

Associação dos Fenótipos da Haptoglobina com os Lípidos e Apolipoproteínas Séricas numa População Infantil de 24 Meses

A. J. M. GUERRA ¹, E. M. B. CASTRO ², F. CARVALHO GUERRA ², C. REGO ¹, C. MONTEIRO ³, A. PRATA ¹,
D. SILVA ¹, M. BICHO ⁴, N. TEIXEIRA SANTOS ¹

¹ Departamento de Pediatria – H. S. João / Faculdade de Medicina do Porto

² Serviço de Bioquímica Clínica / Faculdade de Farmácia do Porto

³ Laboratório de Bioquímica / Faculdade de Motricidade, Humana de Lisboa

⁴ Laboratório de Genética / Faculdade de Medicina de Lisboa

Resumo

A aterosclerose e a hipertensão arterial iniciam-se precocemente na idade pediátrica, ainda que as expressões clínicas da doença cardio-cérebro-vascular se manifestem apenas na idade adulta. É objectivo primordial de numerosos estudos transversais e prospectivos a identificação dos principais factores risco, quer genéticos quer ambientais, relativamente ao processo aterosclerótico de modo a traçar estratégias de intervenção individual e comunitária que visem a diminuição da morbidade e mortalidade por patologia cardiovascular. Assim é objectivo do presente trabalho investigar na idade pré-escolar, o comportamento do colesterol total e fracções bem como de outros parâmetros lipídicos do soro tendo em conta a expressão fenotípica da haptoglobina.

População e Métodos: a população é constituída por cinquenta e cinco crianças com 24 meses de vida. Foram incluídos no estudo crianças nascidos de termo, com um peso adequado à idade gestacional, sem qualquer patologia, nascidos na maternidade do nosso hospital durante um período de dois meses, sem história de complicações ou de medicação crónica durante a gestação. Procedeu-se à avaliação antropométrica (peso e comprimento) ao registo dos hábitos alimentares (frequência alimentar e dieta das 24 horas) e à avaliação de parâmetros biológicos, genéticos (fenotipagem da haptoglobina) e bioquímicos (lípidos e apolipoproteínas séricas).

Resultados: não se registaram diferenças significativas entre os valores do colesterol total, do colesterol das LDL e das apolipoproteínas A₁ e B entre os portadores do alelo 1 e do alelo 2.

Conclusões: os autores concluem que o polimorfismo da haptoglobina não está nesta população significativamente associado aos níveis séricos de colesterol, colesterol das LDL e apolipoproteínas A₁ e B, estando prevista a reavaliação das crianças em idade posterior.

Palavras-chave: Colesterol total e colesterol das HDL e LDL. Apolipoproteínas A₁ e B; Fenótipos da Haptoglobina.

Summary

Atherosclerosis and high blood pressure begins in early childhood although the clinical expression of cardiovascular disease occurs later in adult life. The main purpose of many transversal and longitudinal studies is to screen for genetic and environment risk factors of atherosclerosis in order to program individual and community strategies of prevention of cardiovascular related morbidity and mortality. The objective of the present study is to prospectively investigate the lipid profile according to haptoglobin phenotypes in pre-school children.

Population and Methods: 54 children, 24 month of age were included in the study. This cohort was selected from children born at term in a two months period at the obstetrics department of our Hospital with appropriate weight and no pathology. Protocol included anthropometric evaluation, food habits recall (food frequency and 24-hour recall), genetics (haptoglobin) and biochemistry parameters (lipid profile).

Results: no significant differences were observed in lipids parameters (total cholesterol, LDL and HDL cholesterol, Apo A1 and Apo B), between haptoglobin phenotypes (allele 1 and 2) and after correction for nutrient intake.

Conclusions: The authors conclude that haptoglobin phenotypes in this population, are not related to serum level of total and cholesterol fractions or Apo A1 and Apo B. Further reviews at older age are planned to confirm the results.

Key-words: HDL, LDL and total cholesterol; Apolipoproteins Apo A1 and Apo B; Haptoglobin phenotypes.

Introdução

A aterosclerose e a hipertensão arterial iniciam-se precocemente na idade pediátrica, ainda que as expressões clínicas da doença cardio-cérebro-vascular se manifestem apenas na idade adulta ⁽¹⁻⁴⁾.

A mortalidade e morbidade dependente da patologia cardio-cérebro-vascular é extremamente elevada nos países industrializados, particularmente quando comparada com as dos países em vias de desenvolvimento.

É objectivo primordial de numerosos estudos transversais e prospectivos a identificação dos principais factores risco, quer genéticos quer ambientais, relativamente ao processo aterosclerótico de modo a traçar estratégias de intervenção individual e comunitária que visem a diminuição da morbidade e mortalidade por patologia cardiovascular ^(5, 6).

Tem sido estudado na idade adulta, o valor predictivo relativo aos valores do colesterol sérico de alguns genes polimorfos. Destes, a haptoglobina tem sido particularmente estudada não sendo todavia os resultados consensuais. Parece-nos importante o estudo de outras variáveis lipídicas e lipoproteínas do sôro que desde os primeiros anos de vida possam revelar uma maior relação de interdependência com alguns genes polimorfos que a descrita para o colesterol sérico.

Pretende-se com o presente trabalho investigar na idade pré-escolar, o perfil lipídico do sôro tendo em conta a expressão fenotípica da haptoglobina.

População e Métodos

1. População

A população é constituída por cinquenta e cinco crianças com 24 meses de vida.

2. Selecção da amostra

Foram incluídos no estudo os recém-nascidos de termo, com um peso adequado à idade gestacional, sem qualquer patologia, nascidos na maternidade do Hospital de S. João durante um período de dois meses, sem história de complicações ou de medicação crónica durante a gestação. Todos os recém-nascidos incluídos na investigação tiveram o consentimento expresso dos seus progenitores. O trabalho foi previamente aprovado pelo Comité de Ética do nosso hospital.

3. Dispositivo operacional do trabalho

As crianças incluídas no estudo foram avaliadas ao nascer, mensalmente durante o primeiro semestre de vida e posteriormente trimestralmente até completarem 24 meses.

O protocolo de estudo incluiu as seguintes avaliações:

3.1 Avaliação antropométrica e do estado de nutrição

Para a avaliação dos parâmetros antropométricos, utilizámos metodologia e técnicas, internacionalmente recomendadas ⁽⁷⁾.

Procedemos na criança à avaliação entre outros, do peso e comprimento e ao cálculo do índice de massa corporal ⁽⁸⁾.

Utilizámos como padrões de referência para o peso e a estatura as tabelas do «National Center of Health Statistics» ⁽⁹⁾ e ainda as de Hammer para o índice de massa corporal ⁽¹⁰⁾.

3.2 Avaliação de parâmetros biológicos

3.2.1 Genéticos: A fenotipagem da haptoglobina foi feita pelo método de electroforese em gel de poliacrilamida modificado ⁽¹¹⁾.

3.2.2 Lipídicos: Procedeu-se à avaliação do colesterol total, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade, apolipoproteínas A1 e B de acordo com metodologia laboratorial internacionalmente recomendada ⁽¹²⁻¹⁵⁾.

3.3 Avaliação dos hábitos alimentares

O preenchimento do protocolo de inquérito fez-se através das respostas obtidas, quer das mães, quer de outros familiares presentes. Procedeu-se à recolha da dieta de 24 horas bem como ao registo da frequência alimentar. Foram utilizados modelos alimentares, de modo a facilitar a recolha dos dados e a quantificação dos resultados ^(16, 17).

Para a conversão dos alimentos em calorias e nos principais nutrientes analisados, foi utilizada a Tabela Inglesa de Widdowson e McCance ⁽¹⁸⁾.

Como padrão das necessidades energéticas e em nutrientes, utilizámos as «Recommended Dietary Allowances (RDA's) – US Food and Nutrition Board (FNB)» ⁽¹⁹⁾.

3.4 Avaliação dos antecedentes patológicos familiares

Através de um questionário específico, recolheram-se, por entrevista directa aos progenitores, informações referentes à sua idade e à dos avós, e, à existência ou não, de patologia cardio-cérebro-vascular.

3.5 Tratamento estatístico

Os resultados foram agrupados e analisados estatisticamente utilizando-se para o estudo comparativo o teste do qui quadrado e análise de variância (ANOVA). Definiu-se significado estatístico para os valores de p inferiores a 0,05.

Resultados

A avaliação antropométrica e do estado de nutrição mostrou valores sobreponíveis nos diferentes fenótipos de haptoglobina (Quadro 1). Os resultados referentes aos

parâmetros lipídicos do sêro, agrupados tendo em conta os fenótipos da haptoglobina, estão expressos no Quadro 2. A frequência dos portadores do alelo 1 (homo e heterozigotos) e do alelo 2 (homozigotos), foi respectivamente de 71,1% (n=40) e 28,9% (n=14) (Quadro 2).

QUADRO 1
Avaliação antropométrica e do estado de nutrição: média e erro-padrão da média (EPM) em função do fenótipo da haptoglobina

Antropometria	Hp 2.1 e 1.1 (n=40)		Hp 2.2 (n=14)		F	P
	Média	EPM	Média	EPM		
Peso (Kg)	12,97	0,35	12,46	0,49	0,351	0,708
Estatura (cm)	87,4	0,71	85,6	0,49	1,144	0,332
In. Massa Corporal	16,89	0,35	16,93	0,49	0,051	0,951

QUADRO 2
Parâmetros lipídicos do sêro: média e erro-padrão da média (EPM) em função do fenótipo da haptoglobina. Correção para o suprimento alimentar em gordura total, ácidos gordos saturados, mono-insaturados e poli-insaturados

Parâmetro lipídico mg / dl	Hp 2.1 e 1.1 (n=40)		Hp 2.2 (n=14)		F	P
	Média	EPM	Média	EPM		
Colesterol total	155,5	4,2	144,6	7,0	1,778	0,188
Colesterol das LDL	99,9	4,3	89,6	7,3	1,468	0,231
Apo B	106,3	4,7	98,6	7,9	0,691	0,418
Apo A1	116,9	2,6	118,4	4,4	0,086	0,773
Col. total / Col. LDL	1,62	0,08	1,82	0,14	1,687	0,199
Col. LDL / Apo B	0,997	0,05	0,916	0,08	0,682	0,421
Apo B / Apo A1	0,935	0,05	0,861	0,09	0,547	0,471

A análise de variância multifactorial utilizando o suprimento alimentar dos principais nutrientes (nomeadamente colesterol, gordura total, gordura saturada, mono-insaturada e poli-insaturada), como covariáveis não mostrou diferenças significativas entre os valores de colesterol total, do colesterol das LDL e das apolipoproteínas A1 e B entre os portadores do alelo 1 e do alelo 2 (Figs. 1 e 2 e Quadro 2).

A comparação entre os quartis superiores e inferiores do colesterol total, relativamente ao fenótipo da haptoglobina não mostrou diferenças significativas (Figs. 3 e 4 e Quadro 3).

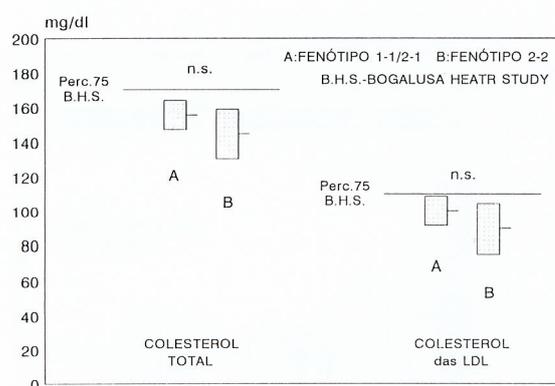


FIG. 1 – Colesterol total e colesterol das LDL (X e L-C 95%). Distribuição de acordo com os fenótipos da haptoglobina e com ajustamento para o suprimento energético, em gordura total e em gordura saturada (n=54).

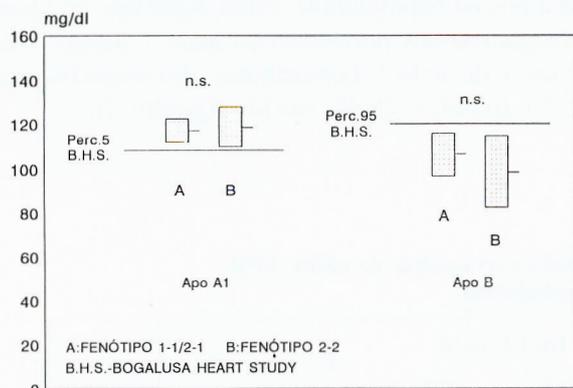


FIG. 2 – Apolipoproteína A1 e B (X e L-C 95%). Distribuição de acordo com os fenótipos da haptoglobina e com ajustamento para o suprimento energético em gordura total e em gordura saturada (n=54).

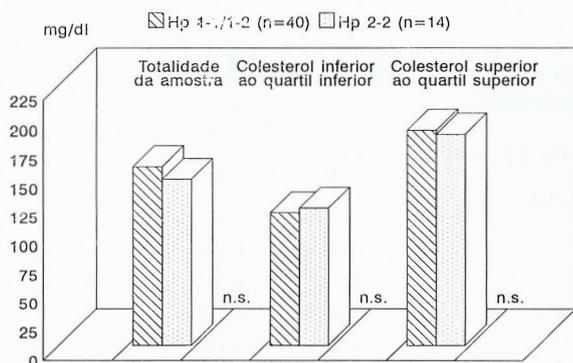


FIG. 3 – Fenótipos da haptoglobina e colesterol total: distribuição pela totalidade da amostra e pelos quartis inferior e superior de colesterol total (mg/dl) (n=54).

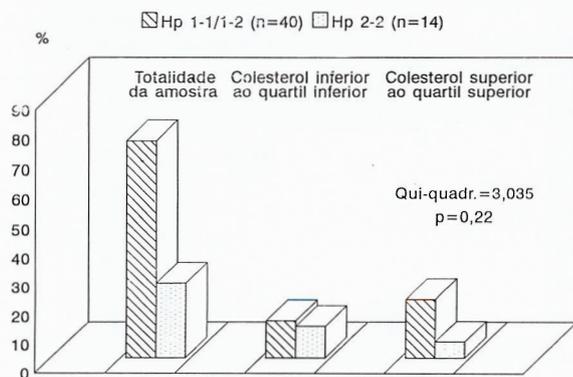


FIG. 4 – Fenótipos da haptoglobina e colesterol total: distribuição pela totalidade da amostra e pelos quartis inferior e superior de colesterol total (%) (n=54).

QUADRO 3

Distribuição das crianças em função do colesterol total agrupado por quartis e tendo em conta os fenótipos da haptoglobina

Colesterol total	Hp 2.1 e 1.1 (n=40 – 74,1%)	Hp 2.2 (n=14 – 25,9%)
≥ Quartil superior	11 (20,3%)	3 (5,6%)
≤ Quartil inferior	7 (13,0%)	6 (11,2%)

$\chi^2 = 3,035 \quad p = 0,221$

Idêntico estudo relativo ao colesterol das LDL e apolipoproteínas A₁ e B também não revelou diferenças significativas.

A regressão linear múltipla considerando como dependentes as diferentes variáveis lipídicas e tendo em conta os fenótipos da haptoglobina, mostrou uma variância explicada de 10,2%, 11,9% e 24,3% respectivamente para o colesterol total, o colesterol das LDL e a apolipoproteína B.

Também o agrupamento das crianças em função dos antecedentes de patologia cardiovascular não mostrou diferenças significativas entre os parâmetros lipídicos estudados.

Discussão

A haptoglobina é uma alfa₂-globulina que fixa a hemoglobina. Trata-se de uma proteína de fase aguda que se encontra elevada em situações inflamatórias e infecciosas e no enfarto do miocárdio (20, 21). O polimorfismo genético da haptoglobina é controlado por dois alelos codominantes (Hp1 e Hp2) (22, 23) que se localizam no braço longo do cromossoma 16, numa posição contígua de dois genes codificadores de dois enzimas envolvidos no metabolismo do colesterol: a lecitina colesterol acil-transferase (LCAT) e o colesterol éster transfer proteína (CETP). A sua capacidade de captar a hemoglobina confere-lhe uma importante acção antioxidante dado que previne a formação de radicais livres dependentes da acção do ferro libertado pela hemoglobina. Este facto ajudará a compreender a associação dos fenótipos da haptoglobina à patologia hipertensiva e poderá justificar também a sua relação com o desenvolvimento ou agravamento da aterosclerose.

Mostrando os valores do colesterol total e da fracção veículada pelas LDL uma tendência para a estabilização a partir do primeiro ano de vida e sendo unanimemente preconizado o rastreio e intervenção dietética a partir do final do segundo ano de vida, consideramos de todo o

interesse procurar investigar também a partir dos 24 meses alguns factores genéticos que possam ser determinantes para a expressão de fenótipos intermédios de patologia aterosclerótica como é o caso da existência de valores inadequados de colesterol total, das suas fracções e das apolipoproteínas.

Os resultados obtidos no presente estudo, não confirmam a tendência à associação, entre os portadores do alelo 2 e os valores mais elevados de colesterol (quartil superior) registados noutros estudos em adolescentes e adultos⁽²⁴⁻²⁶⁾, embora Borrensen encontre apenas valores mais elevados de colesterol das HDL nos portadores do alelo 2 da haptoglobina⁽²⁶⁾.

Todavia não conhecemos estudos que, à semelhança do nosso incluam crianças nos primeiros anos de vida, podendo especular-se sobre a necessidade de decurso de um período de tempo mais alargado para a expressão plena de uma correlação entre as variáveis analisadas. Como já se referiu, os valores do colesterol total e do colesterol das LDL mostram uma marcada estabilidade relativa a partir do primeiro ano de vida, facto muito bem documentado pelos principais estudos prospectivos referentes aos factores de risco de patologia cardiovascular na infância⁽²⁷⁻²⁹⁾ e também por nós registado num estudo prospectivo de oito anos, desde a idade pré-escolar e até à adolescência⁽³⁰⁾. Assim o registo de uma subida para valores de percentis mais elevados pode traduzir uma susceptibilidade genética sobre a qual actuam factores ambientais desfavoráveis particularmente uma dieta inadequada. É possível que em idêntico ambiente a subida dos valores de parâmetros lipídicos ocorra mais precocemente nos portadores de determinado polimorfismo genético, facto não registado no presente estudo aos 24 meses de vida.

Os resultados registados não permitem todavia excluir a possibilidade de existência aos 24 meses de uma associação entre o polimorfismo da haptoglobina e os parâmetros lipídicos habitualmente associados ao risco cardiovascular. Pensamos que se deveriam alargar os estudos por forma a poder definir se na infância o polimorfismo da haptoglobina pode ser considerado como um indicador adicional de risco aterosclerótico. A confirmação de tal facto permitiria identificar melhor as crianças de risco relativamente às quais se deveriam concentrar esforços no sentido de uma intervenção permanente a nível dos factores ambientais, visando o risco de patologia cardiovascular na idade adulta.

Conclusões

Os autores concluem que o polimorfismo da haptoglobina não está nesta população significativamente asso-

ciado aos níveis séricos de colesterol, colesterol das LDL e apolipoproteínas A₁ e B.

BIBLIOGRAFIA

1. Webber LS, Frank GG, Smoak CG, Freedman DS and Berenson G. Design and Participation. *Pediatrics* 1987; 80 (suppl): 767-78.
2. Kwiterovich Po Jr. Commentaries: Biochemical, clinical, epidemiologic, genetic and pathologic data in the pediatric age group relevant to the cholesterol hypothesis. *Pediatrics* 1986; 78: 349-62.
3. National Cholesterol Education Program (NCEP): Highlights of the report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *Pediatrics* 1992; 89: 495-501.
4. Berenson GS, McMahan CA, Voors AW. Cardiovascular Risk Factors in Children – The Early Natural History of Atherosclerosis and Essential Hypertension. New York, Oxford University Press, 1980.
5. WHO. Study of atherosclerosis precursors in children-report of a WHO meeting on prevention of adult cardiovascular diseases in childhood, Geneva, 4-6 February 1974.
6. Tell GS, Tuomilehto J, Epstein FH, Strasser T. Studies of atherosclerosis determinants and precursors during childhood and adolescence. *Bulletin of the World Health Organization* 1986; 64(4): 595-605.
7. Jelliffe DB, Jelliffe EFP. Direct assessment of nutritional status. Anthropometry: major measurements. In: Jelliffe DB, Jelliffe EFP, eds. *Community Nutritional Assessment with special reference to less technically developed countries*. New York: Oxford University Press, 1989: 68-105.
8. Lee J, Kolonel LN, Hinds W. Relative merits of the weight-corrected-for height indices. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 2521-9.
9. Hamill PVV, Drizd TA, Johnson CL, Reed RB, Roche AF, Moore WM. Physical growth: National Center for Health Statistics percentiles. *Am J Clin Nutr* 1979; 32: 607-29.
10. Hammer LD, Kraemer HC, Wilson DM, Ritter PL, Dornbusch SM. Standardized percentiles curves of body-mass index for children and adolescents. *Am J Dis Child* 1991; 145: 259-63.
11. Linke RP. Typing and subtyping of haptoglobin from native serum using disc gel electrophoresis in alkaline buffer: application to routine screening. *Analytical biochemistry* 1984; 141: 55-61.
12. Alain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, FU PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470-5.
13. Flegg HM. An investigation of the determination of serum cholesterol by an enzymatic method. *Amer Clin Biochem* 1973; 10: 79.
14. Manual of laboratory operations, lipid research clinics program. Lipid and lipoprotein analysis. Department of Health Education, Welfare Pub. (NIH) 1974; I: 75.
15. Lindgren FT, Jensen LC, Hatch FT. In: Blood lipid and lipoproteins. Nelson GJ and Wiley J eds. New York: Interscience, 1972: 181-274.
16. Frank GC, Farris RP, Major C. In-House Dietary Studies Methodology, ed 2. New Orleans, Louisiana State University Medical Center, 1978.
17. Frank GC, Berenson GS, Schilling PE, Moore MC. Adapting the 24-hr dietary recall for epidemiologic studies of school children. *J Am Diet Assoc* 1977; 71: 26-31.
18. Paul AA, Southgate DAT, McCance and Widdowson's. The Composition of Foods. Third ed. London: Her Majesty's Stationery Office, 1985.
19. Food and Nutrition Board Recommended Dietary Allowances, rev ed. 8. Washington, DC, National Academy of Science, 1974.
20. Agostini A, Vergani C, Stabilini R, Marasini B, Arcidiacono A, Scaffi A, Binaghi PC. Immunochemical quantitation of acute phase reactive proteins in myocardial infarction. *Am Heart J* 1970; 80: 313-8.
21. Basler MW, Burrel R. Purification of haptoglobin and its effects on lymphocytes and alveolar lymphocyte responses. *Inflammation* 1983; 7: 387-400.
22. Smithies O, Connell GE, Dixon GH. Inheritance of haptoglobin subtypes. *Am J Hum Genet* 1962; 14: 14-21.
23. Smithies O, Connell GE, Dixon GH. Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. *Nature* 1962; 196: 232-6.

24. Sing CF, Orr JD. Analysis of genetic and environmental sources of variation in serum cholesterol in Tecumseh, Michigan. Identification of genetic effects using 12 polymorphic blood marker systems. *Am J Hum Genet* 1976; 28: 453-64.
25. Saha N, Liu Y, Basair J, Ho CH. Association of haptoglobin types with serum lipids and apolipoprotein in Chinese population. *Clin Genet* 1992; 42: 57-61.
26. Borresen A.-L., Leren T, Berg K, Solaas MH. Effect of haptoglobin subtypes on serum lipid levels. *Hum Hered* 1987; 37: 150-6.
27. Freedman DS, Shear CL, Srinivasan SR, Webber LS, Berenson GS. Tracking of serum lipids and apolipoproteins in children over an eight-year period: The Bogalusa Heart Study. *Prev Med* 1985; 14: 203-16.
28. Lauer RM, Lee J, Clarke WR. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels: The Muscatine Study. *Pediatrics* 1988; 82: 309-18.
29. Stuhldreher WL, Orchard TJ, Donahue RP, Kuller LH, Gloninger MF, Drash AL. Cholesterol screening in childhood: sixteen-year Beaver County Lipid Study experience. *J Pediatr* 1991; 119: 551-6.
30. Guerra AJM. Factores de risco de aterosclerose em populações infantis portuguesas. Conferência. II Simpósio Internacional sobre Nutrição, Crescimento e Desenvolvimento na infância. Porto 1996.

Correspondência: António Guerra
Departamento de Pediatria
Hospital S. João
Al. Prof. Hernâni Monteiro
4200 PORTO