

Estudo do polimorfismo TaqIB do gene CETP em indivíduos dislipidêmicos

CRISTIANA ALVES MARTINS¹
CARLA D'ÁVILA DE ASSUMPTÃO²
FERNANDA GOULART LANNES CHULA³
SABRINA ESTEVES DE MATOS ALMEIDA⁴
MARILU FIEGENBAUM⁵
MARIA LUCIA ROSSETTI⁶
CLÁUDIA MARIA DORNELLES DA SILVA⁷

RESUMO

Dislipidemia é uma doença multifatorial causada pela interação entre fatores genéticos e ambientais. A proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP) participa de uma importante etapa da regulação do metabolismo de lipídios, e o polimorfismo TaqIB do gene CETP tem sido associado a concentrações elevadas de HDL. O presente estudo teve como objetivo investigar a interação entre o polimorfismo TaqIB no gene CETP e as concentrações de lipídios em uma população de 119 pacientes dislipidêmicos do Sul do Brasil. O polimorfismo TaqIB foi determinado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a enzima de restrição TaqI. Nenhuma relação entre os genótipos de CETP e parâmetros lipídicos foi observado. Esses achados demonstram que a contribuição genética da dislipidemia é extremamente complexa.

Palavras-chave: dislipidemia, polimorfismo, gene CETP, TaqIB, Brasil.

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Aluno de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Especialista em Diagnóstico Genético Molecular

³ Pesquisadora do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado

⁴ Professor do Curso de Biomedicina/FEEVALE

⁵ Professor do Curso de Farmácia/UFCSPA

⁶ Professor do Curso de Farmácia/ULBRA

⁷ Professor – Orientador do Curso de Biologia/ULBRA (cmdornelles@gmail.com)

ABSTRACT

Dyslipidemia is a multifactorial disorder caused by an interaction between genetic and environmental factors. Cholesterol ester transfer protein (CETP) plays an important role in the regulation of lipid metabolism, and the TaqIB polymorphism of the CETP gene has been associated with elevated HDL concentrations. This study was aimed to investigate the interaction between TaqIB polymorphism in the CETP gene and plasma lipids in 119 dyslipidemic patients from Southern Brazilian population. TaqIB polymorphisms were determined using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and the restriction enzyme TaqI. No relationship between CETP genotypes and lipids parameters was observed. The findings demonstrate that the genetic contribution to dyslipidemia is extremely complex.

Keywords: *Dyslipidemia, polymorphism, CETP gene, TaqIB, Brazil.*

INTRODUÇÃO

As alterações metabólicas nos níveis séricos de lipídios circulantes do sangue são conhecidas como dislipidemias e estão relacionadas com a aterosclerose. Depósitos de lipídios desencadeiam processos bioquímicos que formam placas ateroscleróticas no interior dos vasos arteriais, podendo obstruir, parcial ou totalmente, um ou mais vasos (YAMADA et al., 2007).

A variação dos níveis lipídicos é uma característica de etiologia multifatorial, determinada por uma ampla gama de fatores ambientais e genéticos (somatório de pequenos efeitos de vários genes). Variações em um grande número de genes envolvidos na síntese de proteínas estruturais e enzimas relacionadas ao metabolismo de lipídios podem responder por variações do perfil lipídico de cada indivíduo, associadas às dislipidemias (ORDOVAS, 2006).

Assim sendo, qualquer gene que seja responsável pela produção de uma proteína envolvida na rota metabólica de lipídios pode ser um “gene candidato” para a investigação de determinantes genéticos dos níveis lipídicos. O somatório das variações genéticas com pequeno efeito em cada um destes genes pode levar à modificação do perfil

lipídico de um indivíduo, predispondo à cardiopatia. Como estas variantes genéticas são bastante freqüentes na população em geral (entre 1,0% a 80,0%), seu impacto é muito maior na saúde pública, quando comparadas com mutações de grande efeito, mas que são muito mais raras. As variações genéticas, quando freqüentemente encontradas na população estudada, são chamadas de polimorfismos (ANDRADE; HUTZ, 2002).

A ocorrência de doenças cardiovasculares (DCV) varia amplamente no mundo. De modo geral, a maior freqüência é encontrada em países ocidentais ou com estilo de vida ocidental. No Brasil, as DCV são a primeira causa de morte por doença não-transmissível, sendo que o Rio Grande do Sul apresenta o maior índice em relação aos demais estados do país (ATLAS SÓCIO-ECONÔMICO RGS, 2006).

O gene CETP, codificador da Proteína Transferidora de Ésteres de colesterol, tem um papel central no metabolismo do HDL por participar do mecanismo de transporte reverso de colesterol. Dos vários polimorfismos estudados no gene CETP humano, o que está associado à criação de um sítio de restrição pela enzima *TaqI*, tem recebido atenção, sendo chamado de polimorfismo *TaqIB*. Vários estudos têm reportado

que o polimorfismo *TaqIB*, alelo B1, está associado com níveis diminuídos de HDL e risco de DCV (KLERKX et al., 2004; BOEKHOLDT et al., 2005; SVIRIDOV & NESTEL, 2007). Ainda, tem sido demonstrado que indivíduos com o genótipo B2B2 apresentaram colesterol HDL mais elevado que os indivíduos com o genótipo B1B1. Indivíduos com o genótipo B1B1 apresentam, portanto, um risco maior de desenvolver DCV (BOEKHOLDT et al., 2005).

Novos estudos sobre o polimorfismo *TaqIB* do gene da CETP com relação aos níveis lipídicos são justificados pela necessidade de conhecimento de suas interações nas diversas populações, inclusive no grupo proposto por este trabalho, já que existem poucos estudos com este polimorfismo no Brasil. No presente estudo foram comparados apenas os dados genotípicos do grupo de pacientes com níveis lipídicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

População do Estudo

Pacientes que buscaram atendimento no Ambulatório de Dislipidemia, sendo composta por 119 indivíduos dislipidêmicos. Todos os pacientes preencheram os critérios de elegibilidade e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação do estudo. Dados clínicos, bioquímicos e antropométricos dos pacientes foram obtidos. Foram retirados 10 mL de sangue em condições estéreis para as análises moleculares e bioquímicas.

Dosagens Bioquímicas

Os níveis de colesterol total, HDL-colesterol, LDL, VLDL e triglicerídios foram dosados no

plasma por métodos enzimáticos em indivíduos com 12 horas em jejum. Colesterol Total (CT) foi definido como normal (<200 mg/dL), moderado (200-239 mg/dL) e alto (\geq 240 mg/dL). Para o colesterol LDL (LDL-C), as seguintes variações foram consideradas: normal (<130 mg/dL), moderada (130-159 mg/dL) e alta (\geq 160 mg/dL). Para o colesterol HDL (HDL-C), as seguintes variações foram consideradas: alta (>60 mg/dL) e baixa (<40 mg/dL). Para os triglicerídeos (TG): normal (<150 mg/dL), moderado (150 to 200 mg/dL) e alto (>200 mg/dL). Indivíduos que apresentaram pelo menos uma desses níveis altos foram considerados dislipidêmicos. O colesterol LDL foi calculado de acordo com Friedewald (1972).

Extração de DNA

Os DNAs foram extraídos a partir de sangue total através da técnica descrita por Lahiri e Nurnberger (1991).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As condições de amplificação do gene CETP seguiram instruções segundo Carlquist et al. (2003).

Detecção dos Fragmentos de DNA Amplificados

Os fragmentos de DNA amplificados, com 535 pb, foram visualizados em luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose e o tamanho dos fragmentos avaliado com um marcador de peso molecular.

Genotipagem por PCR-RFLP

Os DNAs amplificados foram genotipados utilizando a enzima de restrição TaqI, segundo Carlquist et al. (2003).

Análises Estatísticas

Teste de qui-quadrado ou exato de Fisher foi utilizado para comparar as variáveis categóricas com a presença ou não do desfecho (polimorfismo *TaqIB*). Teste *t*-Student ou não-paramétrico correspondente foi utilizado para comparar as variáveis contínuas com a presença ou não do desfecho, com intervalo de confiança de 95% e $p < 0,05$. As frequências alélicas foram determinadas pela contagem direta dos alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado por meio do teste de qui-quadrado.

RESULTADOS

Dos 119 pacientes com dislipidemia, 54 eram homens e 65 mulheres. A média de idade foi de 61,8 ($\pm 11,2$) anos, sem diferenças estatísticas entre homens e mulheres. Nenhuma diferença foi observada entre homens e mulheres com relação aos níveis de CT, LDL-C, HDL-C e TG. A distribuição dos genótipos do polimorfismo *TaqIB* não mostrou significância estatística comparadas com aquelas esperadas sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e nenhuma significância foi observada nas frequências alélicas entre os sexos ($p=0,794$). As frequências encontradas do alelo *TaqIB* B2 do gene CETP em homens e mulheres foram 43% e 45,2%, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta as médias ajustadas dos níveis de lipídios de acordo com o polimorfismo *TaqIB*. Nenhuma associação significativa entre os genótipos e os níveis de lipídios foi observada.

Tabela 1 - Associação dos genótipos do polimorfismo *TaqIB* com variáveis lipídicas.

	n	TC	n	HDL-C	N	LDL-C	n	TG
CETP <i>TaqIB</i>								
B1B1	30	240,6 \pm 52,5	3	47,9 \pm 8,3	29	152,9 \pm 46,6	30	5,2 \pm 0,5
B1B2	50	231,1 \pm 50,1	50	46,2 \pm 10,0	42	143,7 \pm 51,2	50	5,35 \pm 0,6
B2B2	16	244,1 \pm 43,8	16	52,7 \pm 10,7	12	150,8 \pm 38,7	16	5,41 \pm 0,7
P		0,565		0,074		0,595		0,477

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado a influência do polimorfismo *TaqIB* presente no gene CETP em uma amostra de pacientes dislipidêmicos do Rio Grande do Sul. Os genótipos obtidos foram analisados quanto as suas possíveis influências sobre os níveis lipídicos.

Trabalhos com o gene CETP tem mostrado associações importantes com níveis lipídicos,

entretanto no presente estudo essas associações não foram encontradas (KLERKX et al., 2004; BOEKHOLDT et al., 2005; SVIRIDOV; NESTEL, 2007). Infere-se que esse resultado possa estar relacionado ao pequeno número amostral, sendo necessário, portanto, que futuros estudos sejam realizados com um número amostral maior, além da inclusão de um grupo controle.

Finalmente, os dados apresentados sugerem que ainda existem vários obstáculos a serem superados

que incluem a real compreensão da dinâmica do genoma humano em relação às doenças de origem multifatorial.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, F.; HUTZ, M. The Genetic Component of Serum Lipid Determination. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 7, p. 175-182, 2002.

BOEKHOLDT, S. M. et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation*, v. 111, p. 278-287, 2005.

CARLQUIST, J. F. et al. The cholesteryl ester transfer protein *TaqIB* gene polymorphis predicts clinical benefit of statin therapy in patients with significant coronary artery disease. *American Heart*, v. 146, p. 1007-1014, 2003.

FRIEDEWALD, N. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, v. 18, p. 499-502, 1972.

KLERKX, A. H. E. M. et al. Cholesteryl ester transfer protein concentrations is associated with progression of atherosclerosis and response to pravastatin in men with coronary artery disease (REGRESS). *European Journal of Clinical Investigation*, v. 34, p. 21-28, 2004.

LAHIRI, D.; NURNBERGER, J. A. Rapid Non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, v. 19, p. 5444, 1991.

ORDOVAS, J. M. Nutrigenetics, plasma lipids, and cardiovascular risk. *Journal of American Diet Association*, v. 106, p. 1074-1081, 2006.

RIO GRANDE DO SUL. Governo do Estado. Atlas Sócio-econômico do Rio Grande do Sul: indicadores sociais: mortalidade por causas. Disponível em: < <http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=315> > Acesso em: 18. jun. 2010.

SVIRIDOV, D.; NESTEL, P. J. Genetics factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Current Opinion in Lipid*, v. 18, p. 157-163, 2007.

YAMADA, Y. et al. Prediction of genetic risk dyslipidemia. *Genomics*, v. 90, p. 551-558, 2007.