

Avaliação da influência dos polimorfismos genéticos *APOE* e *CETP* na resposta ao tratamento com *Garcinia cambogia*

Evaluation of influence of APOE and CETP genetic polymorphisms on response to treatment with Garcinia cambogia

Diego Luiz Rovaris^{1,2}, Pamela Camini Constantin², Ricardo Schneider Junior³, Carlos Augusto Vasques², Fabiana Michelsen de Andrade²

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil;

²Curso de Biomedicina da Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, Brasil; ³Curso de Farmácia da Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, Brasil.

Resumo

Objetivo – Avaliar se polimorfismos nos genes *CETP* (proteína transferidora de ésteres de colesterol) e *APOE* (apolipoproteína E) influenciam no peso e na resposta do perfil lipídico ao tratamento com *G. cambogia*. **Métodos** – Trinta e três pacientes com sobrepeso ou obesidade receberam diariamente uma dose de 2,4g de extrato padronizado de *G. cambogia* (52,4% de ácido-hidroxycítrico). Antes do início do tratamento e após oito semanas, dados antropométricos e perfil lipídico foram obtidos. **Resultados** – Após o período de tratamento, não foi possível perceber diferenças na resposta sobre o perfil lipídico entre portadores e não portadores do alelo *APOE**2, ou do alelo *APOE**4. Uma diferença modesta, porém não significativa, foi encontrada na comparação entre portadores e não portadores do alelo B2 (gene *CETP*) para os níveis de colesterol HDL ($p=0,086$) e triglicérides ($p=0,098$). Em relação ao peso, não foram detectadas diferenças na resposta ao tratamento entre os genótipos. **Conclusão** – Os resultados sugerem que a variante no gene *CETP* pode estar envolvida na modulação dos níveis de HDL-c após o tratamento com *G. cambogia*. Entretanto, uma investigação em uma amostra maior será necessária para confirmar esses resultados.

Descritores: Polimorfismo de um único nucleotídeo; Proteínas de transferência de ésteres de colesterol; Apolipoproteínas E; *Garcinia cambogia*; Farmacogenética

Abstract

Objective – To investigate the influence of polymorphisms of the *CETP* (cholesterol ester transfer protein) and *APOE* (apolipoprotein E) genes on weight changes and lipid levels during the treatment with *G. cambogia*. **Methods** – Thirty three patients with overweight or obesity received a daily dose of 2.4 grams of a standardized extract of *G. cambogia* (52.4% hydroxycitric acid). Before the start of treatment and after eight weeks, lipid profile and anthropometric data were obtained. **Results** – After the treatment, there were no significant differences in the response of serum lipids between carriers and noncarriers of the allele *APOE**2 and *APOE**4. A slight difference, but not significant, was observed in the comparison between carriers and noncarriers of allele B2 (*CETP* gene) for HDL cholesterol levels ($p=0,086$) and triglycerides levels ($p=0,098$). There were no significant differences in the weight after treatment according to genotypes. **Conclusion** – The results suggest that the variant in the *CETP* gene may be associated with levels of HDL-c after treatment with *G. cambogia*. However, an investigation in a larger sample is needed to confirm these results.

Descriptors: Polymorphism, single nucleotide; Cholesterol ester transfer proteins; Apolipoproteins E; *Garcinia cambogia*; Pharmacogenetics

Introdução

A *Garcinia cambogia* é nativa da Ásia (família *Guttiferae*) e tem como princípio ativo o ácido-hidroxycítrico (AHC), que parece ter ação hipolipemiante, pois inibe a atividade da ATP-citrato liase, uma enzima responsável pela biosíntese de lipídeos¹. Alguns dados têm mostrado que a *G. cambogia* tem efeito hipocolesterolêmico e promove perda de peso em humanos^{2,3}, embora isso seja controverso⁴. Como obesidade e dislipidemias são fatores de riscos cardiovasculares bem estabelecidos, torna-se necessário investigar se há genótipos que respondem melhor ao tratamento com este fitoterápico.

Até o momento, não há estudos que avaliaram a influência de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) em genes candidatos sobre a resposta clínica e terapêutica ao tratamento com *G. cambogia*, embora existam estudos farmacogenéticos para hipolipemiantes tradicionais⁵⁻⁶. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi avaliar se SNPs

no gene *CETP*, o qual codifica a proteína transferidora de ésteres de colesterol, e no gene *APOE*, codificante da Apolipoproteína E, influenciam sobre alterações de massa corporal ou na resposta do perfil lipídico ao tratamento com *G. cambogia*.

Métodos

Indivíduos

A amostra consistiu em 33 indivíduos. O desenho experimental do estudo de intervenção com *G. cambogia* foi descrito anteriormente². Em resumo, pacientes com excesso de peso ou obesidade (IMC $35,4 \pm 6,2$ kg/m²) foram selecionados. Nenhuma restrição dietética foi aplicada e as dietas usuais foram monitoradas a partir de um diário alimentar. Os participantes não usavam medicamentos anoréticos ou hipolipemiantes. Durante oito semanas, esses indivíduos utilizaram doses (800 mg três vezes ao dia) de um extrato padronizado de *G.*

cambojia (2,4 g/d) na concentração de 52,4% de AHC (DEG Importação de Produtos Químicos Ltda.). Antes do início do tratamento e após oito semanas, dados antropométricos e perfil lipídico foram obtidos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale.

Análise bioquímica

O colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e colesterol HDL (HDL-c) foram dosados em um analisador automático (cobas c 111 analyser, Roche®), com exceção do colesterol LDL (LDL-c), que foi calculado pela equação de Friedewald⁷. Os valores de colesterol não-HDL (n-HDL) foram obtidos a partir da subtração do HDL-c do CT.

Genotipagem

Os genótipos para o SNP *Taq1B* (rs708272) do gene *CETP* e no exon quatro do gene *APOE* (rs429358 e rs7412) foram obtidos por PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay*) utilizando primers e enzimas de restrição já descritos na literatura⁸⁻⁹.

Brevemente, para o gene *CETP* a PCR foi realizada com 15 pmol de cada um dos primers (5'CACTAGCC-CAGAGAGAGGAGTGCC3' e 5'CTGAGCCAGCCG-CACACTAAC3') além de 21,5 µL de água, 3 µL de tampão (contendo, 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,2 µL de dNTPs (250µM), 0,5µL (2.5 U) de *Taq* DNA polimerase e 1µL de amostra de DNA. A reação passou pelo seguinte programa de temperaturas: 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto. Por fim uma extensão final de 72° por 5 minutos. O produto amplificado de 535 pb foi clivado com 10U da enzima de restrição *Taq I*, por 3 horas a 65°C, e o resultado visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando corante *Blue green* e marcador de peso molecular de 100 pb.

Para o gene *APOE*, a PCR foi realizada com 21,5µL de água, 3µL de tampão (contendo, 1,5µM de MgCl₂, 10mM de Tris e 50mM de KCl), 1µL (15 pmol) de cada primer (5'ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC3' e 5'TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA3'), 0,2µL de dNTPs (250 µM), 0,5 µL (2.5 U) de *Taq* DNA polimerase e 1mL de amostra de DNA. No termociclador, a reação passou pelas seguintes temperaturas: 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95° por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 70°C por 1 minuto. Por fim uma extensão final de 70° por 5 minutos. O produto de PCR de 244pb foi clivado com 10U da enzima de restrição *HhaI*, por 1 hora a 37°C, e os fragmentos foram detectados em gel de agarose 3,5% com Brometo de Etídeo, utilizando como corante o azul de bromofenol e marcador de peso molecular 50 pb.

Análise estatística

As frequências alélicas foram determinadas pelo método da contagem de genótipos e o teste χ^2 foi utilizado para avaliar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Regressão linear foi utilizada para ajustar a variação na concentra-

ção sérica dos lipídios pelos efeitos do gênero, idade, índice de massa corpórea (IMC), percentual de gordura e concentração lipídica inicial. A variação no peso foi ajustada por gênero, idade e peso no início do tratamento. Os genótipos do gene *APOE* foram categorizados em duas variáveis, denominadas de portadores do alelo E2 e portadores do alelo E4. Os genótipos do gene *CETP* foram separados em portadores e não portadores do alelo B2.

As mudanças no perfil lipídico e peso, de acordo com os grupos de genótipos, foram avaliadas por teste *t*. O teste de Mann-Whitney foi utilizado quando os dados não seguiram a distribuição normal. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados estão expressos com média ± erro padrão.

O poder amostral foi calculado através do programa StatMate 2.0.

Resultados

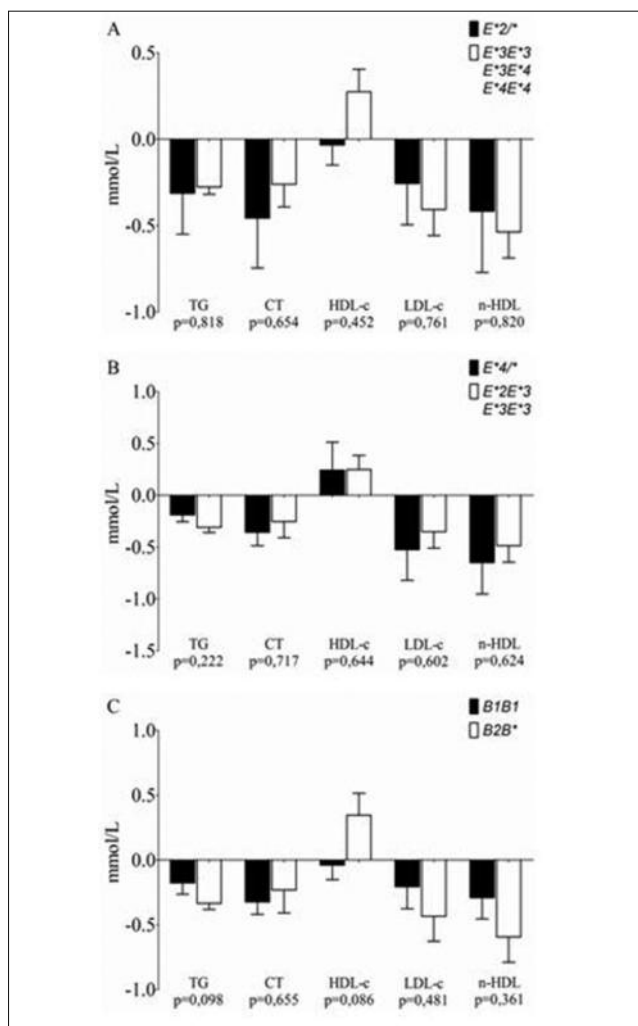


Figura 1. Mudança no perfil lipídico, de acordo com os grupos de genótipos, após dois meses de tratamento com *G. cambogia*
 A) Variação no gene *APOE*. Portadores do alelo E2 versus não portadores (valores ajustados por gênero, idade, IMC, percentual de gordura e concentração lipídica inicial)
 B) Variação no gene *APOE*. Portadores do alelo E4 versus não portadores (valores ajustados por gênero, idade, IMC, percentual de gordura e concentração lipídica inicial). Os resultados estão expressos com média ± erro padrão
 C) Variação no gene *CETP*. Portadores do alelo B2 versus B1B1 (valores ajustados por gênero, idade, IMC, percentual de gordura e concentração lipídica inicial)

A média de idade da população estudada foi $42,2 \pm 9,9$ anos e 87,9% dos pacientes eram mulheres. As frequências genotípicas não diferiram das esperadas pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (*CETP*: $\chi^2 = 0,584$, $p = 0,747$; *APOE*: $\chi^2 = 0$ $p = 1,0$). Nessa amostra de pacientes com excesso de peso e obesos a frequência do alelo B2 do gene *CETP* foi 42%. Para o gene *APOE* a frequência dos alelos *E*2*, *E*3* e *E*4* foram 4,6%, 81,8% e 13,6%, respectivamente.

Dados preliminares ainda não publicados sobre a utilização da *G. cambogia* nesta amostra demonstram efeitos tanto sobre o perfil lipídico quanto sobre o peso. Após oito semanas de tratamento, níveis de CT, TG e LDL-c foram significativamente diminuídos, enquanto valores de HDL-c aumentaram. Além disto, foi detectada também uma diminuição significativa do peso dos voluntários.

Após o período de intervenção, não foi possível perceber nenhuma diferença na resposta do perfil lipídico entre portadores e não portadores do alelo *APOE*2* (Figura 1A), ou do alelo *APOE*4* (Figura 1B). Uma diferença modesta, porém não significativa, foi percebida na comparação entre portadores e não portadores do alelo B2 do gene *CETP* para os níveis de HDL-c ($p = 0,086$) e TG ($p = 0,098$). Nenhuma tendência foi detectada para os demais lipídios (Figura 1C). Em relação ao peso, não foram detectadas diferenças na resposta ao tratamento entre portadores e não portadores dos alelos *E*2* ($p = 0,955$), *E*4* ($p = 0,731$) e B2 ($p = 0,845$) (dados não mostrados).

Discussão

Até o momento, não existem trabalhos publicados que avaliaram a influência de variações em genes candidatos sobre a resposta à *G. cambogia*, embora estudos farmacogenéticos para hipolipemiantes tradicionais, como os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), já tenham sido conduzidos em populações brasileiras⁵⁻⁶.

Fiengenbaum *et al.*⁵ (2005) não encontraram uma influência da variação no exon quatro do gene *APOE* sobre a resposta à sinvastatina, um resultado semelhante ao deste trabalho, após o período de intervenção com *G. cambogia*.

Em relação ao SNP no gene *CETP*, Fiengenbaum *et al.*⁵ (2005) mostraram que indivíduos B2B2 apresentaram um aumento de HDL-c após o tratamento com sinvastatina significativamente maior que portadores do alelo B1 (14,1% vs 1,5%). Os dados referentes ao período de intervenção com *G. cambogia* demonstram esta mesma tendência relacionada à melhor resposta de portadores do alelo B2 para níveis de HDL-c, embora não tenha sido possível atingir significância estatística ($p = 0,086$): enquanto em portadores do alelo B2, valores de HDL-c aumentaram 34%, em homocigotos B1B1, ocorreu uma leve diminuição (menos 6%).

A proteína *CETP* promove a transferência de ésteres de colesterol entre lipoproteínas, causando uma diminuição nos níveis de HDL-c. O SNP *Taq1B* é uma alteração a princípio não funcional, que ocorre no intron 1 (nucleotídeo 277) e a literatura tem mostrado que o alelo B2 (menos comum) é associado com baixa atividade da proteína e consequente aumento dos níveis de HDL-c¹⁰.

É possível que a direção de dados desta pesquisa indique uma ação sinérgica entre a ação do fitoterápico e a presença de uma proteína *CETP* com menor funcionalidade. Desta maneira, a possível ação benéfica da *G. cambogia* seria anulada pela presença de uma *CETP* mais funcional, ou seja, em portadores do alelo B1.

Talvez o tamanho da amostra seja uma limitação para o encontro de alguma influência significativa, uma vez que ela teve apenas ~70% de poder (α em 0,05) para detectar uma diferença média na concentração de HDL-c de 0,30 mmol/L entre os genótipos.

Conclusão

Os presentes resultados sugerem que o *SNP* no gene *CETP* pode estar envolvido na modulação dos níveis de HDL-c após o tratamento com *G. cambogia*. Porém, devido à utilização disseminada de fitoterapia em geral pela população, e do amplo uso deste agente fitoterápico em especial, torna-se clara a necessidade deste tipo de abordagem em estudos similares em outras populações, e com amostras maiores. Somente assim, seria possível no futuro a utilização deste tipo de dado para uma personalização do tratamento com *G. cambogia*.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da Universidade Feevale e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. Sullivan AC, Triscari J, Hamilton JG, Miller ON, Wheatley VR. Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat. I. Lipogenesis. *Lipids*. 1974;9(2):121-8.
2. Vasques CA, Rossetto S, Halmenschlager G, Linden R, Heckler E, Fernandez MS *et al.* Evaluation of the pharmacotherapeutic efficacy of *Garcinia cambogia* plus *Amorphophallus konjac* for the treatment of obesity. *Phytother Res*. 2008;22(9): 1135-40.
3. Mattes RD, Bormann L. Effects of (-)-hydroxycitric acid on appetitive variables. *Physiol Behav*. 2000;71(1-2):87-94.
4. Yonei Y, Takahashi Y, Hibino S, Watanabe M, Yoshioka T. Effects on the human body of a dietary supplement containing L-carnitine and *Garcinia cambogia* extract: a study using double-blind tests. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;42(2):89-103.
5. Fiengenbaum M, Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC *et al.* Pharmacogenetic study of apolipoprotein E, cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase genes and simvastatin therapy in Brazilian subjects. *Clin Chim Acta*. 2005;362(1-2):182-8.
6. Fiengenbaum M, Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC *et al.* The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(5):551-8.
7. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.
8. Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O *et al.* Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest*. 1995;96(3):1664-71.

9. Maekawa B, Cole TG, Seip RL, Bylund D. Apolipoprotein E genotyping methods for the clinical laboratory. *J Clin Lab Anal.* 1995;9(1):63-9.

10. Boekholdt SM, Thompson JF. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of *CETP* in lipid levels and disease. *J Lipid Res.* 2003;44(6):1080-93.

Endereço para correspondência:

Fabiana Michelsen de Andrade
Universidade Feevale
RS 239, nº 2755 – Vila Nova
Novo Hamburgo-RS, CEP 93352-000
Brasil

E-mail: fabiana.andrade@feevale.br

Recebido em 25 de junho de 2011

Aceito em 30 de agosto de 2011