, englobando os resíduos 216 a 299, parece ser um domínio funcionalmente independente, contendo o principal sítio de ligação aos lipídeos (Greenow K, et al 2005; Mahley RW, Rall Jr. SC 2000).

A região amino-terminal se ordena formando quatro α -hélices anfipáticas (resíduos 24-42, 54-81, 87-122, 130-164, respectivamente) em arranjo antiparalelo, com as faces

hidrofóbicas voltadas para o interior do arranjo. Uma curta hélice adicional (resíduos 44-53) conecta as α -hélices 1 e 2. Esta região amino-terminal contém os sítios de reconhecimento para dois receptores celulares distintos, o receptor para a lipoproteína de baixa densidade ("low-density lipoprotein receptor" - LDL-R) e o receptor de proteoglicanos heparan-sulfato / proteína relacionada ao receptor de LDL ("heparan-sulphate proteoglycan / LDL receptor related protein" – HSPG / LRP). Um segmento da α -hélice 4 (resíduos 136-150), que é rico em aminoácidos básicos (arginina e lisina) é essencial para a interação com os resíduos ácidos dos receptores de membrana celular. A importância destes resíduos de arginina e lisina foi demonstrada por mutagênese sítio-específica e modificação química. Experimentos que removeram parcial ou totalmente estes resíduos básicos levaram à redução ou abolição da interação da apoE com seus receptores de membrana celular (Greenow K, et al 2005; Mahley RW, Rall Jr. SC 2000; Weisgraber KH 1994).

O segmento contendo a α -hélice 4 também contém um sítio de alta afinidade para a ligação aos proteoglicanos heparan-sulfato, com os resíduos de arginina e lisina interagindo com as cargas negativas dos grupos carboxilato e sulfato dos proteoglicanos.

A estrutura da região carboxi-terminal é menos compreendida, mas se acredita que ela adote uma conformação de α -hélice anfipática. Os resíduos 243-272 provavelmente contêm um sítio de ligação à heparina.

O locus gênico da apoE é polimórfico, tendo sido identificados 22 loci variáveis no locus da apoE e nas regiões flangeadoras 5' e 3'. Vinte e um destes polimorfismos são polimorfismos dialélicos de nucleotídeo isolado ("single-nucleotide polymorphism" – SNP) e um é um polimorfismo de inserção / deleção multialélico. Dois destes SNPs em região codificadora do exon 4 (posição 3937 e 4075 da seqüência gênica) determinam a existência de três alelos comuns que são aqueles tradicionalmente investigados na vasta maioria dos estudos publicados. Estes alelos são denominados ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4 e codificam três isoformas da proteína – apoE 2, apoE 3 e apoE 4. Estes alelos determinam a existência de seis genótipos possíveis, sendo três homozigotos (ϵ 2 ϵ 2, ϵ 3 ϵ 3 e ϵ 4 ϵ 4) e três heterozigotos (ϵ 2 ϵ 3, ϵ 2 ϵ 4 e ϵ 3 ϵ 4), com seis fenótipos resultantes (Fullerton SM, et al 2000).

Outra fonte de polimorfismo, determinado não-geneticamente, foi identificada pela focalização isoelétrica, que era o método inicial de diferenciação das isoformas da apo E, antes do advento das técnicas de Biologia Molecular. Este polimorfismo ocorre pela

sialilação pós-tradução (adição de resíduos de ácido siálico, com carga negativa, à proteína apo E madura), gerando isoformas mais raras (Mahley RW, et al 1984; Mahley RW, Rall Jr. SC 2000).

A isoforma mais comum em todas as populações estudadas é a apoE 3. As outras duas isoformas comuns diferem da apoE 3 pela substituição de um único aminoácido. A apoE 3 possui uma cisteína no resíduo 112 e uma arginina no resíduo 158. A apoE 2 possui cisteínas em ambas as posições, enquanto a apoE4 possui argininas nestes locais. (Mahley RW, Rall Jr. SC 2000).

Embora sutis, estas mudanças de um único aminoácido determinam profundas alterações estruturais e funcionais das isoformas da apoE. A substituição da Arg 158 pela cisteína que ocorre na apoE 2 modifica ligações iônicas dentro da α -hélice 4 e outras ligações iônicas entre as α -hélices 3 e 4. Também reduz o potencial iônico positivo da região de ligação a receptores dos resíduos 140-150. Esta redução do potencial iônico positivo parece ser a causa principal da redução da afinidade da apoE 2 pelo LDL-R, porque reduz a força da ligação iônica com os resíduos de carga negativa do LDL-R. A apoE2 possui afinidade de ligação ao LDL-R que varia de menos que 2% a cerca de 45% da afinidade da apoE 3.

Já a substituição da cisteína 112 pela arginina que ocorre na apoE 4 cria uma nova ligação iônica entre o ácido glutâmico na posição 109 e a arginina 112 na α -hélice 3 e determina ainda que a cadeia lateral da arginina 61 seja deslocada para uma posição mais exposta na α -hélice 2. Esta exposição possibilitará a formação de uma ligação iônica entre a cadeia lateral da arginina 61 com a cadeia lateral do ácido glutâmico 255 que se encontra na região crítica para ligação às lipoproteínas do domínio carboxi-terminal. (Mahley RW, Rall Jr. SC 2000).

A interação entre as regiões amino e carboxi-terminais da apoE 4 causa uma mudança conformacional da proteína que redireciona a preferência da apoE4 para a ligação com as lipoproteínas de muito baixa densidade ("very low-density lipoproteins – VLDL), ao invés das lipoproteínas de alta densidade ("high-density lipoproteins – HDL), como ocorre na apoE 3. Estas modificações têm implicações para a participação da apoE no metabolismo de lípidos, como será detalhado a seguir.

1.3.1 A participação da apolipoproteína E no metabolismo de lípidos

A apoE é sintetizada em sua maior parte pelo fígado, sendo que cerca de 20-40% da proteína circulante é produzida por fontes extra-hepáticas, tais como o cérebro, baço, pulmões, ovários, glândulas supra-renais, rins, músculos e macrófagos. Sua concentração plasmática habitual é de 3 a 7 mg/dL em indivíduos normolipidêmicos, mas pode chegar a 20 a 60 mg/dL em certos indivíduos com hiperlipidemia, especialmente na hiperlipidemia do tipo III (Mahley RW, et al 1984).

A apoE participa do metabolismo lipídico realizando a transferência de lípidos entre diferentes tecidos do organismo ou entre células de um mesmo tecido. Participa do transporte de lípidos de origem exógena (dietética), sendo incorporada aos quilomícrons imediatamente após a síntese e secreção destes pelo intestino delgado. A apoE também é incorporada às partículas de VLDL na medida em que são secretadas pelo fígado. Estas duas lipoproteínas adquirem mais apoE à medida que circulam no interior dos capilares. A superfície endotelial realiza a lipólise destas partículas através da enzima lipoproteína lipase. A hidrólise dos triglicérides libera ácidos graxos para a produção de energia pelas células.

Deste modo a apoE direciona o fluxo do colesterol e triglicérides exógenos (dietéticos) para as células hepáticas na forma de remanescentes de quilomícrons, que são os produtos da lipólise endotelial dos quilomícrons. Lá os ácidos graxos dietéticos podem ser metabolizados ou re-secretados na forma de triglicérides nas VLDL e o colesterol pode ser excretado através da bile. A apoE direciona ainda o colesterol e triglicérides endógenos para as células extra-hepáticas através das VLDL e das remanescentes das VLDL.

Adicionalmente, um processo denominado de transporte reverso de colesterol é responsável pela remoção do excesso de colesterol das células, sendo este levado ao fígado para eliminação através de partículas de lipoproteínas ricas em triglicérides e LDL que incorporam apoE para o direcionamento e captação pelo fígado (Greenow K, et al 2005).

A captação celular das partículas lipídicas contendo apoE se dá por meio de receptores de membrana celular.

1.3.2 Os receptores celulares de apolipoproteína E

Existem dois tipos de receptores envolvidos nestes processos de transporte e captação de lípidos mediados pela apoE. O primeiro é o receptor de lipoproteínas de baixa densidade ("low-density lipoprotein receptor" - LDL-R), presente em células hepáticas e extra-hepáticas. Os dois ligandos para este receptor são a apoE presente nos quilomícrons e VLDL e a apoB 100 presente nas LDL. A ligação da apoE ao LDL-R é muito mais potente que a da apoB 100 e regula os níveis de receptores nas membranas por um mecanismo de retroalimentação.

O segundo tipo de receptor é o receptor de proteoglicanos heparan-sulfato / proteína relacionada ao receptor de LDL ("heparan-sulphate proteoglycan / LDL receptor related protein" – HSPG / LRP), uma proteína da família do LDL-R. Este receptor possui múltiplos ligandos, incluindo a apoE. Estes receptores estão presentes sobretudo no fígado, onde participam do metabolismo das lipoproteínas remanescentes (Mahley RW, Rall Jr. SC 2000).

As três isoformas da apoE se comportam de modo diferente quanto à participação no transporte de lípidos. A apoE 3, por ser a forma mais comum em todas as populações estudadas, é considerada a referência e desta forma contribui pouco para as variações interindividuais e interpopulacionais nos níveis de lipídeos.

Já a apoE 2, devido à sua capacidade de ligação ao LDL-R muito reduzida, tende a levar ao aumento dos níveis séricos de apoE e triglicérides e à redução dos níveis de apoB e colesterol. Em contraste, a apoE 4 se associa com níveis reduzidos de apoE, mas aumentados de apoB e colesterol. Foi estimado em diversos estudos populacionais que a apoE possa ser responsável por até 10% da variação total do colesterol nas populações (Davignon J, et al 1988).

1.3.3 A evolução molecular e as variações populacionais nas frequências alélicas da apolipoproteína E

Estudos em primatas não-humanos revelaram que eles carregam o alelo $\epsilon 4$, sugerindo que este seja na realidade o alelo ancestral e que os demais alelos surgiram após a divergência das linhagens humana e dos chimpanzés pela ocorrência de mutações, tendo se espalhado nos humanos posteriormente (Fullerton SM, et al 2000; Hanlon CS, Rubinsztein DC 1995; Hixson JE, et al 1988). Corbo e Scacchi, (1999) sugerem que o alelo $\epsilon 3$, além de ser o mais freqüente em todas as populações estudadas é, na maioria das vezes, negativamente correlacionado com o alelo $\epsilon 4$, indicando que o alelo ancestral $\epsilon 4$ foi sendo progressivamente substituído pelo novo alelo que leva à mutação 112arg \rightarrow cys (Corbo RM, Scacchi R 1999).

Estudos realizados ao longo das últimas duas décadas mostraram que a frequência do alelo $\epsilon 4$ é mais alta naqueles grupos populacionais onde uma economia de caça ("hunter-gatherers") ainda existe – por exemplo, nos Khoi San (bosquímanos) da África do Sul (Sandholzer C, et al 1995), aborígenes da Malásia e Austrália, nativos da Papua Nova Guiné (Hallman DM, et al 1991), Americanos nativos (Demarchi DA, et al 2005) e Lapões da Finlândia (Gerdes LU, et al 1996). Pelo fato do alelo $\epsilon 4$ ser associado a uma maior absorção intestinal de colesterol e a níveis mais elevados de colesterol plasmático (Kesäniemi YA, et al 1987), indivíduos portadores deste alelo seriam favorecidos num ambiente onde o suprimento alimentar fosse restrito, disponível esporadicamente ou qualitativamente pobre, pois teriam maior possibilidade de equilibrar seus níveis de colesterol, que de outra forma poderiam ser baixos demais para suas funções metabólicas.

A permanência do alelo $\epsilon 4$ em grupos populacionais "ocidentalizados", onde prevalece uma dieta muito diferente daquela dos nossos ancestrais hominídeos, com quantidade reduzida de fibra e níveis extremamente mais elevados de sódio e colesterol pode desta forma permitir a eclosão de efeitos deletérios do gene decorrentes do acúmulo de LDL colesterol. O exemplo clássico destes efeitos deletérios é o das doenças cardiovasculares (Milton K 1993).

Vários estudos foram conduzidos ao longo das últimas duas décadas, verificando as frequências alélicas e genotípicas da apoE em populações de todos os continentes (ver, por

exemplo, Corbo RM, Scacchi R 1999; Gerdes LU, et al 1996). Em todas as populações o alelo $\epsilon 3$ é o mais freqüente, com freqüências que variam de 50-90%. Na maioria dos casos o alelo $\epsilon 4$ é o segundo em freqüência (5-35%), enquanto que o $\epsilon 2$ varia de 1-15%. Deve-se ressaltar que muitos estudos utilizaram amostras populacionais reduzidas.

Estudos em populações européias mostram um gradiente de freqüência do alelo $\epsilon 4$, com as populações mediterrâneas tendo baixas freqüências, que aumentam gradativamente à medida que se caminha para o norte europeu (Corbo RM, Scacchi R 1999; Gerdes LU, et al 1996). As populações do norte da Europa, em particular os finlandeses, e populações africanas (Nigéria, África do Sul, Sudão) são as que possuem as maiores freqüências de apoE 4. As populações Ameríndias se caracterizam pela quase total ausência do alelo $\epsilon 2$, sugerindo que talvez este alelo possa ter sido introduzido nestas populações nativas pelo contato com populações européias (Demarchi DA, et al 2005).

O alelo $\epsilon 2$ parece flutuar nos grupos humanos onde está presente sem qualquer tendência particular discernível (Corbo RM, Scacchi R 1999).

1.3.4 A apolipoproteína E e a hipertensão arterial

Alguns autores postulam que a apoE possa ter um efeito sobre os níveis pressóricos através do seu papel na aterogênese, sendo a presença de aterosclerose necessária para a indução de déficits no relaxamento vascular dependente do endotélio, ou por um mecanismo renovascular (Panza JA, et al 1990; Uusitupa M, et al 1994; Yang R, et al 1999).

Outro estudo sugeriu que a apoE possa mediar a hipertensão arterial por um efeito direto na vasoconstrição, com a isoforma apoE 4 tendo o maior efeito vasoconstritor sobre anéis aórticos *in vitro*, seguida pela apoE 3 e apoE 2 (Paris D, et al 1998).

1.3.5 Outras funções da apolipoproteína E no organismo humano

Além das suas funções específicas no metabolismo dos lípidos, a apoE desempenha funções em outros sistemas. Tem importante papel na neurobiologia, sendo produzida em abundância no cérebro e servindo como o principal meio de transporte de lípidos no líquido céfalo-raquidiano. É secretada em altas concentrações nos locais onde ocorrem danos a nervos periféricos e parece desempenhar um papel-chave no reparo neuronal, redistribuindo lípidos a axônios em regeneração e a células de Schwann durante a remielinização. *In vitro*, modula o crescimento de prolongamentos neuronais em culturas de células ganglionares de raízes dorsais de coelhos. Nestes modelos, a apoE 3 e apoE 2 se associam com uma substância transportadora de lipoproteínas que encaminha a apoE a receptores específicos de superfície celular, induzindo os neurônios a produzirem prolongamentos celulares longos. Já a apoE 4 está associada a uma inibição do crescimento dos prolongamentos de neurônios (Mahley RW, Rall Jr. SC 2000).

A apoE está implicada no surgimento da doença de Alzheimer (Corder EH, et al 1993; Farrer LA, et al 1997). A apoE 3 estimula a polimerização da β -tubulina e estabiliza a formação de microtúbulos em culturas celulares de neurônios, enquanto que a apoE 4 desestabiliza os complexos de microtúbulos. Strittmatter e colaboradores levantaram a hipótese de que a apoE 3, que interage de forma preferencial com a proteína tau, associada aos microtúbulos, protege a tau da hiperfosforilação. A hiperfosforilação impede a proteína tau de interagir com os microtúbulos e resulta em depósitos intracelulares de tau, que formam os emaranhados neurofibrilares presentes na doença de Alzheimer (Strittmatter WJ, et al 1994).

Adicionalmente, a apoE se associa com as placas amilóides no meio extracelular do cérebro de pacientes com doença de Alzheimer. A apoE 4 forma complexos insolúveis de alto peso molecular com peptídeo amilóide- β , levando à formação de monofibrilas amilóides densas *in vitro*. Já a apoE 3 é menos reativa e não resulta na formação de complexos tão extensos (Sanan DA, et al 1994).

A apoE tem ainda importante papel na captação de antígenos lipídicos séricos e sua apresentação ao compartimento endossomal de células apresentadoras de antígenos, através de endocitose mediada por receptores. Pode ser secretada pelas células apresentadoras de

antígenos como um mecanismo de varredura do microambiente local para a captura de antígenos, ou para a transferência de antígenos lipídicos microbianos de células infectadas para células apresentadoras de antígenos circunvizinhas (van den Elzen P, et al 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Embora estudos sobre o polimorfismo da **apo E** existam em diversos grupos populacionais, no Brasil estudos realizados em populações bem definidas baseadas em comunidade são raros e todos tiveram uma amostragem relativamente pequena, de menos de 500 participantes. Somente dois estudos envolveram primariamente indivíduos idosos.

O presente trabalho descreve o maior estudo populacional brasileiro sobre a distribuição do polimorfismo da **apoE** e sua associação com a hipertensão arterial, em indivíduos idosos residentes na comunidade. Como exposto na Introdução a população de idosos brasileiros é numerosa e está aumentando rapidamente, entretanto, sua representação em estudos científicos ainda é proporcionalmente pequena.

Adicionalmente, embora exista um corpo de literatura considerável sobre a associação da **apoE** com variáveis lipídicas como fatores de risco cardiovascular, dados sobre a associação da **apoE** com a hipertensão arterial, em estudos populacionais, são relativamente escassos e controversos. Estes estudos são ainda mais raros na população idosa, onde se encontram as maiores prevalências da hipertensão arterial.

O polimorfismo da **apoE** tem grande importância devido à suas múltiplas funções, em especial pela sua participação no metabolismo de lipídeos e associação com doenças crônico-degenerativas associadas ao envelhecimento. Estudos de sua distribuição e associação com doenças ligadas ao envelhecimento são de interesse populacional.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Descrever a distribuição do polimorfismo da **apoE** numa população idosa brasileira residente na comunidade e estudar sua associação com variáveis demográficas, bioquímicas e com a hipertensão arterial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo da **apoE** em 1.408 indivíduos brasileiros de uma coorte de idosos residentes na comunidade da cidade de Bambuí, Minas Gerais.

- Realizar a análise de associação dos alelos, genótipos e do número de alelos $\epsilon 4$ por indivíduo com as variáveis idade, sexo e cor da pele nesta amostra.

- Verificar a associação das variáveis biológicas pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), LDL colesterol e triglicérides com o genótipo de **apo E** numa amostra de 1.406 indivíduos desta população.

- Avaliar a associação do polimorfismo da **apoE** com a hipertensão arterial prevalente nesta população.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Os sujeitos do presente estudo provêm da cidade de Bambuí, localizada na região sudoeste do estado de Minas Gerais. A cidade continha cerca de 15.000 habitantes em 1996, quando foi realizada a linha de base do Projeto Bambuí, e esta população tem se mantido estável ao longo da última década. As doenças cerebrovasculares constituem a principal causa de mortalidade, seguidas pela doença de Chagas e pelas doenças cardíacas. A alta prevalência de doença de Chagas ocorre por Bambuí ter sido área endêmica da doença, com o ciclo de transmissão do agente tendo sido interrompido através de programas de saneamento e habitação promovidos pelo governo brasileiro.

O Projeto Bambuí foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro em 1996 e o projeto do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, em 2006. Todos os participantes do estudo forneceram consentimento informado escrito para a participação.

O Projeto Bambuí tem um desenho prospectivo. Os indivíduos estudados no presente trabalho fazem parte da linha de base da coorte.

Em novembro e dezembro de 1996 um censo foi realizado na cidade de Bambuí para a identificação inicial dos participantes. Todos os residentes na cidade à época, com idade maior ou igual a 60 anos, foram considerados aptos para participarem do estudo ($n = 1.742$).

A amostra inicial do presente trabalho consistia dos 1.496 indivíduos que foram entrevistados, submetidos ao exame físico e que tiveram amostras de sangue colhidas para a realização de estudos laboratoriais e para a extração de DNA (85,9% dos residentes idosos na linha de base). Os participantes examinados eram semelhantes à população total quanto ao sexo, idade, número de habitantes por domicílio, estado civil, renda familiar e escolaridade (Lima-Costa, MF, et al 2000).

Os resultados contidos neste volume de Tese dizem respeito a dois grupos de análises que foram submetidas independentemente para publicação. A primeira análise inclui dados da frequência alélica e genotípica do polimorfismo da apoE em idosos de Bambuí e o estudo de sua associação com variáveis demográficas desta população (idade, sexo e cor da pele).

O segundo trabalho analisa a associação do polimorfismo da apo E com fatores de risco cardiovascular como a idade, sexo, história de tabagismo e etilismo, atividade física, história familiar de doença cardiovascular, diabetes mellitus, PA sistólica, PA diastólica, índice de massa corporal (IMC), HDL colesterol, LDL colesterol, triglicérides, ácido úrico e creatinina séricas, e com a prevalência de HA na linha de base desta coorte.

4.2 VARIÁVEIS DO ESTUDO

As variáveis sócio-demográficas, condições de saúde, hábitos de vida e uso de medicamentos foram coletados por entrevistas realizadas nos domicílios dos participantes. Os entrevistadores tinham no mínimo onze anos de escolaridade e haviam sido previamente treinados pelos responsáveis pelo estudo. Os exames físicos e a coleta das amostras de sangue foram feitos no Posto Emmanuel Dias em Bambuí, com agendamento prévio, ou na própria residência do participante, quando havia dificuldade de locomoção.

Para a classificação da cor da pele, os entrevistadores compararam a cor da pele dos participantes com cartões contendo fotografias de indivíduos representativas das quatro categorias de cor da pele (branca, moreno, mulato e negra) e em seguida realizaram a classificação.

Os participantes foram classificados como tabagistas quando relatavam ter fumado pelo menos 100 cigarros durante sua vida e ainda fumavam (Wortley PM, et al 2003). Para a estimativa da ingestão etílica foram mostrados aos participantes cartões com representações da quantidade de líquido correspondente a um drinque (cartões diferentes para cerveja, destilados e vinho). O consumo de álcool foi calculado se multiplicando o número de doses pela frequência de uso semanal nos 12 meses anteriores.

Atividade física foi definida como qualquer exercício realizado pelo participante por 20 a 30 minutos, três vezes ou mais por semana, durante o seu tempo de lazer, nos 90 dias antecedentes.

A presença de diabetes mellitus foi definida por uma medida de glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL, e/ou uso atual de insulina ou de hipoglicemiantes orais, como definido pelos critérios revisados de 2003 da Associação Americana de Diabetes (Genuth S, et al 2003).

Os níveis séricos de LDL colesterol, HDL colesterol, triglicérides, creatinina e ácido úrico foram determinados após um jejum de 12 horas, utilizando kits comerciais (Boehringer Mannheim, Alemanha) e um analisador automático (Eclipse Vitalab, Merck, Holanda) (Lima-Costa MF, et al 2000). Todas as amostras de sangue foram colhidas após um jejum noturno recomendado de 12 horas. As amostras foram separadas e enviadas sob refrigeração para o laboratório de pesquisa em Belo Horizonte para processamento.

O índice de massa corporal (peso [kg]/altura [m]²) foi calculado a partir das medidas de altura e peso registradas com equipamento próprio (CMS Weighing Equipment Ltd., Reino Unido).

A pressão arterial foi medida no mínimo 30 minutos após a última ingestão de cafeína ou cigarro fumado, usando esfigmomanômetros de coluna de mercúrio (Tyco 5097-30, EUA) e estetoscópios Littman Cardiology II (St. Paul, Minnesota, EUA). Foram realizadas três medidas, após cinco minutos de repouso, com intervalos de dois minutos. A pressão arterial foi considerada como a média aritmética da segunda e terceira medidas. Quando uma medida elevada de PAS ou PAD foi encontrada o processo de medida foi repetido em dois dias separados. A hipertensão arterial foi definida como PAS \geq 140 mmHg e/ou PAD \geq 90 mmHg, ou uso de medicação anti-hipertensiva, de acordo com os critérios do VII Joint National Committee (Chobanian AV, et al 2003).

O uso atual de medicação anti-hipertensiva foi certificada pela revisão das receitas médicas ou invólucros de medicamentos, e pela codificação da medicação conforme descrito pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization. Capturado 10 de fevereiro de 2005).

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E GENOTIPAGEM DA APOE

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue utilizando-se o kit de extração de DNA Wizard[®] Genomic DNA Purification System (Promega – Madison, Wisconsin, EUA). O DNA extraído foi armazenado a -70° C até o uso.

Para a genotipagem da **apoE** as amostras de DNA foram submetidas à amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito por Hixson & Vernier, com pequenas modificações (Hixson JE, Vernier DT 1990).

A mistura para reação da PCR continha 1,5 U de DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (TAq) 50 pmol do primer **forward** (5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3'), 50 pmol do primer **reverse** (5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC 3'), 2 µL da mistura de desoxirribonucleotídeos tri-fosfato, 1 µL de MgCl₂ TAq, 2,5 µL de tampão TAq, 2,5 µL de DMSO e 13,2 µL de H₂O Milli-Q[®]. As misturas para PCR foram submetidas a uma desnaturação inicial de cinco minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de amplificação com anelamento a 60°C por um minuto, extensão a 72°C por dois minutos e desnaturação a 95°C por um minuto e, por fim, por uma extensão final a 72°C por dez minutos.

O DNA amplificado foi submetido à técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição ("restriction fragment length polymorphism" - RFLP), com digestão com 10 unidades da enzima **HhaI**, a 37°C durante a noite. A visualização dos fragmentos de restrição foi feita após corrida em géis de agarose a 4%, tratamento com brometo de etídio e visualização com luz ultravioleta.

Os fragmentos de restrição gerados pelos sítios polimórficos da **HhaI** foram os seguintes: ε2 ε2 – 91 e 83 pb, ε3 ε3 – 91, 48 e 35 pb, ε4 ε4 – 72, 48 e 35 pb, ε2 ε3 – 91, 83 e 48 pb, ε2 ε4 – 91, 83, 72 e 48 pb e ε3 ε4 – 91, 72 e 48 pb. A avaliação dos fragmentos de restrição foi feita por comparação com um padrão de DNA de 100 pb.

A genotipagem da **ApoE** foi realizada em colaboração com o Laboratório do Dr. Emílio H. Moriguchi no Rio Grande do Sul.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No primeiro trabalho a variável dependente foi o polimorfismo da **apoE**. A análise foi feita categorizando o polimorfismo de três formas: 1) os três alelos da **apoE** (ϵ_2 , ϵ_3 e ϵ_4), 2) os seis genótipos ($\epsilon_2 \epsilon_2$, $\epsilon_2 \epsilon_3$, $\epsilon_2 \epsilon_4$, $\epsilon_3 \epsilon_3$, $\epsilon_3 \epsilon_4$, $\epsilon_4 \epsilon_4$) e 3) o número de alelos ϵ_4 por indivíduo (0, 1 ou 2 alelos), devido às associações relatadas do alelo ϵ_4 com doenças crônico-degenerativas do envelhecimento e com alterações aterogênicas do perfil lipídico (Davignon J, et al 1988; Greenow K, et al 2005).

As variáveis independentes foram idade (categorizada em 60-69, 70-79 e 80 ou + anos), sexo e cor da pele (branca, morena, mulata e negra).

As frequências alélicas foram determinadas pela contagem gênica. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado utilizando-se um teste qui-quadrado ("goodness-of-fit"). As análises de associação foram feitas utilizando o teste qui-quadrado de Pearson e a regressão logística multinomial.

Para o segundo trabalho, as médias e erros-padrão, ajustadas por idade e sexo, para as variáveis PAS, PAD, HDL colesterol, LDL colesterol e triglicérides foram calculadas para cada genótipo da **apoE**. Foi usada a regressão linear múltipla para se testar a associação dos genótipos da **apoE** com as variáveis acima descritas, com ajustes para a idade e sexo. A análise não-ajustada da associação dos alelos e genótipos da **apoE** com a HA prevalente foi baseada no teste qui-quadrado de Pearson.

Modelos de regressão de Poisson foram usados para estimar as razões de prevalência (RP) para a HA (Zou G 2004). Os modelos da regressão de Poisson incluíram idade e sexo (modelo 1) e idade, sexo, tabagismo, consumo de álcool, atividade física, história familiar de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, HDL colesterol, LDL colesterol, ácido úrico, creatinina e IMC (modelo 2). Para as análises ajustadas, os genótipos da **apoE** foram codificados em três grupos: 1) portadores de ϵ_3 (genótipo $\epsilon_3 \epsilon_3$), 2) portadores de ϵ_2 (genótipos $\epsilon_2 \epsilon_2$ e $\epsilon_2 \epsilon_3$) e 3) portadores de ϵ_4 (genótipos $\epsilon_4 \epsilon_4$ e $\epsilon_3 \epsilon_4$). Em cada modelo os homocigotos $\epsilon_3 \epsilon_3$ foram o grupo de referência. Vinte indivíduos com genótipo $\epsilon_2 \epsilon_4$ foram excluídos destas análises devido aos efeitos opostos destes dois alelos sobre os níveis de LDL colesterol. Como nenhuma diferença foi notada na análise separada por sexo, os

resultados são apresentados para a amostra total. A significância estatística nestes modelos foi avaliada pelo teste de Wald.

As análises foram realizadas usando as versões 7.1 e 9.1 do programa estatístico Stata (Stata Corporation, College Station, Texas, EUA).

5 ARTIGOS

Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study

A.K. Fuzikawa¹,
S.V. Peixoto¹,
M. Taufer²,
E.H. Moriguchi^{2,3}
and M.F. Lima-Costa¹

¹Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil
²CMIC Brasil Pesquisas Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil
³Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Abstract

Apolipoprotein E (**ApoE**) is one of the most extensively studied genes in the context of aging, but there are few population-based studies on **ApoE** polymorphism in the elderly in developing countries. The objective of the present study was to assess **ApoE** allele and genotype distribution in a large elderly community-based sample and its association with age, sex and skin color. Participants included 1408 subjects (80.8% of all residents aged ≥ 60 years) residing in Bambuí city, MG, Brazil. The DNA samples were subjected to the polymerase chain reaction amplification, followed by the restriction fragment length polymorphism technique, with digestion by *HhaI*. Analysis was carried out taking into consideration the six **ApoE** genotypes ($\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, and $\epsilon 2/\epsilon 2$), the three **ApoE** alleles, and the number of **ApoE4** alleles for each individual. The $\epsilon 3$ allele predominated (80.0%), followed by $\epsilon 4$ (13.5%) and $\epsilon 2$ (6.5%). All six possible genotypes were observed, the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype being the most frequent (63.4%). This distribution was similar to that described in other western populations. Sex was not associated with number of **ApoE4** alleles. Black skin color was significantly and independently associated with the presence of two **ApoE4** alleles (age-sex adjusted OR = 7.38; 95%CI = 1.93-28.25), showing that the African-Brazilian elderly have a high prevalence of the $\epsilon 4$ allele, as observed in blacks from Africa. No association between number of **ApoE4** alleles and age was found, suggesting the absence of association of **ApoE** genotype with mortality in this population.

Key words

- Apolipoprotein E
- Elderly
- Prevalence
- Brazil

Correspondence

M.F. Lima-Costa
Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica
Centro de Pesquisas René Rachou
Fundação Oswaldo Cruz
Av. Augusto de Lima, 1715
30190-002 Belo Horizonte, MG
Brasil
Fax: + 55-31-3295-3115
E-mail: lima-costa@cpqrr.fiocruz.br

Research supported by CNPq
(No. 470841/2004-4)

Received January 31, 2007
Accepted August 7, 2007

Introduction

The search for genes and mutations potentially linked to diseases and aging itself has revealed many candidates. One of the genes most extensively studied in the context of aging has been the apolipoprotein E

gene (**ApoE**), located on chromosome 19, which encodes for a protein that participates in the regulation of lipid metabolism (1-3).

The **ApoE** gene is polymorphic, containing single-nucleotide polymorphisms, which are mutations leading to changes in a single nucleotide base in the DNA sequence of the gene,

eventually causing changes in the amino acid sequence of the protein. Studies have shown that there are three common ApoE alleles in populations throughout the world, known as $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, and $\epsilon 4$, giving rise to 6 genotypes ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, and $\epsilon 4/\epsilon 4$). Allelic frequencies vary widely, with $\epsilon 3$ being the most common (wild type), while $\epsilon 4$ is more frequent in certain populations from Africa (4-6), northern Europe (5,7), Oceania (7), and in native Americans (8,9).

ApoE has multiple other roles in addition to its role in lipid metabolism (10) and the presence of the $\epsilon 4$ allele has been consistently linked to the development of Alzheimer's disease (11). This allele has also been associated with coronary heart disease (12, 13) and cerebrovascular disease (14,15) in some studies but not in others (16,17). In addition, ApoE has been studied in the context of mortality, but the results of these studies are controversial (18-24).

Community-based studies on ApoE polymorphism conducted in well-defined Brazilian populations are scarce (25), and all of them were small, involving populations of less than 500 subjects (8,9,25-30). The present study describes ApoE allele and genotype distribution in an elderly community-based sample of 1408 subjects, and its association with age, gender and skin color.

Material and Methods

Study area

The city of Bambuí (approximately 15,000 inhabitants) is situated in the South-western region of the State of Minas Gerais. Cerebrovascular diseases constitute the main cause of death in the population aged ≥ 60 years, followed by Chagas' disease and ischemic heart diseases. The Bambuí Health and Ageing Study (BHAS) is a population-based cohort study of older adults which is being conducted in Bambuí since 1997. In this report, we analyze data collected at the

baseline of this study.

The Bambuí cohort study was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro in 1996, and the present project was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation in Belo Horizonte in 2006. All participants gave informed written consent.

Study population

From November to December 1996, a census was conducted in Bambuí to identify participants for the baseline study. Every person aged 60 years or older ($N = 1742$) was invited to take part in the study. Of these, 1606 (92%) were interviewed for risk factors, and 1496 (85.9%) had blood samples drawn for genomic DNA extraction. The latter subjects comprise the sample for the present study. Additional details have been reported elsewhere (31).

DNA extraction, PCR amplification and RFLP genotyping

Genomic DNA was extracted from the blood samples using the Wizard genomic DNA extraction kit (Promega, Madison, WI, USA). Samples were stored at -70°C until further use. ApoE genotyping was carried out as described by Hixson and Vernier (32), with slight modifications. The DNA samples were subjected to the polymerase chain reaction amplification, using the following primers: forward 5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3' and reverse 5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC 3'. Polymerase chain reaction conditions were denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 70°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The amplified DNA was subjected to the restriction fragment length polymorphism technique, with digestion by HhaI, generating the following patterns: $\epsilon 2\epsilon 2$, 83 and 91 bp; $\epsilon 3\epsilon 3$, 91, 48, and 35 bp, and $\epsilon 4\epsilon 4$, 72, 48, 35, and 19 bp.

These fragments were visualized on 4% agarose gels, instead of polyacrylamide gels as described in the original article.

Variables

In the present study, the dependent variable was the single-nucleotide polymorphism of the ApoE gene. Analysis was carried out taking into consideration the three ApoE alleles, the six ApoE genotypes ($\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, and $\epsilon 2/\epsilon 2$) and the number of ApoE4 alleles for each individual (0, 1 or 2 alleles).

Independent variables included age (60-69, 70-79, and ≥ 80 years), sex and skin color. Interviewers classified the subjects based on photographs representative of individuals with different skin colors (white, light brown, dark brown, and black).

Statistical analysis

Statistical analysis was based on Pearson's chi-square test and on multinomial regression (33). Allele frequencies were estimated by gene counting. Hardy-Weinberg equilibrium expectations were tested by using a chi-square goodness-of-fit test. The statistical analysis was performed using the Stata version 7.0 software (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

Results

Of the 1606 BHAS cohort members, 1408 (557 males and 851 females) could be genotyped and participated in this study, their mean age being 69.3 years (SD = 7.2). The participants in this study were similar to non-participants regarding age ($P = 0.999$), sex ($P = 0.365$), and skin color ($P = 0.063$).

The ApoE allele and genotype distribution in the study population is shown in Figure 1. The most frequent allele was $\epsilon 3$ (80.0%), followed by $\epsilon 4$ (13.5%), and $\epsilon 2$ (6.5%). The distribution of ApoE alleles was within Hardy-

Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). All six possible genotypes were observed: the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype predominated (63.4%), followed by $\epsilon 3/\epsilon 4$ (21.9%), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (11.4%), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (1.8%), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (1.4%), and $\epsilon 2/\epsilon 2$ (0.1%).

There was no statistically significant difference ($P = 0.311$) in allele or genotype distribution among the various age groups (Table 1). The $\epsilon 3$ allele (79.4, 81.4, and 79.3%) and the $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype predominated in all age groups (61.8, 66.6, and

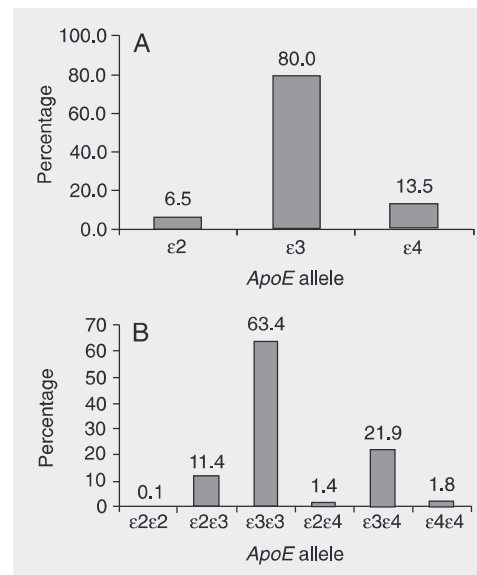


Figure 1. ApoE allele (A) and genotype (B) distribution among 1408 elderly participants at baseline of the Bambuí Health and Aging Study (Brazil).

Table 1. Apolipoprotein E (ApoE) allele and genotype distributions among 1408 elderly participants at baseline of the Bambuí Health and Aging Study by age group (Brazil).

ApoE	Age group		
	60-69 years	70-79 years	≥ 80 years
Allele			
$\epsilon 2$	110 (6.6%)	58 (6.7%)	15 (5.5%)
$\epsilon 3$	1328 (79.4%)	707 (81.4%)	219 (79.3%)
$\epsilon 4$	234 (14.0%)	103 (11.9%)	42 (15.2%)
Genotype			
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0 (0.0%)	1 (0.2%)	0 (0.0%)
$\epsilon 2/\epsilon 3$	102 (12.2%)	47 (10.8%)	12 (8.7%)
$\epsilon 3/\epsilon 3$	517 (61.8%)	289 (66.6%)	86 (62.3%)
$\epsilon 2/\epsilon 4$	8 (1.0%)	9 (2.1%)	3 (2.2%)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	192 (23.0%)	82 (18.9%)	35 (25.4%)
$\epsilon 4/\epsilon 4$	17 (2.0%)	6 (1.4%)	2 (1.4%)

Data are reported as number with percent in parentheses. ApoE: $P = 0.481$, genotype: $P = 0.311$ (Pearson's chi-square test).

62.3% among subjects aged 60-69, 70-79 and ≥ 80 years, respectively).

The distribution of the number of ApoE4 alleles according to demographic characteristic is shown in Table 2. A significant association between number of $\epsilon 4$ alleles and skin color was found ($P = 0.023$), but no associations with age ($P = 0.437$) or sex ($P = 0.394$) were observed. The prevalence of two $\epsilon 4$ alleles among black and dark brown subjects was 9.1 and 4.1%, respectively, while among light brown and white subjects the prevalence was less than 2%. The association between black skin color and two $\epsilon 4$ alleles was strong and independent of sex and age (OR = 7.38; 95%CI = 1.93-28.25).

Discussion

The results of the present study show that $\epsilon 3/\epsilon 3$ was the most frequent genotype and $\epsilon 3$ was the most frequent allele in the study population. These results are in agreement with previous observations that $\epsilon 3$ is the most common allele worldwide (5,7).

Regarding the $\epsilon 4$ and $\epsilon 2$ alleles, some

differences in distribution have been reported. In Europe, studies have described a north to south cline in the $\epsilon 4$ allele, with a higher frequency in the northern region and a lower frequency in the southern region (7,34,35). The highest frequencies of $\epsilon 4$ have been described in Nigerians (4), Sub-Saharan Africans (5), South Africans (6), Inuit from Greenland (7), Finns (7), and native Americans (up to 47% in Brazilian natives) (8). $\epsilon 2$ is the least frequent allele, being completely absent from certain populations, in particular from several Native American tribes (8,9,26). In the present study, the prevalence of the $\epsilon 4$ and $\epsilon 2$ alleles was 13.5 and 6.5%, respectively.

In Brazil, studies carried out in children have found similar allele distributions. In Recife city (northeastern Brazil), allele distribution among 414 children ascertained at a pediatric hospital was as follows: $\epsilon 3$, 77%; $\epsilon 4$, 17%, and $\epsilon 2$, 6% (27). In Fortaleza city, also in northeastern Brazil, the corresponding findings among 72 shantytown children were 77.1, 14.6, and 8.3%, respectively (28). Previous studies of ApoE polymorphism in small samples of native Brazilian and South Ameri-

Table 2. Association of the number of ApoE4 alleles among 1408 elderly participants at baseline of the Bambuí Health and Aging Study with selected demographic characteristics (Brazil).

Variables	Number of ApoE4 alleles				
	None N (%)	One N (%)	Two N (%)	One OR (95%CI)*	Two OR (95%CI)*
Age group (years)					
60-69 years	619 (74.1%)	200 (23.9%)	17 (2.0%)	1.00	1.00
70-79 years	337 (77.6%)	91 (21.0%)	6 (1.4%)	0.83 (0.62-1.10)	0.69 (0.27-1.79)
≥ 80 years	98 (71.0%)	38 (27.5%)	2 (1.5%)	1.17 (0.78-1.76)	0.73 (0.16-3.24)
Gender					
Female	643 (75.6%)	196 (23.0%)	12 (1.4%)	1.00	1.00
Male	411 (73.8%)	133 (23.9%)	13 (2.3%)	1.05 (0.82-1.36)	1.65 (0.74-3.67)
Skin color					
White	630 (74.2%)	207 (24.4%)	12 (1.4%)	1.00	1.00
Light brown**	368 (77.1%)	101 (21.2%)	8 (1.7%)	0.84 (0.64-1.10)	1.11 (0.45-2.76)
Dark brown**	35 (71.4%)	12 (24.5%)	2 (4.1%)	1.04 (0.53-2.04)	2.87 (0.61-13.35)
Black	21 (63.6%)	9 (27.3%)	3 (9.1%)	1.30 (0.59-2.89)	7.38 (1.93-28.25)

ApoE = apolipoprotein E; OR = odds ratio; 95%CI = confidence interval at 95%. Age group: $P = 0.437$, sex: $P = 0.394$, skin color: $P = 0.023$ (Pearson chi-square test).

*Adjusted by multinomial logistic regression for the variables listed in the table (absence of $\epsilon 4$ allele was the reference group). **Light brown: "moreno"; dark brown: "mulatto".

can populations (8,9,26,29) found a highly heterogeneous distribution of alleles with a predominance of $\epsilon 3$ (frequency range: 51-98%), followed by $\epsilon 4$ (0-47%) and $\epsilon 2$ (0-4%).

Regarding older subjects, two Brazilian studies were carried out in the State of Rio Grande do Sul, in the south of Brazil (25,30). One involved a random sample of 64 subjects aged 80 years and older from a population of Italian descent residing in the city of Veranópolis. ApoE allelic frequencies were $\epsilon 3$, 84%; $\epsilon 4$, 11%, and $\epsilon 2$, 5%, and only four genotypes were observed: $\epsilon 3/\epsilon 3$ (70%), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (22%), $\epsilon 3/\epsilon 2$ (6%), and $\epsilon 2/\epsilon 2$ (2%) (25). The other study involved 252 Caucasian volunteers ≥ 50 years of age residing in the city of Gravataí. ApoE allelic frequencies for this population were $\epsilon 3$, 76.7%; $\epsilon 4$, 16.2%, and $\epsilon 2$, 7.1%, with five genotypes ($\epsilon 2$ homozygotes were absent), $\epsilon 3/\epsilon 3$ being the most frequent (61.3%), followed by $\epsilon 3/\epsilon 4$ (24.3%) (30).

The allelic frequencies found in the present study are similar to the distributions found among older adults from south Brazil (25,30), even though the population from Bambuí is miscigenated and somewhat different from the populations in these studies which have a more strict European ascendance.

Reports that have included blacks from Africa (4-6) have suggested that there may be a higher frequency of the $\epsilon 4$ allele in blacks but, to the best of our knowledge, there are no population-based studies of ApoE polymorphisms in African-Brazilians. In our study, we found a gradient in the prevalence of $\epsilon 4$ homozygotes when genotypes were compared by skin color, with the highest prevalence among black-skinned individuals and the lowest among white-skinned subjects. Black-skinned individuals from this

sample were significantly more likely to be $\epsilon 4$ homozygotes compared to white-skinned individuals. Among the dark-brown-skinned individuals the prevalence of $\epsilon 4$ homozygotes was twice as high as among white-skinned subjects, but this difference was not statistically significant. Those results could be the consequence of the greater $\epsilon 4$ prevalence mentioned above among African subjects, groups of which were brought to Brazil by the Portuguese during the 15th to 18th centuries as slaves, and which now form an important part of the Brazilian gene pool (8).

Several studies have investigated the association between $\epsilon 4$ allele and age. If an association of $\epsilon 4$ and mortality existed, one would expect to find a lower prevalence of this allele among the very old. Previously published results have been controversial, with some investigators reporting lower frequencies of $\epsilon 4$ among the very old (19-21), a finding which was not replicated by others (22-24). In the present study, we did not identify an association between $\epsilon 4$ allele prevalences and age.

This paper presents the largest population-based study on ApoE distribution carried out in Brazil, involving 1408 individuals who represent a well-defined target population. The results of the present study showed a distribution of ApoE alleles and genotypes similar to those observed in other western populations. The distribution of ApoE alleles was influenced by skin color, showing that the African-Brazilian elderly in the study population have a high prevalence of the $\epsilon 4$ allele, as observed in blacks from Africa (4-6). The distribution of ApoE4 alleles was not influenced by age, suggesting the absence of association with mortality in the study population.

References

1. Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985; 260: 6240-6247.
2. Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 3445-3449.

3. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25: 1277-1294.
4. Sepehrnia B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, Nwankwo M, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. VII. Population distribution of polymorphisms of apolipoproteins A-I, A-II, A-IV, C-II, E, and H in Nigeria. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 847-853.
5. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A, et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 338-349.
6. Sandholzer C, Delport R, Vermaak H, Utermann G. High frequency of the apo ϵ 4 allele in Khoi San from South Africa. *Hum Genet* 1995; 95: 46-48.
7. Gerdes LU, Gerdes C, Hansen PS, Klausen IC, Faergeman O, Dyerberg J. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum Genet* 1996; 98: 546-550.
8. de Andrade FM, Coimbra CE Jr, Santos RV, Goicoechea A, Carnese FR, Salzano FM, et al. High heterogeneity of apolipoprotein E gene frequencies in South American Indians. *Ann Hum Biol* 2000; 27: 29-34.
9. Demarchi DA, Salzano FM, Altuna ME, Fiegenbaum M, Hill K, Hurtado AM, et al. APOE polymorphism distribution among Native Americans and related populations. *Ann Hum Biol* 2005; 32: 351-365.
10. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-630.
11. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997; 278: 1349-1356.
12. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1250-1255.
13. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2004; 141: 137-147.
14. Margaglione M, Seripa D, Gravina C, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, et al. Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke: an Italian Case-Control Study. *Stroke* 1998; 29: 399-403.
15. Kokubo Y, Chowdhury AH, Date C, Yokoyama T, Sobue H, Tanaka H. Age-dependent association of apolipoprotein E genotypes with stroke subtypes in a Japanese rural population. *Stroke* 2000; 31: 1299-1306.
16. Volcik KA, Barkley RA, Hutchinson RG, Mosley TH, Heiss G, Sharrett AR, et al. Apolipoprotein E polymorphisms predict low density lipoprotein cholesterol levels and carotid artery wall thickness but not incident coronary heart disease in 12,491 ARIC study participants. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 342-348.
17. Luthra K, Prasad K, Kumar P, Dwivedi M, Pandey RM, Das N. Apolipoprotein E gene polymorphism in cerebrovascular disease: a case-control study. *Clin Genet* 2002; 62: 39-44.
18. Gerdes LU, Jeune B, Ranberg KA, Nybo H, Vaupel JW. Estimation of apolipoprotein E genotype-specific relative mortality risks from the distribution of genotypes in centenarians and middle-aged men: apolipoprotein E gene is a "frailty gene," not a "longevity gene". *Genet Epidemiol* 2000; 19: 202-210.
19. Heijmans BT, Westendorp RG, Slagboom PE. Common gene variants, mortality and extreme longevity in humans. *Exp Gerontol* 2000; 35: 865-877.
20. Ewbank DC. Mortality differences by APOE genotype estimated from demographic synthesis. *Genet Epidemiol* 2002; 22: 146-155.
21. Corder EH, Lannfelt L, Viitanen M, Corder LS, Manton KG, Winblad B, et al. Apolipoprotein E genotype determines survival in the oldest old (85 years or older) who have good cognition. *Arch Neurol* 1996; 53: 418-422.
22. Lee JH, Tang MX, Schupf N, Stern Y, Jacobs DM, Tycko B, et al. Mortality and apolipoprotein E in Hispanic, African-American, and Caucasian elders. *Am J Med Genet* 2001; 103: 121-127.
23. Louhija J, Viitanen M, Aguero-Torres H, Tilvis R. Survival in Finnish centenarians in relation to apolipoprotein E polymorphism. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49: 1007-1008.
24. Slooter AJ, Cruts M, Van Broeckhoven C, Hofman A, van Duijn CM. Apolipoprotein E and longevity: the Rotterdam Study. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49: 1258-1259.
25. Schwanke CH, da Cruz I, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Analysis of the association between apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular risk factors in an elderly population with longevity. *Arq Bras Cardiol* 2002; 78: 561-579.
26. Crews DE, Kamboh MI, Mancilha-Carvalho JJ, Kottke B. Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and H polymorphisms in Yanomami Indians of northwestern Brazil: associations with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism. *Hum Biol* 1993; 65: 211-224.
27. De Franca E, Alves JG, Hutz MH. Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipid levels in Brazilian children. *Hum Biol* 2004; 76: 267-275.
28. Oria RB, Patrick PD, Zhang H, Lorntz B, de Castro Costa CM, Brito GA, et al. APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. *Pediatr Res* 2005; 57: 310-316.
29. de Andrade FM, Ewald GM, Salzano FM, Hutz MH. Lipoprotein lipase and APOE/APOC-I/APOC-II gene cluster diversity in native Brazilian populations. *Am J Hum Biol* 2002; 14: 511-518.
30. Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Mussel DP, da Cruz I. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res* 2005; 4: 691-703.
31. Lima-Costa MF, Uchoa E, Guerra HL, Firmo JO, Vidigal PG, Barreto SM. The Bambuí health and ageing study (BHAS): methodological approach and preliminary results of a population-based cohort study of the elderly in Brazil. *Rev Saude Publica* 2000; 34: 126-135.
32. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.
33. Hamilton LC. Interpreting multinomial logistic regression. *Stata Tech Bull* 1993; 13: 24-28.
34. de Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat* 1994; 4: 178-194.
35. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet* 1999; 63: 301-310.

Correction

Braz J Med Biol Res 2008; 41(2): 89-94

Association of *ApoE* polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambuí Health Aging Study (BHAS)

A.K. Fuzikawa, S.V. Peixoto, M. Taufer E.H. Moriguchi and M.F. Lima-Costa

Pages 93-94. The correct list of REFERENCES is printed below. For html or pdf file, see: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2008000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en

REFERENCES

1. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25: 1277-1294.
2. Kesaniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. *J Clin Invest* 1987; 80: 578-581.
3. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
4. Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985; 260: 6240-6247.
5. Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 3445-3449.
6. Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults. The CARDIA Study. Coronary artery risk development in young adults. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 859-868.
7. Volcik KA, Barkley RA, Hutchinson RG, Mosley TH, Heiss G, Sharrett AR, et al. Apolipoprotein E polymorphisms predict low-density lipoprotein cholesterol levels and carotid artery wall thickness but not incident coronary heart disease in 12,491 ARIC study participants. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 342-348.
8. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by *ApoE* phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992; 33: 447-454.
9. Katsuya T, Baba S, Ishikawa K, Mannami T, Fu Y, Inamoto N, et al. Epsilon 4 allele of apolipoprotein E gene associates with lower blood pressure in young Japanese subjects: the Suita Study. *J Hypertens* 2002; 20: 2017-2021.
10. Wilson PW, 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: 1666-1671.
11. Jemaa R, Elasmı M, Naouali C, Feki M, Kallel A, Souissi M, et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Tunisian population: frequency and effect on lipid parameters. *Clin Biochem* 2006; 39: 816-820.
12. Rastas S, Mattila K, Verkkoniemi A, Niinisto L, Juva K, Sulkava R, et al. Association of apolipoprotein E genotypes, blood pressure, blood lipids and ECG abnormalities in a general population aged 85+. *BMC Geriatr* 2004; 4: 1.
13. Schwanke CH, da Cruz I, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Analysis of the association between apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular risk factors in an elderly population with longevity. *Arq Bras Cardiol* 2002; 78: 561-579.
14. Formiga F, Alia P, Navarro MA, Pujol R. Apolipoprotein e genotypes in nonagenarians. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54: 1471-1473.
15. Bhavani AB, Sastry KB, Reddy NK, Padma T. Lipid profile and apolipoprotein E polymorphism in essential hypertension. *Indian Heart J* 2005; 57: 151-157.
16. Isbir T, Yilmaz H, Bihorac A, Akoglu E. Mild-to-moderate hypertension and apolipoprotein E gene polymorphism. *Am J Hypertens* 1997; 10: 827-828.
17. Li X, Du Y, Du Y, Huang X. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with essential hypertension and its complications. *Clin Exp Med* 2003; 2: 175-179.
18. Niu W, Guo X, Su Y, Qiu C. Apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor gene polymorphisms in dyslipidemias-associated essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21: 337-339.
19. Yilmaz H, Isbir T, Agachan B, Aydin M. Is epsilon4 allele of

- apolipoprotein E associated with more severe end-organ damage in essential hypertension? *Cell Biochem Funct* 2001; 19: 191-195.
20. Imazu M, Yamamoto H, Toyofuku M, Watanabe T, Okubo M, Egusa G, et al. Association of apolipoprotein E phenotype with hypertension in Japanese-Americans: data from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima Study. *Hypertens Res* 2001; 24: 523-529.
 21. Scuteri A, Najjar SS, Muller D, Andres R, Morrell CH, Zonderman AB, et al. ApoE4 allele and the natural history of cardiovascular risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E322-E327.
 22. Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 1429-1434.
 23. Barreto SM, Passos VM, Firmo JO, Guerra HL, Vidigal PG, Lima-Costa MF. Hypertension and clustering of cardiovascular risk factors in a community in Southeast Brazil - The Bambuí Health and Ageing Study. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77: 576-581.
 24. Lima-Costa MF, Barreto SM, Uchoa E, Firmo JO, Vidigal PG, Guerra HL. The Bambuí Health and Aging Study (BHAS): prevalence of risk factors and use of preventive health care services. *Rev Panam Salud Publica* 2001; 9: 219-227.
 25. Costa MF, Uchoa E, Guerra HL, Firmo JO, Vidigal PG, Barreto SM. The Bambuí health and ageing study (BHAS): methodological approach and preliminary results of a population-based cohort study of the elderly in Brazil. *Rev Saúde Pública* 2000; 34: 126-135.
 26. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289: 2560-2572.
 27. World Health Organization. Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification index with Defined Daily Doses (DDDs). <http://www.whocc.no/atcddd/indexdata> base. Accessed February 10, 2005.
 28. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.
 29. Wattanakit K, Folsom AR, Chambless LE, Nieto FJ. Risk factors for cardiovascular event recurrence in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am Heart J* 2005; 149: 606-612.
 30. Sundstrom J, Sullivan L, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS. Relations of serum uric acid to longitudinal blood pressure tracking and hypertension incidence. *Hypertension* 2005; 45: 28-33.
 31. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-3167.
 32. Zou G. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 702-706.



•
•
•
•
•
•
•
•
•
•

Scientific Electronic Library

FAPESP - Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado de São

BIREME - Centro Latino-Americano

Caribe de Informação em Ciências da

•
•
•
•
•

<http://www.scielo.br>

SciELO is a virtual library of Brazilian scientific journals in electronic format. It organizes and publishes in the Internet/Web full texts of scientific journals as well as indicators of usage and impact.

The general objective of SciELO is to contribute to the advancement of Brazilian scientific research by widening and improving the process of publication, dissemination and evaluation of scientific literature.

Providing universal access to scientific journals, SciELO will promote a remarkable increase in the visibility and accessibility of national scientific literature.

The development and operation of SciELO are sponsored by FAPESP and carried out in partnership with BIREME. SciELO had its pilot operation

Association of *ApoE* polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambuí Health Aging Study (BHAS)

A.K. Fuzikawa¹, S.V. Peixoto¹, M. Taufer², E.H. Moriguchi³ and M.F. Lima-Costa¹

¹Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento (NESPE), Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

²CMIC Brasil Pesquisas Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade do Vale dos Sinos, Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondence to: M.F. Lima-Costa, Laboratório de Epidemiologia e Antropologia Médica, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil

Fax: +55-31-3295-3115. E-mail: lima-costa@cpqrr.fiocruz.br

Apolipoprotein E (*ApoE*) polymorphism influences lipid metabolism, but its association with arterial hypertension is controversial. The objective of this study was to examine the association between *ApoE* polymorphism and prevalent hypertension in a large unselected population of older adults. Participants from the baseline of the Bambuí Health Aging Study whose *ApoE* genes had been genotyped were selected for this study (N = 1406, aged 60-95 years). These subjects represented 80.7% of the total elderly residents in Bambuí city, MG, Brazil. Hypertension was defined as a systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and/or a diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg, or the use of anti-hypertensive medication. The exposure variable was the *ApoE* genotype as follows: ϵ_3 carriers, $\epsilon_3\epsilon_3$, ϵ_2 carriers, $\epsilon_2\epsilon_2$ or $\epsilon_2\epsilon_3$, and ϵ_4 carriers, $\epsilon_3\epsilon_4$ or $\epsilon_4\epsilon_4$. Potential confounding variables were age, gender, traditional cardiovascular risk factors, uric acid, and creatinine levels. The prevalence of hypertension was 61.3%. Compared with the ϵ_3 homozygotes, neither the ϵ_2 nor the ϵ_4 carrier status was associated with hypertension (adjusted prevalence ratios = 0.94, 95%CI = 0.83-1.07 and 0.98, 0.89-1.07, respectively). On the other hand, the ϵ_2 allele carriers had lower LDL cholesterol levels (P < 0.001) and the ϵ_4 carriers had higher LDL cholesterol levels (P = 0.036). This study provides epidemiologic evidence that the *ApoE* genotype is not associated with prevalent hypertension in old age.

Key words: Apolipoprotein E; Hypertension; Low-density lipoprotein cholesterol; Triglycerides; Lipid metabolism

Research supported by CNPq (No. 470841/2004-4).

Received June 29, 2007. Accepted November 8, 2007

Introduction

There has been an increasing interest in apolipoprotein E (*ApoE*) polymorphisms as predictors of hypertension. *ApoE* plays a fundamental role in lipid metabolism, participating in the clearance of chylomicron remnants and very low-density lipoproteins (VLDL) by serving as a ligand for low-density lipoprotein (LDL) receptors (1). It is also an important determinant of intestinal cholesterol absorption (2) and plasma lipid levels (3). The *ApoE* gene

is located on chromosome 19 (4,5) with three common alleles, termed ϵ_2 , ϵ_3 and ϵ_4 . The ϵ_4 allele has consistently been linked to increases in LDL cholesterol levels (6,7). The ϵ_2 allele has been reported to be linked with higher triglyceride levels in some (6,8), but not all studies (7).

Although *ApoE* genotype is involved in lipid metabolism, its association with arterial hypertension is controversial. Nevertheless, only two previous studies (9,10) involved populations of more than 1000 subjects, few studies have been carried out in representative community-

based samples, and few studies have considered traditional risk factors as potential confounders for the association between *ApoE* and hypertension or blood pressure level (9-21). Additionally, few studies focused on the influence of *ApoE* genotype on hypertension in older individuals (9, 12-14).

The primary objective of this study was to investigate the effect of the *ApoE* polymorphisms on the prevalence of hypertension in a population of 1406 community-dwelling older adults, considering several potential confounding factors in the analysis. A secondary objective was to examine the association between *ApoE* polymorphism and systolic blood pressure, diastolic blood pressure, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, LDL cholesterol and triglyceride levels.

Material and Methods

The Bambuí Health Ageing Study (BHAS)

The BHAS is a population-based cohort of older adults, which has been carried out in Bambuí city (~15,000 inhabitants), which is situated in Minas Gerais State, Southeastern Brazil. The cohort baseline was established in 1997. From November to December 1996, a complete census was carried out by the research team for identification of participants. Of the 1742 inhabitants aged 60 years or older by January 1, 1997, 1606 (92.0%) participated. The mean age of the cohort participants was 69.3 years (range: 60-95 years), and 60.0% were women. White skin color was predominant (60.4%), followed by light brown ("moreno", 33.3%), dark brown ("mulato", 3.6%), and black (2.7%) (22). The prevalence of hypertension (61.5%) was close to that described for the North American elderly (~60%) (23), as well as the prevalence of some traditional risk factors (24). A detailed description of the study design and methods has been published elsewhere (25).

Study participants

All of the 1406 cohort members who had their blood pressure (BP) measured at baseline and whose *ApoE* was genotyped were selected for the present study. The participants in this study were similar to non-participants in relation to age ($P = 0.999$) and gender ($P = 0.365$).

Measurements

Three measurements of systolic (SBP) and diastolic (DBP) were taken on the right arm with an appropriately sized cuff using a mercury sphygmomanometer. BP measurements were taken early in the morning, after a 5-min initial rest and subsequently at 2-min intervals between each measurement, and after 30 or more min of the last

caffeine intake or cigarette smoked. BP was considered as the arithmetic mean of the second and third measurements. According to the Seventh Joint National Committee criteria (26), hypertension was defined as SBP ≥ 140 mmHg and/or DBP ≥ 90 mmHg or the use of anti-hypertensive medication. Current use of anti-hypertensive medication was ascertained by reviewing medication containers or prescription, and coding the medication as previously described (27).

Genomic DNA for *ApoE* genotyping was extracted from blood samples using the Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). DNA samples were then amplified by polymerase chain reaction (PCR), followed by digestion with *HhaI*, and restriction fragment length polymorphism analysis, as previously described (28). The DNA samples were subjected to PCR with the following primers: forward 5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3' and reverse 5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC 3'. The PCR conditions were denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 70°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min. Restriction fragment length polymorphism analysis yielded the following patterns: $\square 2 \square 2$ 91 and 83 bp; $\square 5 \square 3$ 91, 48 and 35 bp; $\square 4 \square 4$ 72, 48 and 35 bp. Each of the heterozygote genotypes contained both sets of fragments from each *ApoE* allele.

Other variables considered included baseline age, gender, smoking, alcohol consumption, physical activity, family history of cardiovascular diseases, diabetes, traditional risk factors for cardiovascular diseases such as SBP, DBP, body mass index (BMI), and levels of LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, creatinine (29), and uric acid (30). Current smokers were defined as those who had smoked at least 100 cigarettes during their lifetime and were still smoking. For alcohol consumption estimates, the subjects were shown cards with a representation of the amount of liquid corresponding to one drink for liquor, beer or wine. The alcohol consumption was calculated by multiplying the number of drinks by the frequency of imbibing in a week during the previous 12 months. Physical activity was defined as any exercise for 20-30 min at least three times a week, during leisure time in the previous 90 days. Diabetes was defined by a fasting blood glucose level ≥ 126 mg/dL and/or current use of insulin or oral antidiabetic drug treatment, as defined by the 2003 American Diabetes Association updated criteria (31). BMI (weight/height²) was calculated from height and weight measurements. Levels of LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, creatinine, and uric acid were determined after a 12-h recommended overnight fast, using commercial kits (Boehringer Mannheim, Germany) and an automated ana-

lyzer (Eclipse Vitalab, Merck, Netherlands), as described elsewhere (25).

All of the observers of the BHAS were trained and certified before each examination. The BHAS was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro, RJ, Brazil, in 1996, and the present investigation was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation in Belo Horizonte, MG, Brazil, in 2006. All participants gave full informed written consent.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed by using the Stata version 9.1 software (Stata Corporation, College Station, TX, USA). Allele frequencies were estimated by gene counting. Hardy-Weinberg equilibrium expectations were tested by using a chi-square (χ^2) goodness-of-fit test. Non-adjusted analysis of the association between *ApoE* genotypes and alleles with prevalent hypertension was based on Person's chi-square test. Age-gender adjusted means and standard errors of the mean by *ApoE* genotype were calculated for baseline SBP, DBP, LDL cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride levels. Multiple linear regression was used to assess the association between *ApoE* genotype and the above mentioned parameters, after adjustments for age and gender. Poisson regression models (32) were used to estimate the prevalence ratio for hypertension. The models included age and gender in model 1, and age, gender, smoking, alcohol consumption, physical activity, family history, diabetes, LDL cholesterol, HDL cholesterol, uric acid, creatinine, and BMI in model 2. In the adjusted analysis, *ApoE* genotypes were classified into three groups: ϵ_3 carriers ($\epsilon_3\epsilon_3$), ϵ_2 carriers ($\epsilon_2\epsilon_2$, $\epsilon_2\epsilon_3$) and ϵ_4 carriers ($\epsilon_4\epsilon_4$, $\epsilon_3\epsilon_4$). In each model, the homozygous $\epsilon_3\epsilon_3$ genotype was the reference group. Twenty subjects (1.4%) with the $\epsilon_2\epsilon_4$ genotype were excluded from the analysis because of the opposite effects of these two alleles on LDL cholesterol levels. Since no effect

modification by gender was noted, all analyses were for both sexes. Statistical significance in the models was assessed using Wald χ^2 statistics.

Results

The prevalence of hypertension was 61.3% for the 1406 participants in the BHAS baseline. As found in most western populations, the $\epsilon_3\epsilon_3$ genotype was the most common (63.4%), followed by $\epsilon_3\epsilon_4$ (21.9%), $\epsilon_2\epsilon_3$ (11.5%), $\epsilon_4\epsilon_4$ (1.8%), $\epsilon_2\epsilon_4$ (1.4%), and $\epsilon_2\epsilon_2$ (0.1%). Allele frequencies were within the Hardy-Weinberg equilibrium expectations ($P > 0.05$). Additional baseline characteristics of the study participants are shown in Table 1.

Selected baseline characteristics of the BHAS population by *ApoE* genotypes, adjusted for age and gender are shown in Table 2. The mean LDL cholesterol was signifi-

Table 1. Selected baseline characteristics of the 1406 participants from the Bambuí Health and Aging Study (BHAS).

Characteristics	Percentage or mean (standard deviation)
Age (years)	69.1 (7.1)
Female gender	60.5%
Current smokers	18.1%
Alcohol consumption in the previous 12 months (>14 doses a week)	2.8%
Exercises lasting 20-30 min three times a week or more during the previous 3 months	12.5%
Family history of cardiovascular diseases	45.9%
Diabetes mellitus	14.1%
Systolic blood pressure (mmHg)	137.2 (22.6)
Diastolic blood pressure (mmHg)	83.6 (12.7)
Body mass index (kg/m ²)	25.0 (4.9)
LDL cholesterol (mg/dL)	155.0 (45.4)
HDL cholesterol (mg/dL)	49.1 (15.1)
Triglycerides (mg/dL)	151.1 (100.3)
Creatinine (mg/dL)	0.90 (0.30)
Uric acid (mg/dL)	5.3 (1.7)

Table 2. Age-sex adjusted analysis of the association between selected baseline characteristics of the Bambuí Health and Aging Study (BHAS) population and *ApoE* genotype.

<i>ApoE</i> genotype	N	Characteristics				
		Systolic blood pressure (mmHg)	Diastolic blood pressure (mmHg)	LDL cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)
$\epsilon_3\epsilon_3$	891	137.25 (0.75)	83.59 (0.42)	155.85 (1.50)	48.99 (0.49)	147.63 (3.34)
$\epsilon_2\epsilon_2$, $\epsilon_2\epsilon_3$	162	136.80 (1.76)	83.88 (0.99)	140.46 (3.56)*	50.95 (1.16)	167.11 (7.84)***
$\epsilon_3\epsilon_4$, $\epsilon_4\epsilon_4$	333	137.16 (1.23)	83.53 (0.69)	161.91 (2.47)**	48.20 (0.81)	153.63 (5.47)

Data are reported as means (standard error of the mean) adjusted for age and gender.

* $P < 0.001$; ** $P = 0.036$; *** $P = 0.022$ compared to $\epsilon_3\epsilon_3$ (multiple linear regression).

cantly greater among the $\epsilon\epsilon$ carriers ($P = 0.036$) and lower among the $\epsilon\epsilon$ carriers ($P < 0.001$), in comparison to the homozygous $\epsilon\epsilon$ carriers. The mean triglyceride level was significantly greater among those with the ϵ allele ($P = 0.022$). No significant associations were found between *ApoE* genotype and SBP, DBP and HDL cholesterol levels.

The *ApoE* genotype and allele frequencies for the prevalence of hypertension are shown in Table 3. Both the *ApoE* genotype and the allele frequencies showed similar distributions among prevalent hypertension cases and non-cases.

The results of the adjusted analysis for the association

Table 3. Non-adjusted analysis of the association between *ApoE* polymorphism and hypertension in the Bambuí Health and Aging Study (BHAS) population.

	Hypertension	
	Yes	No
<i>ApoE</i> genotype		
$\epsilon\epsilon$	1 (0.1%)	0 (0.0%)
$\epsilon\epsilon$	95 (11.0%)	66 (12.1%)
$\epsilon\epsilon$	13 (1.5%)	7 (1.3%)
$\epsilon\epsilon$	556 (64.5%)	335 (61.6%)
$\epsilon\epsilon$	179 (20.8%)	129 (23.7%)
$\epsilon\epsilon$	18 (2.1%)	7 (1.3%)
P = 0.538		
<i>ApoE</i> allele		
ϵ	110 (6.4%)	73 (6.7%)
ϵ	1386 (80.4%)	865 (79.5%)
ϵ	228 (13.2%)	150 (13.8%)
P = 0.846		

Data are reported as number of subjects with percent in parentheses.

*P value: Person's chi-square test.

Table 4. Poisson regression models and prevalence ratio for hypertension in the Bambuí Health and Aging Study (BHAS) population, by *ApoE* genotype.

<i>ApoE</i> genotype	N	Hypertension prevalence (%)	Model 1 PR (95%CI)	Model 2 PR (95%CI)
$\epsilon\epsilon$	891	556 (62.4%)	1.0	1.0
$\epsilon\epsilon$ $\epsilon\epsilon$	162	96 (59.3%)	0.96 (0.83-1.09)	0.94 (0.83-1.07)
$\epsilon\epsilon$ $\epsilon\epsilon$	333	197 (59.2%)	0.95 (0.86-1.05)	0.98 (0.89-1.07)

Model 1: Adjusted for age and gender. Model 2: Adjusted for age, gender, smoking, alcohol consumption, physical activity, family history, diabetes, LDL cholesterol, HDL cholesterol, uric acid, creatinine, and body mass index. PR = prevalence ratio (95% robust confidence intervals).

between *ApoE* genotype and hypertension are shown in Table 4. Hypertension was not associated with the presence of either ϵ or ϵ alleles in the model adjusted by age and gender or in the model adjusted for several confounders.

Discussion

In this study, prevalent hypertension was not associated with *ApoE* polymorphisms in a large sample of Brazilian older adults. This lack of association was observed in the age-gender adjusted analysis and in the analysis adjusted for factors *a priori* believed to be potential confounders for the association between *ApoE* genotype and hypertension. Secondary analysis indicated that such associations were absent for both males and females (data not shown).

An association was observed between greater LDL cholesterol levels and the presence of the ϵ allele, as well as between lower LDL cholesterol levels and the presence of the ϵ allele. This observation is in agreement with other studies reporting a consistent relationship between the ϵ allele and greater levels of LDL cholesterol (6,7), as well as between the ϵ allele and lower LDL cholesterol levels (6). Higher triglyceride levels were found in ϵ carriers. This association was reported in some (6,8), but not all previous investigations (7). The association of the *ApoE* alleles with plasma lipid levels is a direct consequence of the role of ApoE protein in lipid metabolism. ApoE2 is metabolically impaired when compared to ApoE3 and ApoE4, due to its reduced interaction with cellular receptors, resulting in delayed clearance and accumulation of chylomicrons and VLDL remnants in the plasma. ApoE-mediated LDL conversion from VLDL remnants is also reduced. The net effect is an up-regulation of LDL receptors, higher plasma concentrations of triglyceride- and cholesterol-containing remnant particles, and lower plasma levels of cholesterol-rich LDL particles (1). *ApoE4* alleles have an opposite net effect compared to those of *ApoE2* (1,3).

There have been several studies of the association between the *ApoE* genotypes and prevalent hypertension, with inconsistent findings. Results from small prevalent case control studies have consistently described a positive relationship between the presence of the ϵ allele and hypertension or with greater BP levels (15-19). The results from cross-sectional studies have been more inconsistent. Four investigations carried out in a mixed population of younger and older adults reported i) lack of association between the *ApoE* genotype and hypertension in the USA (10) and in Tunisia (11), ii) a positive association between the ϵ allele and prevalent hypertension among male, but

not female, Japanese immigrants living in Los Angeles or Hawaii (20), and iii) a negative association between the presence of the $\epsilon 4$ allele and prevalent hypertension in young, but not older, Japanese (9). Three other cross-sectional studies included very old subjects. Two were carried out in Finland (12) and in Spain (14), and did not find significant association between ApoE genotype, prevalent hypertension (14), or mean SBP and mean DBP (12). The third study included Italian descendants living in the south of Brazil and reported a significantly lower DBP among the $\epsilon 4$ carriers, compared to the homozygous $\epsilon 3/\epsilon 3$ but the mean SBP was similar in both groups (13). In addition, two cohort studies carried out with Japanese Americans (20) and North American males (21) reported contradictory results. In the present study, the mean baseline SBP and DBP, as well as prevalent hypertension, were not associated with the ApoE genotype.

This investigation benefits from a large number of subjects, the use of an unselected community-based population, and the use of double-blind data collection, as the technicians were unaware of the participants' ApoE or hypertension status. Selection and information bias are therefore unlikely, but prevalence bias is a potential limitation. The population investigated here consisted of older adults; therefore, the results may not be relevant to younger subjects.

In conclusion, this study confirms that the presence of the $\epsilon 4$ allele is associated with greater LDL cholesterol levels and the presence of the $\epsilon 2$ allele is associated with lower LDL levels and greater triglyceride levels. This investigation also provides epidemiologic evidence that ApoE genotype is not associated with prevalent hypertension in old age.

REFERENCES

- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25: 1277-1294.
- Kesaniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apolipoprotein E phenotype. *J Clin Invest* 1987; 80: 578-581.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
- Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985; 260: 6240-6247.
- Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 3445-3449.
- Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults. The CARDIA Study. Coronary artery risk development in young adults. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 859-868.
- Volcik KA, Barkley RA, Hutchinson RG, Mosley TH, Heiss G, Sharrett AR, et al. Apolipoprotein E polymorphisms predict low-density lipoprotein cholesterol levels and carotid artery wall thickness but not incident coronary heart disease in 12,491 ARIC study participants. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 342-348.
- Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by ApoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992; 33: 447-454.
- Katsuya T, Baba S, Ishikawa K, Mannami T, Fu Y, Inamoto N, et al. Epsilon 4 allele of apolipoprotein E gene associates with lower blood pressure in young Japanese subjects: the Suita Study. *J Hypertens* 2002; 20: 2017-2021.
- Wilson PW, 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: 1666-1671.
- Jemaa R, Elasmı M, Naouali C, Feki M, Kallel A, Souissi M, et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Tunisian population: frequency and effect on lipid parameters. *Clin Biochem* 2006; 39: 816-820.
- Rastas S, Mattila K, Verkkoniemi A, Niinisto L, Juva K, Sulkava R, et al. Association of apolipoprotein E genotypes, blood pressure, blood lipids and ECG abnormalities in a general population aged 85+. *BMC Geriatr* 2004; 4: 1.
- Schwanke CH, da Cruz I, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Analysis of the association between apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular risk factors in an elderly population with longevity. *Arq Bras Cardiol* 2002; 78: 561-579.
- Formiga F, Alia P, Navarro MA, Pujol R. Apolipoprotein e genotypes in nonagenarians. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54: 1471-1473.
- Bhavani AB, Sastry KB, Reddy NK, Padma T. Lipid profile and apolipoprotein E polymorphism in essential hypertension. *Indian Heart J* 2005; 57: 151-157.
- Isbir T, Yilmaz H, Bihorac A, Akoglu E. Mild-to-moderate hypertension and apolipoprotein E gene polymorphism. *Am J Hypertens* 1997; 10: 827-828.
- Li X, Du Y, Du Y, Huang X. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with essential hypertension and its complications. *Clin Exp Med* 2003; 2: 175-179.
- Niu W, Guo X, Su Y, Qiu C. Apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor gene polymorphisms in dyslipidemias-associated essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21: 337-339.
- Yilmaz H, Isbir T, Agachan B, Aydin M. Is epsilon4 allele of apolipoprotein E associated with more severe end-organ damage in essential hypertension? *Cell Biochem Funct*

- 2001; 19: 191-195.
20. Imazu M, Yamamoto H, Toyofuku M, Watanabe T, Okubo M, Egusa G, et al. Association of apolipoprotein E phenotype with hypertension in Japanese-Americans: data from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima Study. *Hypertens Res* 2001; 24: 523-529.
 21. Scuteri A, Najjar SS, Muller D, Andres R, Morrell CH, Zonderman AB, et al. *ApoE4* allele and the natural history of cardiovascular risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E322-E327.
 22. Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Apolipoprotein E polymorphism distribution in an elderly Brazilian population: the Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 1429-1434.
 23. Barreto SM, Passos VM, Firmo JO, Guerra HL, Vidigal PG, Lima-Costa MF. Hypertension and clustering of cardiovascular risk factors in a community in Southeast Brazil - The Bambuí Health and Ageing Study. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77: 576-581.
 24. Lima-Costa MF, Barreto SM, Uchoa E, Firmo JO, Vidigal PG, Guerra HL. The Bambuí Health and Aging Study (BHAS): prevalence of risk factors and use of preventive health care services. *Rev Panam Salud Publica* 2001; 9: 219-227.
 25. Costa MF, Uchoa E, Guerra HL, Firmo JO, Vidigal PG, Barreto SM. The Bambuí health and ageing study (BHAS): methodological approach and preliminary results of a population-based cohort study of the elderly in Brazil. *Rev Saúde Pública* 2000; 34: 126-135.
 26. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289: 2560-2572.
 27. World Health Organization. Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification index with Defined Daily Doses (DDDs). <http://www.whocc.no/atcddd/indexdata> base. Accessed February 10, 2005.
 28. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *HhaI*. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.
 29. Wattanakit K, Folsom AR, Chambless LE, Nieto FJ. Risk factors for cardiovascular event recurrence in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am Heart J* 2005; 149: 606-612.
 30. Sundstrom J, Sullivan L, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS. Relations of serum uric acid to longitudinal blood pressure tracking and hypertension incidence. *Hypertension* 2005; 45: 28-33.
 31. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-3167.
 32. Zou G. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 702-706.

6 CONCLUSÕES

- 1) A distribuição dos alelos e genótipos da **apoE** na população com idade ≥ 60 anos de Bambuí, MG, Brasil se encontra dentro das faixas de frequência relatadas para outras populações mundiais.
- 2) A distribuição alélica nesta população foi influenciada pela cor da pele dos indivíduos participantes, com os indivíduos de cor de pele negra tendo maior prevalência do alelo $\epsilon 4$, conforme descrito em populações negras de origem africana.
- 3) Não foi observada diferença na distribuição do alelo $\epsilon 4$ nas diferentes faixas etárias, sugerindo uma ausência de associação entre este alelo e mortalidade nesta população.
- 4) O alelo $\epsilon 4$ se encontrou associado a níveis mais elevados de LDL colesterol e o alelo $\epsilon 2$ a níveis mais baixos de LDL colesterol e mais altos de triglicérides na população idosa de Bambuí, confirmando associações descritas em outros grupos populacionais.
- 5) Os alelos da **apoE** não se encontram associados à pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e à hipertensão arterial prevalente nesta amostra populacional.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dados dos seguimentos da coorte de Bambuí fornecerão material importante para a avaliação epidemiológica da associação entre os alelos da **apoE** e a hipertensão arterial incidente, o que não pode ser avaliado com os dados da linha de base da coorte.

Adicionalmente, os dados longitudinais da coorte poderão fornecer material para uma melhor avaliação da associação entre os alelos da **apoE** com a mortalidade nesta população de idosos baseada na comunidade.

A existência do banco de DNA permitiria ainda o estudo de múltiplos genes quanto à sua associação com variáveis do metabolismo lipídico e a hipertensão arterial, associados à **apoE**.

REFERÊNCIAS

Andrade FM, Coimbra CE Jr., Santos RV, Goicoechea A, Carnese FR, Salzano FM et al. High heterogeneity of apolipoprotein E gene frequencies in South American Indians. *Ann Hum Biol* 2000; 27: 29-34.

Andrade FM, Ewald GM, Salzano FM, Hutz MH. Lipoprotein lipase and APOE/APOC-I/APOC-II gene cluster diversity in native Brazilian populations. *Am J Hum Biol* 2002; 14: 511-518.

Barreto SM, Passos VM, Firmo JO, Guerra HL, Vidigal PG, Lima-Costa MF. Hypertension and clustering of cardiovascular risk factors in a community in Southeast Brazil – The Bambuí Health and Ageing Study. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77: 576-581.

Bhavani AB, Sastry KB, Krishna Reddy N, Padma T. Lipid profile and apolipoprotein E polymorphism in essential hypertension. *Indian Heart J* 2005; 57: 151-157.

Camarano AA. Envelhecimento da População Brasileira: Uma Contribuição Demográfica. In: Viana de Freitas E, Py L, Neri AL, Cançado FAX, Gorzoni ML, Rocha SM, ed. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. Cap.6. p.58-71.

Carvalho JAM, Garcia RA. The aging process in the Brazilian population: a demographic approach. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(3): 725-733.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, et al. The seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: The JNC 7 Report. *Hypertension* 2003; 42: 1206-1252.

Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet* 1999; 63: 301-310.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-923.

Corder EH, Lannfelt L, Viitanen M, Corder LS, Manton KG, Winblad B et al. Apolipoprotein E genotype determines survival in the oldest old (85 years or older) who have good cognition. *Arch Neurol* 1996; 53: 418-422.

Crews DE, Kamboh MI, Mancilha-Carvalho JJ, Kottke B. Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and H polymorphisms in Yanomami Indians of north-western Brazil:

Associations with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolisms. *Hum Biol* 1993; 65: 211-224.

Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992; 33: 447-454.

Das HK, McPherson GA, Bruns GAP, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985; 260: 6240-6247.

Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8:1-21.

de Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat* 1994; 4: 178-194.

Demarchi DA, Salzano FM, Altuna ME, Fiegenbaum M, Hill K, Hurtado AM et al. APOE polymorphism distribution among Native Americans and related populations. *Ann Hum Biol* 2005; 32(3):351-365.

Ewbank DC. Mortality differences by APOE genotype estimated from demographic synthesis. *Genet Epidemiol* 2002; 22: 146-155.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *J Am Med Assoc* 1997; 278: 1349-1356.

Formiga F, Alia P, Navarro MA, Pujol R. Apolipoprotein E genotypes in nonagenarians. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54(9): 1471-1473.

França E, Alves JG, Hutz MH. Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipid levels in Brazilian children. *Hum Biol* 2004; 76: 267-275.

Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengård JH, et al. Apolipoprotein E Variation at the Sequence Haplotype Level: Implications for the Origin and Maintenance of a Major Human Polymorphism. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 881-900.

Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Apolipoprotein E distribution in an elderly Brazilian population: The Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 1429-1434.

Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, DeFronzo R, Kahn R, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-3167.

Gerdes LU, Gerdes C, Hansen PS, Klausen IC, Faegerman O, Dyerberg J. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum Genet* 1996; 98:546-550.

Gerdes LU, Jeune B, Ranberg KA, Nybo H, Vaupel JW. Estimation of apolipoprotein E genotype-specific relative mortality risks from the distribution of genotypes in centenarians and middle-aged men: apolipoprotein E gene is a "frailty" gene, not a "longevity" gene. *Genet Epidemiol* 2000; 19: 202-210.

Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res* 2005; 4(4): 691-703.

Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med* 2005; 83:329-342.

Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A et al. The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 338-349.

Hamilton LC. Interpreting multinomial logistic regression. *Stata Tech Bull* 1993; 13: 24-28.

Hanlon CS, Rubinsztein DC. Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis* 1995; 112: 85-90.

Heijmans BT, Westendorp RG, Slagboom PE. Common gene variants, mortality and extreme longevity in humans. *Exp Gerontol* 2000; 35: 865-877.

Hixson JE, Cox LA, Borenstein S. The baboon apolipoprotein E gene: structure, expression, and linkage with the gene for apolipoprotein C-1. *Genomics* 1988; 2: 315-323.

Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with *Hha*I. *J Lipid Res* 1990; 31:545-548.

Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults. The CARDIA Study. Coronary artery risk development in young adults. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 859-868.

Imazu M, Yamamoto H, Toyofuku M, Watanabe T, Okubo M, Egusa G, et al. Association of Apolipoprotein E Phenotype with Hypertension in Japanese-Americans: Data from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima Study. *Hypertens Res* 2001; 24: 523-529.

Isbir T, Yilmaz H, Bihorac A, Akoğlu E. Mild-to-Moderate Hypertension and Apolipoprotein E Gene Polymorphism. *Am J Hypertens* 1997; 10(7): 827-828.

Jemaa R, Elasmı M, Naouali C, Feki M, Kallel A, Souissi M, et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Tunisian population: Frequency and effect on lipid parameters. *Clin Biochem* 2006; 39: 816-820.

Katsuya T, Baba S, Ishikawa K, Mannami T, Fu Y, Inamoto N, et al. Epsilon 4 allele of apolipoprotein E gene associates with lower blood pressure in young Japanese subjects: The Suita Study. *J Hypertens* 2002; 20: 2017-2021.

Kesäniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal Cholesterol Absorption Efficiency in Man is Related to Apoprotein E Phenotype. *J Clin Invest* 1987; 80: 578-581.

Kokubo Y, Chowdhury AH, Date C, Yokoyama T, Sobue H, Tanaka H. Age-dependent association of apolipoprotein E genotypes with stroke subtypes in a Japanese rural population. *Stroke* 2000; 31: 1299-1306.

Lee JH, Tang MX, Schupf N, Stern Y, Jacobs DM, Tycko B et al. Mortality and apolipoprotein E in Hispanic, African-American, and Caucasian elders. *Am J Med Genet* 2001; 103: 121-127.

Li X, Du Y, Du Y, Huang X. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with essential hypertension and its complications. *Clin Exp Med* 2003; 2: 175-179.

Lima-Costa MF, Barreto SM, Uchoa E, Firmo JO, Vidigal PG, Guerra HL. The Bambuí Health and Aging Study (BHAS): prevalence of risk factors and use of preventive health care services. *Rev Panam Salud Publica* 2001; 9: 219-227.

Lima-Costa MF, Uchôa E, Guerra HL, Firmo JOA, Vidigal PG, Barreto SM. The Bambuí Health and Ageing Study (BHAS). Methodological approach and preliminary results of a population-based cohort study of the elderly in Brazil. *Rev Saúde Pub* 2000; 34: 126-135.

Louhija J, Viitanen M, Agüero-Torres H, Tilvis R. Survival in Finnish centenarians in relation to apolipoprotein E polymorphism. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49: 1007-1008.

Luthra K, Prasad K, Kumar P, Dwivedi M, Pandey RM, Das N. Apolipoprotein E gene polymorphism in cerebrovascular disease: a case-control study. *Clin Genet* 2002; 62: 39-44.

Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science* 1988; 240: 622-630.

Mahley RW, Innerarity TL, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25: 1277-1294.

Mahley RW, Rall Jr. SC. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1:507-537.

Margaglione M, Seripa D, Gravina C, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, et al. Prevalence of apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of ischemic stroke: an Italian Case-Control Study. *Stroke* 1998; 29: 399-403.

Milton K. Diet and Primate Evolution. *Sci Am* 1993; 269(2): 70-77.

Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS – DATASUS [on-line]. Brasília, Brasil, 2007. [Capturado 30 de agosto 2007] Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php?area=359A1B378C5D0E0F359G22H0I1Jd5L25M0N&VInclude=../site/infsaude.php>.

Niu W, Guo X, Su Y, Qiu C. Apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor gene polymorphisms in dyslipidemias-associated essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21: 337-339.

Oriá RB, Patrick PD, Zhang H, Lorntz B, Castro Costa CM, Brito GA et al. APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. *Pediatr Res* 2005; 57: 310-316.

Paik Y-K, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3445-3449.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New Engl J Med* 1990; 323: 22-27.

Paris D, Town T, Parker TA, Humphrey J, Mullan M. Isoform-specific vasoconstriction induced by Apolipoprotein E and modulation of this effect by Alzheimer's β -amyloid peptide. *Neurosci Lett* 1998; 256: 73-76.

Ramos LR. Epidemiologia do Envelhecimento. In: Viana de Freitas E, Py L, Neri AL, Cançado FAX, Gorzoni ML, Rocha SM, ed. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 2002. Cap.7. p.72-78.

Rastas S, Mattila K, Verkkoniemi A, Niinistö L, Juva K, Sulkava R, et al. Association of apolipoprotein E genotypes, blood pressure, blood lipids and ECG abnormalities in a general population aged 85+. *BMC Geriatrics* 2004; <http://www.biomedcentral.com/1471-2318/4/1>.

Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A, et al. Apolipoprotein E associates with β amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest* 1994; 94: 860-869.

Sandholzer C, Delport R, Vermaak H, Utermann G. High frequency of the apo ϵ 4 allele in Khoi San from South Africa. *Hum Genet* 1995; 95: 46-48.

Schwanke CHA, Cruz IBM, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Analysis of the association between apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular risk factors in an elderly population with longevity. *Arq Bras Cardiol* 2002; 78: 561-579.

Scuteri AS, Najjar SS, Muller D, Andres R, Morrell CH, Zonderman AB, et al. apoE4 allele and the natural history of cardiovascular risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E322-E327.

Sepehrnia B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, Nwankwo M, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. VII. Population distributions of polymorphisms of apolipoproteins A-I, A-II, A-IV, C-II, E and H in Nigeria. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 847-853.

Slooter AJ, Cruts M, van Broeckhoven C, Hofman A, van Duijn CM. Apolipoprotein E and longevity: The Rotterdam Study. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49: 1258-1259.

Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2004; 141: 137-147.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong L-M, Jakes R, et al. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: Implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11183-11186.

Sundstrom J, Sullivan L, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasani RS. Relations of serum uric acid to longitudinal blood pressure tracking and hypertension incidence. *Hypertension* 2005; 45: 28-33.

Uusitupa M, Sarkkinen E, Kervinen K, Kesäniemi YA. Apolipoprotein E phenotype and blood pressure. *Lancet* 1994; 343: 57.

van den Elzen P, Garg S, León L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, et al. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* 2005; 437: 906-910.

Vijg J, Suh Y. Genetics of Longevity and Aging. *Annu Rev Med* 2005; 56: 193-212.

Volcik KA, Barkley RA, Hutchinson RG, Mosley TG, Heiss G, Sharrett AR et al. Apolipoprotein E polymorphisms predict low density lipoprotein cholesterol levels and carotid artery wall thickness but not incident coronary heart disease in 12,491 ARIC study participants. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 342-348.

Wattanakit K, Folsom AR, Chambless LE, Nieto FJ. Risk factor for cardiovascular event recurrence in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J* 2005; 149: 606-612.

Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 1994; 45:249-302.

Wilson PWF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E Alleles, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease: The Framingham Offspring Study. *J Am Med Assoc* 1994; 272(21): 1666-1671.

Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1250-1255.

World Health Organization. Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification index with Defined Daily Doses (DDDs). [Capturado 10 de fevereiro de 2005] Disponível em: <http://www.whocc.no/atcddd/indexdatabase>.

World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Suíça. World Health Organization 2002 [Capturado 25 de julho de 2007] Disponível em <http://www.who.int/whr/2002>.

Wortley PM, Husten CG, Troscclair A, Chrismon J, Pederson LL. Nondaily smokers: a descriptive analysis. *Nicotine Tob Res* 2003; 5(5): 755-759.

Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara AK, Dybdal N, Bunting S, Ohneda O, et al. Hypertension and Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2762-2768.

Yilmaz H, Isbir T, Agachan B, Aydin M. Is epsilon4 allele of apolipoprotein E associated with more severe end-organ damage in essential hypertension? *Cell Biochem Funct* 2001; 19: 191-195.

Zou G. A modified Poisson regression approach to prospective studies with binary data. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 702-706.