

Miguel Ângelo De Marchi

Caracterização Clínica, Perfil Lipídico e Polimorfismos
Genéticos em Pacientes com Xantelasma Palpebral

São José do Rio Preto

2014

Miguel Ângelo De Marchi

Caracterização Clínica, Perfil Lipídico e Polimorfismos
Genéticos em Pacientes com Xantelasma Palpebral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto como requisito para obtenção do título de Doutor. Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

São José do Rio Preto

2014

Ficha Catalográfica

De Marchi, Miguel Ângelo

Caracterização clínica, perfil lipídico e polimorfismos genéticos em
pacientes com xantelasma palpebral /

Miguel Ângelo De Marchi

São José do Rio Preto, 2014,
75 p.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

1. Xantelasma; 2. Clínica; 3. Genética; 4. Dislipidemia

Miguel Ângelo De Marchi

Caracterização Clínica, Perfil Lipídico e Polimorfismos
Genéticos em Pacientes com Xantelasma Palpebral

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

2º Examinador: Prof. Dr. Maurício Mota de Avelar Alchorne

3º Examinador: Prof. Dr. João Roberto Antonio

4º Examinador: Prof. Dr. Joel Carlos Lastoria

5º Examinador: Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy

Suplentes: Profa. Dra. Alice de Oliveira de Avelar Alchorne

Profa. Dra. Rosa Maria Cordeiro Soubhia

São José do Rio Preto, 12/11/2014.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas e Quadros.....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	x
Resumo	xii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações Gerais.....	1
1.2 Polimorfismos Genéticos e Metabolismo de Lipídios.....	3
1.3 Objetivo.....	15
2. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	16
2.1 Casuística.....	16
2.2 Método.....	16
2.3 Análise Estatística.....	31
3. RESULTADOS.....	32
3.1 Dados Demográficos.....	32
3.2 Características Clínicas.....	33
3.3 Perfil Lipídico.....	40
3.4 Frequências Alélicas e Genotípicas e Perfil Lipídico.....	41
3.5 Associação entre Perfil Lipídico e Polimorfismos.....	46

4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
APÊNDICES.....	69
ANEXOS.....	75

A minha mãe Eneida (*in memorian*), mestra e mãe que diante de sua sabedoria, desprendimento e dedicação, iniciou, desencadeou e sempre incentivou a evolução cultural e educacional de seus filhos.

Ao meu pai Alcidino, minha irmã Rosangela e cunhado Luciano, companheiros em todas etapas para concretização deste estudo.

Aos queridos Carlos Henrique e Nely, irmão e cunhada, exemplos de determinação e inteligência, que carinhosamente e espiritualmente foram grandes incentivadores da conclusão deste estudo.

Ao querido tio Joel, brilhante oftalmologista, doutor e pós-doutor, modelo e exemplo maior de cientista, pesquisador e professor, para seus familiares, residentes e alunos de pós-graduação.

À Luzia e Angelo (*in memorian*), Enedina (*in memorian*), José Eurides, Josué, Joel, Eloy, Enide e respectivas famílias, Maria e Miguel (*in memorian*), José Alberto, Maria Alzira e família, sustentáculos da união e amor familiar, célula mãe, centro de princípios e valores humanos, religiosos e espirituais.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, pela amizade, estímulo e pelas importantes discussões sobre dislipidemia e doenças da pele, por sua disponibilidade e dedicação total a seus orientandos.

Aos Profs. Drs. Maurício Mota de Avelar Alchorne, João Roberto Antonio, Joel Carlos Lastoria e Moacir Fernandes de Godoy, membros da banca examinadora, pelas sugestões, críticas e correções.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), especialmente ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, por toda a dedicação e esforço para elevar o nível desta pós-graduação.

Aos Profs. Drs. Moacir Fernandes de Godoy e José Antonio Cordeiro da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e Helymar Costa Machado da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela análise estatística.

Aos Profs. Drs. José Ernesto dos Santos da Universidade de São Paulo (USP-Ribeirão Preto) e Mário Hirata da USP - São Paulo, pelo auxílio na metodologia do perfil lipídico e polimorfismo genético.

Ao Prof. Dr. Renato Braz de Araujo, amigo e extraordinário educador, com intensa técnica pedagógica e motivacional para capacitar a compreensão e execução das etapas do estudo científico e sua relevância na aplicação à ciência e comunidade.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da FAMERP, pelo auxílio no desenvolvimento de técnicas em biologia molecular, especialmente Marcelo Nakazone, Marcela Pinhel, Carolina Barros, Maysa Júlio, Anielli Pinheiro, Simone Arazi, sempre disponíveis e imprescindíveis nas tarefas e conclusão deste estudo.

Aos funcionários da Pós-Graduação da FAMERP, Fabiana Cristina Godoy, Rosemeire Cleide Souza Desidério e José Antonio Silistino, pela colaboração e paciência durante todo o transcorrer do doutorado.

Aos funcionários da Biblioteca da FAMERP, em especial Zélia Cristina Régis Brazolin, pela colaboração no levantamento de dados e revisão bibliográfica.

Ao oftalmologista Dr. Fred Martinelli e cardiologista Dr. Marcelo Cunha, pela triagem e encaminhamento dos pacientes, ações relevantes e fundamentais para realização deste estudo.

Aos funcionários, técnicos e biomédicos Sueli Tempesta e Moisés Jeronino do Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Misericórdia de Tupã, que gentilmente abriram as portas deste laboratório para coleta e execução do perfil lipídico e, coleta, condicionamento e transporte de material para polimorfismos genéticos.

À secretária Cristina e auxiliares técnicas Iracélis e Luísa pela tolerância, colaboração e compreensão sobre a dedicação a esta pesquisa em relação às atividades profissionais.

Aos pacientes e familiares que compreenderam a importância, colaboraram e participaram deste estudo.

A Deus e sua dinâmica de ação, possibilitando uma sintonia individual e singular de sua presença no universo.

“Todas ações humanas estejam em harmonia com a ação única de Deus que tem por objetivo uma comunidade universal de perfeito amor”.

William A. Barry, SJ

“Para fazer ciência, duas coisas são necessárias: olho e cérebro. Ciência não é algo que se faz em laboratórios sem o resultado deste fazer. É um jeito de ver as coisas, que nasce dos objetos deste fazer. É um jeito de ver as coisas que nasce do cotidiano, na casa, na rua, na oficina. Os olhos produzem o jeito científico de ver as coisas quando estão a serviço da inteligência”.

Rubens Alves

“Nós geralmente descobrimos o que fazer percebendo aquilo que não devemos fazer. E provavelmente aquele que nunca cometeu um erro, nunca fez uma descoberta”.

Samuel Smiles

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema apresentando perfil de bandas eletroforéticas em gel de poliacrilamida para o polimorfismo apolipoproteína E-Hha I, mostrando os genótipos correspondentes a fragmentos de DNA em pares de base (pb), sob restrição enzimática com Hha I..... 25
- Figura 2 - Fotografia de gel de poliacrilamida submetido à eletroforese para análise do polimorfismo apolipoproteína B-Ins/Del. Notam-se genótipos II nas colunas 1, 3, 8, 9, 14, 15 e 16; DD nas colunas 4, 5, 7, 18, 19 e 20 e ID nas colunas 2, 6, 10, 12, 13 e 17. Coluna 11 apresenta amostra de DNA padrão (10 pb). pb = pares de base.. 26
- Figura 3 - Fotografia de gel de poliacrilamida submetido à eletroforese para análise do polimorfismo de receptor LDL-Ava II. Notam-se genótipos A+A+ nas colunas 1 e 16; A+A- nas colunas 3, 12, 13, 14, 15, 18 e 20 e A-A- nas colunas 4, 8, 11, 17 e 19. Coluna 10 apresenta uma amostra de ladder 100 pares de base (pb)..... 27
- Figura 4 - Fotografia de gel de poliacrilamida submetido à eletroforese para análise do polimorfismo receptor LDL-Hinc II. Notam-se genótipos H+H+ nas colunas 2, 3, 9, 18 e 19; H+H- nas colunas 1, 4, 6, 7, 10, 13, 14, 16 e 17 e H-H- nas colunas 5 e 15. Coluna 11 apresenta amostra de ladder 100 pares de base (bp)..... 28
- Figura 5 - Fotografia de gel de agarose submetido à eletroforese para análise de polimorfismo apolipoproteína B-Xba I. Notam-se genótipos X+X+ nas colunas 2 e 7; X+X- nas colunas 1, 3, 6, 9, 11, 12, 14 e 16; X-X- nas colunas 4, 8, 10 e 15. Colunas 5 e 13 apresentam amostra de ladder 100 pares de base (bp)..... 30

- Figura 6 - Fotografia mostrando paciente (32 anos, sexo feminino) portador de xantelasma palpebral do tipo papulosa (< 1 cm) de coloração amarelo claro, à direita, localização superior e inferior, e extensão palpebral proximal-médio-distal superior e proximal-médio inferior..... 36
- Figura 7 - Fotografia mostrando paciente (67 anos, sexo feminino) portador de xantelasma palpebral do tipo papulosa (> 1 cm) e placa (< 1 cm) de coloração amarelo claro, à direita, localização superior e inferior, e extensão palpebral proximal superior e inferior..... 37
- Figura 8 - Fotografia mostrando paciente (62 anos, sexo feminino) portador de xantelasma palpebral do tipo placa linear (> 1 cm) de coloração amarelo escuro, à direita, localização superior e inferior, e extensão palpebral proximal superior e médio inferior..... 38
- Figura 9 - Fotografia mostrando paciente (62 anos, sexo feminino) portador de xantelasma palpebral do tipo placa linear (> 1 cm) bilateral superior, localização bilateral superior e inferior, e extensão palpebral proximal superior e médio inferior em ambas as pálpebras..... 39

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1- Valores de referência dos lípides plasmáticos para indivíduos acima de 20 anos.....	18
Tabela 1 - Dados demográficos de pacientes com xantelasma palpebral (G1) e controles (G2).....	32
Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com xantelasma palpebral conforme faixa etária e sexo.	33
Tabela 3 - Distribuição percentual de variáveis clínicas de pacientes com xantelasma palpebral (n = 100).....	34
Tabela 4- Distribuição dos pacientes com xantelasma palpebral conforme faixa etária e média do tempo de aparecimento (meses) referido pelos pacientes.....	35
Tabela 5 - Distribuição das medianas e valores mínimos e máximos para perfil lipídico em pacientes com xantelasma palpebral (G1) e controles (G2).....	40
Tabela 6 - Distribuição de pacientes com xantelasma palpebral e controles considerando sua frequência para valores lipídicos desejáveis e alterados.....	41
Tabela 7 - Dados genotípicos de indivíduos com xantelasma palpebral e controles.....	45

Tabela 8 - Resultados da associação entre perfil lipídico e polimorfismos de apo E, apo B e RLDL em pacientes com xantelasma palpebral.....	47
Tabela 9 - Resultados da associação entre perfil lipídico e polimorfismos de apo E, apo B e RLDL em pacientes sem xantelasma palpebral (grupo controle).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Apo A	apolipoproteína A
Apo B	apolipoproteína B
Apo E	apolipoproteína E
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronariana
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
DTAB	brometo dodeciltrimetalomônio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	<i>expectation-maximization</i>
et al	e outros
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FDB	deficiência familiar de apo B-100
HDL	lipoproteína de densidade alta
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
LDL	lipoproteína de densidade baixa
Lp(a)	lipoproteína a
LRP	proteína de ligação ao receptor LDL
Max	valor máximo
mg	miligramas
mg/L	miligramas por litro
mg/dL	miligramas por decilitro

Min	valor mínimo
mL	mililitros
N	número de indivíduos
p	probabilidade de significância
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pb	pares de base
SP	São Paulo
TBE	tri-ácido clorídrico, ácido bórico, EDTA
TG	triglicérides
UV	ultravioleta
V	Volts
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa
XP	xantelasma palpebral
°C	graus Celsius
%	porcentagem
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
=	igual

RESUMO

Introdução: Xantelasma palpebral (XP) é o tipo mais comum de xantoma caracterizado por placas amareladas em região superior, inferior ou bilateral de pálpebras, de diferentes formas e tamanhos, assintomáticas e revela depósito de derivados do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDLc).

Objetivo: Caracterizar pacientes com XP considerando aspectos clínicos e demográficos, perfil lipídico e polimorfismos genéticos de apolipoproteína E (apo E), apolipoproteína B (apo B) e receptor de LDL (RLDL). **Casuística e**

Método: Foram estudados 200 indivíduos caucasoides, não aparentados, distribuídos em dois grupos pareados em relação a sexo e idade: G1- 100 pacientes com XP e G2- 100 indivíduos sem XP. Todos os indivíduos foram avaliados clinicamente considerando-se sexo, idade, sinais e sintomas, localização, lateralidade, coloração, tempo de aparecimento e evolução do XP. Foi realizada coleta de sangue periférico para análise dos polimorfismos genéticos de apo E-*Hha* I, apo B-*Xba* I e receptor de LDL RLDL-*Ava* II e RLDL-*Hinc* II e do perfil lipídico (colesterol total - CT, e frações de colesterol de lipoproteína de densidade baixa - LDL, lipoproteína de densidade alta - HDL, lipoproteína de densidade muito baixa - VLDL e de triglicérides - TG).

Resultados: Houve predomínio do sexo feminino em ambos os grupos. XP foi mais frequente em pacientes com 50 a 59 anos tanto no sexo masculino (29,7%) como no feminino (30,2%). Houve predomínio do tipo placa (> 1 cm) (57%), coloração amarelo claro (90%), acometimento de ambos os lados

(67%), localização bilateral superior (60%) e da extensão palpebral proximal superior (76%). O tempo médio de aparecimento do XP foi $54,7 \pm 35,9$ meses. O perfil lipídico apresentou valores desejáveis, exceto para VLDLc e TG nos controles (32mg/dL e 160mg/dL, respectivamente), sendo significativamente elevados comparado a pacientes (30mg/dL, $P=0,0086$ e 148mg/dL, $P=0,0082$; respectivamente). Quanto a apo E-*Hha* I, o alelo $\epsilon 3$ prevaleceu em pacientes e controles (0,84 e 0,82; respectivamente), o mesmo ocorreu para o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ (68% - pacientes e 71% - controles). A análise do perfil lipídico em associação com o polimorfismo apo E-*Hha* I mostrou aumento significativo de níveis séricos de VLDLc e TG em portadores do genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ (mediana= 31; 155mg/dL; respectivamente). Pacientes com genótipo X+X- apresentaram níveis aumentados de LDLc (mediana = 124mg/dL) e reduzidos de VLDLc (mediana = 28 mg/dL) e TG (mediana = 140mg/dL). **Conclusões:** XP destaca-se no sexo feminino e sexta década de vida, sendo o tipo placa, coloração amarelo claro, acometimento bilateral, localização bilateral superior e extensão palpebral proximal superior o mais frequente. O tempo médio de aparecimento DE XP foi aproximadamente 5 anos, sendo assintomático para maioria dos pacientes. Aproximadamente metade dos pacientes com XP apresentou alteração nos níveis de CT, VLDL-c e TG. A distribuição de polimorfismos de apo E, apo B, RLDL e os níveis de CT, HDL-c e VLDL-c foi semelhante em ambos os grupos. Polimorfismos apo E, apo B e RLDL não estão associados ao perfil lipídico.

ABSTRACT

Introduction: Eyelid xanthelasma (EX) is the most common type of xanthoma characterized by yellowish plaques in upper, lower or bilateral eyelid, of different shapes and sizes, asymptomatic and reveals deposit of cholesterol derivatives of low-density lipoprotein (LDLc). **Objective:** To characterize patients with EX considering clinical and demographic aspects, lipid profile and genetic polymorphisms of apolipoprotein E (apo E), apolipoprotein B (apo B), and LDL receptor (RLDL). **Patients and Methods:** 200 Caucasian subjects were studied, unrelated, divided into two groups matched by sex and age: G1 - 100 patients with EX and G2 - 100 individuals without EX. All subjects were clinically evaluated considering gender, age, signs, symptoms, location, laterality, color, time of appearance and evolution. A peripheral blood sample for analysis of genetic polymorphism of apo E-*Hha* I, apo B-*Xba* I and LDL receptor RLDL-*Ava* II, and lipid profile (total cholesterol - TC, and cholesterol fractions of low density lipoprotein - LDL, high density lipoprotein - HDL, very low density lipoprotein - VLDL and triglycerides - TG) was taken. **Results:** There was predominance of females in both groups. XP was more frequent in patients 50 to 59 years both in males (29.7%) as in females (30.2%). As the clinical predominance of type plate (>1 cm) (57%), light yellow color (90%), involvement of both sides (67%), bilateral upper location (60%) and eyelid extension upper proximal (76%). Mean time of appearance of XP was 54.7 ± 35.9 months. Lipid profile showed desirable values for all variables except for serum TG and VLDL-C in controls (32mg/dL and 160mg/dL respectively), being significantly higher compared to patients (30mg/dL, $P = 0.0086$ and 148mg/dL, $P = 0.0082$, respectively). As the allelic

and genotypic frequencies for apo E *Hha* I, the $\epsilon 3$ allele prevailed in patients (0.84) and controls (0.82). The same occurred with $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype (68% patients and 71% controls). The lipid profile in association with the apo E polymorphism- *Hha* I showed a significant increase in the serum levels of TG and VLDL-C in patients with $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotype (median = 31; 155mg/dL; respectively). Patients with genotype X+X had increased levels of LDLc (median = 124mg/dL) and reduced levels of VLDL-c (median = 28 mg/dL) and TG (median = 140mg/dl). **Conclusions:** EX was predominant in female and sixth decade of life, being plate type, yellow color course, bilateral involvement, bilateral upper and location proximal upper eyelid extension the most frequent. The average time of onset of EX was approximately 5 years, with asymptomatic for most of them. Serum levels of TC, VLDL-cholesterol and triglycerides showed abnormalities in approximately half of patients with EX. The distribution of polymorphisms of apo E, apo B and RLDL and levels of TC, HDL-cholesterol and VLDL-cholesterol was similar in subjects with EX and controls. Polymorphisms apo E, apo B and RLDL are not associated with lipid profile.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Xantomas são lesões caracterizadas pelo acúmulo de derivados do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDLc) na pele ou nos tendões.^(1,2) Xantelasma palpebral (XP) é o tipo mais comum de xantoma,⁽³⁾ sendo caracterizado por placas amareladas, em região superior, inferior ou bilateral de pálpebras, de diferentes formas e tamanhos, e assintomática.⁽⁴⁾ Esse depósito de lipídios ocorre em macrófagos denominados células espumosas ou xantomatosas. Quando o depósito lipídico é recente, há numerosos vacúolos intracitoplasmáticos com lisossomos com fibras mielínicas. Em depósitos antigos os lipídios são localizados entre o colágeno, células de Schawann e endotélio de vasos palpebrais.⁽²⁾

Aproximadamente metade dos pacientes com XP é hiperlipidêmica, sendo considerado marcador para risco aumentado de aterosclerose.⁽³⁾ Em hiperlipidêmicos com XP, o risco para aterosclerose pode ser inferido a partir de alterações nas concentrações de lipoproteínas e apolipoproteínas.⁽³⁾ Dentre algumas manifestações cutâneas, o XP representa sinal de perigo para doença arterial coronária (DAC) precoce.^(5,6)

Na clínica médica, a hipercolesterolemia familiar (HF) é diagnosticada por diversos critérios como alto nível plasmático de colesterol, presença de xantomas e XP⁽⁷⁾ e coronariopatia precoce. Porém, apenas por essas características pode haver dificuldade entre distinção de HF e outras doenças

associadas a hipercolesterolemia, sendo indicado nesses casos estudos genéticos moleculares para se estabelecer um diagnóstico mais adequado.

Estudos foram realizados considerando prevenções primária e secundária da doença arterial coronariana (DAC) e, em particular, da própria aterosclerose. Confirmaram, de forma consistente, que elevações séricas crônicas de lípidos constituem fator de risco para complicações cardiovasculares de natureza aterosclerótica, fatais e não-fatais.⁽⁸⁻¹¹⁾ A correlação estabelecida entre aterosclerose e alterações plasmáticas de lipídios e de lipoproteínas originou a teoria lipídica, que propõe a hipercolesterolemia como uma das principais causas da aterosclerose.^(12,13) Resultados de estudo realizado na década de 40 demonstraram que valores de colesterol total (CT) e fração de colesterol das lipoproteínas de baixa (LDLc) e alta densidade (HDLc) são indicadores de risco para ocorrência futura de eventos clínicos da doença aterosclerótica.⁽⁸⁾

Estudos confirmaram que tanto o colesterol livre quanto o esterificado, em excesso, acumulam-se na aorta, nas artérias coronárias e no cérebro, com variações entre os indivíduos. Além disso, a gênese da aterosclerose parece associada a mecanismos celulares e moleculares com influências genéticas e estresse moderado crônico, fato que poderia elucidar medidas terapêuticas e minimizar a vulnerabilidade arterial.^(14,15)

O avanço da biologia molecular tem favorecido o desenvolvimento da tecnologia dos ácidos nucléicos e consolidação de novos conhecimentos a respeito do metabolismo lipídico, permitindo maior compreensão da influência de fatores genéticos sobre a concentração de lípidos plasmáticos. Dentre

esses, destacam-se polimorfismos e mutações que podem alterar a estrutura e, conseqüentemente, a função de proteínas envolvidas na síntese, homeostase e metabolismo do colesterol, como apolipoproteínas, receptores e enzimas.^(11,16)

Polimorfismos são mutações frequentes nas quais o alelo mutado se apresenta na população com uma frequência superior a 1%. É reconhecido que a aterosclerose raramente provém de uma única mutação genética, mas da interação poligênica. Nesse caso, mutações ou inúmeros polimorfismos contribuem para o seu surgimento, expondo o indivíduo a maior ou menor suscetibilidade a doenças cardiovasculares. Assim, são denominados genes predisponentes ao desenvolvimento de aterosclerose.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ Desse modo, a análise precoce de marcadores genéticos envolvidos no metabolismo lipídico a partir de técnicas de biologia molecular pode contribuir para prevenção de doenças cardiovasculares em pacientes hiperlipidêmicos e portadores de XP.

Vários estudos confirmam, por exemplo, a influência de marcadores genéticos para DAC, incluindo apo B, apo E e receptor de LDL (RLDL), entre outros. Nesse caso, variantes genéticas são associadas a concentrações elevadas de colesterol plasmático ou com DAC em várias populações.⁽¹⁹⁻²⁴⁾

1.2 Polimorfismos Genéticos e Metabolismo de Lipídios

O metabolismo lipídico tem como fatores determinantes, além de enzimas, as apolipoproteínas que desempenham funções no transporte de lipoproteínas, em atividades proteolíticas, como fatores de coagulação e imunológico, além dos mecanismos de regeneração celular. As

apolipoproteínas A-I, B e apo(a) são mensuradas rotineiramente em laboratórios de análises clínicas.

A identificação de genes envolvidos nos diferentes fenótipos de dislipidemias e vias metabólicas poderá esclarecer a evolução clínica da doença. A detecção de combinações genéticas predisponentes ou determinantes das dislipidemias permitirá calcular o risco de doenças esporádicas ou familiares. Estudos moleculares incluindo clonagem, sequenciamento e localização cromossômica dos genes que codificam para proteínas com envolvimento direto no metabolismo das lipoproteínas, revelam mutações e ou polimorfismos associados a alterações em seus níveis, além de lipoproteínas, colesterol e triglicérides (TG).⁽²⁵⁾ Nesse sentido, a genotipagem de polimorfismos pode ser útil na avaliação de risco para doenças cardiovasculares em ambos os sexos.⁽²⁶⁾

1.2.1 Apolipoproteína E

A apo E é o principal constituinte protéico das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e possui papel importante no metabolismo das lipoproteínas⁽²⁷⁾ e no transporte de lipídios nos tecidos.⁽²⁸⁾ Está presente também nos quilomícrons e em seus remanescentes, assim como nas lipoproteínas de densidade intermediária (IDL).⁽²⁹⁾ A apo E tem como função principal a interação das lipoproteínas com os receptores celulares responsáveis por sua captação.⁽³⁰⁾

A apo E é estudada principalmente por sua função no metabolismo de lipídios e envolvimento no transporte de colesterol em vários tecidos. Atua

como ligante para no mínimo dois receptores específicos de lipoproteínas, o receptor de LDL ou apoB/E e o receptor hepático para apo E, a proteína de ligação ao receptor LDL (LRP = LDL *receptor related protein*), permitindo a remoção dessas partículas pelo fígado.^(29,31) Além disso, há evidências de sua associação com doenças cerebrovascular,⁽³²⁾ renal⁽³³⁾ e neurodegenerativa como Alzheimer do tipo tardio.^(34,35)

O polimorfismo apo E-*Hha* I, localizado no exon 4, é identificado sob a forma de três alelos principais *APOE*2*, *APOE*3* e *APOE*4* que codificam, respectivamente, para as isoformas apo E2, E3 e E4, distintas entre si pelo conteúdo de cisteína e arginina nas posições dos códons 112 e 158 do exon 4.^(36,37) Assim, as isoformas de apo E mostram diferentes propriedades funcionais e biológicas, sendo E3 e E4 facilmente reconhecidas pelo receptor de LDL, enquanto E2 se liga fracamente a ele, associando-se à hiperlipidemia do tipo III. Em contrapartida, tanto LRP quanto o receptor de VLDL reconhecem todas as isoformas de apo E. Além disso, o receptor de VLDL mostra-se capaz de estabelecer ligação também com apo E-livre, não necessitando de sua associação a lipídios para seu reconhecimento.⁽³⁸⁾

Corbo & Scacchi⁽²⁸⁾ analisaram a distribuição mundial de polimorfismos da apo E, mostrando maior frequência do alelo *APOE*3* em todos os grupos humanos. Diante da grande variabilidade na frequência dos alelos para apo E em diferentes populações, os alelos *APOE*2* e *APOE*4* podem ter influência variável no sentido de prever o risco de eventos vasculares em populações distintas. Desse modo, Kolovou *et al.*⁽³⁹⁾ mostraram concentração plasmática de

LDLc significativamente elevada em homens portadores do genótipo *APOE**3/4 quando comparado àqueles com genótipo *APOE**3/3.⁽⁴⁰⁾

Ribera *et al.*⁽⁴¹⁾ detectaram frequência aumentada do fenótipo apo E3/E4 em pacientes com XP e associaram os níveis plasmáticos elevados de colesterol, LDLc e apo B à prevalência de E4. Entretanto, indivíduos normolipêmicos com XP não apresentaram alteração na distribuição dos fenótipos para apo E. Concluíram que o XP parece associado com alterações quantitativas e qualitativas do metabolismo lipídico e sua relação com depósito na pele e vasos. Esses resultados sugerem que o XP seja um marcador de dislipidemias, sendo necessária a determinação do perfil lipídico para avaliar risco de doença cardiovascular. Por outro lado, em estudo de casuística brasileira a presença de tais manifestações dermatológicas não se associou ao perfil lipídico, mostrando-se semelhante nos pacientes, controles e respectivos familiares. Além disso, a variabilidade da apo E não diferenciou famílias com portadores de xantomatoses.^(42,43)

Outros estudos também associaram história clínica para DAC, medidas antropométricas, perfil lipídico, dosagem de Lp(a), variantes genéticas incluindo apo E e apo B-mutação 3500 e presença de xantomas.⁽⁴⁴⁾ Diante da prevalência de 11% de xantomas, 12% de XP com arco corneano e 16% de casos com doença isquêmica cardíaca, o genótipo *APOE**3/4 foi detectado em 16% dos pacientes, cuja concentração de CT e LDLc mostrou-se mais elevada comparado a *APOE**3/3. Entretanto, em pacientes com XP pareados com um grupo controle por idade, sexo, graus de obesidade e fenótipo hiperlipêmico, a

distribuição dos alelos para apo E foi semelhante nos grupos normolipêmico e hiperlipêmico.⁽⁴⁵⁾

A apo E tem sido estudada não apenas em associação com perfil lipídico e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, mas visando sua possível aplicação clínica.

1.2.2 Apolipoproteína B

A apo B tem quatro funções estabelecidas: proteína estrutural de VLDL, IDL, LDL e Lp(a), participa da biossíntese, montagem e secreção hepática das lipoproteínas ricas em TG, interage com a heparina e com vários proteoglicanos da parede arterial envolvidos na ligação de LDL com as placas ateroscleróticas e é ligante a receptores de LDL, mediando a remoção de LDL do plasma.⁽⁴⁶⁾

Em 1980 foram demonstradas duas formas de apo B no plasma humano, a apo B-100 e a apo B-48. A apo B-100 é sintetizada no fígado e secretada no plasma incorporada às VLDLs, sendo a única apolipoproteína de LDL. Cada partícula de VLDL contém apenas uma molécula de apo B-100. Ao contrário de outras apolipoproteínas, a apo B-100 não é transferida de uma lipoproteína para outra e, por isso, a apo B-100 permanece nas VLDL até que esta seja catabolizada à LDL. A apo B-48 é sintetizada nos enterócitos, sendo a principal apolipoproteína dos quilomícrons.⁽¹⁰⁾

A interação de LDL com o receptor de LDL (RLDL), mediada pela apo B-100, é crítica para a manutenção da homeostase extra e intracelular do

colesterol,⁽⁴⁷⁾ pois cerca de dois terços do colesterol circulante são transportados pelas partículas de LDL.⁽⁴⁸⁾ Assim, uma das regiões funcionais mais importantes da apo B-100 é o domínio de ligação com o RLDL.

Fatores de risco para DAC, incluindo níveis séricos de CT, LDLc, colesterol não-HDL e apo B-100 têm sido analisados conjuntamente, visando identificar o grau de concordância/discordância entre eles e seu significado como risco cardiovascular para indivíduos sem a doença. Nesse contexto, Sniderman *et al.*⁽⁴⁹⁾ observaram correlação significativa entre eles, mas apenas em 50% dos indivíduos que mostraram associação entre níveis de apo B e LDLc. Nesse caso, apo B pareceu ser mais concordante com colesterol não-HDLc que para LDLc.

Alterações no metabolismo de LDL podem ocorrer devido a defeitos no RLDL, ou ainda, em seu ligante, a apo B-100. Mutações no gene para apo B-100 podem comprometer a afinidade da apolipoproteína ao receptor de LDL, retardando a remoção de LDL da circulação sanguínea e resultando em hipercolesterolemia.⁽⁵⁰⁾ A doença causada por mutações em apo B-100 é denominada defeito da apo B-100 familiar (FDB). Kaiser *et al.*⁽⁵¹⁾ postularam ser essa doença clinicamente indistinguível da HF.

Nesse caso, o defeito na estrutura da apo B impede sua ligação adequada ao receptor de LDL. Assim, ocorre retardo na remoção da LDL circulante, embora menos acentuado em relação à HF. Seus portadores podem apresentar arco corneano, xantelasma e ou xantomas.⁽⁵²⁾

O efeito das mutações no gene para apo B resulta na elevação das concentrações plasmáticas de LDLc que atinge valores de aproximadamente

250mg/dL. Nesse contexto, a apo B tem sido considerada fator para lesões relacionadas com acúmulo de colesterol local dependente da idade.⁽⁵³⁾ Aos 60 anos, cerca de 70% de homens e mulheres com FDB apresentam DAC, 40% têm xantomas tendíneos e 35% arco córneo.⁽⁵⁴⁾

A apo B é representada por uma única molécula, com função estrutural, em lipoproteínas aterogênicas. Desse modo, sua concentração reflete diretamente o número de partículas aterogênicas no sangue.⁽⁵⁵⁾ Tal fato justifica a preocupação no estudo de apo B e sua influência na aterosclerose, que apesar de ser uma doença de caráter multifatorial, há evidências de que o conceito de retenção endotelial de lipoproteínas contendo apo B-100 pode fazer parte do início desse processo.^(56,57) Assim, a apo B influenciando níveis de CT e LDLc, poderia tornar-se marcador precoce para doenças cardiovasculares.⁽⁵⁸⁾

A crescente preocupação pela prevenção da aterosclerose é evidente em estudos de indivíduos cada vez mais jovens e com aparente risco para doenças cardiovasculares. Nesse caso, a identificação de fator genético relacionado com uma possível desordem metabólica aumentaria o risco da ocorrência de doenças associadas ao perfil lipídico.

Estudos conferem associação entre polimorfismos genéticos de apo B e risco para doenças coronarianas,^(24,59) incluindo aumento no nível sérico de VLDLc⁽⁶⁰⁾ e LDLc.⁽⁶¹⁾ São reconhecidos vários polimorfismos de apo B detectados pelo método RFLP (polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição), com o uso de enzimas de restrição que identificam regiões polimórficas. Destacam-se os polimorfismos para *Xba* I (genótipos X+X+; X+X-;

X-X-), *EcoRI* (exon 29 - genótipos E+E+; E+E-; E-E-), *Msp I* (exon 26 – M+M+; M+M-; M-M-), além dos polimorfismos na extremidade 3' (3'HVR e Inserção/Deleção - *Ins/Del*- genótipos D/D; I/D; I/I).

1.2.2.1 Polimorfismo apoB-Xba I

A região polimórfica *Xba I*, localiza-se no exon 26 do gene *APOB*, resulta da substituição de A para T na posição 7.673, no códon 2.488 da treonina, o que causa uma mutação silenciosa na apo B.^(62,63) Estudo de metanálise apresentado por Chiodini *et al.*⁽⁶⁴⁾ reforça ausência de associação entre polimorfismo apo B-*Xba I* e aumento de risco para DAC e ou infarto agudo do miocárdio. Além disso, outra metanálise sistemática também não evidenciou associação entre aumento de isquemia cardíaca e presença do alelo X+, apesar de indivíduos portadores desse alelo possuírem níveis mais elevados de LDLc.⁽⁶⁵⁾ Por outro lado, Han *et al.*,⁽⁶⁶⁾ em análise do polimorfismo apo B-*Xba I* encontraram, em pacientes portadores do genótipo X+X-, níveis séricos de CT, LDLc e apo B significativamente aumentados quando comparados a indivíduos com genótipo X-X-. Nesse sentido, correlacionaram o alelo X+ com valores elevados de CT e LCLc, sugerindo-o como possível marcador de risco para alterações do perfil lipídico.

1.2.2.2 Polimorfismo apo B-*Ins/Del*

A região polimórfica *Ins/Del* está localizada no peptídeo sinalizador do gene para apo B e decorre da inserção ou deleção de 9 pares de bases no exon 1. Estas 9 bases, quando presentes no DNA, codificam 3 aminoácidos,

que são leucina-alanina-leucina, localizados entre os códons -26 e -14 do gene para apo B.^(62,67)

Na tentativa de estabelecer relação entre obesidade exógena constitucional e polimorfismos de apo B, Iatsyshina *et al.*⁽⁶⁸⁾ evidenciaram que pacientes não diferiram de controles quanto a constituição genotípica e que não houve associação com obesidade nessa população para indivíduos com genótipo Ins/Ins. A influência do polimorfismo apoB-*Ins/Del* sobre os índices de risco e níveis de TG e VLDLc em indivíduos obesos também foi mostrada por Jemaa *et al.*⁽⁶⁹⁾ Concluíram que nesses pacientes alterações estruturais de apo B podem exercer efeito no metabolismo de lipídios, causando variações em suas concentrações séricas.

1.2.3 Receptor de LDL

O RLDL é uma glicoproteína localizada em regiões definidas da membrana plasmática, onde as partículas de LDL ligam-se por intermédio da apo B-100 à membrana das células. O gene para RLDL está localizado no braço curto do cromossomo 19 humano (19p13.1-19p13.3) e consiste de 18 éxons e 17 íntrons.⁽⁷⁰⁻⁷²⁾

Esse receptor permite a entrada de LDL na célula, suprindo suas necessidades de colesterol. A transcrição do gene, nesse caso, é regulada por retroalimentação negativa, determinada pelo conteúdo de colesterol intracelular. Desse modo, RLDL remove a LDL da circulação sanguínea, sendo responsável pela manutenção da homeostase dos lipídios e das lipoproteínas

no plasma e nos tecidos.⁽⁷³⁾ Larsson *et al.*⁽⁷⁴⁾ demonstraram que o receptor de LDL também tem função coadjuvante na síntese e secreção de VLDL, prevenindo dessa maneira a liberação pelo fígado de lipoproteínas contendo apo B-100.

Defeitos na expressão do receptor da LDL elevam os níveis plasmáticos de LDLc e colesterol. Nesse caso, os pacientes podem apresentar HF associada a presença de xantomas tendíneos, arcos corneanos, XP e estenose aórtica, com risco elevado para doenças coronarianas. Isso sugere que essas manifestações da doença são parcialmente determinadas por mutações no gene *RLDL*.⁽⁷⁵⁾ Nesse contexto, Garcia-Alvarez *et al.*⁽⁷⁶⁾, comparando geneticamente indivíduos com HF devido ao defeito no RLDL e portadores de hipercolesterolemia com alteração na apo B-100, mostraram diferenças significativas quanto ao período de evolução para eventos vasculares. Concluíram que o defeito no receptor de LDL é clinicamente mais agressivo, na medida em que permite manifestações mais precoces da doença.

Há referência de diferentes respostas a hipolipemiantes em portadores de hipercolesterolemia autossômica recessiva, decorrente de mutações no gene *RLDL*, associado ao desenvolvimento mais raro ou tardio de complicações cardiovasculares devido à aterosclerose prematura.⁽⁷⁷⁾

Em relação à aterogênese, Hu *et al.*⁽⁷⁸⁾ demonstraram também a capacidade da LDL oxidada em modular a expressão de RLDL, possivelmente a partir da geração de radicais livres, em células endoteliais de artérias coronárias humanas. Além disso, maior velocidade de transporte transvascular de LDL foi detectada em pacientes diabéticos, sugerindo maior fluxo de

lipoproteínas nas paredes arteriais, possivelmente sustentando o rápido desenvolvimento da aterosclerose ao qual estão sujeitos.⁽⁷⁹⁾

Polimorfismos, além de mutações, identificados no gene para o receptor de LDL, caracterizados como *Stu* I (éxon 8), *Hinc* II (éxon 12), *Ava* II (éxon 13), *Pvu* II (íntron 15), *Msp* I e *Nco* I (éxon 18), entre outros associam-se a níveis plasmáticos de colesterol,^(19,80) contribuindo para lesão aterosclerótica.⁽⁸¹⁾ Essas lesões ateroscleróticas nos vasos sanguíneos seriam decorrentes de defeito no transporte do colesterol, ou mesmo devido à modificação da molécula lipídica. Fato, portanto, não necessariamente associado ao nível sérico de colesterol e suas frações no organismo.⁽⁸²⁾ Desse modo, o estudo de lipoproteínas e seus receptores têm identificado variações genéticas que evidenciam fatores determinantes do perfil lipídico em populações e seu efeito na homeostase do colesterol.

1.2.3.1 Polimorfismo RLDL-Ava II

Descrito pela primeira vez por Hobbs *et al.*,⁽⁸³⁾ o sítio polimórfico *Ava* II está localizado no éxon 13 do gene para receptor LDL. Nesse caso, são caracterizados dois alelos identificados como A+ e A-, correspondentes a presença e ausência do sítio polimórfico, respectivamente. Diversos estudos mostram associação entre polimorfismo RLDL-Ava II e variações no perfil lipídico em pacientes com hipercolesterolemia.^(81,84-86) e indivíduos da população geral.⁽⁸⁷⁾ Alguns autores detectaram a influência do genótipo A+A+

no aumento do nível sérico de LDLc, além da tendência na elevação dos níveis de CT e TG e diminuição de HDLc.⁽⁸⁸⁾

1.2.3.2 Polimorfismo RLDL-*Hinc* II

A região polimórfica *Hinc* II está localizada no exon 12 do gene que codifica para RLDL. Esse polimorfismo é associado a variação dos níveis plasmáticos de lipídios. Salazar *et al.*⁽¹⁹⁾ analisaram o polimorfismo RLDL-*Hinc* II em casuística brasileira com perfil lipídico de alto risco para doenças cardiovasculares, encontrando maior frequência do alelo H+ (0,63) nos pacientes em relação aos controles (0,44). Houve maior prevalência de H+H- nos pacientes (49%) e principalmente nos controles (72%), com relação aos demais genótipos (H+H+ = 38%, 8%; H-H- = 13%, 20%; respectivamente).

Considerando a importância de pesquisas sobre xantelasma palpebral, justifica-se o presente estudo, pois na literatura não foram encontrados trabalhos relacionados a aspectos clínicos, fatores bioquímicos e genéticos em pacientes com essa lesão. Essa associação pode contribuir para esclarecer a relação entre xantelasma palpebral e alterações no metabolismo de lipoproteínas plasmáticas mediadas por fatores genéticos. Além disso, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá ampliar o arsenal terapêutico com enfoque multidisciplinar e também sinalizar possíveis indicadores de fatores de risco cardiovascular nesses pacientes.

1.3 Objetivo

1.3.1 Objetivo geral

Caracterizar pacientes com xantelasma palpebral considerando aspectos clínicos e demográficos, perfil lipídico e polimorfismos genéticos.

1.3.2 Objetivos específicos

- 1- Caracterizar o perfil demográfico quanto a sexo e faixa etária;
- 2- Identificar perfil clínico, incluindo sinais e sintomas, localização, lateralidade, coloração, tempo de aparecimento e evolução do xantelasma palpebral;
- 3- Determinar perfil lipídico de indivíduos com e sem xantelasma palpebral;
- 4- Analisar prevalência dos polimorfismos apo E-Hha I, apo B-Xba I, RLDL-Ava II e RLDL-Hinc II;
- 5- Avaliar associação entre os referidos polimorfismos genéticos e perfil lipídico em indivíduos com e sem xantelasma palpebral.

CASUÍSTICA E MÉTODO

2. CASUÍSTICA E MÉTODO

2.1 Casuística

Foram estudados 200 indivíduos caucasóides, não aparentados, distribuídos em dois grupos pareados em relação a sexo e idade: G1- 100 pacientes com diagnóstico clínico de xantelasma palpebral e G2- 100 indivíduos sem diagnóstico clínico de xantelasma palpebral.

Os indivíduos foram atendidos por médico dermatologista em clínica particular situada no município de Tupã, SP. Foram critérios de exclusão em ambos os grupos tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, doenças renais e ou hepáticas e tratamento com hipolipemiantes.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Anexo 1). Antes do início deste estudo, todos os indivíduos foram informados sobre a importância e o objetivo desta pesquisa, tendo liberdade de participar ou não da mesma mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2 Método

Todos os indivíduos foram avaliados clinicamente considerando-se dados como sexo, idade, sinais e sintomas, localização, lateralidade, coloração, tempo de aparecimento e evolução do XP (Apêndice 1).

A coleta de amostra de sangue periférico para análise dos polimorfismos genéticos de apo E, apo B e receptor de LDL, além do perfil lipídico de todos os indivíduos foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Misericórdia de Tupã, e as análises dos polimorfismos genéticos no Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular da FAMERP (NPBIM/FAMERP).

2.2.1 Análise do perfil lipídico

As concentrações séricas de TG, CT e HDLc foram determinadas por métodos colorimétricos enzimáticos.⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾ Os níveis séricos da fração de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDLc - *high density lipoprotein cholesterol*) foram dosados pelo sistema enzimático oxidase/peroxidase com colorimetria.⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾ Os níveis da fração de colesterol da lipoproteína de baixa (LDLc = *low density lipoprotein cholesterol*) e muito baixa densidade (VLDLc = *very low density lipoprotein cholesterol*) foram calculados pela fórmula de Friedwald [$LDLc = CT - (HDLc + TG/5)$], para valores de TG abaixo de 400 mg/dL.

Foram considerados valores de referência para TG, CT, HDLc e LDLc níveis registrados pela III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia⁽⁹²⁾ (Quadro 1).

Quadro 1. Valores de referência dos lípides para indivíduos acima de 20 anos.

Lípides	Valores (mg/dL)	Categoria
Colesterol total (CT)	< 200	ótimo
	200 – 239	limítrofe
	≥ 240	alto
LDL – colesterol (LDLc)	< 100	ótimo
	100 – 129	desejável
	130 – 159	limítrofe
	160 – 189	alto
	≥ 190	muito alto
HDL – colesterol (HDLc)	< 40	baixo
	>60	alto
Triglicérides (TG)	< 150	ótimo
	150 – 200	limítrofe
	201 – 499	alto
	≥ 500	muito alto

Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia⁽⁹²⁾

LDL = lipoproteína de densidade baixa; HDL = lipoproteína de densidade alta.

2.2.2 Polimorfismos genéticos

Essa análise incluiu as seguintes etapas: extração e amplificação do DNA e restrição do produto amplificado com enzimas de restrição *Hha* I (apo E), *Xba* I (apo B), *Ava* II e *Hinc* II (RLDL), seguida de análise do DNA por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, de acordo com o polimorfismo estudado, seguido de coloração com brometo de etídeo.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico (5 mL) coletados com EDTA. A extração foi realizada em três etapas de acordo com a técnica descrita por Gustincich *et al.*,⁽⁹³⁾ compreendendo: 1) lise das células sangüíneas e desnaturação com solução de brometo dodeciltrimetilamônio (DTAB); 2) desproteinização com clorofórmio; 3) precipitação do DNA e ressuspensão via brometo cetiltrimetilamônio (CTAB) (Apêndices 2 e 3).

Integridade das amostras de DNA e quantificação do DNA genômico

As amostras de DNA foram submetidas a avaliação de sua integridade por eletroforese em gel de agarose. Utilizou-se gel de agarose a 1% em solução tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM) em uma cuba eletroforética. As amostras continham 5µL do DNA e 3µL do tampão da amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol FF 0,25% e glicerol 30%) e foram aplicadas no gel imerso no TBE. Aplicou-se também um marcador de tamanho do DNA de 1kb. As condições de eletroforese para análise da integridade do DNA foram 100V e 60mA por 45 minutos. Após este processo, o gel foi corado com brometo de etídeo, cuja técnica de coloração encontra-se descrita neste texto na análise do polimorfismo da apo E, logo a seguir, com leitura realizada em luz ultravioleta (UV).

A quantificação e análise quanto ao grau de pureza das amostras de DNA foram realizadas em espectrofotômetro após diluição das amostras em

tampão TE, avaliando-se a concentração de DNA e proteínas em 260 e 280nm, respectivamente.

2.2.2.1 Amplificação das regiões polimórficas

Cada reação de PCR (*polymerase chain reaction*) foi realizada em termociclador (Eppendorf - Mastercycler), com os componentes e suas respectivas quantificações.

Preparo da solução reagente – por tubo de reação

Água Milli Q estéril-----	7,05µL
Buffer da Taq polimerase (10 X – Gibco BRL)-----	2,5µL
dNTP (solução de trabalho -1,21mM)-----	2,0µL
Primer P1 2,5mM-----	2,5µL
Primer P2 2,5mM-----	2,5µL
DMSO (10%)-----	2,5µL
Taq polimerase (5U/µL - Invitrogen)-----	0,2µL
Cloreto de Magnésio (50mM – Gibco BRL)-----	0,75µL
DNA (solução de trabalho-0,1µg/µL)-----	5,0µL

Preparo do dNTP (solução de trabalho)

Água Milli Q estéril-----	760µL
dNTP -----	10µL de cada dNTP (A, T, C, G)

Obtendo-se uma solução de 1,21mM ou 1.210 µM.

Primers utilizados

PCR – apo E (*Hha* I)⁽⁹⁴⁾

Primer 1: 5'–ACAGAATTCGCCGGCCTGGTACAC–3'

Primer 2: 5'–TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAGCA–3'

O processo de amplificação por PCR foi realizado de acordo com o protocolo a seguir:

- (1) desnaturação inicial a 90°C por 5 minutos;
- (2) amplificação: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 65°C por dois minutos (hibridização e extensão);
- (3) extensão final: 72°C por 7 minutos .

Ao final dos ciclos, a reação foi interrompida por esfriamento a 4°C.

PCR – apo B (*Xba* I)⁽⁹⁵⁾

Primer 1: 5'–GGAGACTATTCAGAAGCTAA–3'

Primer 2: 5'–GAAGAGCCTGAAGACTGACT–3'

O processo de amplificação por PCR foi realizado de acordo com o protocolo a seguir:

- (1) desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos;
- (2) amplificação: 35 ciclos de 92°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C por 3 minutos (hibridização) e 72°C por 5 minutos (extensão);
- (3) extensão final: 72°C por 7 minutos .

Ao final dos ciclos, a reação foi interrompida por esfriamento a 4°C.

PCR – apo B (*Ins/Del*)⁽⁹⁶⁾

Primer 1: 5'–CAGCTGGCGATGGACCCGCCGA–3'

Primer 2: 5'–ACCGGCCCTGGCGCCCGCCAGCA–3'

Foi seguindo o seguinte protocolo de amplificação:

- (1) desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos;
- (2) amplificação: 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 68°C por 1 minuto (hibridização) e 72°C por 5 minutos (extensão);
- (3) extensão final: 72°C por 7 minutos.

Ao final dos ciclos, a reação foi interrompida por esfriamento a 4°C.

PCR – RLDL (*Ava II*)⁽⁸⁵⁾

Primer 1: 5'-GTC ATC TTC CTT GCT GCC TGT TTA G-3'

Primer 2: 5'-GTT TCC ACA AGG AGG TTT CAA GGT T-3'

O procedimento aplicado seguiu o seguinte protocolo:

- (1) desnaturação inicial: 94°C por 5 minutos;
- (2) amplificação: 35 ciclos de 94°C 1 minuto (desnaturação), 63°C 2 minutos (hibridização) e 72°C 1 minuto (extensão);
- (3) extensão final: 72°C por 10 minutos.

Ao final dos ciclos, a reação foi interrompida por esfriamento a 4°C.

PCR – RLDL (*Hinc II*)⁽⁸⁵⁾

Primer 1: 5'–GCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT–3'

Primer 2: 5'–CACCTAAGTGCTTCGATCTCGTACG–3'

Este procedimento seguiu o seguinte protocolo de amplificação:

- (1) desnaturação inicial: 95°C por 5 minutos;
 - (2) amplificação: 28 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 2 minutos (hibridização) e 72°C por 1 minuto (extensão);
 - (3) extensão final: 72°C por 10 minutos.
- Ao final dos ciclos, a reação foi interrompida por esfriamento a 4°C.

2.2.2.2 Análise do produto de PCR em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% (300mg de agarose, 30mL de TBE 1 X), para conferir a amplificação do DNA. O gel foi preparado com agarose em tampão TBE (Tris-HCl 0,45mM, ácido bórico 0,45mM e EDTA 2,5mM pH 8,0). Para solubilização a agarose foi aquecida em forno microondas por 20 segundos. Após resfriamento (em torno de 45°C) a solução foi colocada em sistema eletroforético horizontal. Após a solidificação do gel, foram pipetados 4µL do produto de PCR diluídos em 2,5µL de bromofenol e 4µL de *ladder* 100 pb (Gibco) diluído também no tampão da amostra em 1:9. O tempo de corrida eletroforética foi de 1 hora a 100V. Após esse processo, o gel foi corado com brometo de etídeo e as bandas visibilizadas sob luz UV em transiluminador.

2.2.2.3 Restrição enzimática e análise eletroforética em gel de poliacrilamida 6%

Apo E – *Hha* I

O produto de amplificação do PCR foi submetido à enzima de restrição *Hha* I (5U por tubo de reação) em banho-maria a 37°C, *overnight*, para clivagem das sequências amplificadas dos alelos *APOE*2*, *APOE*3* e *APOE*4* em regiões específicas (GCGC), separando fragmentos com 91 e 83 pb (*APOE*2*), 91 e 48

pb (*APOE**3) e 72 e 48 pb (*APOE**4). A apo E3 contém cisteína na posição 112 e arginina na posição 158. Na apo E2, resíduo de cisteína substitui a arginina na posição 158, enquanto a apo E4 contém arginina em ambas as posições.

Fragmentos de DNA, referentes aos alelos *APOE**2, *APOE**3 e *APOE**4, obtidos pela ação da enzima de restrição *Hha* I foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não desnaturado, sob corrente constante de 200V. Como controle foi utilizada amostra de DNA padrão (pBR 322-Gibco), digerido pela enzima de restrição *Msp* I que gera fragmentos de até 110, 90, 76 e 67 pb. Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,2mg/L) por 5 minutos e fragmentos de DNA visibilizados sob iluminação UV, seguido de análise do material por fotodocumentação (Figura 1).

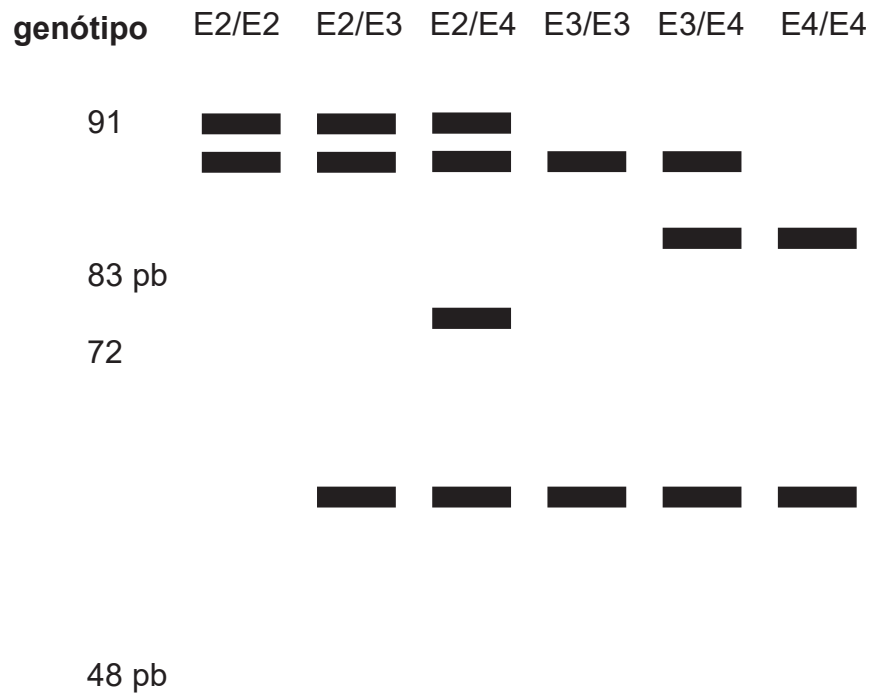


Figura 1 - Esquema apresentando perfil de bandas eletroforéticas em gel de poliacrilamida para o polimorfismo apolipoproteína E-*Hha* I, mostrando os genótipos correspondentes a fragmentos de DNA em pares de base (pb), sob restrição enzimática com *Hha* I.

Apo B – *Ins/Del*

Os produtos de amplificação do polimorfismo *Ins/Del* foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. O perfil eletroforético evidenciou dois fragmentos de tamanhos distintos, 84 e 93 pb (Figura 2). A migração das amostras foi comparada ao padrão ladder 10 pb (Gibco). A presença de um único fragmento de 93 pb caracterizou indivíduos homocigotos para o genótipo *Ins/Ins* (II), enquanto que um único fragmento de 84 pb identificou homocigotos para o genótipo *Del/Del* (DD) e dois fragmentos de tamanhos de 93 e 84 pb revelaram a presença de heterocigose *Ins/Del* (ID).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

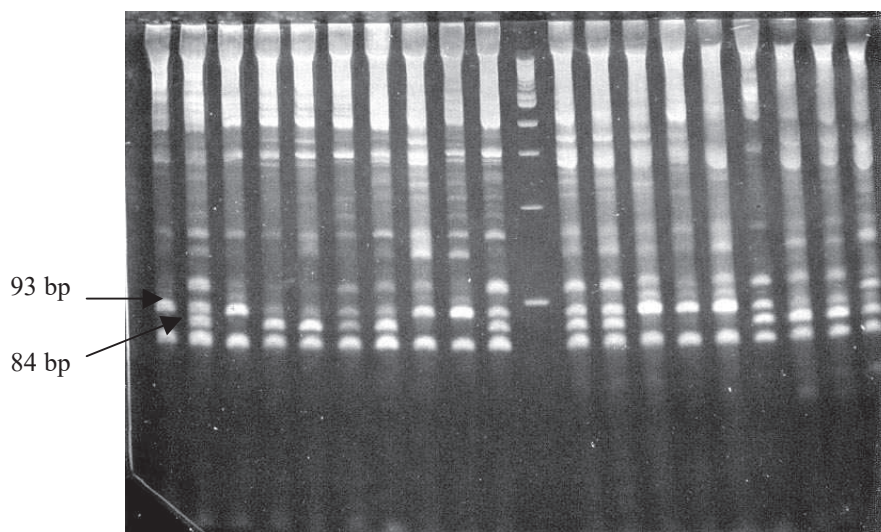


Figura 2 - Fotografia de gel de poliacrilamida submetido à eletroforese para análise do polimorfismo apolipoproteína B-Ins/Del. Notam-se genótipos II nas colunas 1, 3, 8, 9, 14, 15 e 16; DD nas colunas 4, 5, 7, 18, 19 e 20 e ID nas colunas 2, 6, 10, 12, 13 e 17. Coluna 11 apresenta amostra de DNA padrão (10 bp). pb = pares de base.

RLDL – *Ava* II

Os produtos da amplificação por PCR foram submetidos *overnight* à enzima de restrição *Ava* II a 37°C em banho-maria, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e coloração com brometo de etídeo para identificação dos fragmentos de restrição. Indivíduos homocigotos para o genótipo A-A- apresentam apenas um fragmento de 228 pb, indicando ausência de sítios de restrição para *Ava* II. Homocigotos para genótipo A+A+ mostram dois fragmentos, um de 141 pb e outro de 87 pb, indicando presença de um sítio de restrição. Os indivíduos heterocigotos A+A- apresentam 3 fragmentos, 228 pb, 141 pb e 87 pb (Figura 3).

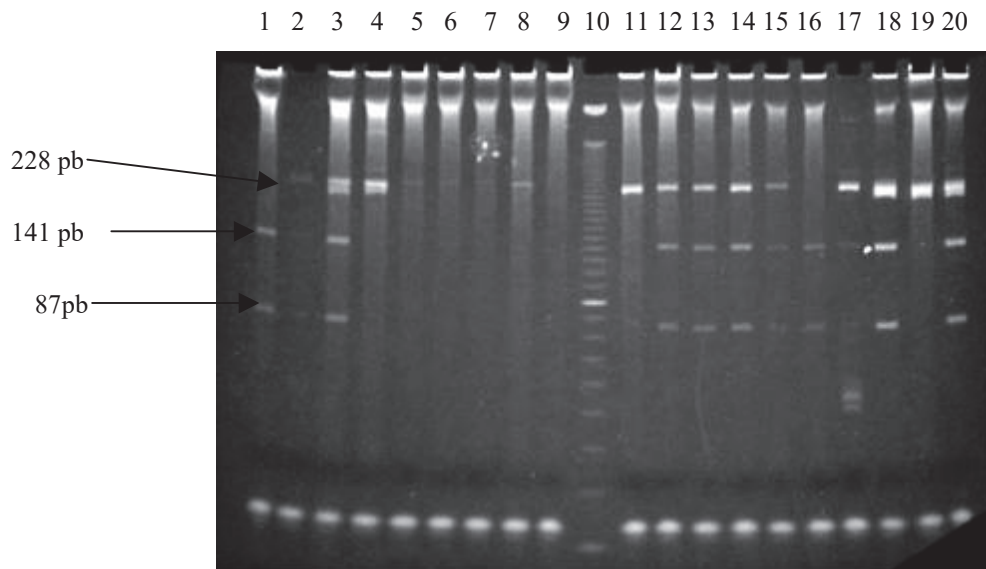


Figura 3 - Fotografia de gel de poliacrilamida submetido à eletroforese para análise do polimorfismo de receptor LDL-Ava II. Notam-se genótipos A+A+ nas colunas 1 e 16; A+A- nas colunas 3, 12, 13, 14, 15, 18 e 20 e A-A- nas colunas 4, 8, 11, 17 e 19. Coluna 10 apresenta uma amostra de ladder 100 pares de base (pb).

RLDL – Hinc II

Os produtos da amplificação por PCR (210 pb) foram submetidos *overnight* à enzima de restrição *Hinc* II a 37°C em banho-maria, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e coloração com brometo de etídeo para identificação dos fragmentos de restrição. Considerando que o fragmento amplificado pode apresentar um ou dois sítios de restrição para a enzima *Hinc* II, após a eletroforese observa-se a presença de quatro fragmentos de tamanhos moleculares diferentes, determinando dois genótipos homozigotos: H+H+ e H-H- e o heterozigoto H+H-. O genótipo H-H- mostra dois fragmentos

de 148 pb e 62 pb; o genótipo H+H+ três fragmentos de 110 pb, 62 pb e 38 pb e H+H- quatro fragmentos (148 pb, 110 pb, 62 pb e 38 pb) (Figura 4).

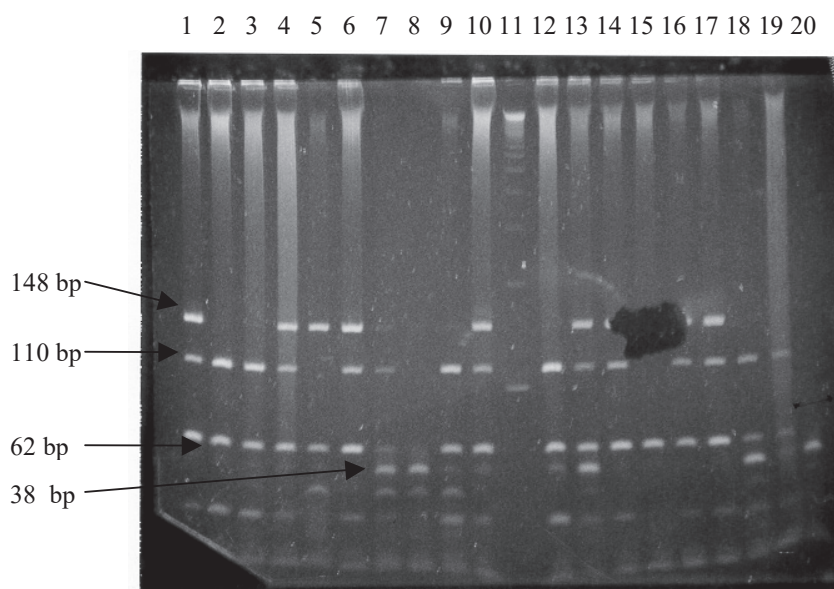


Figura 4 - Fotografia de gel de poliacrilamida submetido à eletroforese para análise do polimorfismo receptor LDL-Hinc II. Notam-se genótipos H+H+ nas colunas 2, 3, 9, 18 e 19; H+H- nas colunas 1, 4, 6, 7, 10, 13, 14, 16 e 17 e H-H- nas colunas 5 e 15. Coluna 11 apresenta amostra de *ladder* 100 pares de base (bp).

2.2.2.4 Restrição enzimática e eletroforese em gel de agarose

Apo B – *Xba* I

Os produtos da amplificação por PCR (710 pb) foram submetidos *overnight* à enzima de restrição *Xba* I a 37°C em banho-maria, seguido de eletroforese em gel de agarose 1,5% (450mg de agarose, 30mL de TBE 1X).⁽⁹⁷⁾

O gel foi preparado com agarose em tampão TBE (Tris-HCl 0,45mM, ácido bórico 0,45mM e EDTA 2,5mM pH 8,0). Para solubilização a agarose foi aquecida em forno microondas por 20 segundos. Após seu resfriamento (em torno de 45°C) a solução foi colocada em sistema eletroforético horizontal. Após a solidificação do gel, foram pipetados os produtos de restrição enzimática diluídos em 4,0µL de bromofenol e 4µL de *ladder* 100pb (Gibco) diluídos também no tampão da amostra em 1:9. A condição de eletroforese foi de 45 minutos a 110V. Após esse processo, corou-se o gel com brometo de etídeo e as bandas foram visibilizadas sob luz UV em transiluminador. O gel foi fotodocumentado com sistema polaroid (filme polaroid 667). A migração das amostras foi comparada com amostra padrão *ladder* de 100 pb. A análise eletroforética mostrou três fragmentos de diferentes tamanhos (Figura 5), sendo que um fragmento de 710 pb foi caracterizado como homocigoto com o genótipo X-X-, indicando a ausência do sítio de restrição para *Xba* I. As amostras de indivíduos homocigotos com o genótipo X+X+, que indica a presença do sítio de restrição, revelaram fragmentos de restrição de 433 pb e 277 pb. Os heterocigotos X+X- mostraram 3 fragmentos: 710 pb, 433 pb e 277 pb.

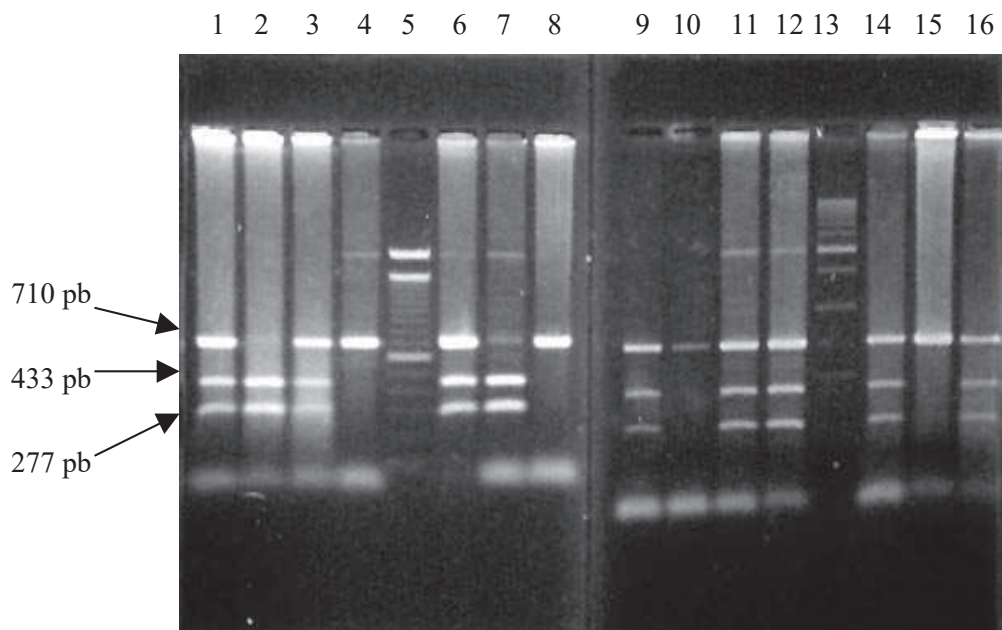


Figura 5 - Fotografia de gel de agarose submetido à eletroforese para análise de polimorfismo apolipoproteína B-Xba I. Notam-se genótipos X+X+ nas colunas 2 e 7; X+X- nas colunas 1, 3, 6, 9, 11, 12, 14 e 16; X-X- nas colunas 4, 8, 10 e 15. Colunas 5 e 13 apresentam amostra de *ladder* 100 pares de base (bp).

2.3 Análise Estatística

Variáveis categóricas foram comparadas por meio dos testes qui-quadrado e exato de Fisher. Variáveis contínuas foram comparadas utilizando-se teste de Mann-Whitney. Diferenças na distribuição de frequência genotípica a partir do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram verificadas por meio do teste qui-quadrado. Frequências de genótipos foram estimadas por meio de algoritmo EM (*Expectation-Maximization*) usando-se programa Arlequin. Associações entre xantelasma palpebral, genótipos e outras variáveis foram avaliadas por meio de análise de regressão logística univariada e multivariada com critério *stepwise*. Foi utilizado o programa computacional SAS System 6.12 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Significância foi definida como $p < 0,05$, após aplicação da correção de Bonferroni.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

Os grupos G1 (pacientes) e G2 (controles) estão caracterizados nas Tabelas 1 a 9, considerando dados demográficos, características clínicas, perfil lipídico e genotipagem para apo E (polimorfismo *Hha I*), RLDL (polimorfismos *Ava II* e *Hinc II*) e apo B (polimorfismos *Xba I* e *Ins/Del*).

3.1 Dados Demográficos

Considerando-se dados referentes a sexo e faixa etária, notou-se predomínio do sexo feminino em ambos os grupos. Comparando-se a média de idade entre os grupos, não houve diferença significativa (Tabela 1). O xantelasma palpebral prevaleceu em pacientes com 50 a 59 anos tanto no sexo masculino como no feminino (Tabela 2).

Tabela 1 - Dados demográficos de pacientes com xantelasma palpebral (G1) e controles (G2).

Variáveis	G1 (N = 100)		G2 (N = 100)		P*
	n	%	n	%	
Sexo					
feminino	63	63	64	64	1,0000
masculino	37	37	36	36	
Idade (anos)					
Média ± DP	46,2 ± 13,6		44,0 ± 12,6		0,2253
Mín - Máx	30 – 82		22 – 82		

DP = desvio padrão; Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo; * = teste de Fisher

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com xantelasma palpebral conforme faixa etária e sexo.

Faixa etária (anos)	M	F
30-39	5(13,5)	9(14,3)
40-49	6(16,2)	13(20,6)
50-59	11(29,7)	19(30,2)
60-69	10 (27,0)	13(20,6)
70-79	4 (10,8)	6 (9,5)
80-89	1 (2,7)	3 (4,8)
Total	37	63

valores entre parênteses correspondem à porcentagem

3.2 Características Clínicas

Dentre os pacientes com XP avaliados, houve predomínio do tipo placa (> 1 cm) (57%), da coloração amarelo claro (90%), do acometimento de ambos os lados (67%), da localização bilateral superior (60%) e da extensão palpebral proximal superior (76%) (Tabela 3, Figuras 6 a 9).

O tempo de aparecimento do XP conforme referido pelos indivíduos variou de 6 a 180 meses ($54,7 \pm 35,9$ meses) (Tabela 4). Os sintomas referidos pelos pacientes incluíram irritação (7%), prurido (2%), dor no olho (2%) e ausência de sintomas (89%).

Tabela 3 - Distribuição percentual de variáveis clínicas em pacientes com xantelasma palpebral (n = 100).

Variáveis	N	%
Tipo		
papulosa (< 1 cm)	5	5
placa (> 1 cm)	57	57
placa linear (> 1 cm)	38	38
Coloração		
amarelo claro	90	90
amarelo escuro	10	10
Lateralidade		
direito	14	14
esquerdo	19	19
ambos	67	67
Localização		
superior direito	8	8
superior esquerdo	13	13
inferior direito	5	5
inferior esquerdo	1	1
bilateral superior	60	60
bilateral inferior	7	7
bilateral superior com inferior esquerdo	5	5
bilateral superior e inferior	1	1
Extensão palpebral		
proximal superior	76	76
proximal inferior	20	20
proximal-médio superior	6	6
proximal-médio inferior	2	2
proximal-médio-distal superior	5	5
proximal-médio-distal inferior	5	5
médio inferior	1	1

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com xantelasma palpebral conforme faixa etária e média do tempo de aparecimento (meses) referido pelos pacientes.

Faixa etária (anos)	N	Média ± DP	Min-Max
30-39	14	24,4±14,8	6-48
40-49	19	36,4± 23,5	6-84
50-59	30	60,7± 29,4	6-120
60-69	23	52,8±35,2	10-120
70-79	10	87,6± 32,5	36-144
80-89	4	132,0 ± 43,2	72-180

DP = desvio padrão; Min = mínimo; Max = máximo



Figura 6 - Fotografia mostrando paciente (32 anos, sexo feminino) portador de xantelasma palpebral do tipo papulosa (< 1 cm) de coloração amarelo claro, à direita, localização superior e inferior, e extensão palpebral proximal-médio-distal superior e proximal-médio inferior.



Figura 7 - Fotografia mostrando paciente (67 anos, sexo feminino) portador de xantelasma palpebral do tipo papulosa (> 1 cm) e placa (< 1 cm) de coloração amarelo claro, à direita, localização superior e inferior, e extensão palpebral proximal superior e inferior.

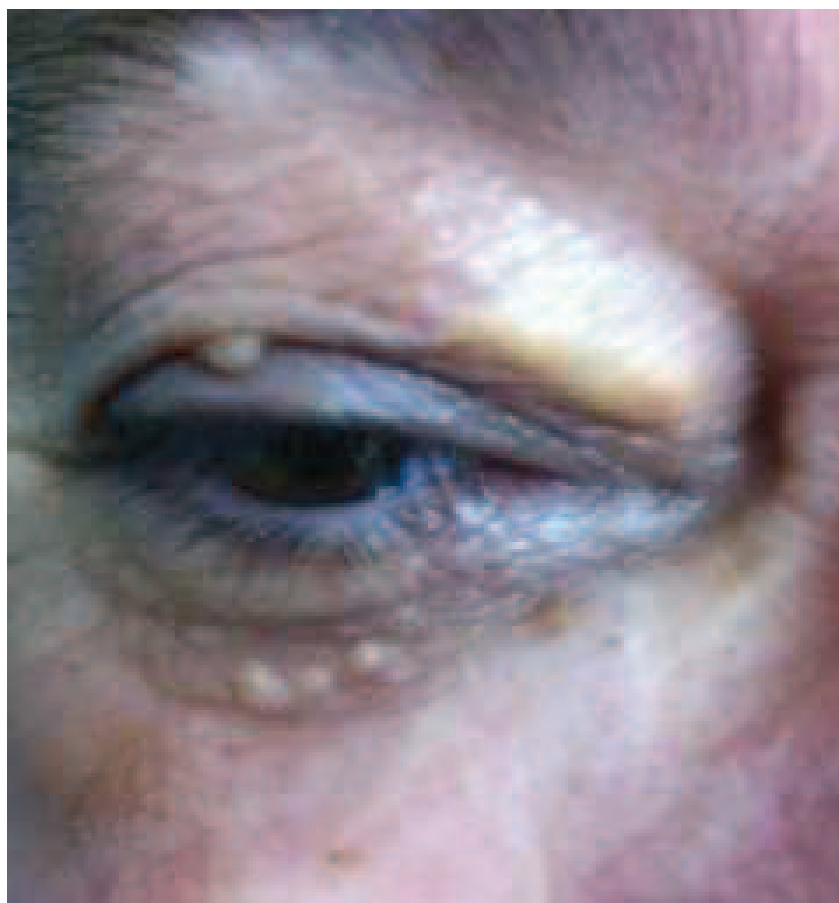


Figura 8 - Fotografia mostrando paciente (62 anos, sexo feminino) portador de xantelasma palpebral do tipo placa linear (> 1 cm) de coloração amarelo escuro, à direita, localização superior e inferior, e extensão palpebral proximal superior e médio inferior.



Figura 9 - Fotografia mostrando paciente (62 anos, sexo feminino) portador de xantelasma palpebral do tipo placa linear (> 1 cm) bilateral superior, localização bilateral superior e inferior, e extensão palpebral proximal superior e médio inferior em ambas as pálpebras.

3.3 Perfil Lipídico

A Tabela 5 apresenta medianas e faixas de variação das concentrações séricas dos parâmetros lipídicos avaliados em indivíduos com xantelasma palpebral (G1) e controles (G2). Notaram-se valores desejáveis para todas as variáveis, exceto para níveis séricos de VLDLc e TG nos controles (32mg/dL e 160mg/dL, respectivamente), sendo significativamente elevados comparado a pacientes (30mg/dL, P=0,0086 e 148mg/dL, P=0,0082; respectivamente).

Tabela 5 - Distribuição das medianas e valores mínimos e máximos para perfil lipídico em pacientes com xantelasma palpebral (G1) e controles (G2).

Perfil lipídico (mg/dL)	G1 (N = 100)	G2 (N = 100)	P*
CT			
mediana	199	197	0,4650
mín- máx	131 - 294	149 - 307	
HDLc			
mediana	46	45	0,8421
mín- máx	31 - 65	30 - 63	
LDLc			
mediana	123	118	0,2716
mín- máx	69 - 225	40 - 218	
VLDLc			
mediana	30	32	0,0086
mín- máx	12 - 56	16 - 70	
TG			
mediana	148	160	0,0082
mín - máx	60 - 278	78 - 348	

*Teste de Mann-Whitney, CT= colesterol total, HDLc= fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade, LDLc= fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade, VLDLc= fração de colesterol de lipoproteína de densidade muito baixa, TG= triglicérides, N= número de indivíduos.

A Tabela 6 apresenta a frequência de pacientes e controles com valores desejáveis e alterados para o perfil lipídico. Notaram-se níveis significativamente alterados de TG (>150 mg/dL) e VLDLc (>30 mg/dL) nos controles (68 e 69%, respectivamente), comparado a pacientes (48%, P=0,0063 e 51%, P=0,0139; respectivamente).

Tabela 6 - Distribuição de pacientes e controles considerando sua frequência para valores lipídicos desejáveis e alterados.

Perfil Lipídico (mg/dL)	Pacientes (N=100)				Controles (N=100)				P*
	desejável		alterado		desejável		alterado		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
CT	54	54	46	46	65	65	35	35	0,1495
HDLc	75	75	25	25	80	80	20	20	0,4985
LDLc	65	65	35	35	70	70	30	30	0,5461
VLDLc	49	49	51	51	31	31	69	69	0,0139
TG	52	52	48	48	32	32	68	68	0,0063

*Teste exato de Fisher. CT= colesterol total, HDLc= fração de colesterol de lipoproteína de alta densidade, LDLc= fração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade, VLDLc= fração de colesterol de lipoproteína de densidade muito baixa, TG= triglicérides, N= número de indivíduos.

3.4 Frequências Alélicas e Genóticas e Perfil Lipídico

3.4.1 Apo E-Hha I

Foram analisadas as frequências alélicas e genóticas para apo E – Hha I em 50 pacientes com XP e 89 controles. O alelo *APOE*3* mostrou-se mais frequente em pacientes e controles (0,84 e 0,82; respectivamente), seguido do alelo *APOE*4* (0,09 e 0,14; respectivamente), sem diferença

estatística entre os grupos (Tabela 7). A distribuição genotípica também foi semelhante nos indivíduos, com prevalência do genótipo *APOE*3/3* (68% nos pacientes e 71% nos controles), seguido dos genótipos *APOE*3/4* (18% em ambos os grupos) e *APOE*2/3* (14% e 5%, respectivamente; $P = 0,0564$).

A análise do perfil lipídico em associação com o polimorfismo apo E-*Hha* I revelou aumento significativo nos níveis de VLDLc e TG em pacientes portadores do genótipo *APOE*3/3* (mediana = 31; 155mg/dL; respectivamente) comparado àqueles com pelo menos um alelo *APOE*2* (mediana = 27, $P=0,0208$; 136mg/dL, $P=0,0187$; respectivamente). O estudo comparativo entre os grupos mostrou aumento significativo nos níveis de VLDLc e TG nos controles (mediana = 34; 168mg/dL) comparado a pacientes (mediana = 27; 136mg/dL; $P = 0,0061$ para ambas variáveis) portadores do genótipo *APOE*2/3*.

3.4.2 Apo B – Xba I

Foram analisadas as frequências alélicas e genotípicas para apo B – *Xba* I em 99 pacientes, sendo 62 (62,5%) do sexo feminino e 37 (37,5%) do masculino, e 100 controles sendo 64 (64%) do sexo feminino e 36 (36%) do masculino. O alelo X- prevaleceu em pacientes e controles (60% para ambos os grupos; Tabela 7). O genótipo X+X- destacou-se em pacientes (58%) e controles (56%), seguido de X-X- (31; 32%, respectivamente).

Pacientes com genótipo X+X- apresentaram níveis significativamente aumentados de LDLc (mediana = 124mg/dL) e reduzidos de VLDLc (mediana = 28 mg/dL) e TG (mediana = 140mg/dL) comparado a controles (mediana = 112mg/dL, $P= 0,0427$; 32, $P= 0,0073$; 160mg/dL, $P = 0,0061$; respectivamente).

3.4.3 Apo B – *Ins/Del*

Foram analisadas as frequências alélicas e genótípicas para apo B – *Ins/Del* em 99 pacientes, sendo 62 (62,5%) do sexo feminino e 37 (37,5%) do masculino, e 100 controles sendo 64 (64%) do sexo feminino e 36 (36%) do masculino. Destacaram-se o alelo I (63% e 58%) e o genótipo ID (51% e 56%) em pacientes e controles, respectivamente, sem diferença entre os grupos (Tabela 7).

3.4.4 RLDL – *Ava II*

Foram analisadas as frequências alélicas e genótípicas para RLDL - *Ava II* em 50 pacientes, sendo 35 (70%) do sexo feminino e 15 (30%) do masculino, e 50 controles sendo 38 (76%) do sexo feminino e 12 (24%) do masculino. O alelo A- prevaleceu em pacientes e controles (68% e 57%; respectivamente). O mesmo ocorreu para o genótipo A+A- (52% e 50%; respectivamente) (Tabela 7).

3.4.5 RLDL – *Hinc II*

Foram analisadas as frequências alélicas e genótípicas para RLDL - *Hinc II* em 86 pacientes, e 100 controles. O alelo H+ prevaleceu em pacientes (66%) e controles (60%) (Tabela 7). O genótipo H+H+ destacou-se nos pacientes (50%) e controles (55%), seguido de H+H- (41; 32%, respectivamente).

Indivíduos controles com genótipo H-H- apresentaram níveis significativamente aumentados de CT (mediana = 216mg/dL) e LDLc (mediana

= 134mg/dL) comparado aos portadores do genótipo H+H+ (mediana = 193mg/dL, P=0,0354; mediana = 114mg/dL; P = 0,0206; respectivamente). Por outro lado, aqueles com genótipo H+H+ mostraram níveis séricos reduzidos de HDLc (mediana = 44mg/dL) em relação ao genótipo H+H- (mediana = 47mg/dL; P = 0,0394).

Dados genotípicos de indivíduos com xantelasma palpebral e controles estão na Tabela 7. Variáveis testadas não mostraram diferença entre indivíduos com xantelasma palpebral e controles. Frequências alélicas para polimorfismos de apo E, apo B and RLDL foram similares em ambos os grupos e todos os 5 polimorfismos apresentaram padrões de distribuição previstos pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto apo B-*XbaI* para pacientes ($\chi^2_{(1)} = 3,97$; $0,02 < p < 0,05$).

Tabela 7 - Dados genotípicos de indivíduos com xantelasma palpebral e controles.

Variáveis	Pacientes	Controles	Pc
apo E Hhal	(N = 50)	(N = 89)	
<i>APOE*2</i>	7,0	4,0	1,000
<i>APOE*3</i>	84,0	82,0	
<i>APOE*4</i>	9,0	14,0	
apo B Xbal	(N = 99)	(N = 100)	
X+	40,0	40,0	1,000
X-	60,0	60,0	
apo B Ins/Del	(N = 99)	(N = 100)	
I	63,0	58,0	0,800
D	37,0	42,0	
RLDL Avall	(N = 50)	(N = 50)	
A+	32,0	43,0	0,288
A-	68,0	57,0	
RLDL Hinc II	(N = 86)	(N = 100)	
H+	66,0	60,0	0,522
H-	34,0	40,0	

N = número de indivíduos. Ins/Del indicam inserção/deleção. Variáveis categóricas foram comparadas por meio dos testes qui-quadro e exato de Fisher. Pc = valor da probabilidade conforme correção de Bonferroni

3.5 Associação entre Perfil Lipídico e Polimorfismos

Os resultados da associação entre perfil lipídico e polimorfismos de apo E, apo B e RLDL em pacientes com xantelasma palpebral e controles encontram-se nas Tabelas 8 e 9. Não houve associação entre perfil lipídico e polimorfismos em nenhum dos dois grupos.

Tabela 8 - Resultados da associação entre perfil lipídico e polimorfismos apo E, apo B e RLDL em pacientes com xantelasma palpebral.

Polimorfismos		Lipídios (mg/dL)				
		CT	HDLc	LDLc	VLDLc	TG
apo E Hhal	E2E3 (7)	204,9±40,2	46,3±6,1	131,7±42,4	26,9±4,0	134,3±19,5
apo B Xbal	E3E3 (34)	204,8±23,6	46,5±8,0	125,6±26,9	32,9±6,9	162,5±34,4
apo B Ins/Del	E3E4 (9)	204,1±14,0	47,7±10,1	122,9±13,6	33,6±7,2	167,4±36,2
RLDL Avall	P	0,422	0,893	0,801	0,073	0,069
RLDL Hinc II	Pc	1,000	1,000	1,000	0,219	0,207
apo B Xbal	X+X+(11)	208,0±22,4	49,1±7,8	126,4±22,0	32,5±6,4	162,6±32,2
	X+X- (57)	203,0±25,4	47,5±7,5	126,3±24,5	28,9±8,7	144,1±43,3
	X-X- (31)	203,8±31,6	45,4±9,5	126,6±31,4	31,2±8,4	155,5±41,9
	P	0,759	0,343	0,915	0,079	0,071
	Pc	1,000	1,000	1,000	0,237	0,213
apo B Ins/Del	II (37)	206,1±32,2	47,3±9,7	128,1±30,8	28,7±7,8	143,1±38,8
	ID (50)	202,3±23,4	46,1±7,2	125,7±23,5	31,2±9,1	155,4±45,5
	DD (12)	203,3±24,6	49,7±7,5	124,3±24,9	29,3±6,9	146,3±35,1
	P	0,702	0,461	0,820	0,398	0,432
	Pc	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
RLDL Avall	A+A+ (3)	230,7±54,9	41,7±5,7	156,3±60,1	32,7±5,0	163,0±24,6
	A+A- (26)	203,0±21,9	45,7±8,5	125,5±24,0	31,7±7,9	158,0±39,2
	A-A- (21)	203,1±21,7	48,7±7,5	122,2±23,9	32,2±5,9	160,8±29,4
	P	0,409	0,169	0,403	0,906	0,893
	Pc	1,000	0,507	1,000	1,000	1,000
RLDL Hinc II	H+H+ (35)	198,3±21,2	47,9±8,1	118,9±20,2	31,5±8,4	157,4±41,9
	H+H- (43)	208,2±27,5	46,5±8,9	131,5±27,3	29,1±7,6	145,3±38,1
	H-H- (8)	207,9±45,7	47,0±7,6	133,6±43,7	27,3±13,5	136,0±67,6
	P	0,276	0,687	0,191	0,713	0,683
	Pc	0,828	1,000	0,573	1,000	1,000

valores entre parênteses correspondem a número de indivíduos; CT = colesterol total; HDLc = colesterol de alta densidade; LDLc = colesterol de baixa densidade; VLDLc = colesterol de muita baixa densidade; TG = triglicérides. +/- indica presença/ausência de um local de restrição. Ins/Del indicam inserção/deleção. Dados estão representados como média ±desvio padrão e foram comparados por meio do teste de Mann-Whitney. Valores para genótipos de APOE foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Pc = valor da probabilidade conforme correção de Bonferroni

Tabela 9 - Resultados da associação entre perfil lipídico e polimorfismos apo E, apo B e RLDL em pacientes sem xantelasma palpebral (grupo controle).

Polimorfismos		Lipídios (mg/dL)				
		CT	HDLc	LDLc	VLDLc	TG
apo E Hhal	E2E3 (4)	186,5±9,8	44,3±4,6	108,3±16,4	34,0±2,7	16,3±13,3
	E3E3 (63)	206,5±32,7	47,3±7,5	126,2±35,4	33,0±6,6	164,7±33,1
	E3E4 (16)	213,3±36,3	45,8±8,0	132,3±39,5	35,1±5,5	175,4±27,4
	P	0,261	0,628	0,543	0,142	0,160
	Pc	0,783	1,000	1,000	0,426	0,480
apo B Xbal	X+X+ (12)	206,3±36,1	48,4±6,8	122,8±27,5	35,0±11,4	174,2±56,6
	X+X- (56)	201,9±30,1	47,2±7,7	121,3±35,1	32,2±5,8	160,6±29,1
	X-X- (32)	213,4±35,6	44,2±7,4	136,3±38,1	32,9±5,6	163,1±28,1
	P	0,226	0,152	0,159	0,897	0,924
	Pc	0,678	0,456	0,477	1,000	1,000
apo B Ins/Del	II (30)	210,0±39,6	45,1±7,6	130,3±45,4	32,1±7,1	160,3±36,0
	ID (56)	206,8±31,9	47,0±7,5	126,1±33,2	33,7±6,6	167,9±32,7
	DD (14)	195,1±13,7	46,6±8,3	118,1±17,3	30,4±4,9	151,9±25,2
	P	0,769	0,614	0,851	0,260	0,300
	Pc	1,000	1,000	1,000	0,780	0,900
RLDL Avall	A+A+ (9)	209,9±29,2	46,6±6,2	131,2±36,0	32,1±3,4	159,9±17,4
	A+A- (25)	211,2±38,6	48,0±7,5	129,2±40,0	34,0±8,9	169,8±44,0
	A-A- (16)	203,3±22,6	45,7±6,9	122,9±25,6	34,6±5,6	173,1±28,4
	P	0,960	0,499	0,943	0,556	0,540
	Pc	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
RLDL Hinc II	H+H+ (32)	200,9±27,5	44,3±7,2	120,3±33,8	33,8±5,9	168,8±29,8
	H + H (55)	203,6±31,3	47,9±7,8	124,0±31,9	32,1± 7,3	160,2±36,2
	H + H (13)	229,4±42,4	45,2±7,1	150,3±47,0	32,7±5,1	163,6±26,2
	P	0,095	0,102	0,119	0,265	0,259
	Pc	0,285	0,306	0,357	0,795	0,777

valores entre parênteses correspondem a número de indivíduos; CT = colesterol total; HDLc = colesterol de alta densidade; LDLc = colesterol de baixa densidade; VLDLc = colesterol de muita baixa densidade; TG = triglicérides. +/- indica presença/ausência de um local de restrição. Ins/Del indicam inserção/deleção. Dados estão representados como média ± desvio padrão e foram comparados por meio do teste de Mann-Whitney. Valores para genótipos de APOE foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Pc = valor da probabilidade conforme correção de Bonferroni

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa mostram que o xantelasma palpebral foi mais frequente em pacientes do sexo feminino, sendo a sexta década de vida a mais acometida. As características clínicas mais frequentes incluem tipo placa, coloração amarelo claro, acometimento bilateral, localização bilateral superior e extensão palpebral proximal superior. O tempo médio de aparecimento do XP referido pelos pacientes foi 4,6 anos, sendo assintomático para maioria deles. A análise do perfil lipídico mostrou que níveis séricos de CT, VLDL-c e TG apresentam alteração em aproximadamente metade dos pacientes com XP. A distribuição de polimorfismos de apo E, apo B e RLDL e os níveis séricos de CT, HDL-c e VLDL-c foi semelhante em indivíduos com XP e controles. Não houve associação entre polimorfismos apo E-*Hha* I, apo B-*Xba* I, apo B-Ins/Del, RLDL-*Ava* II e e RLDL-*Hinc* II e perfil lipídico de pacientes com XP.

Com relação ao sexo, o predomínio de XP em pacientes do sexo feminino é concordante com a literatura.^(6,98-100) A média de idade dos pacientes ora estudados foi 46,2 anos, estando de acordo com Jónsson & Sigfusson⁽⁹⁸⁾ (1976) e Rohrich *et al.*⁽¹⁰¹⁾ Por outro lado, Jain *et al.*⁽¹⁰⁰⁾ verificaram que a idade de 66 pacientes com XP variou de 15 a 73 anos, sendo que a maioria tinha entre 31 e 50 anos.

A caracterização clínica apresentada neste estudo pode contribuir para elucidação de aspectos relacionados à etiologia e fisiopatologia dessa dermatose. Na literatura não foram encontrados trabalhos sobre características clínicas do XP como tipo, coloração, lateralidade, localização e extensão palpebral.

Dentre os poucos casos descritos na literatura,⁽¹⁰²⁾ Jónsson & Sigfusson⁽⁹⁸⁾ afirmam que XP corresponde a placas amareladas na porção medial das pálpebras. Nesta série, apenas 1 paciente apresentou XP nessa região. Quanto à localização, Depot *et al.*⁽¹⁰³⁾ relataram caso de 1 paciente com XP bilateral, enquanto no presente estudo foram encontrados 73 pacientes portadores de XP bilateral.

Portanto, pesquisas clínicas são necessárias visando à confirmação dos achados aqui obtidos e, a partir disso, contribuir para melhorar a qualidade do tratamento dessas lesões inestéticas que podem causar baixa autoestima do paciente e privação social.⁽¹⁰⁴⁾ Além disso, esse conhecimento pode fundamentar a necessidade de integração entre especialidades médicas como dermatologia, oftalmologia e cardiologia.

Na análise do perfil lipídico aproximadamente metade dos pacientes com XP apresentou alteração em níveis séricos de CT, VLDL-c e TG. Segundo Bergman⁽³⁾ cerca de metade dos pacientes com XP é hiperlipidêmica, sendo considerado marcador para risco aumentado de aterosclerose. Portanto, esse resultado pode ser usado para identificar indivíduos com maior risco de DAC devido à dislipidemia. A presença de XP possibilita identificação e tratamento visando prevenir aterosclerose que, em nosso país, atinge proporções epidêmicas.⁽¹⁰⁵⁾

Neste estudo, os polimorfismos de apo E, apoB e LDLR e os níveis séricos de CT, HDL-c e LDL-c foram distribuídos de forma semelhante em indivíduos com xantelasma e controles. Isso reforça a possibilidade de

alterações locais de perfil lipídico com um depósito de lipídios somente em locais dermatológicos.^(3,106)

Em nossa série, as distribuições alélicas e genótípicas do polimorfismo apo E *HhaI* foram similares em indivíduos com xantelasma e controles, não tendo associação com o perfil lipídico em cada grupo. Esses resultados são similares aos encontrados por Gomez *et al.*⁽⁴⁵⁾ Por outro lado, eles diferem daqueles obtidos por Ribera *et al.*⁽⁴¹⁾ que detectaram aumento significativo da frequência do genótipo *APOE**3/4 em pacientes com xantomatose e perfil lipídico alterado. Além disso, a presença do alelo *APOE**2 mostrou ser um fator relacionado a níveis significativamente mais elevados de TG e mais baixos de CT e LDLc em indivíduos controles quando comparado com pacientes.⁽¹⁰⁷⁾ Isso intensifica controvérsia sobre o efeito protetor contra manifestações cardiovasculares conferidos por esse alelo.⁽¹⁰⁸⁾

Este estudo mostrou semelhanças entre os grupos quando se considera frequências alélicas e combinações genótípicas de polimorfismos apoB *XbaI* e *Ins/del*. Houve leve diferença na distribuição genotípica observada para apoB *XbaI* ($p=0,02-0,05$) em relação ao esperado na hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo de pacientes.

A análise de regressão logística multivariada com critério *stepwise* revelou associação entre presença do alelo apo Bx+ e menos chance de aumento de CT e LDLc no grupo controle, contrariando resultados obtidos por Series *et al.*⁽¹⁰⁹⁾

Indivíduos brasileiros com xantelasma, que eram portadores do alelo apoB-D, apresentaram menos chance de sofrer aumento nos níveis de LDLc,

sugerindo sua associação com o perfil lipídico como já relatado por Hansen *et al.*⁽¹¹⁰⁾ na Dinamarca. No entanto, associações não foram detectadas em outros estudos.^(69,111)

Polimorfismos RLDL *Ava II* e *Hinc II* não discriminaram grupos por sua distribuição alélica ou genotípica e não influenciaram no perfil lipídico. Resultados controversos foram verificados em indivíduos tailandeses por Pongrapeeporn *et al.*⁽⁸⁸⁾ quanto à presença de genótipo A+A+ associado a níveis mais elevados de CT e TG, e mais baixos de HDLc. Além disso, Salazar *et al.*⁽¹⁹⁾ constataram aumento de CT e LDLc em portadores brasileiros de genótipo H+H+.

Em conclusão, nossos dados mostram que polimorfismos apo E, apoB e RLDL não estão associados a uma predisposição para xantelasma palpebral. No entanto, polimorfismos apo B distintos são apontados como fatores de risco para alterações do perfil lipídico em indivíduos com xantelasma (apoB d) e controles (apoB x+).

Pesquisas sobre a biologia celular e histologia da pálpebra são necessárias, pois o conhecimento sobre alterações locais no endotélio de pacientes com xantelasma palpebral pode contribuir para melhor compreensão da etiologia e fisiopatologia dessa lesão dermatológica. Essas informações associadas a fatores bioquímicos e ou genéticos podem ampliar o arsenal terapêutico com enfoque multidisciplinar e também sinalizar possíveis indicadores de fatores de risco cardiovascular.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

1- Xantelasma palpebral prevalece em indivíduos do sexo feminino, sendo a sexta década de vida a mais acometida;

2- Xantelasma palpebral do tipo placa, de coloração amarelo claro, acometimento bilateral, localização bilateral superior e extensão palpebral proximal superior é mais frequente;

3- O tempo médio de aparecimento do xantelasma palpebral relatado é aproximadamente 5 anos, sendo assintomático para maioria deles;

4- Níveis séricos de CT, VLDL-c e TG podem mostrar-se alterados em pacientes com xantelasma palpebral;

5- A distribuição de polimorfismos de apo E, apo B e RLDL e os níveis séricos de CT, HDL-c e VLDL-c foi semelhante em indivíduos com xantelasma palpebral e controles;

6- Polimorfismos apo E, apo B e RLDL não estão associados ao perfil lipídico de pacientes com xantelasma palpebral.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Faludi AA, Bertolami MC. Como diagnosticar e tratar as dislipidemias. Rev Bras Med 1998;55:6-11.
- 2- Schaefer E, Santos R. Xanthomatoses and lipoprotein disorders. In: Goldsmith LA, Katz SI, Glichrest BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 8th ed. Springer: New York; 2012. p. 1804-11.
- 3- Bergman R. The pathogenesis and clinical significance of xanthelasma palpebrarum. J Am Acad Dermatol 1994;30:236-42.
- 4- Bagatin E, Enokihara MY, de Souza PK, Macedo FS. Xantelasma: experiência no tratamento de 40 pacientes. An Bras Dermatol 2000;5:705-13.
- 5- Pandhi D, Gupta P, Singal A, Tondon A, Sharma S, Madhu SV. Xanthelasma palpebrarum: a marker of premature atherosclerosis (risk of atherosclerosis in xanthelasma). Postgrad Med J 2012;88:198-204.
- 6- Dey A, Aggarwal R, Dwivedi S. Cardiovascular profile of xanthelasma palpebrarum. Biomed Res Int 2013;2013:932863.
- 7- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hipercholesterolaemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, editores. The metabolic and molecular basis of inherited disease. McGraw-Hill: New York; 1995. p. 1981-2030.
- 8- Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: The Framingham Study. Am J Med 1984;76:4-12.

- 9- Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality 30 years of follow-up from the Framingham Study. *JAMA* 1987;257:2176-80.
- 10- Naito HK. Coronary artery disease and disorders of lipid metabolism. In: Kaplan LA, Pesce AJ, editores. *Clinical chemistry theory, analysis, correlation*. Mosby: St Louis; 1996. p. 642-81.
- 11- Salazar LA, Hirata MH, Cavalli AS, Nakandakare ER, Forti N, Diament J, et al. Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: identification of seven model LDLR gene mutations. *Hum Mutat* 2002;19:462-3.
- 12- Haberland ME, Fogelman AM. The role of altered lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am Heart J* 1987;79:1712-6.
- 13- De Oya M. Teoria lipídica da la aterosclerosis. *Rev Clin Esp* 1988;182:39-43.
- 14- Kumari M, Grahame-Clarke C, Shanks N, Marmot M, Lightman S, Vallance P. Chronic stress accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse. *Stress* 2003;6:297-9.
- 15- Doherty TM, Fitzpatrick LA, Shaheen A, Rajavashisth TB, Detrano RC. Genetic determinants of arterial calcification associated with atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2004;79:197-210.
- 16- Galton DJ. Genetic determinants of atherosclerosis-related dyslipidemias and their clinical implications. *Clin Chim Acta* 1997;257:181-97.
- 17- Suzuki K, Kuriyama M, Saito T, Ichinose A. Plasma lipoprotein (a) levels and expression of the apolipoprotein (a) gene are dependent on the nucleotide polymorphism in its 5' – flanking region. *J Clin Invest* 1997;99:1361-6.

- 18- Gyling H, Kontula K, Koivisto UM, Miettinen HE, Miettinen TA. Polymorphisms of the genes encoding apoproteins A-I, B, C-III and E and LDL receptor, and cholesterol and LDL metabolism during increase cholesterol intake: common alleles of the apoprotein E gene show the greatest regulatory impact. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:38-44.
- 19- Salazar LA, Hirata MH, Giannini SD, Forti N, Diament J, Issa JS, et al. Effects of Ava II and Hinc II polymorphisms at the LDL receptor gene on serum lipid levels of Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease. *J Clin Lab Anal* 1999;13:251-8.
- 20- Scartezini M, Zago MA, Chautard-Freire-Maia EA, Pazin-Filho A, Marin-Neto JA, Hotta HKS, et al. The X-X-/E+E+ genotype of the Xba I/Eco R I polymorphisms of the apolipoprotein B gene as a marker of coronary artery disease in a Brazilian sample. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:369-75.
- 21- Guzmán ECR, Hirata MH, Quintão ECR, Hirata RDC. Association of the apolipoprotein B gene polymorphism with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with lipid profile of high risk for coronary heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:731-6.
- 22- Cavalli SA, Hirata MH, Salazar LA, Diament J, Giannini SD, Forti N, et al. Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact of serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. *Clin Chim Acta* 2000;302:189-203.
- 23- Machado MO, Hirata MH, Bertolami MC, Hirata RDC. Apo B gene haplotype is associated with lipid profile of higher risk for coronary heart disease in Caucasian Brazilian men. *J Clin Lab Anal* 2001;15:19-24.

- 24- Talmud PJ, Hawe E, Miller GJ, Humphries SE. Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1918-23.
- 25- Humphries S, Coviello DA, Masturzo P, Balestreri R, Orecchini G, Bertolini S. Variation in the low density lipoprotein receptor gene is associated with differences in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in young and old normal individuals from Italy. *Arterioscler Thromb* 1991;11:509-16.
- 26- Hirashiki A, Yamada Y, Murase Y, Suzuki Y, Kataoka H, Morimoto Y, et al. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low- or high-risk subjects defined by conventional risk factors. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1429-37.
- 27- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Artherosclerosis* 1988;8:1-21.
- 28- Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet* 1999;63:301-10.
- 29- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SCJr, Weisgraber KH. Apolipoprotein E: genetic variants provides insights into structure and function. *Curr Opin Lipidol* 1990;1:87-95.
- 30- Dergunov AD, Rosseneu M. The significance of apolipoprotein E structure to the metabolism of plasma triglyceride-rich lipoprotein. *J Biol Chem* 1994;375:485-95.
- 31- Beisegel U, Webwr W, Iherke G, Stanley KK. The LDL receptor-related protein. LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 1989;341:162-4.

- 32- Kim JS, Han SR, Chung SW, Kim BS, Lee KS, Kim YI, et al. The apolipoprotein E epsilon4 haplotype is an important predictor for recurrence in ischemic cerebrovascular disease. *J Neurol Sci* 2003;206:31-7.
- 33- Liberopoulos E, Siamopoulos K, Elisaf M. Apolipoprotein E and renal disease. *Am J Kidney Dis* 2004;43:223-33.
- 34- Souza DRS, De Godoy MR, Hotta J, Tajara EH, Brandão AC, Pinheiro Júnior S, et al. Association of apolipoprotein E polymorphism in late-onset Alzheimer's disease and vascular dementia in Brazilians. *Braz J Med Biol Res* 2003b;36:919-23.
- 35- Kuller LH, Lopez OL, Newman A, Beauchamp NJ, Burke G, Dulberg C, et al. Risk factors for dementia in the cardiovascular health cognition study. *Neuroepidemiology* 2003;22:13-22.
- 36- Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of lipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature* 1977;269:604-7.
- 37- Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* 1981;33:11-34.
- 38- Ruiz J, Kouivaskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, et al. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res* 2005;46:1721-31.
39. Kolovou G, Daskalova D, Mikhailidis DP. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Angiology* 2003;54:59-71.

- 40- Tsunoda K, Harihara S, Dashnyam B, Semjidmaa D, Yamaguchi Y, Tanabe Y, et al. Apolipoprotein E and H polymorphisms in Mongolian Buryat: allele frequencies and relationship with plasma lipid levels. *Hum Biol* 2002;74:659-71.
- 41- Ribera M, Pinto X, Argimon JM. Lipid metabolism and apolipoprotein E phenotypes in patients with xanthelasma. *Am J Med* 1995;99:485-90.
- 42- Nakazone MA, De Marchi MA, Pinhel MA, Godoy MF, Souza DRS. Associação de apolipoproteína-E e perfil lipídico em famílias com portadores de xantomas ou xantelasma palpebral. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2003;13:27.
- 43- Nakazone MA, De Marchi MA, Pinhel MA, Araújo M, Sorkin S, Hirata MH, et al. Polimorfismos Ava II e Hinc II do gene receptor de LDL e perfil lipídico em portadores de xantomas ou xantelasma palpebral. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2004;14:26.
- 44- Alonso-Villaverde C, Sarda P, Vallbe JC, Heras M, Perez-Jimenez F, Pedro-Botet JC, et al. Clinical manifestations of familial hypercholesterolemia in Mediterranean population. *Med Clin* 1999;113:521-5.
- 45- Gómez JA, González MJ, de Moragas JM, Serrat J, González-Sastre F, Pérez M. Apolipoprotein E phenotypes, lipoprotein composition, and xanthelasmas. *Arch Dermatol* 1988;124:1230-4.
- 46- Brown MS, Goldstein JL. Receptor mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 1976;191:150.

47. Vrablik M, Ceska R, Horinek A. Major apolipoprotein B-100 mutations in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Physiol Res* 2001;50:337-43.
48. Ludwig EH, Hopkins PN, Allen A, Wu LL, Williams RR, Anderson JL, et al. Association of genetic variations in apolipoprotein B with hypercholesterolemia, coronary artery disease, and receptor binding of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1997;38:1361-73.
- 49- Sniderman AD, St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Despres JP, Lamarche B. Concordance/discordance between plasma apolipoprotein B levels and the cholesterol indexes of atherosclerotic risk. *Am J Cardiol* 2003;91:1173-7.
- 50- Souza DRS, Barros CFDC, Nakazone MA, Pinhel MA, Araújo M, Godoy MF, et al. Variantes genéticas de apolipoproteína B em pacientes com xantomatoses e seus familiares. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2004;14:78.
- 51- Kaiser M, Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M. Intima-media thickness and atherosclerotic plaques in familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967:528-34.
- 52- Cerqueira EM. Dislipidemias e genética. In: Martinez TLR, editor. *Manual de condutas clínicas em dislipidemias*. Editora Medline: Rio de Janeiro; 2003. p. 111-20.
- 53- Malek G, Li CM, Guidry C, Medeiros NE, Curcio CA. Apolipoprotein B in cholesterol-containing drusen and basal deposits of human eyes with age-related maculopathy. *Am J Pathol* 2003;162:413-25.

- 54- Tybjaerg-Hansen A. Rare and common mutations in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55:57-76.
- 55- Cabezas Castro M, Liem A. The use of apolipoprotein B in clinical practice to determine the risk for atherosclerosis. *Ned Tijdschr Geneesk* 2003;147:1445-8.
56. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002;417:750-4.
57. Gustafsson M, Flood C, Jirholt P, Boren J. Retention of atherogenic lipoproteins in atherogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:4-9.
- 58- Fernandez V, Morales LM, Molero-Conejo E, Casanova A, Campos G, Raleigh X, et al. Levels of apoproteins B, A1 and CIII as markers for cardiovascular risk in lean and obese adolescents. *Invest Clin* 2004;45:29-42.
- 59- Ashavaid TF, Shalia KK, Kondkar AA, Todur SP, Nair KG, Nair SR. Gene polymorphism and coronary risk factors in Indian population. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:975-85.
- 60- Puri RD, Tewari S, Sinha N, Ramesh V, Khan F, Singh VP, et al. Polymorphisms in the apolipoprotein B-100 gene: association with plasma lipid concentration and coronary artery disease. *Indian Heart J* 2003;55:60-4.
- 61- Sakuma T, Hirata RD, Hirata MH. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. *J Clin Lab Anal* 2004;18:309-16.

- 62- Renges HH, Peacock R, Dunning AM, Talmud P, Humphries SE. Genetic relationship between the 3'-VNTR and diallelic apolipoprotein B gene polymorphism: haplotype analyses in a individuals of European and South Asian origin. *Hum Genet* 1992;56:11-33.
- 63- Peacock R, Dunning A, Hamsten A, Tornvall P, Humphries S, Talmud P. Apolipoprotein B gene polymorphisms, lipoproteins and coronary atherosclerosis: a study of young myocardial infarction survivors and healthy population-based individuals. *Atherosclerosis* 1992;92:151-64.
- 64- Chiodini BD, Barlera S, Franzosi MG, Beceiro VL, Inrona M, Tognoni G. APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2003;167:355-66.
- 65- Boekholdt SM, Peters RJ, Fountoulaki K, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Molecular variation at the apolipoprotein B gene locus in relation to lipids and cardiovascular disease: a systematic meta-analysis. *Hum Genet* 2003;113:417-25.
- 66- Han T, Jiang Z, Suo G, Zhang S. Apolipoprotein B-100 gene *Xba* I polymorphism and cholesterol gallstone disease. *Clin Genet* 2000;57:304-8.
- 67- Visvikis S, Chan L, Siest G, Drouin P, Boerwinkle E. An insertion deletion polymorphism in the signal peptide of the human apolipoprotein B gene. *Hum Genet* 1990;84:373-5.
- 68- Iatsyshina SB, Moliaka IUK, Karpova SK, Chekhranova MK, Popova IuP, Grigorian ON, et al. Study of the association between constitutional exogenous obesity and polymorphism of the apolipoprotein B gene. *Genetika* 2002;38:285-8.

- 69- Jemaa R, Mebazaa A, Fumeron F. Polymorphism insertion/deletion of apolipoprotein B gene: effect on lipid levels in obese patients. *Ann Biol Clin* 2004;62:183-8.
- 70- Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, et al. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 1984;39:27-38.
- 71- Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 1985;228:815-22.
- 72- Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus and familial hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein. *Ann Rev Genet* 1990;24:133-70.
- 73- Brown MS, Goldstein JL. Are receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis? *Science* 1986;232:34-47.
- 74- Larsson SL, Skogsberg J, Björkegren J. The low density lipoprotein receptor prevents secretion of dense apoB100-containing lipoproteins from the liver. *J Biol Chem* 2004;279:831-6.
- 75- Bujo H, Takahashi K, Saito Y, Maruyama T, Yamashita S, Matsuzawa Y, et al. Clinical features of familial hypercholesterolemia in Japan in a database from 1996-1998 by the research committee of the ministry of health, labour and welfare of Japan. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:146-51.
- 76- Garcia-Alvarez I, Castillo S, Mozas P, Tejedor D, Reyes G, Artieda M, et al. Differences in clinical presentation between subjects with a phenotype of familial hypercholesterolemia determined by defects in the LDL-receptor and defects in Apo B-100. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:769-74.

- 77- Naoumova RP, Neuwirth C, Lee P, Miller JP, Taylor KG, Soutar AK. Autosomal recessive hypercholesterolaemia: long-term follow up and response to treatment. *Atherosclerosis* 2004;174:165-72.
- 78- Hu B, Li D, Sawamura T, Mehta JL. Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:1008-12.
- 79- Kornerup K, Nordestgaard BG, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen KS, Jensen JS. Increased transvascular low density lipoprotein transport in insulin dependent diabetes: a mechanistic model for development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170:163-8.
- 80- Salazar LA, Hirata MH, Giannini SD, Forti N, Diament J, Lima TM, et al. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2000;300:139-49.
- 81- Bertolini S, Coviello D, Masturzo P, Zuccheto E, Elicio N, Balestreri R, et al. RFLPs of the LDL-receptor gene: their use in the diagnosis of FH and evaluation of different levels of gene expression on normal subjects. *Eur J Epidemiol* 1992;8:18-25.
- 82- Pawlicki L, Kajdos J, Pokoca L, Zeman K, Irzmanski R, Ceglinski T, et al. LDL-receptors expression on peripheral blood monocytes in various clinical types of atherosclerosis, depending on LDL concentration in serum. *Pol Merkuriusz Lek* 2003;14:431-5.
- 83- Hobbs H, Esser V, Russell. Ava II polymorphism in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Res* 1987;15:379.

- 84- Daga A, Mattioni T, Balestreri R, Coviello DA, Corte G, Bertolini S. Use of three DNA polymorphisms of the LDL receptor gene in the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet* 1990;84:412-6.
- 85- Hobbs H, Brown M, Goldstein J. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
- 86- Chaves FJ, Puig O, Garcia-Sogo M, Real J, Gil JV, Ascaso J, et al. Seven DNA polymorphisms in the LDL receptor gene: application to the study of familial hypercholesterolemia in Spain. *Clin Genet* 1996;50:28-35.
- 87- Ahn YI, Kasbah IM, Aston CE, Ferrell RE, Hamman RF. Role of common genetic polymorphisms in the LDL receptor gene in affecting plasma cholesterol levels in the general population. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:663-70.
- 88- Pongrapeeporn KU, Pimsawat T, Likidlilid A, Poldee S, Yamwong P, Amornrattana A, et al. Effect of Ava II and Nco I polymorphisms at the low density lipoprotein receptor gene on plasma lipid levels in a group of Thai subjects. *J Med Assoc Thai* 2000;83:S74-80.
- 89- Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24-7.
- 90- Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973;19:476-82.
- 91- Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-5.

- 92- III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2001;77:1-48.
- 93- Gustincich S, Manfiolett GG, Del San G. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *BioTechniques* 1991;11:298-301.
- 94- Hixson JP, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J Lipid Res* 1990;31:545-8.
- 95- Renges HH, Wile DB, McKeigue PM, Marmot MG, Humphries SE. Apolipoprotein B gene polymorphism are associated with lipid levels in men of south Asian descent. *Atherosclerosis* 1991;91:267-75.
- 96- Boerwinkle E, Lee SS, Butler R, Schumaker VN, Chan L. Rapid typing of apolipoprotein B DNA polymorphisms by DNA amplification. *Atherosclerosis* 1990;81:225-32.
- 97- Chapman RW, Brown BL. Two methods to detect DNA fragments produced by restriction enzymes. *Anal Biochem* 1989;177:199-202.
- 98- Jónsson A, Sigfusson N. Significance of xanthelasma palpebrarum in the normal population. *Lancet* 1976;1:372.
- 99- Gonçalves CP. Pálpebras e suas alterações. In: Gonçalves CP, editor. *Oftalmologia*. Atheneu: Rio de Janeiro; 1979. p. 473.
- 100- Jain A, Goyal P, Nigam PK, Gurbaksh H, Sharma RC. Xanthelasma palpebrarum: clinical and biochemical profile in a tertiary care hospital of Delhi. *Indian J Clin Biochem* 2007;22:151-3.

- 101- Rohrich RJ, Janis JE, Pownell PH. Xanthelasma palpebrarum: a review and current management principles. *Plast Reconstr Surg* 2002;110:1310-4.
- 102- Miranda Ah, Yamashita S, Mantoanelli D. Xantelasma palpebral: relato de um caso. *Radiol Bras* 2001;34:117-8.
- 103- Depot MJ, Jakobiec FA, Dodick JM, Iwamoto T. Bilateral and extensive xanthelasma palpebrarum in a young man. *Ophthalmology* 1984;91:522-7.
- 104- Pereira FJ, Cruz AAV, Guimarães Neto HP, Ludvig CC. Blefaroplastia associada à enxertia de pele autóloga para xantelasma palpebrals extensos: relato de caso. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71:592-4.
- 105- Brasil. Ministério da Saúde. Datasus. Banco de dados do Sistema Único de Saúde. 2013; <http://www.datasus.org.br>.
- 106- Bergman R, Kasif Y, Aviram M, Maor I, Ullman Y, Gdal-On M, et al. Normolipidemic xanthelasma palpebrarum: lipid composition, cholesterol metabolism in monocyte-derived macrophages, and plasma lipid peroxidation. *Acta Derm Venereol* 1996;76:107-10.
- 107- Eto M, Watanabe K, Ishii K. Reciprocal effects of apolipoprotein E alleles (epsilon 2 and epsilon 4) on plasma lipid levels in normolipidemic subjects. *Clin Genet* 1986;29:477-84.
- 108- Yang SL, He BX, Liu HL, He ZY, Zhang H, Luo JP, et al. Apolipoprotein E gene polymorphisms and risk for coronary artery disease in Chinese Xinjiang Uygur and Han population. *Chin Med Sci J* 2004;19:150-4.

- 109- Series JJ, Gaffney D, Packard CJ. Frequency of the XBA 1, Eco RI, PVU II and MSp I polymorphism of the apolipoprotein B gene in relation to hypercholesterolemia in the general population. *Clin Chim Acta* 1994;251:89-98.
- 110- Hansen PS, Gerdes LU, Klausen IC, Gregersen N, Faergeman O. Polymorphism in the apolipoprotein B-100 gene contributes to normal variation in plasma lipids in 464 danish men born in 1948. *Hum Genet* 1993;91:45-50.
- 111- Gaffney D, Freeman DJ, Shepherd J, Packard CJ. The ins/del polymorphism in the signal sequence of apolipoprotein B has no effect on lipid parameters. *Clin Chim Acta* 1993;218:131-8.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Identificação

Nome:			Nasc.:	/	/
Estado Civil:		Profissão:		Idade:	
Endereço (Rua ou Av.):				n.º	
Bairro:		Cidade:		Estado:	
Telefone Casa:			Celular:		
Data:	/	/	CAT:		

Queixas principais/HMA

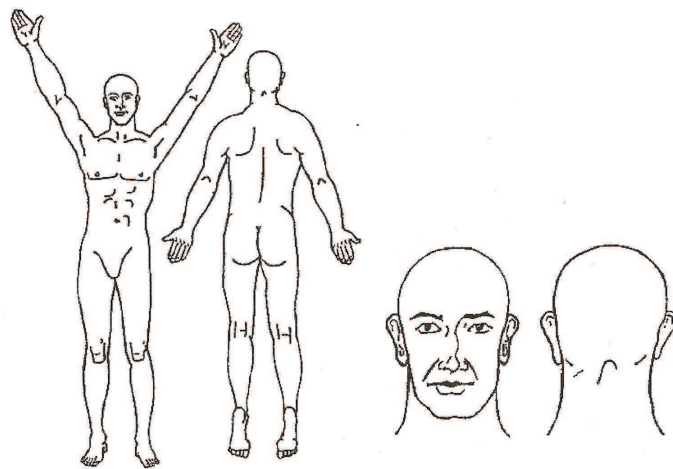
Antecedentes pessoais e familiares

Exame Dermato e Geral

PA: _____

FC: _____

SATO2: _____



Diagnóstico – Conduta – Retorno

APÊNDICE 2

Soluções e reagentes utilizados na extração de DNA e seu procedimento

Solução de lise - DTAB a 12%

DTAB -----12g
NaCl -----13,15g
*Tris HCl 2M pH 8,6 -----7,5mL
* EDTA 0,4M -----18,75mL
Água deionizada qsp-----100mL

Observação: A dissolução do DTAB é facilitada por aquecimento em banho-maria e agitação magnética (40°C) por cerca de 40 minutos. Em seguida, é filtrada e completada até 100mL com água deionizada e armazenada em temperatura ambiente.

*Soluções previamente preparadas, mantidas em estoque.

Solução de precipitação protéica - CTAB a 5%

CTAB -----5g
NaCl 0,4M qsp -----100mL

Observação: A dissolução de CTAB é facilitada por aquecimento e agitação magnética. A solução é armazenada em temperatura ambiente.

EDTA 0,4M

EDTA -----148,89g
Água deionizada qsp -----1000mL
Armazenar a 4°C.

Etanol 70%

Etanol absoluto -----70mL
Água deionizada qsp -----100mL
Armazenar em temperatura ambiente.

NaCl 0,4M

NaCl -----23,37g

Água deionizada-----1000mL

NaCl 1,2M

NaCl -----70g

Água deionizada -----1000mL

TRIS HCl 2M pH 8,6

TRIS ----- 242,28g

Água deionizada qsp -----1000mL

Ajustar o pH com HCl fumegante.

APÊNDICE 3

Procedimento para extração do DNA de sangue periférico

- a) Centrifugar o material a 2.500 rpm por 10 minutos, no mesmo tubo de vacutainer com anticoagulante EDTA usado para a coleta de sangue, ou transferir da seringa para o tubo de centrifuga de 15 mL estéril.
- b) Descartar o sobrenadante (plasma), deixando cerca de 1mL sobre a camada de leucócitos que permanece entre o plasma (fase superior) e as hemácias (fase inferior).
- c) Aspirar a camada de leucócitos, juntamente com plasma restante e cerca de 0,5 mL de hemácias, totalizando 500µL já programados na micropipeta P 1000, e transferi-la para tubo de Eppendorf de 2mL estéril.
- d) Adicionar 500µL de DTAB a 12% e homogeneizar a mistura por inversão do tubo por cerca de 15 segundos.
- e) Incubar a mistura em banho-maria a 70°C por 5 minutos.
- f) Adicionar 900µL de clorofórmio e homogeneizar imediatamente o tubo por inversão durante 15 segundos.
- g) Centrifugar a solução a 5.000 rpm por 5 minutos, sendo formadas 3 camadas.
- h) Transferir o sobrenadante para o tubo de Eppendorf novo ao qual são acrescentados 100µL de CTAB a 5% e 900 µL de água Milli Q estéril.
- i) Homogeneizar o material por inversão vagarosa do tubo até a formação do precipitado. Em caso de ausência do precipitado, distribuir a solução em 2 tubos de Eppendorf e acrescentar 300µL de água. Em seguida homogeneizar o material por inversão do tubo.
- j) Centrifugar a mistura a 5.000 rpm por 5 minutos e desprezar o sobrenadante.
- k) Dissolver o precipitado em 300µL de NaCl 1,2M gelado.
- l) Adicionar 750µL de etanol 90% ou absoluto à temperatura ambiente.
- m) Homogeneizar o material para precipitação do DNA e a centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos.
- n) Desprezar o sobrenadante invertendo-se o tubo de Eppendorf diretamente no recipiente com hipoclorito de sódio.

- o) Lavar o DNA precipitado com 750 μ L de etanol 70% e centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos.
- p) Descartar o etanol e manter o DNA à temperatura ambiente *overnight* para secagem.
- q) Hidratar o DNA em 200 μ L de água Milli Q estéril, usando o Vortex por 20 segundos ou apenas batendo delicadamente no fundo do tubo.
- r) Determinar a concentração de DNA em espectrofotômetro com leitura a 260nm, e a 280nm para concentração de proteínas.

ANEXOS

ANEXO 1



Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos
CEP/FAMERP

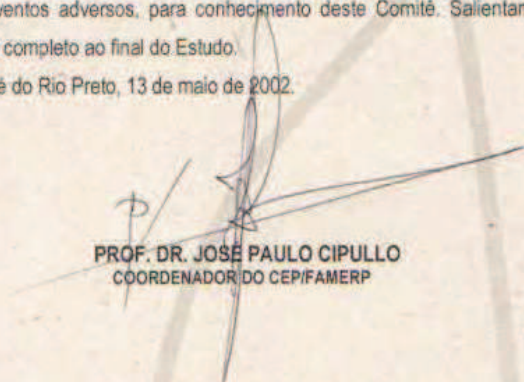
Parecer n.º 062/2002

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 2277/2002 sob a responsabilidade de Miguel Angelo de Marchi, com o título "Variantes genéticas de apolipoproteínas B e E e receptor de Ldl em pacientes com Xantomas e ou Xantelasmas e seus familiares", está de acordo com a Res. CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 13 de maio de 2002.


PROF. DR. JOSÉ PAULO CIPULLO
COORDENADOR DO CEP/FAMERP