

# Polimorfismo genético da apolipoproteína E na doença arterial periférica

*Genetic polymorphism of apolipoprotein E in peripheral artery disease*

Antônio Carlos Brandão<sup>1</sup>, Sidney Pinheiro Jr.<sup>2</sup>, Marcela Augusta Pinhel<sup>3</sup>, Alexandre Maieiras Anacleto<sup>4</sup>, José Maria Pereira de Godoy<sup>5</sup>, Moacir Fernandes de Godoy<sup>5</sup>, José Ernesto dos Santos<sup>6</sup>, Dorotéia Rossi Silva Souza<sup>7</sup>

## Resumo

**Objetivo:** este estudo teve como objetivo analisar o polimorfismo genético da apolipoproteína E na doença arterial periférica obstrutiva ou aneurismática.

**Método:** foram estudados 61 pacientes caucasóides do sexo masculino com sintomas clínicos e comprovação angiográfica de doença aterosclerótica, com idade entre 38 e 79 anos. O grupo-controle foi constituído por 59 indivíduos. Foram excluídos os indivíduos com doença renal, doença hepática ou diabetes melito. A análise do polimorfismo genético da apolipoproteína E foi realizada por PCR (*polimerase chain reaction*) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) com a endonuclease Hha I, identificando-se seis genótipos:  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$  e  $\epsilon 4/\epsilon 4$ . Para análise estatística, foram aplicados teste exato de Fisher e *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%, e admitiu-se erro  $\alpha$  de até 5%.

**Resultados:** o alelo  $\epsilon 3$  mostrou-se mais freqüente em pacientes e controles, enquanto o alelo  $\epsilon 4$  apresentou maior prevalência nos controles em relação aos pacientes, embora sem diferença significativa entre eles. Pacientes com doença arterial periférica obstrutiva mostraram freqüência mais elevada do genótipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  em comparação à doença arterial periférica aneurismática, embora sem diferença significativa entre eles.

**Conclusão:** o polimorfismo da apolipoproteína E-Hha I não foi associada com a doença arterial periférica.

**Palavras-chave:** polimorfismo, apolipoproteínas E, aterosclerose.

## Abstract

**Objective:** The objective of this study was to evaluate the genetic polymorphisms of apolipoprotein E in peripheral artery disease.

**Method:** A total of 61 Caucasian male patients aged between 38 and 79 years old were studied. All the patients had clinical symptoms of arterial disease, which was later confirmed by angiography. A control group was constituted of 59 individuals. Patients with renal disease, liver disease or *diabetes mellitus* were excluded from the study. The genomic DNA was extracted from leukocytes from 5 ml peripheral blood collected in EDTA and the alleles of apolipoprotein E were investigated. Fisher's exact test and odds ratio were employed for statistical analysis.

**Results:** The  $\epsilon 3$  allele was more common in patients when compared to the control group, whilst the  $\epsilon 4$  allele was more frequent if the control group was compared to the study group, however no significant difference was evidenced. Patients with obstructive peripheral artery disease presented with a greater frequency of the  $\epsilon 3/\epsilon 4$  genotype compared to patients with aneurysmal peripheral artery disease. No statistically significant differences were observed.

**Conclusion:** No evidence was observed of an association between apolipoprotein E polymorphisms and peripheral artery disease.

**Key words:** genetic polymorphisms, apolipoprotein E, atherosclerosis.

1. Doutor, Professor adjunto, Dep. de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), S. José do Rio Preto, SP.
2. Professor assistente, Departamento de Biologia Molecular, FAMERP, São José do Rio Preto, SP.
3. Bióloga estagiária, Departamento de Biologia Molecular, FAMERP, São José do Rio Preto, SP.
4. Médico, Instituto de Medicina e Cardiologia de S. José do Rio Preto, SP.
5. Doutor, Professor adjunto, Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular, FAMERP, São José do Rio Preto, SP.
6. Doutor. Professor livre-docente, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, SP.
7. Doutora, Professora adjunta, Departamento de Biologia Molecular, FAMERP, São José do Rio Preto, SP.

Artigo submetido em 05.05.04, aceito em 19.11.04.

A apolipoproteína E (apo E) é uma proteína integrante das lipoproteínas de alta densidade (HDL), proteína de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons, além dos produtos de degradação lipolítica, como remanescentes de quilomícrons e lipoproteína de densidade intermediária (IDL). Essa apolipoproteína, identificada no início da década de 1970<sup>1</sup>, tem sido extensivamente estudada principalmente por sua função no metabolismo dos lipídios e pelo envolvimento no transporte de colesterol em vários tecidos.

A expressão da apo E é reconhecida em vários órgãos e glândulas de seres humanos, ratos e coelhos<sup>2</sup>. Entretanto, a concentração mais alta de seu mRNA encontra-se no fígado, que consiste na fonte primária dessa proteína no plasma; o cérebro é o segundo órgão em nível de mRNA, secretando a apo E no fluido cérebro-espinhal<sup>3</sup>. A apo E também é sintetizada por macrófagos e parece ter efeito importante no metabolismo lipídico e doença vascular, modulando o balanço de seu colesterol e de células musculares lisas da parede arterial, com impacto na progressão ou regressão da lesão aterosclerótica. Essa proteína controla também a agregação plaquetária e a proliferação de linfócitos, e interage com a matriz extracelular que afeta a retenção de lipoproteínas na parede do vaso, a bioviabilidade de citosinas seqüestradas e os fatores de crescimento. Além disso, ela ainda regula o crescimento de células musculares lisas arteriais<sup>4</sup>.

O polimorfismo da apo E foi referido inicialmente por Utermann et al.<sup>5</sup> e observado por Zannis et al.<sup>6</sup> e Utermann et al.<sup>7</sup>, sob a forma de três alelos principais  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ , que codificam as isoformas da apo E, designadas como apo E2, E3 e E4, distintas entre si pelo conteúdo de cisteína e arginina nas posições dos códons 112 e 158 do exon 4. Além da variação genética, podem ocorrer modificações pós-tradução nas principais isoformas de apo E<sup>2</sup>.

A associação entre polimorfismo da apo E e aterosclerose foi inicialmente estabelecida em estudo de pacientes com hiperlipoproteinemia tipo III com fenótipo E2/2 e doença arterial coronária (DAC) prematura<sup>8</sup>. A homozigose para apo E2, presente em até 1% da população, leva à disbetalipoproteinemia primária ou hiperlipoproteinemia tipo III quando associada a outras doenças como diabetes, hipotireoidismo ou dislipidemia genética, com frequência estimada em 0,01 a 0,1% nessa população<sup>2,9</sup>. Além disso, há relatos de aumento da frequência do alelo  $\epsilon 4$  em pacientes com doença arterial periférica (DAP) aterosclerótica e em aneurisma de aorta<sup>10,11</sup>.

Um estudo realizado por autópsia durante um período de 10 anos, em homens entre 30 e 70 anos de idade, mostrou que o alelo  $\epsilon 4$  está associado com DAC somente após a idade de 53 anos, sugerindo que outros fatores, ou a idade avançada, podem ser importantes na formação da aterosclerose<sup>12</sup>. O estudo do polimorfismo genético da apo E em populações humanas tem auxiliado no esclarecimento de seus mecanismos de ação na doença cardiovascular. Entretanto, a população

global carece da identificação e da distribuição dos alelos para apo E e seu efeito, particularmente na DAP.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre polimorfismo genético do apo E e DAP obstrutiva ou aneurismática em pacientes caucasóides do sexo masculino.

### Casuística e método

Foram avaliados, em estudo aleatório, 61 pacientes caucasóides do sexo masculino com sinais e sintomas clínicos de aneurisma e DAP (claudicação) com comprovação angiográfica e por tomografia computadorizada com idade entre 38 e 79 anos (média e desvio padrão =  $62 \pm 8,6$  anos). Os pacientes e o grupo controle foram recrutados nos ambulatórios da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e do Instituto de Moléstia Cardiovascular de São José do Rio Preto, no período de 1 ano (2001 a 2002), e de forma aleatória. Foram excluídos os indivíduos com doença renal, doença hepática ou diabetes melito, excluídos amputados e tratamentos prévios de doenças arterioscleróticas dos grupos de estudo e controle. Entre eles, 39 apresentaram obstrução aterosclerótica nas artérias ilíacas, femorais e/ou carótidas, e 22 tinham aneurisma de aorta torácica, abdominal ou toracoabdominal. Não se valorizou a associação da doença obstrutiva nos pacientes com aneurisma. O grupo controle foi constituído por 59 indivíduos do sexo masculino, sem história clínica da doença ou alterações ao exame clínico, e sua idade variou de 43 a 80 anos (média e desvio padrão =  $59 \pm 9,2$  anos). Os indivíduos foram informados sobre o estudo e confirmaram sua participação pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi submetido e aprovado pelo CEP-FAMERP.

### Polimorfismo da apo E

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico (5 ml) coletados com ácido etilendiaminotetracético (EDTA). A extração foi realizada em três etapas, compreendendo: 1) lise das células sangüíneas e desnaturação com solução de brometo dodeciltrimetilamonio (DTAB); 2) desproteinização com clorofórmio; 3) precipitação do DNA e ressuspensão através de brometo cetilmetrimetilamonio (CTAB)<sup>13</sup>.

Os segmentos polimórficos do gene para apo E foram amplificados pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). Em cada reação, utilizou-se 0,5  $\mu$ l de cada desoxinucleotídeo (0,8 mM); 2,5  $\mu$ l de tampão

PCR 10X; 2,5 µl de dimetilsulfóxido 10%; 2,5 µl de cada *primer* (2,5 mM); 0,2 µl de Taq polimerase (5 U/µl); 11 µl de água Milli Q; e 2 µl de DNA genômico diluído (0,2 µg). Na reação de amplificação, foram utilizados os *primers* P1:5´-ACAGAAT-TCGCCCCGGCCTGGTACAC-3´ e P2:5´-TAAG-CTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3´, complementares às regiões próximas aos códons polimórficos 112 e 158, localizados no exon 4 da apo E<sup>14</sup>. A desnaturação inicial do DNA foi obtida a 94 °C por 5 minutos, e a mistura da reação foi submetida em seguida a 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos e 65 °C por 2 minutos, com ciclo final a 72 °C por 7 minutos. O produto de amplificação do PCR foi submetido à enzima de restrição Hha I (5 U por tubo de reação) em banho-maria a 37 °C, *overnight*, para clivagem das seqüências amplificadas dos alelos ε2, ε3 e ε4 em regiões específicas (GCGC), nas posições 112 e 158, separando fragmentos com 91 pares de base (pb) e 83 pb (ε2), 91 e 48 pb (ε3), e 72 e 48 pb (ε4). É possível, assim, identificar seis genótipos: ε2/ε2, ε2/ε3, ε2/ε4, ε3/ε3, ε3/ε4, ε4/ε4.

Para análise da apo E, foram separados fragmentos de DNA por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% por cerca de 3 horas, sob corrente constante de 200 V, utilizando-se como tampão TEB (ácido bórico 0,89M, TRIS base 0,89M, EDTA de sódio 0,025 M) diluído 10 vezes. Como DNA-controle, foi utilizado pBR 322 (Gibco), digerido pela enzima de restrição MspI, que gera fragmentos de até 110, 90, 76 e 67 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,2 mg/l) por 5 minutos, e os fragmentos de DNA, visibilizados sob iluminação ultravioleta, seguido de fotodocumentação.

### Análise estatística

As freqüências alélicas e genótípicas foram comparadas entre pacientes e controles utilizando-se o teste exato de Fisher. Foi realizado um procedimento semelhante para os pacientes subdivididos de acordo com o tipo de lesão arterial, considerando-se DAP obstrutiva ou aneurismática. A influência dos alelos e genótipos na presença ou ausência da doença foi verificada pelo cálculo dos produtos cruzados (*odds ratio*), com intervalo de confiança (IC) de 95%. Admitiu-se erro α de até 5%, com nível de significância para valor de  $P \leq 0,05$ .

### Resultados

A distribuição de alelos e genótipos referente a 61 pacientes e 59 controles é apresentada na Tabela 1. Nota-se freqüência mais elevada para o alelo ε3 nos pacientes (0,893) e controles (0,814), seguido do alelo ε4 com prevalência reduzida nos pacientes (0,074) em relação aos controles (0,135), embora sem diferença significativa ( $P = 0,2088$ ); o mesmo ocorreu para o alelo ε2. O genótipo ε3/ε3 mostrou-se mais freqüente entre pacientes (78,7%) e controles (69,5%), seguido de ε3/ε4 (14,7 e 22%;  $P = 0,2994$  e 0,3507, respectivamente). Os genótipos com alelo ε2 foram escassos em ambos os grupos.

A Tabela 2 mostra a distribuição dos alelos e genótipos para apo E em pacientes com DAP obstrutiva ou aneurismática. Nota-se semelhança entre os grupos, com freqüência elevada para o alelo ε3 (0,885 e 0,910, respectivamente), seguido dos alelos ε4 e ε2. O genótipo ε3/ε3 foi observado em 81,8% dos pacientes com aneurisma de aorta e em 74,4% na DAP obstrutiva. O genótipo ε3/ε4 foi mais representado nos pacientes com DAP obstrutiva (17,9%) em relação àqueles com aneurisma (9,1%), embora sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P = 0,4674$ ).

Na Tabela 3, são apresentados os valores do *odds ratio* para os genótipos e alelos da apo E, em análise da sua relação com DAP comparado aos controles. Nesse caso, nota-se que todos os ICs de 95% contêm a unidade, que é equivalente à igualdade da *odds* nos grupos. Isso indica ausência da influência do alelo ε2, ε3 ou ε4 e do genótipo ε3/ε3 ou ε3/ε4 para apo E na DAP.

### Discussão

Neste trabalho, o alelo ε4, referido em alguns estudos como fator de risco para DAC e DAP<sup>15,16</sup>, é observado com baixa freqüência, principalmente nos pacientes com DAP (0,074), embora sem diferença significativa em relação aos controles (0,135), cuja freqüência mantém-se reduzida em comparação a populações caucasóides com prevalência variando de 0,140 a 0,227<sup>16</sup>. O alelo ε2 apresenta-se, também, com baixa freqüência em pacientes (0,033) e controles (0,051), cujos valores revelam-se inferiores comparados com a literatura (0,072 a 0,130)<sup>16</sup>. A freqüência reduzida dos alelos ε2 e ε4 determinou a prevalência elevada do alelo ε3 nos pacientes (0,893) e controles (0,814), superior as

relatadas por outros autores na população caucasóide, com variação de 0,720 a 0,786<sup>16</sup>.

Embora constatada a natureza polimórfica do gene para apo E, ainda é polêmica sua associação com

doenças cardiovasculares ateroscleróticas. Em estudo de 77 homens e 27 mulheres com DAC, houve prevalência significativamente aumentada do alelo  $\epsilon 4$  nos homens (0,29) em comparação com as mulheres (0,15),

**Tabela 1** - Distribuição das freqüências alélicas e genótípicas para apolipoproteína E na análise do polimorfismo genético por restrição enzimática com Hha I em pacientes com doença arterial periférica e controles

Alelo	Paciente		Controle		P
	n	Freqüência	n	Freqüência	
$\epsilon 2$	4	0,033	6	0,051	0,5343
$\epsilon 3$	109	0,893	96	0,814	0,099
$\epsilon 4$	9	0,074	16	0,135	0,2088
Total	122	1,000	118	1,000	—
Genótipo	n	%	n	%	
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0	0	1	1,7	0,4917
$\epsilon 2/\epsilon 3$	4	6,6	1	1,7	0,3647
$\epsilon 2/\epsilon 4$	0	0	3	5,1	0,1158
$\epsilon 3/\epsilon 3$	48	78,7	41	69,5	0,2994
$\epsilon 3/\epsilon 4$	9	14,7	13	22	0,3507
$\epsilon 4/\epsilon 4$	0	0	0	0	—
Total	61	100,0	59	100,0	—

(—) = não se aplica

**Tabela 2** - Distribuição das freqüências alélicas e genótípicas para apolipoproteína E na análise do polimorfismo genético por restrição enzimática com Hha I em pacientes com doença arterial periférica (DAP) obstrutiva ou aneurismática

Alelo	DAP obstrutiva		DAP aneurismática		P
	n	Freqüência	n	Freqüência	
$\epsilon 2$	2	0,025	2	0,045	0,6189
$\epsilon 3$	69	0,885	40	0,910	0,7682
$\epsilon 4$	7	0,090	2	0,045	0,4861
Total	78	1,000	44	1,000	—
Genótipo	n	%	n	%	
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0	0	0	0	0
$\epsilon 2/\epsilon 3$	2	7,7	2	9,1	0,6147
$\epsilon 3/\epsilon 3$	30	74,4	18	81,8	0,7533
$\epsilon 3/\epsilon 4$	7	17,9	2	9,1	0,4674
$\epsilon 4/\epsilon 4$	0	0	0	0	0
Total	39	100	22	100	—

(—) = não se aplica

**Tabela 3** – Valor do *oddsratio* para os genótipos e alelos da apolipoproteína E (apo E) em análise de sua relação com a doença arterial periférica

Polimorfismo da apo E	<i>Odds ratio</i> – IC 95%
<b>Alelo</b>	
ε2	0,63 (0,17 – 2,30)
ε3	1,92 (0,92 – 4,02)
ε4	0,28 (0,24 – 1,31)
<b>Genótipo</b>	
ε2/ε2	0,32 (0,01 – 7,95)
ε3/ε3	1,62 (0,71 – 3,70)
ε2/ε4	0,13 (0,01 – 2,60)
ε2/ε3	4,07 (0,44 – 37,56)
ε3/ε4	0,61 (0,24 – 1,56)
ε4/ε4	CI

IC = intervalo de confiança; CI = cálculo impossível.

mas sem diferença significativa nestas<sup>15</sup>. Em contrapartida, em estudo brasileiro feito com 50 mulheres com DAC e média de idade de 48,9 anos, detectou-se frequência significativamente maior do alelo ε4 nas pacientes em relação aos controles (0,23 *versus* 0,11;  $P < 0,05$ ). Nesse caso, houve prevalência significativamente maior do genótipo ε3/ε4 nas pacientes (40%) em comparação aos controles (14%)<sup>17</sup>.

Ainda há relatos que confirmam a associação entre o alelo ε4 e as concentrações levemente mais elevadas de colesterol total em populações (227,3 mg/dl), quando comparado com a ausência desse alelo (206 mg/dl). Nesse caso, evidenciou-se risco significativamente elevado para DAC em indivíduos fumantes e portadores do alelo ε4<sup>18</sup>. Estudos mostram também associação entre ε4 e aumento no nível de LDLc em DAC prematura, embora sem relação entre a doença e o polimorfismo da apo E<sup>19</sup>.

Por outro lado, em estudo de acidente vascular isquêmico, não foi detectada relação entre o polimorfismo da apo E e a doença em população acima de 75 anos, com frequências de 24% para o genótipo ε3/ε4 nos pacientes em relação a 25% nos controles<sup>12</sup>. Em relação à DAP, é obscura sua associação com o polimorfismo da apo E, tornando o assunto polêmico. O estudo realizado com 3.161 americanos descendentes de japoneses com idade entre 71 e 93 anos não evidenciou associação entre pacientes com DAP e diabetes, ou fumantes e polimorfismo da apo E<sup>12</sup>. O presente estudo, embora com casuística mais jovem (38 a 79 anos; média = 62 ± 8,6 anos), não

mostrou associação entre a presença do alelo ε4 e a doença, independentemente do tipo de lesão arterial obstrutiva aterosclerótica ou aneurismática.

Por outro lado, estudos experimentais feitos com animais deficientes para apo E confirmam sua associação com lesões estenóticas nas artérias aorta, carótida, femoral e poplítea<sup>20</sup>. O estudo da apo E em 260 indivíduos clinicamente sadios detectou frequência reduzida do alelo ε4 (0,100) em relação ao alelo ε3 (0,827). No entanto, exames complementares mostraram incidência de lesões obstrutivas de carótida significativamente maior nos indivíduos portadores do alelo ε4 em relação àqueles com alelo ε3 ( $P = 0,029$ )<sup>11</sup>. Além disso, a presença de ε4 mostrou-se associada à aterosclerose em indivíduos não-diabéticos, com maior espessura da camada íntima da carótida se comparada aos indivíduos com genótipo ε2/ε3 ou ε3/ε3<sup>21</sup>. Todavia, o estudo entre 57 pacientes com aneurisma de aorta abdominal, seguido por 2 a 4,5 anos, não demonstrou associação entre o alelo ε4 e o aumento da lesão<sup>22</sup>.

No entanto, em estudo anatomopatológico envolvendo 700 indivíduos do sexo masculino com idade entre 33 e 70 anos (média = 53 anos), relacionou-se a frequência do genótipo ε3/ε4 ao aumento da área da lesão aterosclerótica, em indivíduos com doença coronariana e com doença da aorta torácica e abdominal, quando comparado ao genótipo ε3/ε3<sup>12</sup>. Nesse caso, pacientes mais jovens (abaixo de 53 anos) apresentaram valor de significância de  $P = 0,0085$ , enquanto os mais idosos, valor de  $P = 0,041$ . Para a aorta torácica, foi encontrada significância equivalente a  $P = 0,014$ , enquanto, para a aorta abdominal, o valor não foi significativo ( $P = 0,12$ ), sem influência da idade. Nesse contexto, no presente estudo os pacientes tinham comprometimento principalmente da artéria femoral (DAP obstrutiva) ou aorta abdominal (DAP aneurismática), ambos os tipos de lesão sem associação com apo E, mesmo com a idade variando de 38 a 79 anos. Entretanto, o tamanho da amostra e as características raciais com padrões obstrutivo e aneurismático da arteriosclerose poderiam ter influenciado esse resultado.

Em conclusão, este estudo sobre a DAP, independentemente do tipo de lesão, mostra-se indiferente ao polimorfismo apo E-Hha I. Entretanto, é possível que o polimorfismo da apo E esteja relacionado a lesões em determinados tipos de artérias periféricas, influenciado principalmente por idade, sexo e localização anatômica da lesão, tornando-se necessário o estudo de subgrupos de pacientes com casuísticas amplas.

## Referências

1. Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 1973;12:502-50.
2. Zannis VI. Molecular biology of human apolipoprotein B and E and associated diseases of lipoprotein metabolism. *Adv Lip Res* 1989;23:2-64.
3. Strittmatter WJ. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Am Acad Neur* 1994;4:444-5.
4. Mazzone T. Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:303-7.
5. Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature* 1977;269:604-7.
6. Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* 1981;33:11-24.
7. Utermann G, Steinmetz A, Weber W. Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet* 1982;60:344-51.
8. Utermann G, Jaeschke M, Menzel J. Familial hyperlipoproteinemia type III. Deficiency of a specific apolipoprotein (apo EIII) in the very low density lipoproteins. *FEBS Lett* 1975;56:352-5.
9. Dominiczak MH. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma. In: Rifai N, Warnick GH, Dominiczak MH, editors. *Handbook of Lipoprotein Testing*. Washington (DC): AACC Press; 1997. p. 598.
10. Resnick HE, Rodriguez B, Havilik R, Ferruci L, Foley D, Curb JD, Harris TB. ApoE genotype, diabetes, and peripheral arterial disease in older men: the Honolulu Asia – aging study. *Genet Epidemiol* 2000;19:52-63.
11. Cattin L, Fiscaro M, Tonizzo M, et al. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arterioscler Thromb Basc Biol* 1997;17:91-4.
12. Ilveskoski E, Perola M, Lehtimäki T, et al. Age-dependent association of apolipoprotein E genotype with coronary and aortic atherosclerosis in middle-age men. *Circulation* 1999; 10:608-13.
13. Gustincich S, Manfioletti G, Del San G, Schiuder C. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques* 1991;11:298-301.
14. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J Lipid Res* 1990;31:545-8.
15. Scuteri A, Bos AJG, Zonderman AB, Brant LJ, Lakatta EG, Fleg JL. Is the apo ε4 allele an independent predictor of coronary events? *Am J Med* 2001;10:28-32.
16. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1-21.
17. Salazar LA, Hirata MH, Giannini SD, et al. Seven DNA polymorphism at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2000;300:139-49.
18. Humpries SE, Talmud PJ, Hawe E, Bolla M, Day INM, Miller GJ. Apolipoprotein ε4 and coronary heart disease in middle aged men who smoke: a prospective study. *Lancet* 2001;358:115-19.
19. Petrovic D, Zorc M, Peterlin B. Effect of apolipoprotein E polymorphism and apolipoprotein A-1 gene promoter polymorphism on lipid parameters and premature coronary artery disease. *Folia Biol* 2000;46:181-5.
20. Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, et al. Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3593-601.
21. Vauhkonen I, Niskanen L, Ryyanen M, et al. Divergent association of apolipoprotein E polymorphism with vascular disease in patients with NIDDM and control subjects. *Diabet Med* 1997;14:748-56.
22. Gerdes LU, Lindholt JS, Vammen S, Henneberg EW, Fasting H. Apolipoprotein E genotype is associated with differential expansion rates of small abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2000;87:760-5.

## Correspondência:

Antonio Carlos Brandão

Rua Garabed Karabashian, 411

CEP 15070-600 – São José do Rio Preto, SP

E-mail: godoyjmp@riopreto.com.br