

O POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEINA E EM TRÊS GRUPOS ÉTNICOS E
SUAS INFLUÊNCIAS SOBRE OS NÍVEIS LIPÍDICOS E
A DOENÇA DE ALZHEIMER

Fabiana Michelsen de Andrade

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em *Genética e
Biologia Molecular* da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul para a obtenção do
grau de Mestre em *Genética e Biologia
Molecular*

Orientadora: Dra. Mara Helena Hutz

Porto Alegre

1999

Dedico esta dissertação à minha filha, Jade.

AGRADECIMENTOS

À Dr. Mara H. Hutz não só pela brilhante orientação, mas também pela amizade e imensa paciência com os meus erros.

Ao Dr. Francisco M. Salzano, pela obtenção das amostras de caucasóides e indígenas, e pelas conversas sempre engrandecedoras na hora do almoço, fossem sobre ciência ou não.

A Dra. Sídia M. Callegari-Jaques, pela boa-vontade em todas as milhares de vezes em que lhe pedi ajuda para os testes estatísticos.

Ao Dr. Thales O. R. Freitas, pela iniciação à pesquisa.

A Dra. Maria Cátira Bortolini, Elisa Heidrich e Eliane Bandinelli pela obtenção da amostra de negróides.

Ao André F. Vargas pela coleta da amostra de caucasóides do Hospital de Clínicas.

À Letícia Kaufman, por me trazer para o grupo e me iniciar no laboratório.

À Fabiana Herédia, pela ajuda e incentivo para a prova de seleção de Mestrado.

À Marilu Fiegenbaum e Vanessa Mattevi pelos ensinamentos técnicos.

À Gisele Ewald pela ajuda em decifrar aquelas milhares de concentrações de reagentes, e pela paciência com minhas limitações de bióloga.

Ao Luiz Ernani Henkes por todas as horas perdidas com o computador da sala 117, além dos outros computadores do departamento.

Aos amigos Lêka, Vanessa, Marilu, Silvana, Tatiana, André, Domingos, Bandi e principalmente à Bina e à Gisa pelas boas horas de risadas e por agüentar meus desabafos e mau-humor.

Aos meus pais, Eldio e Marli, pelo incentivo constante em todas as áreas de minha vida.

Ao meu marido Alexandre, pela compreensão e companheirismo.

À minha filha Jade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que este estudo fosse concluído.

As pesquisas realizadas no Laboratório de DNA do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul são subvencionadas pelas agências financiadoras CNPq, FAPERGS, FINEP e PRONEX.

SUMÁRIO

Capítulo I — Introdução.....	6
1— Introdução.....	7
1.1 — Considerações gerais.....	7
1.2 — A apolipoproteína E.....	8
1.3 — O metabolismo de lipídeos.....	9
1.4—O locoda apoE.....	13
1.5 — Variabilidade do gene <i>APOE</i> em populações humanas.....	14
1.6 — Efeito da Apoe sobre diferentes fenótipos.....	19
1.6.1 — Relação com níveis lipídicos.....	19
1.6.2 — Doenças cardiovasculares.....	24
1.6.3 — Doença de Alzheimer.....	24
1.6.4 — Longevidade.....	26
1.7 — Justificativa e Objetivos.....	27
 Capítulo II — High heterogeinety of apolipoprotein E gene frequencies in South American Indians.....	 28
 Capítulo III — Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer' s disease in a Southern Brazilian population.....	 44
 Capitulo IV — DISCUSSÃO.....	 68
Capítulo V — RESUMO E CONCLUSÕES.....	72
Capítulo VI —SUMMARY AND CONCLUSION.....	76
Capítulo VII — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais

Lipídeos são utilizados "in vivo" para diversos propósitos, tais como fontes de energia e precursores de moléculas biologicamente ativas, como os hormônios esteróides, prostaglandinas e ácidos biliares, além de serem importantes constituintes das membranas e outras estruturas celulares. As moléculas desta classe mais abundantes no corpo humano são colesterol, ésteres de colesterol, triglicerídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos livres (Weiss, 1993; Montgomery, 1996).

Os lipídeos, por serem apolares e insolúveis em água, necessitam de proteínas especializadas para serem transportados no plasma, chamadas apolipoproteínas. Estas são codificadas por genes específicos, denominados por abreviações, como por exemplo, o gene da apo E (apo E, proteína; *APOE*, gene).

A partícula formada por lipídeos e apolipoproteínas é denominada lipoproteína. Essas moléculas são caracterizadas de acordo com sua posição em gradiente de centrifugação. Assim, lipoproteínas com uma alta relação lipídeo/proteína terão uma densidade baixa, e uma pequena quantidade de lipídeo fará com que a lipoproteína seja mais densa. Estas partículas são classificadas, de um modo geral, como quilomícrons, quilomícrons remanescentes, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e lipoproteínas de densidade alta (HDL).

As apolipoproteínas ocupam um papel central no metabolismo de lipídeos, sendo necessárias para o transporte dessas moléculas, além de agirem como ativadoras ou inibidoras de enzimas do metabolismo de lipídeos. Essas proteínas possuem duas funções básicas: solubilizam os lipídeos altamente hidrófobos e contém sinais que

regulam o movimento de lipídeos particulares em sua entrada e saída de células-alvo específicas (Stryer, 1987).

1.2 - A apolipoproteína E

A apo E é uma importante constituinte estrutural de várias lipoproteínas plasmáticas, atua como ligante de alta afinidade para o receptor LDL (Mahley, 1988), para várias classes de receptores de lipoproteínas, entre eles o receptor de remanescentes de quilomicrons (também chamado de receptor apo E) e a proteína relacionada ao receptor LDL (LRP) (Mahley e Innerarity, 1983), além de ser o principal componente da VLDL (Utermann e cols., 1980). Estes receptores estão presentes principalmente em células hepáticas, o que permite uma absorção específica das partículas ricas em colesterol, especialmente quilomícrons, VLDL e seus remanescentes (Kao e cols., 1995). A apo E possui também um importante papel no transporte de lipídeos para o interior dos tecidos periféricos, principalmente cérebro, nervos e paredes das artérias, além de estar envolvida na absorção do colesterol pelo intestino (Mahley, 1988).

A maior quantidade de mRNA da apo E é encontrada no fígado, que é a principal fonte desta proteína. Grandes quantidades de apo E estão também presentes no cérebro, onde os astrócitos são primariamente responsáveis pela sua produção. Além disso, a apo E é encontrada mais discretamente em outros órgãos, onde provavelmente é produzida por macrófagos. Foi também, detectada nas células do músculo liso (Mahley e Rall, Jr., 1995).

Deste modo, outras funções da apo E estão relacionadas com a redistribuição de lipídeos entre células de um mesmo tecido, como por exemplo, entre células de nervos periféricos lesados e em regeneração. Nestes tipos celulares, a apo E é a única apolipoproteína produzida, formando a HDL rica em apo E. Esta lipoproteína capta os lipídeos do meio intercelular, e é avidamente internalizada pelos receptores, de modo

que o suprimento de lipídeos seja suficiente para o tecido em crescimento. Da mesma maneira, a secreção de apo E pelos macrófagos maximiza a absorção de lipoproteínas contendo apo E. Na presença de altos níveis de colesterol no plasma, os macrófagos captam VLDL e IDL avidamente, formando as "foam cells" que são precursoras das placas ateroscleróticas. A apo E atua também na proliferação e diferenciação de células musculares lisas, além de estar relacionada com imunorregulação (Mahley, 1988).

A estrutura e conformação da apo E em solução e especialmente sua topografia na superfície de partículas lipoprotéicas, parecem influenciar o metabolismo destas lipoproteínas tanto sob condições normais como em casos patológicos. O catabolismo de partículas ricas em lipídeos, pode ser então modulado pela conformação da apo E, que pode influenciar a afinidade ligante/receptor (Dergunov e Rosseneu, 1994).

1.3 - O metabolismo de lipídeos

O colesterol pode ser obtido a partir da dieta, ou sintetizado "de novo". O principal local de síntese do colesterol em mamíferos é o fígado, apesar de quantidades apreciáveis de colesterol serem formadas também pelo intestino (Stryer, 1987).

Os lipídeos ingeridos são absorvidos pela mucosa intestinal sob forma de quilomícrons, partículas com alto teor de triglicerídeos que contém as apolipoproteínas B-48, CII e CIII em sua superfície (fig. 1).

Nos capilares, a presença da apo CII possibilita a hidrólise dos triglicerídeos pela lipoproteína lipase, reação esta que libera os ácidos graxos e as apos CII e CIII, resultando nos quilomícrons remanescentes, que são menores e relativamente ricos em colesterol. Estes ainda possuem apo B-48, além de estarem agora ligados à apo E. Devido ao seu pequeno tamanho, e pela presença da apo E, os quilomícrons

remanescentes são absorvidos por hepatócitos, que possuem em sua superfície receptores para apo B e E (receptor LDL) e receptores para apo E (LRP) (fig. 1).

No fígado, o colesterol pode ser usado na produção de membranas celulares, hormônios esteróides ou lipoproteínas, ou pode ser secretado como colesterol livre.

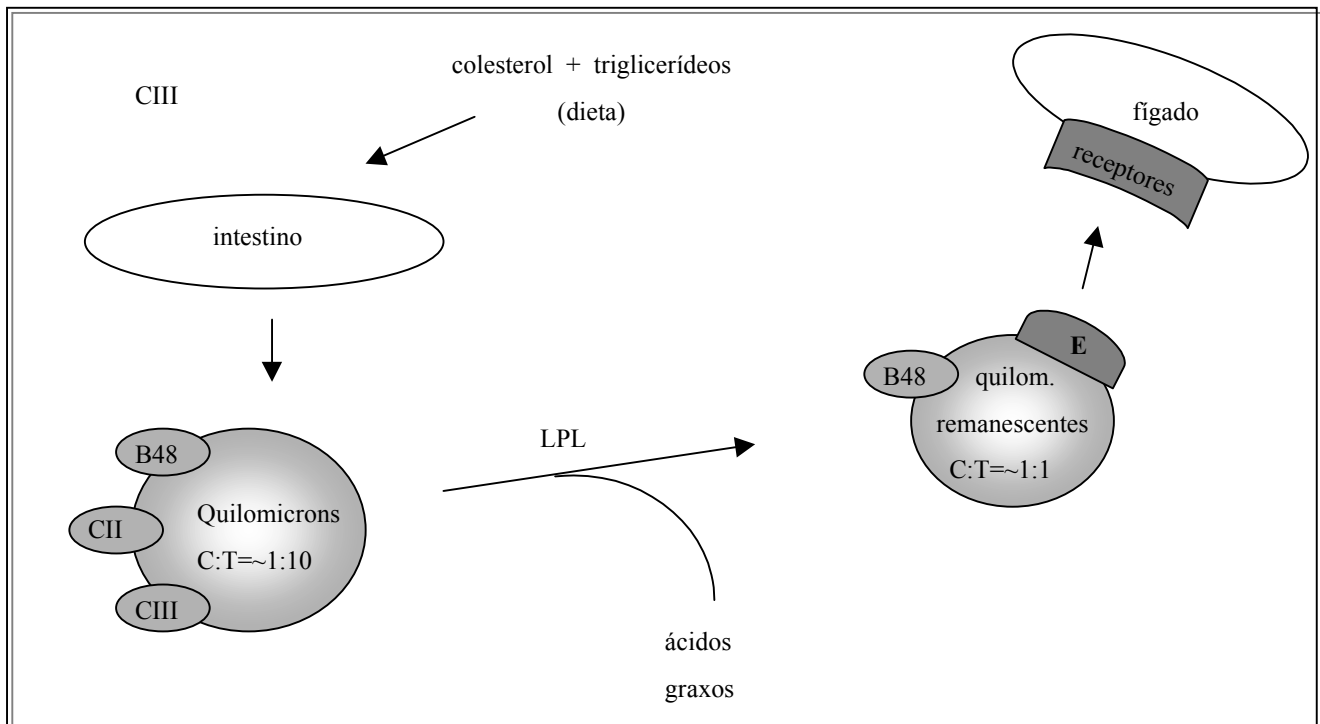


Figura 1 - Transporte de lipídeos - via exógena. C:T, proporção de colesterol para triglicerídeos; LPL, lipoproteína lipase

Outra rota metabólica envolve a síntese e secreção de colesterol e triglicerídeos pelo fígado, tornando-os disponíveis para os tecidos periféricos (fig. 2). Estes lipídeos são secretados sob a forma de VLDL (partículas ricas em triglicerídeos) contendo apo B-100, apo E e apo C. Neste caso a apo B-100 atua na secreção e a presença da apo C impede que estas partículas sejam reabsorvidas, por conterem apo B e E. Com a hidrólise pela lipoproteína lipase, ocorre a quebra de triglicerídeos e a VLDL é convertida em LDL que possui somente apo B-100. Nesta conversão, são produzidos resíduos de VLDL que são absorvidos via receptores LDL ou receptores

LRP e portanto são portadores de apo E. Além do fígado, tecidos periféricos também possuem receptores para LDL e o acesso de LDL mediado por estes receptores regula a síntese endógena do colesterol e reprime a produção de receptores LDL e enzimas relacionadas.

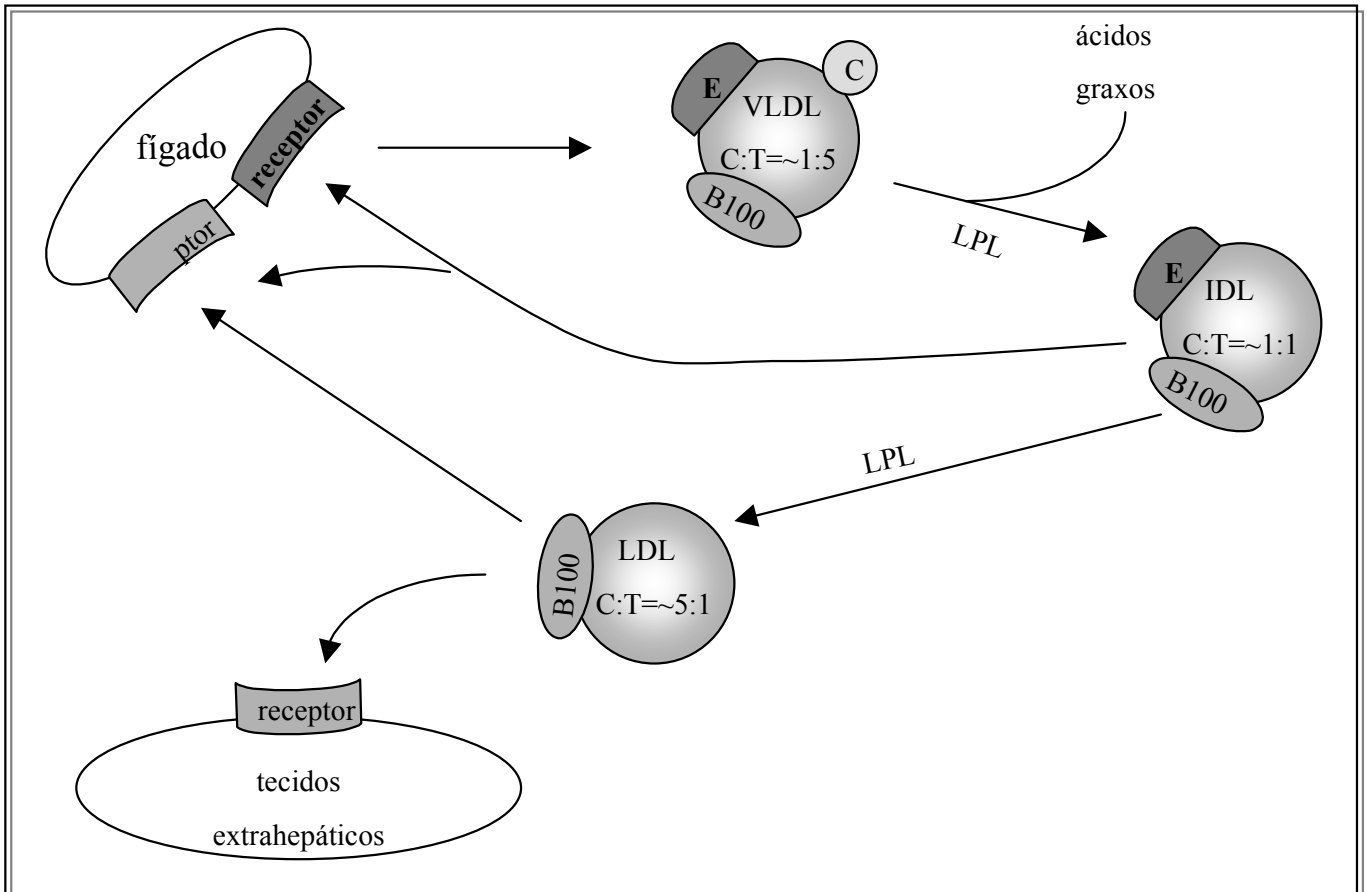


Figura 2 - Transporte de lipídeos - via endógena. C:T, proporção de colesterol para triglicerídeos; LPL, lipoproteína lipase

Células ricas em colesterol (como, por exemplo, macrófagos) podem liberar o lipídeo para aceptores no fluído intersticial (fig. 3). Um importante acceptor é a apolipoproteína AI, pobre em lipídeos. Ao adquirir colesterol, forma-se a HDL nascente que possui somente colesterol não esterificado. Esta lipoproteína adquire progressivamente mais colesterol e muda para uma conformação esférica (HDL3). Nessa conformação associa-se à LCAT (lecitina-colesterol aciltransferase), que

esterifica o colesterol livre presente na HDL3. À medida que são formados mais ésteres de colesterol, a HDL3 adquire também a apo AII, formando a HDL2. Nesta fase, a CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol) transfere os ésteres de colesterol para a IDL ou VLDL. Estas lipoproteínas, por possuírem apo E e apo B, são internalizadas pelos receptores dos hepatócitos. Deste modo, completa-se a via conhecida como "transporte reverso" do colesterol (para uma revisão mais detalhada, ver Stryer,1987; Mahley,1988; Weiss,1993; Fielding e Fielding, 1995).

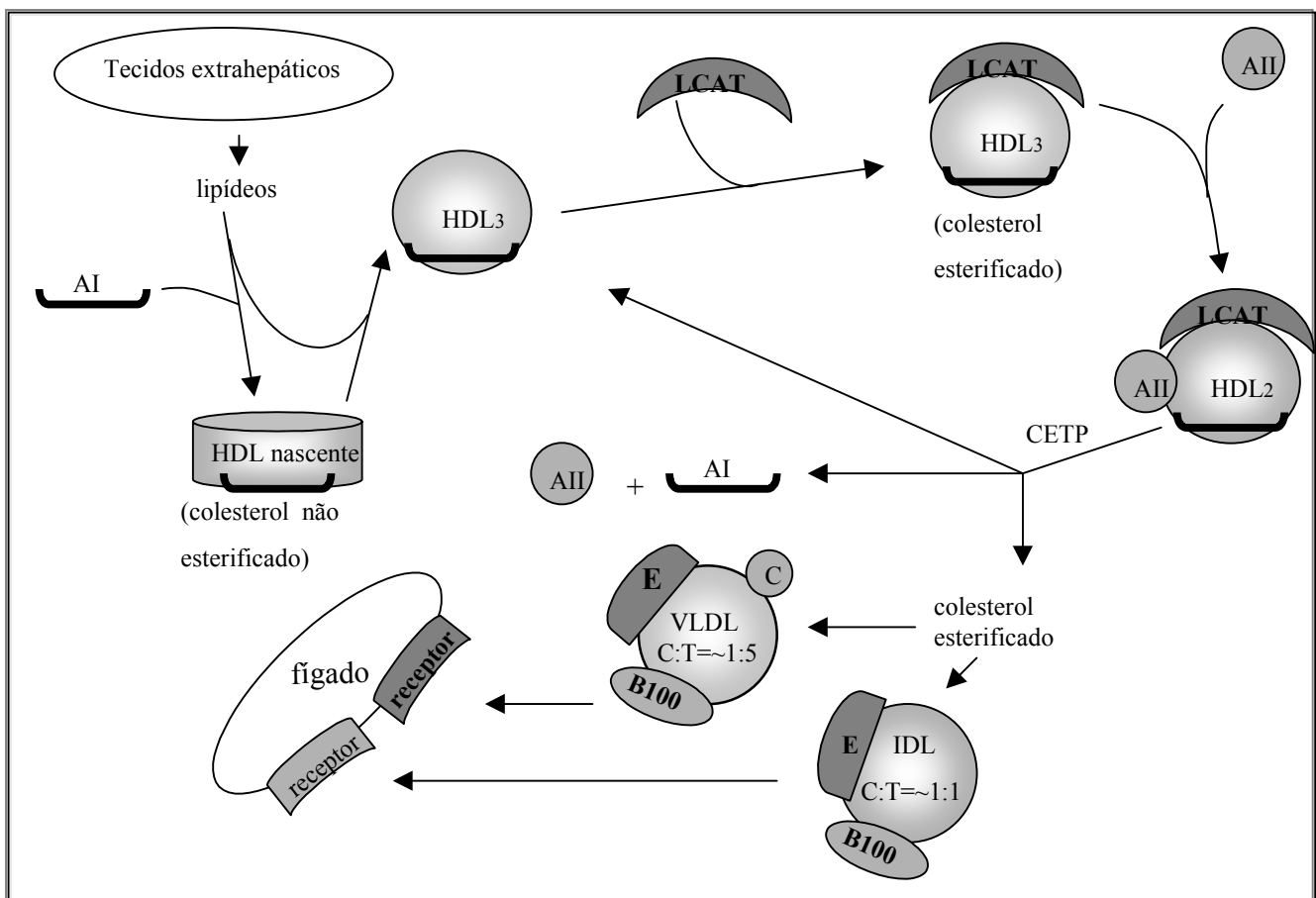


Figura 3 - Transporte reverso do colesterol

1.4 - O loco da apo E

O loco da apo E foi mapeado no cromossomo 19q 13.2 (Olaisen e cols., 1982) e está ligado aos locos da apo CI e CII e ao pseudogene da apo C I (Tata e cols., 1985).

Este gene tem um comprimento de 3.7 Kb. A análise de sua estrutura revelou a presença de quatro exons e três íntrons (fig. 4). A seqüência promotora TATAATT se localiza a aproximadamente 30 bp 5' do sítio de início da transcrição (Mahley, 1988).

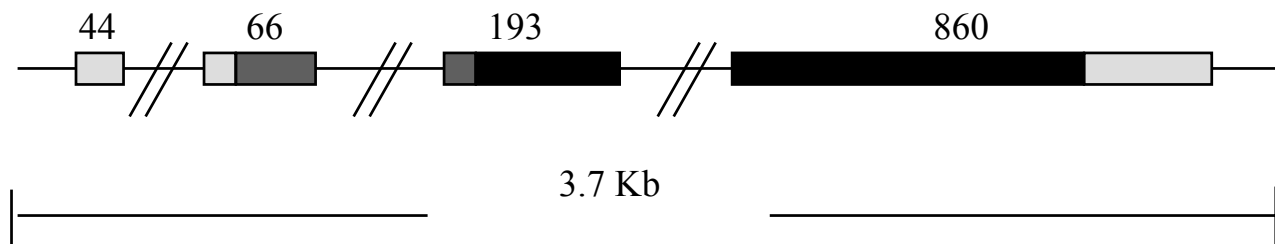


Figura 4 - Representação do loco da *APOE*

O transcrito primário da apo E tem 1163 bp de comprimento. O produto primário da tradução é composto por 317 aminoácidos. A parte amino terminal composta por 18 aminoácidos funciona como polipeptídeo sinal e é excisado para possibilitar a secreção da proteína, contendo agora 299 aminoácidos, e com um peso molecular de 34 kD. (Mahley, 1988).

As mutações de ponto no exon quatro originam três alelos (E^*2 , E^*3 e E^*4) com freqüências polimórficas e codificam para três diferentes formas da proteína. Consequentemente, três fenótipos homozigotos ($E2/E2$, $E3/E3$ e $E4/E4$) e três heterozigotos ($E2/E3$, $E2/E4$ e $E3/E4$) são expressos .

O alelo E^*3 caracteriza-se por possuir um códon para cisteína na posição 112 e na posição 158 um para arginina. Já em E^*2 , há uma troca de arginina para cisteína na posição 158, enquanto que no E^*4 ocorre uma substituição de cisteína para arginina na posição 112 (ver Richard e cols.,1994). Como estas mutações envolvem adições ou perdas de sítios de restrição *Hha I*, as três formas são facilmente distinguíveis pela

digestão com essa endonuclease de restrição. A seqüência entre os resíduos 140 e 160 são primariamente responsáveis pela interação do lipídeo ligado à apo E com o receptor para LDL (Dergunov e Rosseneu, 1994). O resíduo 112 parece determinar a especificidade de ligação do lipídeo à lipoproteína (Mahley e Rall Jr., 1995). Como as mutações descritas envolvem a substituição de um aminoácido neutro (cisteína) por um aminoácido básico (arginina) as propriedades das regiões correspondentes da molécula são modificadas.

O produto codificado pelo alelo *E*2* possui uma afinidade de apenas 1 a 2% pelo receptor em relação ao alelo *E*3* (Demant e cols., 1991). Além disso, o catabolismo da partícula contendo apo E2 também é mais lento (Davignon e cols., 1988), resultando em uma taxa menor de formação de LDL. Como a hidrólise até LDL é mais lenta, ocorre um acúmulo de VLDL e remanescentes contendo apo E2, no meio extracelular. Dessa forma, o nível extracelular de colesterol diminui, levando a um estímulo na síntese de receptores, conseqüentemente aumenta a absorção de LDL, diminuindo sua concentração no plasma.

Por outro lado, as lipoproteínas contendo apo E4 são rapidamente internalizadas pelo fígado (Greegg e cols., 1981), além de sofrerem uma hidrólise mais eficiente por parte da lipoproteína lipase (Davignon e cols., 1988). Deste modo, além do suprimento celular de colesterol se tornar suficiente e portanto provocar a diminuição na produção de receptores, com o conseqüente acúmulo de LDL no exterior da célula, as VLDL são catabolizadas rapidamente, o que também contribue para o aumento do nível de LDL no plasma (ver Boerwinkle e Utermann, 1988).

1.5 - Variabilidade da *APOE* em populações humanas

As freqüências alélicas da *APOE* mostram grande variação mesmo entre populações de um mesmo grupo étnico (tabela I.1). De uma forma global, o alelo *E*3* é

o mais frequente em todas as populações investigadas, seguido pelo E^*4 , enquanto que o E^*2 é o menos prevalente, não tendo sido detectado em algumas populações.

Em caucasóides, os valores de E^*3 variaram de 69,5% a 89% e os de E^*4 entre 5,2% e 24%. O alelo E^*2 sempre foi identificado embora com uma prevalência menor que E^*4 (4% a 10%) (tabela I.1).

Ao comparar diferentes populações da Europa, Siest e cols.(1995) e Lucotte e cols.(1997) observaram um gradiente norte-sul na frequência de E^*4 . A frequência desse alelo aumenta a medida que a população se localiza mais ao norte do continente. As populações da Grecia, da Italia e da Espanha possuem a menor frequência de E^*4 entre os caucasóides, enquanto que as populações de países como a Dinamarca, Grã-Bretanha e Finlândia possuem as prevalências mais elevadas deste alelo encontradas neste grupo étnico (tabela I.1). É interessante notar que esta diminuição na prevalência de E^*4 no sul da Europa está acompanhada por aumento nos valores de E^*3 , e não pela mudança de frequência do alelo E^*2 .

Poucos estudos investigaram a variabilidade do loco da apo E em populações de origem africana. Na África foram identificadas frequências mais altas de E^*4 (18-41%) e mais baixas de E^*3 (54% a 72%) em relação à caucasóides(tabela I.1).

Na Ásia, de uma maneira geral, as frequências de E^*3 são sempre superiores a 76% exceto nas populações aborígenes de Papua Nova Guine e da Malasia. A frequência de E^*2 varia entre menos de 1% na Sibéria até 14% nos aborígenes da Malasia. Essa é a maior prevalência descrita para qualquer população para esse alelo(tabela I.1).

Nas populações aborígenes do continente americano, a prevalência de E^*4 é em geral mais alta do que a observada em caucasóides e asiáticos (tabela I.1). O alelo E^*2 foi identificado com frequências muito baixas nas populações nativas da América do Norte. É interessante salientar que esse alelo não foi detectado em nenhuma população de ameríndios das Américas Central e do Sul (Asakawa e cols., 1985, Kamboh e cols., 1991b, Crews e cols., 1993, Scacchi e cols., 1997; Marin e cols., 1997).

Tabela I.1 - distribuição das frequências alélicas da *APOE* em diferentes grupos étnicos

POPULAÇÃO(n)	<i>E*2</i>	<i>E*3</i>	<i>E*4</i>	REFERÊNCIA
Caucasóides				
Australianos(598)	0.103	0.760	0.137	de Knijff e cols., 1994
Norte-americanos(5027)	0.066	0.796	0.137	de Knijff e cols., 1994
Norte-americanos (201)	0.080	0.783	0.137	Kamboh e cols., 1993
Norte-americanos hispânicos (238)	0.048	0.853	0.099	Kamboh e cols 1993
Franco-Canadenses(435)	0.137	0.749	0.114	Robitaille e cols., 1996
Ingleses (1259)	0.057	0.759	0.184	Tiret e cols., 1994
Ingleses(844)	0.082	0.769	0.149	de Knijff e cols., 1994
Europeus - N(1325) ¹	0.090	0.743	0.167	de Knijff e cols., 1994
Europeus - centro(8191) ²	0.084	0.770	0.146	de Knijff e cols., 1994
Europeus - S(2737) ³	0.089	0.795	0.116	de Knijff e cols., 1994
Turcos (8366)	0.061	0.860	0.079	Mahley e cols., 1995
Gregos (216)	0.053	0.882	0.065	Sklavounou e cols.,1997
Cipriotas gregos (335)	0.054	0.876	0.070	Cariolou e cols., 1995
Italianos (centro) (417)	0.066	0.851	0.083	Corbo e cols., 1995
Italianos (sul) (367)	0.056	0.858	0.085	Corbo e cols., 1995
Italianos (Sardenha) (280)	0.050	0.898	0.052	Corbo e cols., 1995
Marroquinos (100)	0.041	0.855	0.104	Valveny e cols., 1997
Espanhois (560)	0.038	0.858	0.104	Valveny e cols., 1997
Espanhois (399) ⁴	0.075	0.850	0.075	Muros e cols., 1996
Franceses (466)	0.120	0.764	0.116	Gueguen e cols.,1989
Alemães (563)	0.063	0.793	0.144	Boerwinkle e cols.,1988
Dinamarqueses (466)	0.085	0.741	0.174	Gerdes e cols., 1992

(continua)

Belgas (760) ³	0.073	0.765	0.162	Braeckman e cols., 1996
Islandeses(185)	0.068	0.768	0.165	Hallman e cols.,1991
Finlandeses(203)	0.062	0.695	0.244	Hallman e cols., 1991
Húngaros(202)	0.064	0.807	0.129	Hallman e cols., 1991
Tirolesees(469)	0.090	0.789	0.117	Hallman e cols., 1991
Asiáticos				
Evenki (Siberia)(124)	0.004	0.843	0.153	Kamboh e cols.,1996
Ilhas do Pacífico(67)	0.045	0.799	0.157	de Knijff e cols., 1994
Pawaia(Papua N. Guiné) (58)	0.138	0.603	0.259	Kamboh e cols., 1990
Huli (Papua N. Guiné) (52)	0.154	0.356	0.490	Kamboh e cols., 1990
Aborígenes da Malasia (223)	0.140	0.620	0.240	Gajra e cols., 1994
Norte da Ásia(2755)	0.051	0.849	0.100	de Knijff e cols., 1994
Sul da Ásia(910)	0.110	0.814	0.077	de Knijff e cols., 1994
Chineses(546)	0.076	0.875	0.049	Kao e cols., 1995
Chineses(190)	0.097	0.829	0.074	Hallman e cols., 1991
Japoneses (319)	0.080	0.846	0.074	Hallman e cols., 1991
Japoneses (1329)	0.052	0.855	0.093	Zaman e cols.,1997
Malaios(118)	0.114	0.767	0.119	Hallman e cols., 1991
Indianos(142)	0.046	0.827	0.127	Hallman e cols., 1991
Koreanos (145)	0.020	0.870	0.110	Hong e cols., 1997
Negróides				
Norte-americanos(1062)	0.075	0.722	0.203	de Knijff e cols., 1994
Sudaneses(103)	0.081	0.619	0.291	Hallman e cols., 1991
Nigerianos(365)	0.027	0.677	0.296	Sepehrnia e cols.,1989
Africanos (470)	0.116	0.706	0.178	Zekraoui e cols., 1997
Pigmeus (70)	0.057	0.536	0.407	Zekraoui e cols., 1997

(continua)

Indígenas

Wayana-Apalai(25) ⁵	0.000	0.820	0.180	Marin e cols., 1997
Wayampi(26) ⁵	0.000	0.820	0.180	Marin e cols., 1997
Arara (21) ⁵	0.000	0.928	0.072	Marin e cols., 1997
Kayapo (26) ⁵	0.000	0.904	0.096	Marin e cols., 1997
Cayapa (91) ⁵	0.000	0.720	0.280	Scacchi e cols.,1997
Índios da América Latina(95) ⁵	0.000	0.816	0.184	Asakawa e cols., 1985
Yanomami (23) ⁵	0.000	0.956	0.043	Marin e cols., 1997
Yanomami (96) ⁵	0.000	0.844	0.156	Crews e cols.,1993
Maia (135)	0.000	0.911	0.089	Kamboh e cols., 1991b
Índios do Arizona - EUA(1500)	0.004	0.859	0.137	Kataoka e cols., 1996
Índios de Dakota(S e N)-EUA (1514)	0.016	0.876	0.108	Kataoka e cols. 1996
Índios de Oklahoma - EUA(1527)	0.029	0.828	0.143	Kataoka e cols., 1996
Aborígenes do Canadá (188)	0.006	0.886	0.108	Hegele e cols., 1997
Nativos do Alasca(130)	0.020	0.787	0.193	Scheer e cols.,1995
Outros				
Inuit da Groelândia (100) ⁶	0.025	0.790	0.185	Gerdes e cols., 1996b
Inuit da Groelândia(78) ⁷	0.000	0.769	0.231	Gerdes e cols., 1996b
Inuit da Groelândia(133)	0.015	0.756	0.229	de Knijff e cols., 1994
Aborígenes da Austrália(64)	0.000	0.740	0.260	Kamboh e cols., 1991a

¹Islândia, Dinamarca, Noruega e Suécia; ²Países Baixos, Suíça, Austria, Alemanha e Hungria; ³França, Espanha, Portugal e Itália; ⁴Ilhas Canárias; ⁵tribos da América do Sul; ⁶costa oeste; ⁷costa leste

1.6 - Efeito dos alelos da *APOE* sobre diferentes fenótipos

1.6.1-Relação com níveis lipídicos

Numerosos estudos têm especulado sobre o efeito do polimorfismo da *APOE* nos níveis de lipídeos circulantes no plasma (tabela I.2). No entanto, a magnitude deste efeito varia entre os grupos étnicos, o que gera grande controvérsia sobre a sua universalidade.

Em caucasóides, a maioria dos trabalhos encontrou uma associação do alelo E^*4 com aumento nos níveis de colesterol total e LDL quando comparados com níveis lipídicos de homozigotos E^*3/E^*3 . Algumas exceções são encontradas neste grupo étnico, como pode ser observado na tabela I.2. A população hispano-americana estudada por Kamboh e cols. (1995) é um bom exemplo, pois estes autores não obtiveram resultados significantes ao estudar uma amostra de hispânicos com aproximadamente 20% de genes de Ameríndios. Da mesma maneira, Valdez e cols. (1995) também não encontraram associação com colesterol total estudando uma população hispânica do Texas.

Todas as investigações realizadas com povos de origem asiática [exceto o estudo de Hallman e cols. (1991) com um grupo da Malásia] encontraram a mesma relação, embora alguns autores não tenham documentado significância estatística da associação com o alelo E^*4 (Kao e cols., 1995 e Tozuka e cols., 1996).

Já para os negróides, somente três investigações foram descritas. Em nigerianos foi observado que portadores de E^*4 tinham seus níveis lipídicos aumentados, embora não significativamente (Sepehrnia e cols., 1989), enquanto que no Sudão (Hallman e cols., 1991) e no grupo "Khoi San" da África do Sul (Sandholzer e cols., 1995) houve associação significativa.

A relação deste loco com os níveis de HDL foi pouco estudada. Uma associação entre E^*4 e a diminuição dos níveis de HDL foi descrita por alguns autores para populações caucasóides, enquanto outros estudos não encontraram resultados

significantes. Uma meta-análise realizada com populações de dezesseis países diferentes mostrou uma diminuição significativa dos níveis de HDL em portadores de *E*4* (Dallongeville e cols., 1992).

Da mesma maneira que *E*4* está ligado com o aumento dos valores de colesterol e LDL, na maioria dos estudos citados (tabela I.2), o alelo *E*2* foi relacionado com um decréscimo destes níveis. Em muitas investigações, o efeito deste alelo é maior que o de *E*4*, como foi observado por Sefhernia e cols. (1989), Kao e cols. (1995), Uusitupa e cols. (1996) e Gylling e cols. (1997) que documentaram efeitos significantes somente em relação ao decréscimo nos níveis de colesterol total relacionado com *E*2*.

Foi demonstrado que o efeito do alelo *E*4* sobre o aumento de níveis de colesterol é mais pronunciado quando a dieta é rica em colesterol e ácidos graxos saturados, sugerindo que este é o principal fator interagindo com a apo E na determinação dos níveis lipídicos (Lala e cols., 1998). Em todos os estudos feitos com populações até a pouco tempo formadas por grupos caçadores/coletores e com uma dieta pobre em gordura de origem animal, as associações da apo E com os valores de colesterol e triglicerídeos não foram significantes (tabela I.2). A única exceção é uma amostra de nativos da Malásia (Gajra e cols., 1994).

O estudo da influência da apo E sobre os níveis de triglicerídeos mostra resultados bem menos coerentes. Assim, já foi documentada a associação do aumento destes níveis associado ao alelo *E*4* (Mahley e cols., 1995; Gerdes e cols., 1996), ao alelo *E*2* (Sefhernia e cols., 1989) e a ambos os alelos (vários autores, tabela I.2). A meta-análise anteriormente citada (Dallongeville e cols., 1992) mostrou que há associação dos alelos *E*2* e *E*4* com aumento de níveis de triglicerídeos. No entanto, a maioria das investigações feitas após este estudo não obtiveram resultados significantes para esta relação (tabela I.2).

Além da origem étnica e da dieta, outros fatores parecem influenciar os resultados encontrados. Entre estes, estão a presença de diabetes (Kamboh e cols., 1995), obesidade (Boer e cols., 1997), idade avançada (Pablos-Mendez e cols., 1997),

sexo (Xhignesse e cols., 1991), menopausa em mulheres (Zaman e cols., 1997) além da relação com outros locos envolvidos no metabolismo de lipídeos (Gylling e cols., 1995).

Tabela 2 - Investigações sobre a associação entre os alelos da *APOE* e níveis lipídicos

POPULAÇÃO	REFERÊNCIA	INFLUÊNCIA SOBRE OS NÍVEIS LIPÍDICOS*						
		CT	HDL	LDL	VLDL	TRIG.	COL ñ-HDL	CT/ HDL
CAUCASÓIDES								
Finlandia	Gylling e cols., 1997	2-				NS		
Finlandia	Porkka e cols. 1994	4+ 2-	NS	4+ 2-		NS		
Finlandia ¹	Uusitupa e cols., 1996	2-	NS	2-	NS	NS		
Finlandia (idosos)	Louhija e cols.,1994	NS	4+ 2-					
Finlandia	Hallman e cols., 1991	4+ 2-						
Islandia	Hallman e cols., 1991	4+ 2-						
Belgica ²	Braekcman e cols., 1996	4+ 2-	4- 2+				4+ 2-	
Austria(Tiro- leses)	Hallman e cols., 1991	4+ 2-						
Hungria	Hallman e cols., 1991	4+ 2+						
Países Baixos	Boer e cols., 1998	4+ 2-	4- 2+					
Alemanha	Boerwinkle e Utermann, 1988	4+ 2-						
França	Gueguen e cols., 1989	4+ 2-				NS		
Espanha	Muros e cols., 1996	4+ 2-	NS	4+ 2-		4+ 2+		
Turquia	Mahley e cols., 1995	4+ 2-	NS	4+ 2-		4+ 2-		
Europa (vários países)	Boer e cols., 1997	4+ 2-				4+ 2+		
Canadá (franco- canadenses)	Robitaille e cols., 1996	4+ 2-	4-	4+ 2-		4+ 2+Γ		
Canadá	Sing e Davignon,1985	4+ 2-	NS	4+ 2-	NS	NS		
EUA	Boerwinkle e cols., 1991	NS	4- 2+	4+ 2-		NS		
EUA ³	Valdez e cols., 1995	NS	NS	4+ 2-		NS		
EUA ⁴	Valdez e cols., 1995	NS	NS	NS		4+ 2+		

(continua)

EUA⁴	Kamboh e cols., 1993	4+ 2-	NS	4+2-Γ		NS		
EUA³	Kamboh e cols., 1993	4+	NS	4+ 2-		NS		
EUA^{3,5}	Kamboh e cols., 1995	4+2-	NS	4+ 2-		NS		
EUA^{4,5}	Kamboh e cols., 1995	NS	NS	4+E		NS		
EUA^{4,6}	Kamboh e cols., 1995	NS	4-Γ	NS		NS		
EUA^{3,6}	Kamboh e cols., 1995	NS	NS	NS		4+2+Γ		
ASIÁTICOS								
Japão⁷	Tozuka e cols., 1996	2-						
China	Kao e cols., 1995	2-E	NS	4+2-E 2- Γ		NS		
China	Hallman e cols., 1991	4+ 2-						
Japão	Zaman e cols., 1997	4+ 2-	NS					4+ 2-
Japão	Hallman e cols., 1991	4+ 2-						
India	Hallman e cols., 1991	4+ 2-						
Malasia	Hallman e cols., 1991	NS						
NEGRÓIDES								
Sudão	Hallman e cols., 1991	2-						
Nigeria	Sepehrnia e cols., 1989	2-	NS	4+ 2-		2+		
Khoi San	Sandholzer e cols., 1995	4+ 2-						
AMERÍNDIOS								
Yanomami	Crews e cols.,1993	NS				NS		
Maia	Kamboh e cols., 1991a	NS						
Inuit	Gerdes e cols.,1996b	NS	NS	NS		4+Γ	4+E	
Alasca	Scheer e cols., 1995	NS	NS				NS	
EUA	Kataoka e cols., 1996		4- 2+	4+ 2-				
Siberia	Kamboh e cols., 1996	NS	NS	NS		NS		
Aborígenes da Malasia	Gajra e cols., 1994	4+	NS	4+		NS		
Aborígenes do Canada	Hegele e cols., 1996	NS	NS	2-		NS		4+

* 4+: aumento significativo do nível lipídico associado com alelo E^*4 ; 4-: diminuição significativa do nível lipídico associado ao alelo E^*4 ; 2+: aumento significativo do nível lipídico associado com alelo E^*2 ; 2-: diminuição significativa do nível lipídico associado ao alelo E^*2 ; NS: não significativa
 E associação encontrada somente em mulheres; Γ associação encontrada somente em homens
¹amostra de mulheres; ²amostra de homens; ³amostras biétnicas (hispanico-americanos); ⁴brancos não hispânicos; ⁵normoglicêmicos; ⁶diabéticos; ⁷amostra de crianças

1.6.2-Doenças cardiovasculares

Níveis lipídicos aumentados estão associados com doenças cardiovasculares e coronarianas (ver Montgomery e cols., 1996). Assim, muitos autores sugeriram que portadores do alelo E^*4 teriam maior susceptibilidade a este tipo de patologia, enquanto aqueles com E^*2 seriam mais resistentes a essas doenças. Um exemplo deste tipo de abordagem foi descrita por Tiret e cols. (1994), que relata uma frequência aumentada de E^*4 na descendência de pais com doença coronária. Por outro lado, Moore e cols.(1997), ao investigarem uma amostra de indivíduos doentes, encontraram uma frequência maior de E^*2 , o que pode ser devido ao aumento de triglicerídeos causado por esta forma de apo E, como documentaram alguns autores (Kataoka e cols., 1996 e Muros e cols., 1996).

1.6.3-Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa caracterizada por perda de memória, distúrbios e deterioração das funções cognitivas, sendo a causa mais comum de demência entre idosos. Evidências epidemiológicas e moleculares sugerem que há múltiplas causas genéticas para DA. A maioria dos genes associados são raros e causam menos de 2% dos casos (Farrer e cols., 1997). Do ponto de vista fenotípico pode-se distinguir dois tipos principais: a) DA de início precoce, a qual se manifesta antes dos 60 anos e mostra um rápido curso clínico (6-8 anos); b) DA de início tardio, onde os sintomas clínicos podem ser observados após os 60 anos, com uma duração que pode superar os 10 anos (Cacabelos e cols., 1996).

Em 1984 o grupo de trabalho do National Institute of Communicative Disease and Stroke and Alzheimer Disease and Related Disorders (NINCDS-ADRDA, McKhann e cols., 1984) publicaram os critérios para o diagnóstico clínico da doença baseados: na história clínica, no exame físico e neurológico e na investigação por imagem, os quais requerem a exclusão de outras causas de perda da memória e comprometimento da função cognitiva. Seguidos estes critérios, pode-se estabelecer

o diagnóstico de possível ou provável DA. O diagnóstico definitivo pode ser feito apenas pelo exame microscópico do tecido cerebral, geralmente por autópsia, seguindo dois critérios neuropatológicos básicos: a presença de enovelados neurofibrilares e de placas senis ou neuríticas. Os primeiros são um grupo de densos filamentos intraneuronais, formados pela fosforilação anormal da proteína tau. Já as placas senis são formadas pelo acúmulo extracelular de $A\beta$, que é resultante de uma clivagem anormal do precursor β amilóide. A relação destes fenótipos com a isoforma E4 da apo E não está totalmente esclarecida, mas alguns estudos "in vitro" mostraram algumas diferenças desta isoforma com E3. A apoE3 se liga à proteína tau, provavelmente prevenindo a formação de enovelados neurofibrilares, enquanto apoE4 não possui afinidade por esta proteína (Strittmater e Roses, 1996). Além disso, apoE4 se liga mais facilmente a $A\beta$, reduzindo sua solubilidade, e propiciando a formação das placas senis (Rubinsztein e cols., 1995). Apesar destas evidências, a diferença de interações entre as isoformas provavelmente não é a causa primária da doença, e sim um fenômeno secundário.

Dentre as várias mutações diferentes que resultam no mesmo fenótipo clínico da DA, o loco da *APOE* foi associado com a DA de início tardio. Investigações do tipo caso-controle encontraram uma frequência significativamente maior de E^*4 em pacientes (Ball e Mah, 1993; Corder e cols., 1993; Rubinsztein e cols., 1994, entre outros). Além disso, variações no genótipo da *APOE* parecem estar associadas com diferenças na distribuição da idade de início da doença. Assim, a idade média de início varia de menos de 70 anos para indivíduos com o genótipo E^*4/E^*4 , a mais de 90 anos em portadores de E^*2 (Strittmater e Roses, 1996). A relação do alelo E^*4 com DA tem sido estudada em várias populações de diferentes grupos étnicos, e já foram demonstradas associações significantes em várias amostras de caucasóides e asiáticos (Farrer e cols., 1997). Porém, os estudos feitos com Nigerianos e Afro-Americanos obtiveram resultados controversos (Lendon e cols., 1997). A meta-análise realizada

por Farrer e cols.(1997) mostrou que o aumento de *E*4* em pacientes Afro-Americanos é muito mais discreto.

1.6.4-Longevidade

Se o alelo *E*4* está associado com efeitos como doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer, seria de se esperar que grupos de indivíduos de idade avançada tivessem uma menor prevalência deste alelo. A diminuição da frequência de *E*4* foi descrito por Haviland e cols.(1995) e Corder e cols. (1993), em amostras de octogenários do Canadá e da Suécia respectivamente, e por Louhija e cols.(1994) em centenários da Finlândia, entre outras series de indivíduos idosos.

1.7 - Justificativa e Objetivos

A associação dos genes das apolipoproteínas com o metabolismo de lipídeos, as diferenças em suas frequências alélicas e a ausência de alguns alelos em determinadas populações, têm feito destas uma importante ferramenta de pesquisa no estudo de afinidades entre populações humanas e influências destes polimorfismos em algumas doenças (Chakraborty e cols., 1991; Weiss e cols, 1993).

Devido ao significativo impacto do polimorfismo da *APOE* sobre os níveis lipídicos, é importante conhecer a distribuição dos alelos em populações de diferentes grupos étnicos, para determinar se este polimorfismo tem um efeito universal sobre os níveis lipídicos, e como esse efeito é modulado por interações genéticas e ambientais. Alguns resultados contraditórios de estudos entre e dentro dos grupos étnicos indicam que a associação dos alelos da *APOE* com níveis lipídicos necessita de investigações em diferentes populações, a fim de se estabelecer a influência de fatores como estilo de vida, hábitos alimentares e composição genética sobre estes fenótipos. Do mesmo modo, existe pouca informação, em nosso meio, sobre a associação desse loco com a doença de Alzheimer. Assim, devido ao pequeno número

de estudos deste marcador de importância clínica e antropológica em populações brasileiras, os objetivos específicos deste trabalho são:

- 1-Determinar as frequências gênicas e genótípicas da *APOE* nas populações de negróides e caucasóides de Porto Alegre e de seis tribos indígenas da América do Sul.
- 2-Verificar se as associações entre os alelos da *APOE* e lipídeos séricos descritas em outros grupos étnicos também ocorrem em populações indígenas brasileiras.
- 3-Investigar a influência do polimorfismo da apo E em pacientes com hipercolesterolemia , hipertrigliceridemia bem como em indivíduos normais da população de Porto Alegre.
- 4-Determinar a distribuição dos alelos da *APOE* em uma amostra de pacientes com Doença de Alzheimer

CAPÍTULO II

**High heterogeneity of apolipoprotein E gene frequencies in
South American Indians**

(Trabalho submetido à revista *Annals of Human Biology*)

High Heterogeneity of Apolipoprotein E gene frequencies in South American Indians

FABIANA M. DE ANDRADE^{*}, CARLOS E. A. COIMBRA JR.[†], RICARDO V. SANTOS^{†‡},
ALICIA GOICOECHEA[§], FRANCISCO R. CARNESE[§], FRANCISCO M. SALZANO^{*}, and
MARA H. HUTZ^{*}

^{*}Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

[†]National School of Public Health, Rio de Janeiro, Brazil

[‡]National Museum, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[§]School of Philosophy and Letters, Buenos Aires University, Buenos Aires, Argentina

Short title: *APOE* Polymorphism in Amerindians

Address to which proofs should be sent:

Mara H. Hutz
Departamento de Genética
Instituto de Biociências, UFRGS
Caixa Postal 15053
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil
Telephone: 55 51 3166718
Telefax: 55 51 3192011
e-mail: jade@if.ufrgs.br

Summary. The apolipoprotein E (*APOE*) polymorphism was investigated in 186 individuals from six South American Indian tribes, and the results integrated with those previously presented for this ethnic group. The three *APOE* alleles commonly reported in other populations were also observed in South Amerinds, with a highly heterogeneous distribution. As in other populations, *APOE*3* was the most common allele (51-98%) followed by *APOE*4* (2-47%). These two isoforms were identified in all tribes, but *APOE*2* was observed among the Wai Wai (2%) and Mataco (4%) only. No previous indications of interethnic admixture were observed among the Wai Wai, but the introduction of this allele among the Mataco through non-Indian sources cannot be excluded. A small elevating effect of *APOE*4* (as compared to *APOE*3*) in total cholesterol, LDL, VLDL and triglycerides, but a decrease in HDL, was found in part of our sample, following the same trend observed in non-Amerindian societies.

Key words: *APOE* polymorphism; Amerindians; lipid levels; disease susceptibility

1. Introduction

Apolipoprotein E (apo E, protein; *APOE*, gene), a serum glycoprotein, plays an important physiologic role in the regulation of overall lipid homeostasis (Mahley 1988). The structural locus of *APOE* has three common alleles designated *APOE*2*, *APOE*3* and *APOE*4*, which code for three protein isoforms (E2, E3 and E4). *APOE*3* is the most frequent allele in all populations studied to date (Gerdes, Gerdes, Hansen, Klausen, Faergeman and Dyerberg 1996). They have been shown to influence lipid traits and cardiovascular risk (Davignon, Gregg and Sing 1988, Hallman, Boerwinkle, Saha, Sandholzer, Menzel, Csázár and Utermann 1991, Siest, Henny, Galteau, Schiele, Steinmetz and Visvikis 1995), as well as the risk for developing Alzheimer's disease (Strittmater, Sanders, Schmechel, Pericak-Vance, Enghild, Salvesen and Roses 1993, Lendon, Ashall and Goate 1997), with *APOE*2* and *APOE*4* most often having opposite effects. Due to their clinical significance, it is very important to know the distribution of apo E alleles in populations from diverse ethnic groups, and to determine if this polymorphism has a universal effect on lipid levels or whether this effect is modulated by genetic-environmental interactions.

This study presents data on the *APOE* allele distribution of six South American Indian tribes and compares them to those reported for other Native American groups. Association of this polymorphism with quantitative levels of plasma lipids and the Body Mass Index (BMI) was also investigated in three of these tribes on whom this information was available.

2. Subjects and methods

The South American Indian samples, collected in the period 1988-1990, consisted of 186 individuals from the Suruí (24), Gavião (29), Zoró (30), Wai Wai (29), Xavante (31) and Mataco (43) tribes. These populations can be characterized as follows:

2.1. *Xavante*

The Xavante language can be assigned to the Ge-Pano-Carib group (Rodrigues 1986; Greenberg 1987). At present they live in six different areas. The village from which material was collected is Rio das Mortes (51°40'W;13°20'S) and is situated near the western boundary of the Indian Reservation Pimentel Barbosa, State of Mato Grosso, Brazil. From an estimated number of 1500-2000 in the 1960s, the Xavante have increased to a total of 6233 individuals at present (Ricardo 1991; Flowers 1994). The population of the Rio das Mortes village numbered 461 individuals in 1990.

2.2. Wai Wai

The Wai Wai Indians speak a language classified in the Karib stock, Parukoto-Charumã family (Rodrigues 1986). Blood samples were collected in the Mapuera village, located at the east bank of the Mapuera river, State of Pará, Brazil (57°55'W;0°40'S). The Mapuera population was estimated as having about 700 individuals in 1980 (Almeida 1981).

2.3. Mataco

The Mataco studied live in the locality of Santa Victoria Este and environs, Department of Rivadavia, Province of Salta, North of Argentina (62°42'W;22°17'S). They are assigned to the Mataco-Mataguaio linguistic family (Carnese 1995).

2.4. Zoró

The Zoró language is classified in the Tupi stock of the Mondé family (Rodrigues 1986). In 1990 they lived in a single village located 20 km from the Rio Branco river (60°20'W;10°20'S), Aripuanã Park, State of Mato Grosso, Brazil. In the 1960s, it was estimated that they numbered 1000-1500. After extensive contact with non-Indians, the group experienced a population decline due to epidemics. By July-August, 1990, the Zoró numbered 215, after a period of population

recovery (Santos 1991). The latter author registered that horticultural products, meat and fish were commonly observed in Zoró households, and reported about their nutrition. Industrialized products were less common than in the two other Tupi-Mondé groups.

2.5. *Gavião*

The Gavião are also a Tupi-Mondé group. The population we studied lives further west from the Zoró, in the Indian Area Igarapé Lourdes, State of Rondonia, Brazil. They are distributed in two villages, but many of them have houses in both, and we obtained samples from the people of the two communities (61⁰8'W;10⁰10'S). In July-August, 1990, their total population was estimated as 288 persons. In addition to horticultural products, their diet includes industrialized food items, such as soybean oil, pasta, rice, beans and canned foods (Santos 1991).

2.6. *Suruí*

The Suruí also speak a Tupi-Mondé language. They live in the Indian Area Sete de Setembro (61⁰10'W;10⁰50'S), located in the States of Mato Grosso and Rondônia, Brazil, and in 1990 their population comprised approximately 500 individuals distributed in 10 villages. The present samples were collected at random among the 10 villages. This tribe lives in a contiguous area with that occupied by the Zoró, and east of where the Gavião live. There are estimates that the Suruí experienced a reduction of about 45% in size in 1972-1973, due to epidemics of infectious diseases. According to Coimbra (1989), the current trend of the dietary changes observed among them is for an overall increase in the consumption of starch products and refined carbohydrates, and a decrease in the intake of game, fish and other major sources of protein.

Blood samples, obtained from non-fasting subjects, were collected with anticoagulant, refrigerated shortly afterwards, and flown in this condition to either Porto Alegre or Rio de Janeiro. In the latter city the plasma lipids were analyzed enzymatically with commercial kits (CELM,

Brazil). In Porto Alegre the DNA was extracted by the salting-out procedure described by Miller, Dykes and Polesky (1988) for the Xavante, Zoró, Gavião and Suruí, and by the technique described by Lahiri and Nurnberger (1991) for the Wai Wai and Mataco samples.

DNA was amplified by the PCR reaction, using the same conditions and oligonucleotide primers as those described by Maekawa, Cole, Seip and Bylund (1995). The amplification products were subsequently digested with Hha I under conditions recommended by the manufacturer. Genotypes were determined after electrophoresis in 4% agarose gel containing ethidium bromide, using a 10 bp ladder to score the band sizes.

Allele frequencies were estimated by gene counting. A χ^2 test for goodness of fit was used to verify whether the observed allele frequencies agreed with those expected under the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium. Heterogeneity among tribes was tested by the χ^2 test of Roff and Bentzen (1989) for small numbers. Linear regression analysis was used to adjust lipid plasma concentrations to the effects of age and sex in all groups. Differences for lipid, BMI (Body Mass Index – kg/cm²) and age among unadjusted and adjusted means by genotypes, were evaluated by the t-test (Zar 1996). Analyses were carried out using the software package SPSS/PC.

3. Results and discussion

3.1. APOE Variability

The distribution of APOE genotypes in the six population samples is shown in table 1. In all groups the genotypes observed are in agreement with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. The most common genotype in five of the six tribes was APOE*3/APOE*3. The exception was the Wai Wai, where 59% of the individuals typed were APOE*3/APOE*4 heterozygotes. A highly heterogeneous distribution was observed among tribes.

Insert table 1 about here

The corresponding allele frequencies are presented in table 2 together with those available from other South American Indians. In the present study, APOE*2 was identified in 2% and 4% of Wai Wai and Mataco chromosomes, respectively. Gerdes *et al.* (1996), based on data available by May, 1996, suggested that APOE*2 was absent in the groups who peopled the Americas in prehistoric times. However, this allele has now been observed in 2% of North American Indians from Arizona, Oklahoma, South and North Dakota (Kataoka, Robbins, Cowan, Go, Yeh, Devereux, Fabsitz, Lee, Welty and Howard 1996) and in these two South American tribes. Two explanations are possible for these observations: (a) APOE*2 was present in the founding populations of the Americas in very low frequency, and was lost from some groups during the process of tribalization, or was not identified due to restricted sample sizes; and (b) The presence of APOE*2 is due to admixture with non-Indians. The degree of ethnic interbreeding estimated for the Mataco, using 22 protein systems, was 22.5%, while no signs of admixture were detected in the Wai Wai based on 27 protein systems (Callegari-Jacques, Salzano, Weimer, Franco, Mestriner, Hutz and Schüler 1996). Both groups have been in contact with non-Indians for several years. The extension of these investigations to a larger number of populations, spread over the continent, is needed to decide between the two alternatives.

The prevalence of APOE*4 in South American Indians is highly heterogeneous. Its frequency varied from 2% in the Xavante and Mataco, to 47% in the Wai Wai (where 76% of the subjects typed had at least one APOE*4 allele). No geographical gradients were observed in the distribution of this allele among tribes (data not shown), but more homogeneous distributions were found when the populations were grouped by language (table 2). Even using this criterion for classification, however, significant heterogeneity was encountered within the Tupi and Karib groups, where more tribes were involved in the comparisons.

Considering all human ethnic groups thus far investigated, Sub-Saharan Africans, Aborigenes from Oceania (Hallman *et al.* 1991, Gerdes *et al.* 1996 and references therein) and

Native Americans (average=20%) have the highest prevalences of *APOE*4*. Since all these populations consume a low-cholesterol diet, and consequently have low mean serum cholesterol levels compared to Western populations, Scacchi, Corbo, Rickards, Mantuano, Guevara and de Stefano (1997) suggested that selection due to a common genotype-environment interaction could have played an important role favouring a higher frequency of the *APOE*4* allele in these populations. However, this hypothesis could not explain the wide variation observed in the present study, or the low frequencies of *APOE*4* found among the Xavante, Mataco, and Arara (table 2) . Kamboh, Weiss and Ferrell (1991) also detected a low prevalence of this allele (9%) in the Maya of the Yucatan Peninsula. It is possible that founder effects, isolation and genetic drift could have played a major role in determining *APOE*4* frequencies in American Indian populations.

Insert table 2 about here

3.2. Association of *APOE* with lipid levels, age and BMI

The 32 individuals of the Tupi Mondé tribes (Suruí, Zoró and Gavião) on whom lipid levels were available were further tested for the impact of the *APOE* genotype on lipid levels, BMI and age. The adjusted and unadjusted mean values for two classes of genotypes are presented in table 3. In this admittedly very small sample, none of the comparisons yielded significant differences. Nevertheless, the values of total cholesterol, LDL-C, VLDL-C and tryglicerides were slightly increased in carriers of at least one *APOE*4* allele , and the HDL-C level was decreased in these individuals. These differences conform to the pattern of *APOE* influences seen in most populations (Davignon *et al.* 1988, Hallman *et al.* 1991, Siest *et al.* 1995).

Insert table 3 about here

In Mayans (Kamboh *et al.* 1991) and in Alaskan natives (Scheer, Boudreau, Malcom and Middaugh 1995) the rising effect of the *APOE*4* allele on lipid levels was also absent, while a slightly reduced average total cholesterol level was detected by Crews, Kamboh, Mancilha-

Carvalho and Kottke (1993) in the Yanomami *APOE*4* carriers. Both authors pointed out that dietary habits, activity and lifestyle may significantly influence any effect of the apolipoprotein genetic variation. Therefore, studies in groups like those considered here, that are experiencing drastic changes in their ways of living, may be important to separate the relative genetic and environmental effects that are acting on this interesting biological system.

Acknowledgements

Thanks are due to our colleague Sidia M. Callegari-Jacques for statistical help, and the Fundação Nacional do Índio (FUNAI) for permission to study the Indians and for logistic assistance. The Indian leaders and the subjects of the investigation were adequately informed about the aims of the study and gave their approval, which is also gratefully acknowledged. Financial support was provided by Núcleo de Apoio a Grupos de Excelência (PRONEX, Brazil), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) Wenner-Green Foundation for Anthropological Research (USA), McArthur Foundation (USA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina), and Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT, Argentina).

References

- ALMEIDA, M.H.P. ,1981, Eleição e delimitação dos PIs. Nhamundá e Mapuera (AM/PA): Fundação Nacional do Índio, Brasília, Brazil.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M., SALZANO, F.M., WEIMER, T.A., FRANCO, M.H.L.P., MESTRINER, M.A., HUTZ, M.H., and SCHÜLER, L. ,1996, The Wai Wai Indians of South America: history and genetics. *Annals of Human Biology*, **23**, 189-201.
- CARNESE, F.R.,1995, Genetic markers in the aboriginal populations of Argentina. *Brazilian Journal of Genetics*, **18**, 651-656.
- COIMBRA, C.E.A. JR.,1989, From shifting cultivation to coffee farming: The impact of change on the health and ecology of the Suruí in the Brazilian Amazon. Ph.D.Thesis, Indiana University, Bloomington, IN.
- CREWS, D.E., KAMBOH, M.I., MANCILHA-CARVALHO, J.J., and KOTTKE, B., 1993, Population genetics of Apolipoprotein A-4, E, and H Polymorphisms in Yanomami Indians of northwestern Brazil: Associations with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism. *Human Biology*, **65**, 211-224.
- DAVIGNON, J., GREGG, R.E., and SING, C.F., 1988, Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, **8**, 1-21.
- FLOWERS, N.M.,1994, Demographic crisis and recovery : A case study of the Xavante of Pimentel Barbosa. *South American Indian Studies*, **4**, 18-36.
- GERDES, L.U., GERDES, C., HANSEN, P.S., KLAUSEN, I.C., FAERGEMAN, O., AND DYERBERG, J., 1996, The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Human Genetics*, **98**, 546-550.
- GREENBERG, J.H., 1987, Language in the Americas. (Stanford: Stanford University Press).

- HALLMAN, D.M., BOERWINKLE, E., SAHA, N., SANDHOLZER, C., MENZEL, H.J., CSÁZÁR, A., and UTERMANN, G., 1991, The apolipoprotein E polymorphism : A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *American Journal of Human Genetics*, **49**, 338-349.
- KAMBOH, M.I., WEISS, K.M., and FERRELL, R.E., 1991, Genetic studies of human apolipoproteins. XVI. APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Clinical Genetics*, **39**, 26-32.
- KATAOKA, S., ROBBINS, D.C., COWAN, L.D., GO, O., YEH, J.L., DEVEREUX, R.B., FABBITZ, R.R., LEE, E.T., WELTY, T.K., AND HOWARD, B.V., 1996, Apolipoprotein E polymorphism in American Indians and its relation to plasma lipoproteins and diabetes. *Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology*, **16**, 918-925.
- LAHIRI, D.K., and NURNBERGER, J.I., 1991, A rapid non-enzymatic method for preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, **19**, 5444.
- LONDON, C.L., ASHALL, F., and GOATE, A.M., 1997, Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. *Journal of the American Medical Association*, **277**, 825-831.
- MAEKAWA, B., COLE, T.G., SEIP, L., AND BYLUND, D., 1995, Apolipoprotein E genotyping methods for the clinical laboratory. *Journal of Clinical and Laboratory Analysis*, **9**, 63-69.
- MAHLEY, R.W., 1988, Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, **240**, 622-629.
- MARIN, G.B., TAVELLA, M.H., GUERREIRO, J.F., SANTOS, S.E.B., AND ZAGO, M.A., 1997, Absence of the E*2 allele of apolipoprotein in Amerindians. *Brazilian Journal of Genetics*, **20**, 741-743.
- MILLER, A.S., DYKES, D.D., AND POLESKY, H.F., 1988, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1215.

- RICARDO, C.A., 1991, Povos Indígenas no Brasil (1987/88/89/90). (São Paulo, Brazil: Centro Ecumênico de Documentação e Informação).
- RODRIGUES, A.D., 1986, Línguas Brasileiras. Para o Conhecimento das Línguas Indígenas. (São Paulo, Brazil: Edições Loyola).
- ROFF, D.A., and BENTZEN, P., 1989, The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. *Molecular Biology and Evolution*, **6**, 539-545.
- SCACCHI, R., CORBO, R.M., RICKARDS, O., MANTUANO, E., GUEVARA, A., and DE STEFANO, G.F., 1997, Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador. *Human Biology*, **69**, 375-382 .
- SANTOS, R.V., 1991, Coping with change in native Amazonia: A bioanthropological study of Gavião, Suruí and Zoró, Tupi-Mondé speaking societies from Brazil. Ph.D. Thesis, Indiana University, Bloomington, IN.
- SCHEER, W.D., BOUDREAU, D.A., MALCOM, G.T., AND MIDDAUGH, J.P., 1995, Apolipoprotein E and atherosclerosis in Alaska Natives. *Atherosclerosis*, **114**, 197-202.
- SIEST, G., HENNY, J., GALTEAU, M.M., SCHIELE, F., STEINMETZ, J., and VISVIKIS, S., 1995, Lipid and lipoprotein genetic variability: An important contribution from the French health examination centers. *Clinical Biochemistry*, **28**, 31-38.
- STRITTMATER, W.J., SUNDERS, A.M., SCHMECHEL, D., PERIKAC-VANCE, M.A., ENGHILD, J., SALVESEN, G.S., AND ROSES, A.D., 1993, Apolipoprotein E: High avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **90**, 1977-1981.
- ZAR, J.H., 1996, Bioestatistical Analysis. (Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall).

Table 1. *APOE* genotype distribution in six South American tribes.

genotypes	Suruí		Gavião		Zoró		Wai Wai		Xavante		Mataco	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<u><i>E*3/E*3</i></u>	16	67	12	41	17	57	6	21	30	97	38	88
<u><i>E*4/E*4</i></u>	0	0	2	7	5	17	5	17	0	0	0	0
<u><i>E*3/E*4</i></u>	8	33	15	52	8	26	17	59	1	3	2	5
<u><i>E*2/E*3</i></u>	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	3	7
Total	24	100	29	100	30	100	29	100	31	100	43	100

Chi-square test for heterogeneity: 77.1; $p < 0.001$.

Table 2. *APOE* allele frequencies in South American Indians.

Tribes	2n	<i>E</i> *3	<i>E</i> *4	<i>E</i> *2	Linguistic group	Reference
Suruí	48	0.83	0.17	0.00	Tupi	1
Gavião	58	0.67	0.33	0.00	Tupi	1
Zoró	60	0.70	0.30	0.00	Tupi	1
Wai Wai	58	0.51	0.47	0.02	Karib	1
Xavante	62	0.98	0.02	0.00	Ge	1
Mataco	86	0.94	0.02	0.04	Mataco	1
Apalai-Wayana	50	0.82	0.18	0.00	Karib	2
Wayampi	52	0.58	0.42	0.00	Tupi	2
Arara	42	0.93	0.07	0.00	Karib	2
Kayapo	52	0.90	0.10	0.00	Ge	2
Yanomami	46	0.96	0.04	0.00	Yanomami	2
Yanomami	192	0.84	0.16	0.00	Yanomami	3
Yanomami	72	0.90	0.10	0.00	Yanomami	4
Makiritare	54	0.89	0.11	0.00	Karib	4
Macushi	30	0.83	0.17	0.00	Karib	4
Wapishana	64	0.64	0.36	0.00	Arawak	4
Baniwa	40	0.75	0.25	0.00	Arawak	4
Cayapa	182	0.72	0.28	0.00	Chibcha	5

¹Present study

²Marin, Tavella, Guerreiro, Santos and Zago 1997.

³Crews *et al.* 1993.

⁴J. V. Neel (personal communication).

⁵Scacchi *et al.* 1997.

Chi-square tests for heterogeneity: (a) among all tribes: 122.1; $p < 0.0001$; (b) among the Tupi tribes: 7.9; $p < 0.05$; (c) among the Ge tribes: 2.0; $p > 0.23$; (d) among the Arawak tribes: 1.4; $p > 0.27$; (e) among the Karib tribes: 32.8; $p < 0.001$; (e) among the Yanomami samples: 5.0; $p > 0.08$.

Table 3. Effect of the *APOE* polymorphism on serum lipids, age and BMI in Tupi-Mondé Indians.

Plasma lipid traits (mg/dl)	<i>E*3/E*3</i>		<i>E*4/+</i>		p
	Mean	SD	Mean	SD	
Unadjusted					
Total cholesterol	143.57	22.09	146.65	29.90	0.740
HDL-C	32.98	7.97	28.80	6.56	0.129
LDL-C	89.50	22.20	98.09	26.14	0.325
VLDL-C	19.39	11.02	20.40	9.56	0.790
Triglycerides	97.33	55.20	102.92	48.64	0.770
Adjusted					
Total cholesterol	141.63	22.74	145.79	30.68	0.681
HDL-C	31.98	7.79	28.20	6.45	0.160
LDL-C	93.95	21.51	97.92	27.24	0.649
VLDL -C	18.72	9.73	21.20	9.32	0.477
Triglycerides	92.71	48.59	102.97	44.30	0.548
Age (years)	34.61	16.23	37.43	16.50	0.635
BMI (kg/m ²)	22.56	2.61	22.04	2.09	0.554

CAPÍTULO III

Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population

(Manuscrito em preparação a ser submetido à revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research)

**Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and
Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population**

**F. M. de Andrade¹; Mariela Larrandaburu¹; S. M. Callegari-Jaques²; G. Gastaldo³; M. H.
Hutz¹**

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

² Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, 91540-000, Porto Alegre, Brazil.

³ Unidade de Bioquímica, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Running Title: *APOE* polymorphism in Brazil

Key words: *APOE*, Alzheimer's disease, association studies, serum lipids

Financial support was provided by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP - Grant n^o 66.96.0617.00), Programa de Apoio a Nucleos de Excelência (PRONEX - Grant n^o 76.97.0996.00), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Grant n^o 520105/96-2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - Grant n^o 96/0607.9). FMA has a master degree fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Adress to wich proofs should be sent:

Mara H. Hutz
Departamento de Genética
Instituto de Biociências, UFRGS
Caixa Postal 15053
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil
Telephone: 55 51 3166718
Telefax: 55 51 3192011
E-mail: jade@if.ufrgs.br

ABSTRACT

Apolipoprotein E plays an important role in the multifactorial etiology of both Alzheimer's disease (AD) and lipid level concentrations. Polymerase chain reaction (PCR) was used to investigate the *APOE* gene polymorphism in 446 unrelated caucasians, among them 23 AD patients, and 100 Afro-Brazilians living in Porto Alegre, Brazil. The frequencies of the *APOE**2, *APOE**3 and *APOE**4 alleles were 0.075, 0.810 and 0.115 in caucasians and 0.075, 0.700 and 0.225 in Afro-Brazilians, respectively. A highly significant association was observed between the *APOE**4 allele and Alzheimer's disease in this population-based sample. The *APOE**4 frequency in AD patients (39%) was about four times higher than in the general caucasian population (11%). The influence of each of the three common *APOE* alleles on lipid traits was evaluated by the use of the average excess statistic. The *E**2 allele is associated with lower levels of triglycerides, total and non-HDL cholesterol in both men and women. Conversely, the *E**4 is associated with higher levels of these traits in women only. The effect of *APOE* alleles was of greater magnitude in women. The *APOE* gene may be considered as a possible candidate for the atherogenic process as well as useful marker for AD diagnosis in the Brazilian population.

INTRODUCTION

The apolipoprotein E (apo E, protein, *APOE*, gene) has a major physiologic role in the regulation of overall lipid homeostasis (1). This protein also plays an important role in neuronal repair (2). The structural locus of *APOE* has three common alleles designated *E*2*, *E*3* and *E*4*, which code for three protein isoforms (E2, E3 and E4). *APOE*3* is the most frequent allele in all populations studied to date (3).

These isoforms have been shown to influence serum lipid levels (4, 5, 6, 7), cardiovascular disease (8, 9) as well as the risk for developing Alzheimer's disease (AD) (10,11), with *APOE*2* and *APOE*4* most often having opposite effects.

Due to their clinical significance, it is very important to know the distribution of *APOE* alleles in different populations in order to determine if this polymorphism has an universal effect on lipid levels and on the risk for developing AD or whether this effect is modulated by genetic-environmental interactions.

The aims of the present investigation was to describe *APOE* allele frequencies and to investigate the effect of this polymorphism on serum lipid levels and AD in a Southern Brazilian population.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Porto Alegre is the capital of Brazil's southernmost state; the city was founded in 1752 by 60 white couples from the Azores Islands. At present the whites from Porto Alegre are still mainly of Portuguese descent, but Italians, Spaniards and Germans have also contributed to its gene pool. Blacks constitute approximately 14% of the population. They are descendants of slaves who were

brought to Brazil between the fifteenth and eighteenth centuries mainly from Africa's West Coast, but also from Angola and Mozambique.

The white sample consisted of 466 individuals. One hundred subjects were ascertained at the Genetics Department of the Federal University of Rio Grande do Sul where they came to paternity testing, their mean age being 31 ± 11.5 years. A total of 343 samples were collected at the Biochemistry Unit from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre to which they went for routine blood determinations (mean age 57 ± 13.1 years). Twenty three patients with a diagnosis of probable Alzheimer's disease, according to the NINCDS-ADRDA criteria (12) were recruited at the Neurology Service from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All cases were sporadic and their ages ranged from 61 to 84 years.

The sample of Blacks ($n=100$) was ascertained at the Central Laboratory of the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, their mean age being 35 ± 15.2 years.

Informed consent was obtained from patients, relatives or their legal tutors in all cases.

Methods

Lipid analyses

Total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were determined enzymatically with commercial kits (Merck®) on a MegaMerck® autoanalyser from 343 subjects after a 12 hours fast.

DNA analyses

DNA was extracted from the blood samples by a salting out procedure (13). DNA was amplified by the PCR reaction, using the same conditions and oligonucleotide primers as described (14). The amplification products were subsequently digested with *Hha* I under conditions recommended by the manufacturer. Genotypes were determined after electrophoresis on 4% agarose gels containing ethidium bromide, using a 10 bp ladder to score the band sizes.

Statistical analyses

Allele frequencies were estimated by gene counting. A χ^2 test for goodness of fit was used to verify whether the observed allele frequencies agreed with those expected under the hypothesis of Hardy-Weimberg equilibrium. Heterogeneity among groups was tested by the χ^2 of Roff and Bentzen for small numbers (15).

Linear regression analysis was used to adjust serum lipid concentrations for the effect of age and sex. Differences for lipids among adjusted means by genotypes were evaluated by ANOVA. Equality of variances was tested by the method of Levene, when variances were unequal, the non-parametric Kruskal-Wallis test was employed. Triglyceride levels were log transformed to remove skewness. Analyses were performed using the SPSS/PC software.

The average excess of the three alleles in the population at large on each gender and age-adjusted levels were estimated according to the formula

$$a_i = \sum_{k=1}^k [f_{ik}/p_i] [\bar{y}_{ik} - \bar{y}], i=1, \dots, k$$

where \bar{y}_{ik} is the mean of the phenotype for individuals with genotype \bar{ik} , \bar{y} is the mean of the phenotype for the population, f_{ik} is the frequency of the ordered genotype ik , and p_i is the frequency of allele i (16).

RESULTS

APOE genotype and allele frequencies in normal individuals and Alzheimer's disease patients

To establish a population baseline, *APOE* allele and genotype frequencies were determined in 100 unrelated caucasian individuals, randomly chosen among those presenting for paternity tests

and in the 100 Afro-Brazilians investigated (Table 1). Both samples were in Hardy-Weimberg equilibrium. The distribution of *APOE* alleles between the two ethnic groups was significantly heterogeneous ($p=0.013$). The relative frequency of the *E*4* allele (22.5%) was higher in Afro-Brazilians than in Brazilian caucasians (11%, Table 1).

Table In the light of this population survey, the Alzheimer's disease (AD) patients, all caucasians, were compared with the caucasian sample as controls (Table 1). Approximately 60% of the AD patients had at least one *E*4* allele. The prevalence of this allele (39%) was four times higher in the AD group than in controls (11%). This difference was highly significant ($p<0.001$).

Lipid association study

To evaluate the impact of *APOE* genotypes on lipid values, the sample obtained at the Biochemistry Unit from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre were divided into subjects with hypercholesterolemia (total plasma cholesterol >300 mg/dl), normolipidemics (total cholesterol <200 mg/dl and serum triglycerides <182 mg/dl) and hypertriglyceridemics (plasma levels >350 mg/dl). Sixty two subjects were not included in this analysis because they did not meet these criteria while 25 individuals had hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. Table 2 shows the allele and genotype frequencies observed among the three groups. Although not significant, the *E*2* containing genotypes are underexpressed in hypercholesterolemic and hypertriglyceridemic subjects, while *APOE*4* carriers are less frequent in normolipidemic individuals.

Table 2 The adjusted mean values of lipid levels by *APOE* genotypes are given in Table 3. Since very few subjects had the *E*2/E*2* or *E*4/E*4* genotype, subjects were regrouped into *E*2*-carriers (*E*2/E*2* and *E*2/E*3*), *E*3/E*3* and *E*4*-carriers (*E*3/E*4* and *E*4/E*4*). Individuals with *E*2/E*4* genotype ($n=5$) could not be assigned to any of the groups and were therefore excluded from this analysis. A significant directional variation was seen among the three groups for triglycerides. *APOE*2* carriers had the lower levels while *APOE*4* carriers showed the highest. The

mean levels of total cholesterol and non-HDL cholesterol were also lower in the E^*2 group but they were not increased relative to E^*3 homozygotes in the E^*4 carriers. No specific trend was observed for HDL-cholesterol.

Table The estimates of average excess for each of the three common apo E alleles for total cholesterol, non-HDL cholesterol and triglycerides are presented in Figure 1. The effect of the E^*3 allele on lipid levels is negligible because the means of subjects carrying this allele is indistinguishable from the population mean. In this sample, the effect of E^*2 is to lower total cholesterol, non-HDL cholesterol and triglycerides. This is true for both men and women, although the magnitude of this difference is more pronounced in women. Conversely the E^*4 is associated with higher lipid levels, but in women only. The range of effects of the E^*4 allele is less than that of the E^*2 allele (Figure 1).

Figure

Discussion

Data on distribution of *APOE* genotypes are highly heterogeneous in frequencies among populations (3, 4, 17). European populations have been widely studied for the *APOE* polymorphism. One of the most important findings of these investigations is a clear north to south decreasing gradient of the E^*4 allele frequency in continental western Europe with an opposite direction of the E^*3 allele. The prevalence of E^*4 is above 20% in Finland and Sweden (4, 18) and below 8% in the Iberian Peninsula (19). No clinal pattern is apparent for E^*2 frequencies (20). *APOE* allele prevalences observed in the present study on Southern Brazilian caucasians are similar to those found for Southern Europeans (18, 19, 21), what is expected when the European origin of our population is considered. Much less information is available for African populations (4, 18, 22, 23). These investigations reported a higher prevalence of E^*4 (range 24-30%) and a lower E^*3

frequency relative to caucasians. The Afro-Brazilian sample studied herein had a slightly lower E^*4 prevalence (22.5%, Table 1). This result strengthens the case for more population studies at this locus to avoid false positive or negative results in association studies with unmatched ethnic controls.

Strittmatter et al (24) reported the association of $APOE^*4$ with late onset familial AD. Saunders et al (25) extended this association to autopsy verified sporadic AD patients. These data have been confirmed and extended to AD groups in several populations. However, a meta-analysis including 47 case-control investigations concluded that the E^*4/AD association in African-Americans and Hispanics requires clarification and should be investigated further (26). In our admittedly very small sample of Brazilians from European ancestry with AD, this association was highly significant ($p < 0.001$; Table 1). These results agree with those observed elsewhere (26) and support the usefulness of apo E genotyping as one criterion for the differential diagnosis of dementias as suggested (27).

Although $APOE$ allele distributions are heterogeneous, the relation of alleles with plasma cholesterol is found to be similar among populations (4). However, the amplitude of the effect may be modulated by ethnic background and environmental factors (28, 29). In the present study, associations of $APOE$ genotypes with serum lipids were consistent with the well identified effects of $APOE$ (30, 31, 32). Several studies have shown that the lowering effect of E^*2 on cholesterol levels is two to fourfold the E^*4 increasing effect (4, 5, 33), whereas similar effects of both alleles have also been reported (34, 35). In Brazilian caucasians the impact of E^*2 was greater than that of E^*4 . The most plausible reasons for these inconsistencies are differences in statistical treatment, different sampling schemes or different environmental factors. It is likely that the influence of the $APOE$ gene on serum lipid levels would be modified by other genetic or environmental factors among different populations.

Whereas the apo E effects on serum cholesterol levels is almost constant in most populations, there are controversial results about these effects on triglyceride levels. *E*2* has been associated with higher levels (5, 22, 32, 35, 36, 37) and lower levels (6, 30) relative to *E*3* and *E*4*. Our study shows higher triglyceride concentrations in *E*4* carriers than in *E*2* carriers. The *E*2* allele have been associated with some degree of impaired clearance of triglyceride-rich chylomicrons and VLDL remnants (38), while others suggested that patients with type V hyperlipoproteinemia have an overrepresentation of the *E*4* allele, which may contribute to hypetriglyceridemia (39). Clearly more data are needed to understand the relationship of apoE and triglyceride levels.

The average excess of the common *APOE* alleles reported here are in agreement with previous studies (4, 5, 35). The effect of *APOE* alleles on lipid levels were more pronounced in women (Figure 1). These results suggest that sex-specific hormones act as important regulators on these complex metabolic pathways as discussed by Robitaille et al (35) and Schaefer et al (40). Additional studies on the interaction of hormones, genes and lipids, in women, are needed to understand how hormones influence the effects of *APOE* alleles on lipids.

In conclusion, the *APOE* polymorphism appears to be promising for clinical coronary heart disease and Alzheimer's disease risk assessment in the Brazilian population.

Acknowledgments

Thanks are due to Prof. Francisco M. Salzano for help in the obtention of the caucasoid control sample. The Afro-Brazilian sample was obtained by Elisa M. Heidrich and Maria Catira Bortolini. The sample collection and DNA extraction of the hyperlipidemic and normolipidemic subjects was obtained with the help of Andre F. Vargas and Marilu Fiegenbaum. We are also grateful to the staff of the Neurology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, mainly to Dr Marcia L. F. Chaves for referral of the AD patients.

REFERENCES

1. Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240: 622-630.
2. Rubinsztein, D. C. (1995). Apolipoprotein E: a review of its roles in lipoprotein metabolism, neuronal growth and repair as a risk for Alzheimer's disease. *Psychological Medicine*, 25:223-229.
3. Gerdes , L.U.; Gerdes, C.; Hansen, P.S.; Klausen, I. C.; Færgeman, O. & Dyerberg, J. (1996). The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Human Genetics*, 98:546-550.
4. Hallman, D. M.; Boerwinkle, E.; Saha, N.; Sandholzer, C.; Menzel, H. J.; Császár, A. & Utermann, G. (1991). The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *American Journal of Human Genetics*, 49:338-349.
5. Kamboh, M.I.; Aston, C.E. & Hamman, R.F. (1995). The relationship of APOE polymorphism and cholesterol levels in normoglycemic and diabetic subjects in a biethnic population from San Luis Valley, Colorado. *Atherosclerosis*, 112:145-159.
6. Mahley, R. W.; Palaoglu, K. E.; Atak, Z.; Dawson-Pepin, J.; Langlois, A.; Cheung, V.; Onat, H.; Fulks P.; Mahley, L.; Vakar, F.; Özbayrakç1, S.; Gökdemir O. & Winkler W. (1995). Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 36:839-859.

7. Boer, J. M. A.; Feskens, E. J. M.; Schouten, E. G.; Havekes, L. M.; Seidell, J. C. & Kromhout, D. (1998). Lipid profiles reflecting high and low risk for coronary heart disease: contribution of apolipoprotein E polymorphism and lifestyle. *Atherosclerosis*, 136:395-402.
8. Tiret, L.; De Knijff, P.; Menzel, H.; Ehnholm, C.; Nicaud, V. & Havekes, L. M. (1994). ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations – The EARS study. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14:1617-1624.
9. Moore, J. H.; Reilly, S. L.; Ferrel, R. E. & Sing, C. F. (1997). The role of the apolipoprotein E polymorphism in the prediction of coronary artery disease age of onset. *Clinical Genetics*, 51:22-25.
10. Strittmater, W. J.; Sauders, A. M. & Schmechel, D. (1993). Apolipoprotein E: High affinity binding to β A amyloid and increased frequency of type 4 allele in familial Alzheimer's. *Proceedings of Natural Academy of Science, USA*, 90:1977-1981
11. Lendon, C. L.; Ashall, F. & Goate, A. M. (1997). Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. *Journal of American Medical Association*, 277:825-831.
12. McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R. ; Price, D. & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRA Work Group under the auspices of Departments of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology*, 34: 939-944.
13. Lahiri D. K. & Nurnberger J. I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid Research*, 19:5444.

14. Maekawa, B.; Cole, T. G.; Seip, R. L. & Bylund, D.(1995). Apolipoprotein E genotyping methods for the clinical laboratory. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 9:63-69.
15. Roff , D. A. & Bentzen, P. (1989). The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem os small samples. *Molecular Biology and Evolution*, 6: 539-545.
16. Templeton, A. R. (1987). The general relationship between average effect and average excess. *Genetics Research* , 49:69-70.
17. Gerdes L. U.; Klausen, I. C. Sihm, I. & Færgeman, O. (1992). Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genetic Epidemiology*, 9:155-167.
18. Knijff, P. de; Maagdenberg, A. M. J. M.; Frants, R. R. & Havekes, L. M. (1994). Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Human Mutation*, 4:178-194.
19. Valveny, N.; Esteban, E.; Kandil, M. & Moral, P. (1997). APO E polymorphism in Spanish and Moroccan populations. *Clinical Genetics*, 51: 354-356.
20. Lucotte, G.; Loirat, F. & Hazout, S. (1997). Pattern of gradient of apolipoprotein E allele *4 frequencies in Western Europe. *Human Biology*, 69:253-262.

21. Corbo, R. M.; Scacchi, R.; Mureddu, L.; Mulas, G. & Alfano, G.(1995). Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrilamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. *Annals of Human Genetics*, 59:197-209.
22. Sepehrnia, B.; Kamboh, M. I.; Adams-Campbell, L. L.; Bunker, C. H.; Nwankwo, M.; Majumder, P. P. & Ferrell, R. E. (1989).Genetic studies of human apolipoproteins. X. The effect of the apolipoprotein E polymorphism on quantitative levels of lipoproteins in Nigerian blacks. *American Journal of Human Genetics*, 45:586-591.
23. Zekraoui, L.; Lagarde, J. P.; Raisonnier, A.; Gérard, N.; Aouizérate, A. & Lucotte, G. (1997). High frequency of the apolipoprotein *E*4* allele in African Pygmies and most of African populations in Sub-Saharan Africa. *Human Biology*, 69:575-581.
24. Strittmatter , W. J.; Saunders, A. M. & Schmechel, D. (1993). Apolipoprotein E genotyping methods binding to β A amyloid and increased frequency of type 4 in familial Alzheimer's. *Proceedings of Natural Academy of Science USA*, 90:1977-1981.
25. Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D.; St. George-Hyslop, P. H.; Pericak-Vance, M. A.; Joo, S. H.; Rosi, B. L.; Gusella, J. F.; Crapper-McLachlan, D. R.; Alberts, M. J.; Hulette, C.; Crain, B.; Goldgaber, D. & Roses, A. D. (1993). Association of apolipoprotein E allele *E*4* with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43:1467-1472.
26. Farrer, L.A.; Cupples, L. A.; Haines, J. L.; Hyman, B.; Kukull, W. A.; Mayeux, R.; Myers, R. H.; Pericak-Vance, M. A.; Risch, N. & Van Dujin, C. M. (1997). Effects of age, sex, and

ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease – A meta-analysis. *Journal of American Medical Association*, 278:1349-1356.

27. Alzheimer's Association Working group (1996). Apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease. *Lancet*, 347:1091-1095.
28. Pablos-Méndez, A.; Mayeux, R.; Ngai, C.; Shea, S. & Berglund, L. (1997). Association of apo E polymorphism with plasma lipid levels in a multiethnic elderly population. *Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology*, 17:3534-3541.
29. Boer, J. M. A.; Feskens, E. J. M.; Schouten, E. G.; Havekes, L. M.; Seidell, J. C. & Kromhout, D. (1998). Lipid profiles reflecting high and low risk for coronary heart disease: contribution of apolipoprotein E polymorphism and lifestyle. *Atherosclerosis*, 136:395-402.
30. Xhignesse, M.; Lussier-Cacan, S.; Sing, C. F.; Kessling, A. M. & Davignon, J. (1991). Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 11:1100-1110.
31. Zaman, M. M.; Ikemoto, S.; Yoshiike, N.; Date, C.; Yokoyama, T. & Tanaka, H. (1997). Association of apolipoprotein genetic polymorphisms with plasma cholesterol in a Japanese rural population. *Arterioscler. Thrombosis and Vascular Biology*, 17:3495-3504.
32. Boer, J. M. A.; Ehnholm, C.; Menzel, H.; Havekes, L. M.; Rosseneu, M.; O'Reilly, D. S. J. & Tiret, L. (1997). Interactions between lifestyle-related factors and the apoE polymorphism on

plasma lipids and apolipoproteins – The EARS study. *Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology*, 17:1675-1681.

33. Bohnet, K.; Regis-Bailly, A.; Vincent-Viry, M.; Schlenck, A.; Gueguen, R.; Siest, G. & Visvikis, S. (1996). Apolipoprotein E genotype E^*4/E^*2 in the STANISLAS Cohort Study – Dominance of the E^*2 allele? *Annals of Human Genetics*, 60:509-516.
34. Sandholzer, C.; Delport, R.; Vermaak, H. & Utermann, G. (1995). High frequency of the apo E4 allele in Khoi San from South Africa. *Human Genetics*, 95:46-48.
35. Robitaille, N.; Cormier, G.; Couture, R.; Bouthillier, D.; Davignon, J. & Pérusse L. (1996). Apolipoprotein E polymorphism in a French Canadian population of northeastern Quebec: allele frequencies and effects on blood lipid and lipoprotein levels. *Human Biology*, 68:357-370.
36. Valdez, R.; Stern, M. P.; Howard, B. V. & Haffner, S. M. (1995). Apolipoprotein E polymorphism and insulin levels in a biethnic population. *Diabetes Care*, 18:992-1000.
37. Muros, M. & Rodríguez-Ferrer, C. (1996). Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4. *Atherosclerosis*, 121:13-21.
38. Gregg, R. E.; Zech, L. A.; Schaefer, E. J. & Brewer, H. B. Jr. (1981). Type III hyperlipoproteinemia: defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. *Science*, 211:584.

39. Ghiselli G.; Schaefer, E. J.; Zech L. A.; Gregg, R. E. & Brewer, H. B. Jr (1982). Increased prevalence of apolipoprotein E4 in type V hyperlipoproteinemia. *Journal of Clinical Investigation*, 70:474.

40. Schaefer , E. J.; Lamon-Fava, S.; Johnson, S.; Ordovas, J. M.; Schaefer, M. M.; Castelli, W. P. & Wilson, P. W. F. (1994). Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 14:1105-1113.

Table 1- *APOE* genotype and allele frequencies (%) in a Southern Brazilian population

	Blacks (n=100)	Caucasians (n=100)	AD (n=23)
Genotypes			
<i>E*2/E*2</i>	0	1	0
<i>E*2/E*3</i>	13	10	4
<i>E*2/E*4</i>	2	3	9
<i>E*3/E*3</i>	50	68	35
<i>E*3/E*4</i>	27	16	35
<i>E*4/E*4</i>	8	2	17
Alleles			
<i>E*2</i>	7.5	7.5	7.0
<i>E*3</i>	70.0	81.0	54.0
<i>E*4</i>	22.5	11.5	39.0

AD –Alzheimer's disease caucasian patients

$\chi^2=8.72$; $p=0.013$ (between the ethnic groups)

$\chi^2=20.65$; $p<0.001$ (between AD patients and caucasian controls)

Table 2 - Genotype and allele frequencies of the *APOE* in the sample of Porto Alegre*

Genotypes	Hypercholesterolemics (n=134)		Controls (n=130)		Hypertriglyceridemics (n=42)		Total sample (n=343)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>E*2/E*2</i>	1	0.7	2	1.5	1	2.4	2	0.6
<i>E*2/E*3</i>	1	7.5	19	14.6	3	7.1	38	11.1
<i>E*2/E*4</i>	2	1.5	2	1.5	0	0	5	1.4
<i>E*3/E*3</i>	89	66.4	84	64.6	26	61.9	221	64.4
<i>E*3/E*4</i>	31	23.1	23	17.7	11	26.2	75	21.9
<i>E*4/E*4</i>	1	0.7	0	0	1	2.4	2	0.6
Alleles								
<i>E*2</i>		7.5		9.6		5.9		6.9
<i>E*3</i>		81.0		80.8		78.6		80.9
<i>E*4</i>		11.5		9.6		15.5		12.2

$\chi^2 = 3.58$; $p=0.059$ [hypercholesterolemics versus controls (comparison between carriers and non-carriers of *APOE*2* allele)]

$\chi^2 = 1.44$; $p=0.231$ [hypercholesterolemics versus controls (comparison between carriers and non-carriers of *APOE*4* allele)]

$\chi^2 = 1.601$; $p=0.206$ [hypertriglyceridemics versus controls (comparison between carriers and non-carriers of *APOE*2* allele)]

$\chi^2 = 1.640$; $p=0.200$ [hypertriglyceridemics versus controls (comparison between carriers and non-carriers of *APOE*4* allele)]

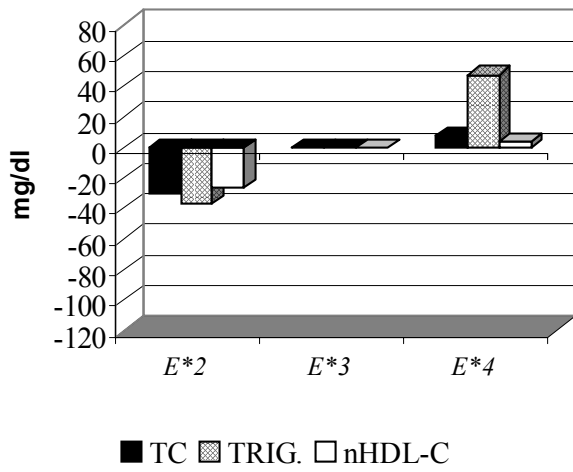
*From the 343 individuals studied, 62 were not included in any group and 25 subjects with hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia were included in both groups

Table 3 – Adjusted lipid levels by *APOE* genotypes (mg/dl)

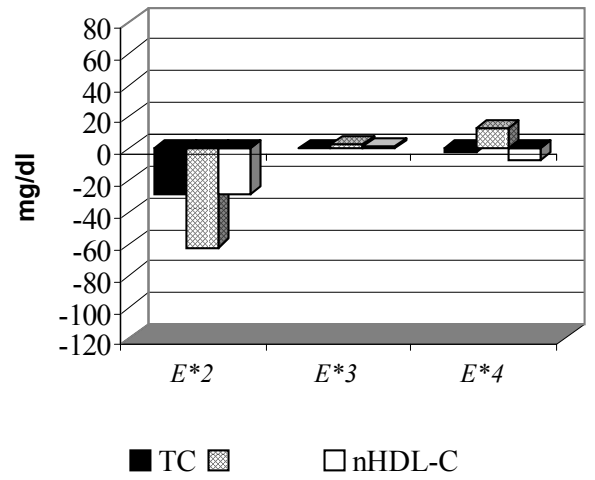
	<i>E</i> *2 carriers mean (SD)	<i>E</i> *3/ <i>E</i> *3 mean (SD)	<i>E</i> *4 carriers mean (SD)	p
TC	222.6 (71.9)	250.2 (81.1)	251.0 (72.1)	0.08 ¹
HDL-C	44.5 (14.0)	46.1 (13.0)	45.1 (16.8)	0.75 ²
NonHDL-C	177.5 (72.2)	202.4 (80.4)	202.4 (69.4)	0.14 ¹
Triglycerides	177.0 (129.5)	211.5 (80.4)	243.9 (204.5)	0.048 ¹

¹Kruskal-Wallis test; ² ANOVA;

a) Sample pooled



b) Men



c) Women

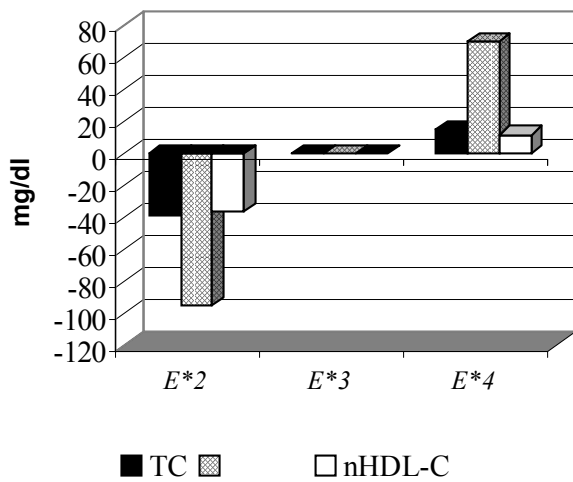


Figure 1 – Average excess of the *APOE* alleles (mg/dl), a)total sample, b)Men only, c) Women only. TC - total cholesterol; TRI - triglycerides; nHDL-C - non HDL cholesterol

CAPÍTULO IV
DISCUSSÃO

4 - DISCUSSÃO

Os aspectos mais específicos do presente estudo foram discutidos em ambos os artigos que compõem os capítulos II e III desta Dissertação. Neste ítem, será feita uma discussão mais geral sobre a origem e manutenção deste polimorfismo na espécie humana, bem como sobre as diferenças nas magnitudes do efeito do loco da *APOE* em populações distintas com o objetivo de contribuir para o estudo da genética das hiperlipidemias.

Recentemente Hanlon e Rubinztein (1995) investigaram a variabilidade do loco da *APOE* em 24 chimpanzés e 21 indivíduos de outras espécies de primatas. Todos apresentaram um padrão de DNA similar a *APOE*4*. Esse resultado sugere que esse é o alelo ancestral na espécie humana. A partir deste dado e examinando as frequências alélicas apresentadas no capítulo I, deparamos com duas questões: 1) Como o alelo *E*3* se tornou o mais freqüente, levando-se em conta que a forma ancestral é *E*4*? 2) Que forças agem sobre todas as populações humanas, a ponto de permitir que a freqüência do alelo *E*3* seja superior a 60% em todas as populações já investigadas?

Os resultados do presente trabalho bem como os da literatura mostram que o alelo *E*4* parece conferir aos seus portadores uma maior susceptibilidade à hipercolesterolemia, doenças cardiovascular e de Alzheimer. Deve-se salientar porém que nenhuma dessas patologias pode ser considerada como um fator seletivo, pois de uma forma geral manifestam-se após o período reprodutivo.

No entanto, a seleção pode ter tido um papel importante na manutenção desse polimorfismo, porque a apo E está também envolvida em muitos processos biológicos nos quais as características funcionais e

estruturais das diferentes isoformas poderiam afetar a sobrevivência até a idade reprodutiva tais como a absorção da gordura da dieta, imunorregulação e a função neuronal (Mahley, 1988 e Mahley e Rall, 1995)). A apo E parece também estar envolvida na função gonadal, implantação do embrião no útero e transporte de lipídeos transplacentário (Rindler e cols., 1991; Schneider e Nimpf, 1993; Olson e cols, 1995). Gerdes e cols (1996a) para testar a hipótese de que a apo E poderia afetar a eficiência reprodutiva, examinaram o número de filhos de homens casados com mais de 40 anos. Esses investigadores verificaram que indivíduos com pelo menos um alelo E^*4 eram menos férteis do que aqueles com outros genótipos da *APOE*. Esses dados porém não são suficientes para estimar o valor adaptativo desses genótipos independentemente do ambiente.

Avramopoulos e cols (1996) verificaram que em mulheres jovens, mães de filhos com síndrome de Down, decorrente de uma não-disjunção na meiose II, a frequência de E^*4 era significativamente mais alta do que em mulheres controles ou em mães mais velhas de filhos com síndrome de Down também resultantes de erros na meiose II materna. Esses autores sugeriram que a apoE poderia ser um fator de risco para a não-disjunção na meiose II de mulheres jovens contribuindo, dessa forma, para a perda fetal em portadoras de E^*4 . No entanto, esse resultado deve ser visto com cautela, pois o papel biológico da apo E em oócitos ainda não está esclarecido.

Vários investigadores sugeriram, baseados na distribuição geográfica das frequências de E^*4 (tabela I.1), que populações que até pouco tempo eram caçadores/coletores ou nômades possuem uma alta prevalência de E^*4 indicando uma interação genótipo/ambiente (Gerdes e cols., 1996b). Scacchi e cols (1997) propõem ainda que portadores de E^*4 submetidos a dietas com baixos níveis de colesterol, tais como as provavelmente utilizadas por

populações primitivas, teriam uma vantagem adaptativa, na medida em que portadores desse alelo possuem uma maior absorção de colesterol ao nível intestinal (Kesäieni e cols., 1987). É possível que diferenças funcionais entre os alelos da *APOE* possam conferir vantagens diferenciais de acordo com os tipos de alimentos mais abundantes em determinadas regiões.

Deriva genética e efeito do fundador foram provavelmente forças evolutivas que também contribuíram para a atual distribuição dos alelos da *APOE*, principalmente em populações pequenas e isoladas como as ameríndias (capítulo II dessa dissertação). No entanto, a quantificação dos efeitos de cada uma das forças evolutivas envolvidas na manutenção desse polimorfismo, ainda é uma questão em aberto.

Na Introdução desta dissertação foi enfatizado que o impacto da apo E nos níveis lipídicos pode ser de diferentes magnitudes. Um dos fatores que melhor explica essa variabilidade é o grupo étnico dos indivíduos analisados. De uma forma geral, em populações caucasóides, os estudos de associação entre a *APOE* e colesterol são estatisticamente significantes. Os resultados obtidos no presente trabalho na amostra caucasóide de Porto Alegre estão de acordo com os verificados para este grupo étnico (capítulo III). Como a variância dos níveis lipídicos foi muito grande nessa amostra, os resultados foram mais evidentes com a estatística do excesso médio que é independente desse parâmetro. Os dados obtidos na amostra de Ameríndios (capítulo II) mostram, juntamente com outras investigações no mesmo grupo étnico (tabela I.2), aparentemente uma menor influência deste loco no metabolismo de lipídeos nesse grupo étnico. Dois fatores principais parecem estar influenciando estas diferenças: a composição genética e a dieta.

A dieta parece ser o principal fator interagindo com a apo E na determinação dos níveis lipídicos (Lala e cols., 1998). Assim, o efeito do

alelo *E*4* aumenta com uma maior ingestão de gorduras saturadas e colesterol. Em populações que consomem uma dieta pobre desses elementos, o efeito deste alelo pode ser pequeno a ponto de não aparecer no tipo de abordagem mais comumente utilizada (estudos de associação).

Outra abordagem que poderia contribuir para a compreensão da genética das dislipidemias é a investigação de outros locos que poderiam afetar o metabolismo de lipídeos. Uma característica de herança multifatorial somente pode ser elucidada utilizando-se informações de diferentes locos. Principalmente porque genes diferentes que afetam o traço em estudo podem estar segregando de forma diversa em distintos grupos étnicos. Dessa forma, é importante uma triagem de vários genes para se obter uma conclusão mais definitiva. Locos que aparentemente influenciam os níveis lipídicos ainda devem ser estudados para as populações brasileiras. Esta dissertação marca o início do estudo das influências genéticas sobre os níveis lipídicos em nossas populações.

CAPÍTULO V
RESUMO E CONCLUSÕES

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

O gene da apolipoproteína E (*APOE*) possui três alelos com frequências polimórficas. Esta apolipoproteína possui um importante papel no metabolismo de lipídeos, crescimento e regeneração neuronal, e parece estar relacionada com a doença de Alzheimer. No entanto, a magnitude destas influências difere de acordo com a população estudada, sugerindo uma interação genótipo/ambiente. No presente trabalho, foram estudadas seis tribos indígenas sul-americanas (n=186), 100 negróides e 466 caucasóides de Porto Alegre. Destes últimos, 343 foram investigados quanto à associação com níveis lipídicos e 23 quanto à associação com doença de Alzheimer. Todas as amostras foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e clivadas com a enzima de restrição *Hha* I. Os genótipos foram identificados após separação dos fragmentos de restrição por eletroforese em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídeo. O presente estudo teve os seguintes objetivos específicos: 1) Determinar as frequências gênicas e genotípicas da *APOE* nas populações negróides e caucasóides de Porto Alegre e de seis tribos indígenas da América do Sul; 2) Verificar se as associações entre os alelos da *APOE* e lipídeos séricos descritas em caucasóides também ocorrem em populações indígenas brasileiras; 3) Investigar a influência do polimorfismo do gene *APOE* em pacientes com hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, bem como em indivíduos normais da população de Porto Alegre e 4) Determinar a distribuição dos alelos da *APOE* em uma amostra de pacientes com Doença de Alzheimer.

Os principais resultados e conclusões do presente trabalho foram:

1 - As seis tribos indígenas investigadas mostraram uma alta variabilidade das frequências alélicas da *APOE* ; o alelo mais frequente foi o *E*3* em todas as amostras estudadas.

2 - O alelo *E*2* foi identificado em 2% e 4% dos cromossomos dos Wai Wai e Mataco, respectivamente. Estas são as primeiras tribos da América do Sul onde a presença deste alelo foi documentada. Esta observação poderia ser explicada por mistura interétnica, embora estudos anteriores tenham mostrado um grau muito baixo de miscigenação nessas tribos. Outra hipótese é a de que este alelo esteve presente nas populações que entraram na América, em frequências muito baixas, tendo sido detectado apenas com o aumento no número de tribos estudadas.

3 - As frequências do alelo *E*4* variaram de 2% nos Xavante a 47% nos Wai Wai. Esta grande heterogeneidade possivelmente é decorrente de efeito do fundador, isolamento e deriva genética.

4 - Índios Tupi-Mondé portadores do alelo *E*4* tiveram os níveis de colesterol total, LDL, VLDL e triglicérides maiores quando comparados a indivíduos com o genótipo *E*3/E*3*. Contudo, nenhum teste atingiu resultados estatisticamente significantes.

5 - O alelo *E*3* foi o mais prevalente, seguido de *E*4* e *E*2* em negróides e caucásóides de Porto Alegre. As frequências dos alelos e genótipos foram significativamente diferentes entre os dois grupos étnicos ($\chi^2=8,72$; $p=0,013$).

6 - As frequências alélicas de caucasóides de Porto Alegre são muito semelhantes as descritas em populações do sul da Europa. Enquanto que as prevalências observadas em negróides gaúchos são similares às descritas em populações africanas.

7 - No presente estudo foi detectada uma associação altamente significativa entre o alelo E^*4 e a doença de Alzheimer ($\chi^2=20,65$; $p<0,001$). A frequência deste alelo foi cerca de quatro vezes maior na amostra de pacientes em comparação com controles do mesmo grupo étnico.

8 - O alelo E^*2 foi menos frequente nas amostras de hipercolesterolêmicos e hipertrigliceridêmicos quando comparados aos normolipidêmicos. Além disso, indivíduos portadores de E^*2 possuem níveis de colesterol total e colesterol não-HDL mais baixos. Nenhuma relação foi observada entre o polimorfismo da *APOE* e níveis de HDL.

9 - Indivíduos portadores do alelo E^*2 tiveram níveis de triglicerídeos significativamente menores que homozigotos E^*3/E^*3 , enquanto a relação inversa foi observada para portadores de E^*4 .

10 - Os resultados dos testes estatísticos mostraram que a magnitude do efeito do alelo E^*2 é maior que a do alelo E^*4 na amostra de Porto Alegre. O excesso médio de ambos os alelos foi maior em mulheres do que em homens, possivelmente devido aos diferentes efeitos hormonais entre os sexos.

CAPÍTULO VI
SUMMARY AND CONCLUSIONS

6 - SUMMARY AND CONCLUSIONS

The apolipoprotein E gene (*APOE*) has three alleles with polymorphic frequencies. This apolipoprotein has an important role in lipid metabolism, neuronal growth and is probably related to Alzheimer's disease. However, the magnitude of these influences differs in diverse populations suggesting an environment/genetic interaction. In the present study six South American Indian tribes (n=186), 100 Blacks and 466 Caucasian from Porto Alegre were investigated. Among the caucasians, 343 were investigated for an association with lipid levels and 23 for an association with Alzheimer's disease. All samples were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) and digested with the *Hha* I restriction enzyme. Genotypes were identified after electrophoresis of the digested DNA fragments on 4% agarose gels containing ethidium bromide. The present study had following specific objectives: 1) To determine *APOE* allelic and genotypic frequencies in Caucasian and Blacks from Porto Alegre and from six South American Indian tribes; 2) To verify if the associations among *APOE* alleles and serum lipid levels described in Caucasian populations also occurs in Brazilian Indian populations; 3) To investigate the influence of *APOE* polymorphism in hypercholesterolemic and hypertriglyceridemic patients as well as in normal individuals from the Porto Alegre population; and 4) To determine the *APOE* allele distribution in a sample of Alzheimer's disease patients.

The main results and conclusions of the present study were:

1 - A high variability of *APOE* allelic frequencies was observed among the six Indian tribes. The *E*3* allele was the most frequent in all samples investigated.

2 - The E^*2 allele was identified in 2% and 4% of the Wai Wai and Mataco chromosomes respectively. The presence of this allele in South American Natives is being reported herein for the first time. This finding could be due to interethnic admixture, however previous studies showed a low degree of non-Indian gene flow in these tribes. On the other hand, this allele could be present in low frequencies among the ancestral populations, and was detected only because more tribes have been studied.

3 - E^*4 frequencies ranged from 2% in the Xavante to 47% in the Wai Wai. This high heterogeneity probably is due to founder effects, isolation and genetic drift.

4 - Although non-significant, Tupi-Mondé Indians carriers of E^*4 allele had higher total cholesterol, LDL, VLDL and triglycerides when compared to E^*3/E^*3 individuals.

5 - The E^*3 allele was the most frequent, followed by E^*4 and E^*2 alleles in Blacks and Caucasians from Porto Alegre. The allele and genotypic frequencies were significantly different between the two ethnic groups ($\chi^2=8,72$; $p=0,013$).

6 - The allelic frequencies in Porto Alegre Caucasians are similar to those described in Southern European populations, while those observed in the Black sample are similar to those detected in African populations.

7 - In the present study a highly significant association was detected between the E^*4 allele and Alzheimer's disease ($\chi^2=20,65$; $p<0,001$). The

frequency of this allele was about four times higher in the patient sample than in controls from the same ethnic group.

8 - The E^*2 allele was less prevalent in the hypercholesterolemic and hypertriglyceridemic samples when compared to normolipidemic individuals. Carriers of the E^*2 allele had lower levels of total cholesterol and non-HDL cholesterol. No specific trend was observed between *APOE* and HDL levels.

9 - Carriers of the E^*2 allele showed significant lower triglyceride levels than E^*3/E^*3 homozygotes while the opposite was observed for E^*4 carriers.

10 - Statistical tests showed that the magnitude of the E^*2 allele effect is higher than that of the E^*4 allele in the Porto Alegre sample. The average excesses for both alleles were higher in women than in men probably due different hormonal effects between males and females.

CAPÍTULO VII
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASAKAWA, J.; TAKAHASHI, N.; ROSEENBLUM, B. B. and NEEL, J. V. (1985). Two-dimensional gel studies of genetic variation in the plasma proteins of Amerindians and Japanese. *Hum Genet*, **70**:222-230.
- AVRAMOPOULOS, D.; MIKKELSEN, M.; VASSILOPOULOS, D.; GRIGORIADOU, M.; PETERSEN, M. B. (1996). Apolipoprotein E allele distribution in parents of Down's syndrome children. *Lancet*, **347**:862-865.
- BALL, S. S.; MAH, V. H. (1993). Apolipoprotein E4, mental vitality in youth and Alzheimer's disease em old age?. *Age*, **16**:136-149.
- BOER, J. M. A.; EHNHOLM, C.; MENZEL, H.; HAVEKES, L. M.; ROSSENEU, M.; O'REILLY, D. S. J.; TIRET, L. (1997). Interactions between lifestyle-related factors and the apoE polymorphism on plasma lipids and apolipoproteins - The EARS study. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, **17**:1675-1681.
- BOER, J. M. A.; FESKENS, E. J. M.; SCHOUTEN, E. G.; HAVEKES, L. M.; SEIDELL, J. C.; KROMHOUT, D. (1998). Lipid profiles reflecting high and low risk for coronary heart disease: contribution of apolipoprotein E polymorphism and lifestyle. *Atherosclerosis*, **136**:395-402.
- BOERWINKLE, E. and UTERMANN, G. (1988). Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet*, **42**:104-112.

BOERWINKLE, E.; BROWN, S. B.; ROHRBACH, K.; GOTTO, A. M., JR.; PATSCH, W. (1991). Role of apolipoprotein E and B gene variation in determining response of lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels to increased dietary cholesterol. **Am J Hum Genet**, **49**:1145-1154.

BRAECKMAN, L.; DE BACQUER, D.; ROSSENEU, M.; DE BACKER, G. (1996). Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men: phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. **Atherosclerosis**, **120**:67-73.

CACABELOS, R. (1996). Diagnosis of Alzheimer's disease: defining genetic profiles (genotype vs phenotype). **Acta Neurol Scand**, **165**:72-84.

CARIOLOU, M. A.; KOKKOFITOU, A.; MANOLI, P.; SOTEROULA, C.; KARAGRIGORIOU, A.; MIDDLETON, L. (1995). Underexpression of the apolipoprotein E2 and E4 alleles in Greek Cypriot population of Cyprus. **Genet Epidemiol**, **12**:489-497.

CHAKRABORTY, R.; KAMBOH, M. I.; FERREL, R.E. (1991). "Unique" alleles in admixed populations: a strategy for determining "hereditary" population differences of disease frequencies. **Ethnicity Dis**, **1**:245-256.

CORBO, R. M.; SCACCHI, R.; MUREDDU, L.; MULAS, G.; ALFANO, G. (1995). Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrilamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. **Ann Hum Genet**, **59**:197-209.

CORDER, E.H.; SAUNDERS, A .M.; STRITTMATTER, W.J.; SCHMECHEL, D.E.; GASKELL, P.C.; SMALL, G.W.; ROSES, A D.; HAINES, J.L.; PERICAK-VANCE, M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, **261**: 921-923 .

CREWS, D. E.; KAMBOH, M. I.; MANCILHA-CARVALHO, J. J.; KOTTKE, B.(1993). 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**, **65**: 211-224.

DALLONGEVILLE, J.; LUSSIER-CACAN, S.; DAVIGNON, J. (1992). Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. **J Lipid Res**, **33**:447-454.

DAVIGNON, J.; GREGG, R. E.; SING, C. F. (1988). Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. **Arteriosclerosis**, **8**:1-21.

DEMMANT, T.; BEFORD, D.; PACKARD C. J. ;SHEPHERD, J. (1991). Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipidaemic subjects. **J Clin Invest**, **88**:1490-1501.

DERGUNOV, A. D.; ROSSENEU, M. (1994). The significance of apolipoprotein e structure of plasma triglyceride-rich lipoproteins. **Biol Chem Hoppe-Seyler**, **375**:485-495.

FARRER, L.A.; CUPPLES, L. A.; HAINES, J. L.; HYMAN, B.; KUKULL, W. A.; MAYEUX, R.; MYERS, R. H.; PERICAK-VANCE, M. A.; RISCH, N.; VAN DUJIN, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease - A meta-analysis. **JAMA**, **278**:1349-1356.

FIELDING, C. J. and FIELDING, P. E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **J Lipid Res**, **36**:211-228.

GAJRA, B.; CANDLISH, J. K.; SAHA, N.; MAK J. W.; TAY, J. S. H. (1994). Effect of apolipoprotein E variants on plasma lipids and apolipoproteins in the Orang Asli ("Aborigines") of Malaysia. **Hum Hered**, **44**:209-213.

GERDES , L.U.; KLAUSEN, I. C.; SIHM, I.; FÆRGEMAN, O. (1992). Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. **Genet Epidemiol**, **9**:155-167.

GERDES , L.U.; GERDES, C.; HANSEN, P.S KLAUSEN, I. C.; FÆRGEMAN, O. (1996a). Are men carrying the apolipoprotein E^*4 or E^*2 allele less fertile than E^*3/E^*3 genotypes? **Hum Genet**, **98**:239-242.

GERDES , L.U.; GERDES, C.; HANSEN, P.S.; KLAUSEN, I. C.; FÆRGEMAN, O.; DYERBERG, J. (1996b). The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. **Hum Genet**, **98**:546-550.

GREGG, R. E.; ZECH, L. A.; SCHAEFER, E. J.; BREWER, H. B. Jr. (1981).

Type III hyperlipoproteinemia: defective metabolism of an abnormal apolipoprotein E. **Science**, **211**:584.

GUEGUEN, R.; VISVIKIS, S.; STEINMETZ, J.; SIEST, G.; BOERWINKLE,

E. (1989). An analysis of genotype effects and their interactions by using the apolipoprotein E polymorphism and longitudinal data. **Am J Hum Genet**, **45**:793-802.

GYLLING, H.; KONTULA, K.; MIETTINEN, T. A. (1995). Cholesterol

absorption and metabolism and LDL kinetics in healthy men with different apoprotein E phenotypes and apoprotein B *Xba* I and LDL receptor *Pvu* II genotypes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, **15**:208-213.

GYLLING, H.; KONTULA, K.; KOIVISTO, U.; MIETTINEN, H. E.;

MIETTINEN, T. A. (1997). Polymorphisms of the genes encoding apoproteins A-I, B, C-III, and E and LDL receptor, and cholesterol and LDL metabolism during increased cholesterol intake - Common alleles of the apoprotein E gene show the greatest regulatory impact. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, **17**:38-44.

HALLMAN, D. M.; BOERWINKLE, E.; SAHA, N.; SANDHOLZER, C.;

MENZEL, H. J.; CSÁZÁR, A. and UTERMANN, G. (1991). The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. **Am J Hum Genet**, **49**:338-349.

HANLON, C. S. and RUBINSZTEIN, D. C. (1995). Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. **Atherosclerosis**, **112**:85-90.

HAVILAND, M. B.; LUSSIER-CACAN, S.; DAVIGNON, J.; SING, C.(1995). Impact of apolipoprotein E genotype variation on means, variances, and correlations of plasma lipid, lipoprotein, and apolipoprotein traits in octogenarians. **Am J Med Gen**, **58**:315-331.

HEGELE, R. A.; CONNELLY, P.W.; HANLEY, A. J. G.; SUN F.; HARRIS S. B.; ZINMAN B. (1997) Common genomic variants associated with variation in plasma lipoproteins in young aboriginal Canadians. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, **17**:1060-1066.

HONG, S. H.; KANG, B.Y.; OH J.H.; KIM, J.Q; LEE, C.C. (1997). Genetic variations of the apo E-CI-CII cluster gene in Koreans. **Clin Biochem**, **30**:215-219.

KAMBOH, M.I.; BHATIA, K. K.; FERRELL, R. E. (1990). Genetic studies of human apolipoproteins: XII. Population Genetics os apolipoproteins in Papua New Guinea. **Am J Hum Biol** **2**:17-23.

KAMBOH, M.I.; SERJEANTSON, S.W.; FERREL, R.E. (1991a). Genetic studies of human apolipoproteins. XVIII. Apolipoprotein polymorphisms in Australian aborigines. **Hum Biol**, **63**:179-186.

KAMBOH, M.I.; WEISS, K.M.; FERREL, R.E. (1991b). Genetic studies of human apolipoproteins. XVI. Apo E polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico. **Clin Genet**, **39**: 26-32.

KAMBOH, M.I.; ASTON, C.E.; FERREL, R. E.; HAMMAN, R.F. (1993). Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanics whites. **Atherosclerosis**, **98**:201-211.

KAMBOH, M.I.; ASTON, C.E.; HAMMAN, R.F. (1995). The relationship of APOE polymorphism and cholesterol levels in normoglycemic and diabetic subjects in a biethnic population from San Luis Valley, Colorado. **Atherosclerosis**, **112**:145-159.

KAMBOH, M. I.; CRAWFORD, M. H.; ASTON, C. E.; LEONARD, W. R. (1996). Population distributions of *APOE*, *APOH*, and *APOA4* polymorphisms and their relationships with quantitative plasma lipids levels among the Evenki Herders of Siberia. **Hum Biol**, **68**:231-243.

KAO, J.; TSAI, K.; CHANG, C.; HUANG, P.(1995). The effects of apolipoprotein E polymorphism on the distribution of lipids and lipoproteins in the Chinese population. **Atherosclerosis**, **114**: 55-59.

KATAOKA, S.; ROBBINS, D. C.; COWAN, L. D.; GO, O.; YEH, J. L.; DEVEREUX, R. B.; FABSITZ, R. R.; LEE, E. T.; WELTY, T. K.; HOWARD, B. V.(1996). Apolipoprotein E polymorphism in American Indians and its relation to plasma lipoproteins and diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, **16**:918-925.

KESÄNIEMI, Y. A.; EHNHOLM, C.; MIETTINEN, T. A, (1987). Intestinal cholesterol absorptionefficiencyin man is related to apoprotein E phenotype. **J Clin Invest**, 80:578-581.

KNIJFF, P. de; MAAGDENBERG, A. M. J. M.; FRANTS, R. R.; HAVEKES, L. M. (1994). Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. **Hum Mutat**, 4:178-194.

LALA, A.; SCOPPOLA, A.; MOTTI, C.; CORTESE, C.; CACCESE, D.; MENZINGER, G. (1998). Apolipoprotein E genotype and cholesterologenesis in polygenic hypercholesterolemia. **Metabolism**, 47: 97-100.

LENDON, C. L.; ASHALL, F.; GOATE, A. M. (1997). Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. **JAMA**, 277:825-831.

LOUHIJA, J.; MIETTINEN, H. E.; KONTULA, K.; TIKKANEN, M. J.; MIETTINEN, T.A.; TILVIS, R. S. (1994). Aging and genetic variation of plasma apolipoproteins - Relative loss of the apolipoprotein E4 phenotype in centenarians. **Arterioscler Thromb**,14:1084-1089.

LUCOTTE, G.; LOIRAT, F.; HAZOUT, S. (1997). Pattern of gradient of apolipoprotein E allele *4 frequencies in Western Europe. **Hum Biol**, 69:253-262.

MAHLEY, R. W. and INNERARITY, T. L. (1983). Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. **Biochim Biophys Acta**, 737:197-222.

MAHLEY, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, **240**: 622-630.

MAHLEY, R. W.; PALAOGLU, K. E.; ATAK, Z.; DAWSON-PEPIN, J.; LANGLOIS, A.; CHEUNG, V.; ONAT, H.; FULKS P.; MAHLEY, L.; VAKAR, F.; ÖZBAYRAKÇI, S.; GÖKDEMİR O.; WINKLER W. (1995). Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. **J Lipid Res** **36**:839-859.

MAHLEY, R. W. and RALL, S. C., JR. (1995). Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: SCRIVER, C. K.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (eds.). *The metabolic basis of inherited disease*. 7. ed. McGraw Hill. New York, 1953-1980.

MARIN, G. B.; TAVELLA, M. H.; GUERREIRO, J. G.; SANTOS, S. E. B.; ZAGO, M. A. (1997). Absence of the E2 allele of apolipoprotein in Amerindians. **Braz J Genet**, **20**:741-743.

McKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; KATZMAN, R.; PRICE, D.; STADLAN, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRA Work Group under the auspices of Departments of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. **Neurology**, **34**:939-944.

MONTGOMERY, R.; CONWAY, T. H.; SPECTOR, A. A.; CHAPPELL, D. (1996). *Biochemistry - A case-oriented approach*. 6^a ed. St. Louis: Mobby.

- MOORE, J. H.; REILLY, S. L.; FERREL, R. E. SING, C. F. (1997). The role of the apolipoprotein E polymorphism in the prediction of coronary artery disease age of onset. **Clin Genet**, **51**:22-25 .
- MUROS, M.; RODRÍGUEZ-FERRER, C. (1996). Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4. **Atherosclerosis**, **121**:13-21.
- OLAISEN, B.; TEISBEG, P.; GEDDE-DAHL Jr, T.(1982). The locus for apolipoprotein E (apo E) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. **Hum Genet**, **62**:233-236.
- OLSON, L. M.; ZHOU, X.; SCHREIBER, J. R. (1995). Cell-specific localization of apolipoprotein E messenger ribonucleic acid in the testis and epididymis of the rat. **Biol Reprod**, **52**:1003-1011.
- PABLOS-MÉNDEZ, A.; MAYEUX, R.; NGAI, C.; SHEA, S.; BERGLUND, L. (1997). Association of apo E polymorphism with plasma lipid levels in a multiethnic elderly population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, **17**:3534-3541.
- PORKKA, K. V. K.;TAIMELA, S.; KONTULA, K.; LEHTIMÄKI, T.; AALTO-SETÄLÄ, K.; AKERBLOM, H. K.; VIKARI, J. S. A.(1994). Variability gene effects of DNA polymorphisms at the apo B, apo AI/CIII and apo E loci on serum lipids: the cardiovascular risk in young finns study. **Clin Genet**, **45**:113-121.

RICHARD, P.; THOMAS, G.; ZULUETA, M. P.; DE GENNES, J.; THOMAS, M.; CASSAIGNE, A.; BÉRÉZIAT, G.; IRON, A. (1994). Common and rare genotypes of human apolipoprotein E determined by specific restriction profiles of polymerase chain reaction-amplified DNA. **Clin Chem**, **40/1**: 24-29.

RINDLER, M. J.; TRABER, M. G.; ESTERMAN, A. L.; BERSINGER, N. A.; DANCIS, J. (1991). Synthesis and secretion of apolipoprotein E by human placenta and choriocarcinoma cell lines. **Placenta**, **12**:615-624.

ROBITAILLE, N.; CORMIER, G.; COUTURE, R.; BOUTHILLIER, D.; DAVIGNON, J.; PÉRUSSE L. (1996). Apolipoprotein E polymorphism in a French Canadian population of northeastern Quebec: allele frequencies and effects on blood lipid and lipoprotein levels. **Hum Biol**, **68**:357-370.

RUBINSZTEIN, D. C.; HANLON, C. S.; IRVING, R. M.; GOODBURN, S.; EVANS, D. G. R.; WOOD, H. K.; XUERE, J. H.; BANDMANN, O.; HARDING, A. E. (1994). Apo E genotypes in multiple sclerosis, Parkinson's disease, schwannomas and late-onset Alzheimer's disease. **Mol Cell Prob**, **8**:519-525.

RUBINSZTEIN, D. C. (1995). Apolipoprotein E: a review of its roles in lipoprotein metabolism, neuronal growth and repair as a risk for Alzheimer's disease. **Psych Med**, **25**:223-229.

SANDHOLZER, C.; DELPORT, R.; VERMAAK, H.; UTERMANN, G. (1995). High frequency of the apo E4 allele in Khoi San from South Africa. **Hum Genet**, **95**:46-48.

SCACCHI, R.; CORBO, R. M.; RICKARDS, O.; MANTUANO, E.; GUEVARA, A.; DE STEFANO, G. F. (1997). Apolipoprotein B and E genetic polymorphism in the Cayapa Indians of Ecuador. **Hum Biol**, **69**:375-382.

SCHERR, W.D.; BOUNDREAU, D. A.; MALCOM, G.T.; MIDDAGH, J. P. (1995). Apolipoprotein E and atherosclerosis in Alaska Natives. **Atherosclerosis**, **114**:197-202.

SCHNEIDER, W. J.; NIMPF, J. (1993). Lipoprotein receptors: old relatives and new arrivals. **Curr Opin Lipidol**, **4**:205-209.

SEPEHRNIA, B.; KAMBOH, M. I.; ADAMS-CAMPBELL, L. L.; BUNKER, C. H.; NWANKWO, M.; MAJUMDER, P. P. and FERRELL, R. E. (1989). Genetic studies of human apolipoproteins. X. The effect of the apolipoprotein E polymorphism on quantitative levels of lipoproteins in Nigerian blacks. **Am J Hum Genet**, **45**:586-591.

SKLAVOUNOU, E.; ECONOMOU-PETERSEN, E.; KARADIMA, G.; PANAS, M.; AVRAMOPOULUS, D.; VARSOU, A.; VASSILOPOULOS, D.; PETERSEN, M. B. (1997). Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population. **Clin Genet**, **52**:216-218.

SIEST, G.; HENNY, J.; GALTEAU, M. M.; SCHIELE, F.; STEINMETZ, J.; VISVIKIS, S. (1995). Lipid and lipoprotein genetic variability: an important contribution from the french health examination centers. **Clin Biochem**, **28**: 31-38.

SING, C. F. and DAVIGNON, J. (1985). Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. **Am J Hum Genet**, **37**:268-285.

STRITTMATER, W. J. and ROSES, A. D. (1996). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. **Annu Rev Neurosci**, **19**:53-77 .

STRYER, L. (1987). Bioquímica. 3^a ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.

TATA, F.; HENRY, I.; MARKHAM, A. F.; WALLIS, S. C.; WEIL, D.; GRZESCHIK, K. H.; JUNIEN, C.; WILLIAMSON, R.; HUMPHRIES, S. E. (1985). Isolation and characterisation of a cDNA clone for human apolipoprotein CI and assignment of the gene to chromosome 19. **Hum Genet**, **69**:345-349.

TIRET, L.; DE KNIJFF, P.; MENZEL, H.; EHNHOLM, C.; NICAUD, V.; HAVEKES, L. M. (1994). ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations - The EARS study. **Arterioscler Thromb**, **14**:1617-1624.

TOZUKA, M.; OHTA, H.; HIDAKA, H.; OKUMURA, N.; FURIHATA, K.; KATSUYAMA, T. (1996). Influence of apolipoprotein E phenotypes on total serum cholesterol in Japanese children. **Clin Chim Acta**, **247**:175-180.

UTERMANN, G.; ULRICH, L.; ULRIKE, B.; WEBER, W. (1980). Genetics of the apolipoprotein E system in man. **Am J Hum Genet**, **32**:339-347.

UUSITUPA, M.. I. J.; KARHUNEN, L.; RISSANEN, A.; FRANSSILA-KALLUNKI, A.; NISKANEN, L.; KERVINEN, K.; KESÄNIEMI, A. (1996). Apolipoprotein E phenotype modifies metabolic and hemodynamic abnormalities related to central obesity in women. **Am J Clin Nutr**, **64**:131-136.

VALDEZ, R.; STERN, M. P.; HOWARD, B. V.; HAFFNER, S. M. (1995). Apolipoprotein E polymorphism and insulin levels in a biethnic population. **Diabetes Care**, **18**:992-1000.

VALVENY, N.; ESTEBAN, E.; KANDIL, M.; MORAL, P. (1997). APO E polymorphism in Spanish and Moroccan populations. **Clin Genet**, **51**: 354-356.

WEISS, K. M. (1993). *Genetic variation and human disease - principles and evolutionary approaches*. Cambridge University Press

XHIGNESSE, M.; LUSSIER-CACAN, S.; SING, C. F.; KESSLING, A. M.; DAVIGNON, J. (1991). Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. **Arterioscler Thromb**, **11**:1100-1110.

ZEKRAOUI, L.; LAGARDE, J. P.; RAISONNIER, A.; GÉRARD, N.; AOUIZÉRATE, A.; LUCOTTE, G. (1997). High frequency of the apolipoprotein *E*4* allele in African Pygmies and most of African populations in Sub-Saharan Africa. **Hum Biol**, **69**:575-581.

ZAMAN, M. M.; IKEMOTO, S.; YOSHIKE, N.; DATE, C.; YOKOYAMA, T.; TANAKA, H. (1997). Association of apolipoprotein genetic polymorphisms with plasma cholesterol in a Japanese rural population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 17:3495-3504.