

FACULDADES INTEGRADAS PROMOVE DE BRASÍLIA

**Associação entre o Polimorfismo dos Genes das
Apolipoproteínas Apo A-V, Apo B e Apo E e os Fatores de
Risco Cardiovasculares em Idosos.**

Alaine Arruda

Brasília

2012

Alaine Arruda

**Associação entre o Polimorfismo dos Genes das
Apolipoproteínas Apo A-V, Apo B e Apo E os Fatores de
Risco Cardiovasculares em Idosos.**

Projeto de Pesquisa submetido ao Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa (NIP) das Faculdades Integradas Promove de Brasília como requisito obrigatório para inserção no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Orientador: Dr. Aparecido Pimentel
Ferreira

Brasília

2012

Resumo

Introdução: O envelhecimento é considerado um processo fisiológico normal do ser humano, deixando-os mais susceptíveis às doenças, tais como as doenças cardiovasculares, assim fatores genéticos como as apolipoproteínas E, A-V e B tem sido associado com o surgimento de doenças cardiovasculares. **Objetivo:** verificar a presença dos polimorfismos dos genes das apolipoproteínas Apo E, Apo B, Apo A-V e sua associação com os fatores de riscos cardiovasculares em idosos. **Materiais e Métodos:** a amostra será composta de 200 idosos residentes em asilos inseridos de forma randômica no estudo. Os critérios de inclusão serão: ter mais de 60 anos, residir em asilos, assinar termo de TCLE, e participar de todas as coletas dos dados. Será necessário verificar a presença de fatores de risco cardiovasculares, coleta sanguínea, análise bioquímica de HDL, triglicerídeos e glicemia e identificação dos genótipos por meio da extração do DNA utilizando a técnica salting out, envolvendo três etapas: quebra remoção e precipitação do DNA, em seguida será quantificado e amplificado por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Logo após será realizada genotipagem da apo B usando a reação de restrição para identificação dos exon 26 e 29 com a enzima XbaI e a enzima Eco RI (Amersham Biosciences), a genotipagem da apo E por meio da eletroforese em gel de agarose e a apo A-V utilizando a enzima taq I com especificidade pela sequencia 5`T*CGA.3`. A análise estatística será realizada com o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows, versão 11.5.

Palavras-chave: Apolipoproteínas E, A-V e B, fatores de riscos cardiovasculares, idosos, perfil genético.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 JUSTIFICATIVA	9
3 OBJETIVO	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1. DELINEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	11
4.2. CRITÉRIOS ÉTICOS	11
4.3. AMOSTRA	11
4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	11
4.5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	11
4.5.1. VARIÁVEIS ANALISADAS	12
4.5.1.1 FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR.	12
4.5.1.2. ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO	12
4.5.1.3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	12
4.5.1.4. QUANTIFICAÇÃO DO DNA	13
4.5.1.5. AMPLIFICAÇÃO DO DNA	13
4.5.1.6. GENOTIPAGEM DA APOE	14
4.5.1.7. GENOTIPAGEM DA APO A-V	14
4.5.1.8. GENOTIPAGEM DA APO B	15
4.5.2. ANÁLISE BIOQUÍMICA	16
4.5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4.5.4. RISCOS E BENEFÍCIOS	17
4.5.5. ORÇAMENTO	18
4.5.6. CRONOGRAMA	19
4.5.7. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	20
4.5.8. DURAÇÃO DO ESTUDO E RESPONSABILIDADES	20
4.5.9. RETORNO AOS VOLUNTÁRIOS	20
5. RESULTADOS ESPERADOS	21
6. REFERÊNCIAS	22
7. ANEXOS	24

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é considerado um processo fisiológico normal do ser humano, sendo esse um processo dinâmico programado geneticamente para ocorrer na vida dos indivíduos. Com o avançar da idade há uma redução significativa das funções cognitivas, motoras e orgânicas dos idosos, comprometendo dessa forma a realização de suas atividades e autoestima, deixando-os mais susceptíveis a adquirir doenças, como por exemplo, as doenças cardiovasculares (DCVs) que são as principais causas de morte e incapacidade no Brasil e no mundo. (SANTOS et.al, 2002, SMELTZER et al, 2008).

Estudos têm relacionado o surgimento dessas patologias com os fatores de risco cardiovasculares que segundo o Ministério da Saúde são classificados em controláveis: obesidade, sedentarismo, tabagismo, hipertensão arterial, histórico familiar de doença prematura, dislipidemias (LDL-c) que são controlados por meio de mudanças intervencionistas no estilo de vida. E os não modificáveis: idade, etnia e fatores genéticos, como é o caso dos genes das apolipoproteínas (Apo A-V), (Apo B) e (APO E), que são proteínas constituídas por lipoproteínas responsáveis por manter estável a estrutura dos lipídeos tendo diferentes funções no seu metabolismo, sendo necessário uma atenção especial, pois estudos mostram que estes genes estão cada vez mais envolvidos no aparecimento de doenças cardiovasculares. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; FORTIN et al, 2007).

O gene da apolipoproteína A-V é codificado pelo gene SNP -1131T>C/ S19W. Sintetizada no fígado formado por 343 aminoácidos. O polimorfismo S19W é responsável pela troca de uma serina por um trofano na posição 19 da proteína, enquanto no SPN3 não há trocas de aminoácidos, já que estão localizados na região promotora do gene. Estes polimorfismos podem alterar a síntese ou a estrutura secundária da proteína, modificando sua função no controle de lipídeos. Esse gene tem um papel determinante nos níveis plasmáticos de triglicerídeos constituindo um fator de alto risco para doenças coronarianas, a mutação está associada a um maior IMC, causada devido ao aumento na ingestão de alimentos com elevados níveis de triglicerídeos. (SCHUCH, 2007; RICHET, 2009; SPOSITO et al, 2007).

A apolipoproteína B é uma proteína de 4536 aminoácidos que realiza o transporte de colesterol para as células periféricas, em humanos o gene se localiza

no braço curto do cromossomo 2(P24) e contém 29 exon e 28 introns, sendo que ocorre alteração nos polimorfismos thr71 ile(exon 4) e arg. 3500 in (exon 26), onde ocorre a troca de uma citosina por uma uracila, ficando o códon CAA que codifica a glutamina, posição 2153 para terminação UAA. Entre as inúmeras mutações polimórficas da Apo B as mais bem estudadas são os sítios polimórficos: *Xba*I (exon 26), *Eco*RI (exon 29). O polimorfismo *Xba*I do gene da apo B refere-se a uma troca de um nucleotídeo no exon 26, em que ocorre a troca de uma citosina por uma timina na terceira porção do códon 2488(ACC-ACT), a presença da timina resulta em um sítio de restrição dando origem ao alelo X+ ou sua ausência originando o alelo X-, sendo possível assim três genótipos: X+X+,X+X- e X-X-. O polimorfismo *Eco*RI refere a uma troca da base guanina por uma adenina (GAA-AAA) no exon 29. Resultando na troca do ácido glutâmico por uma lisina. A presença desse polimorfismo revela o alelo E+, quando perde o sitio de restrição origina o alelo E-, determinando assim três genótipos E+E, E+E- e E-E-. (OLIVEIRA, 2005).

Apresenta-se de duas formas Apo B100 e Apo B48. A apoB 48 está presente em quilomícrons (com grande capacidade aterogênica) é produzida no intestino e metabolizado na circulação hepática. A ApoB 100 é responsável pelas ligações das partículas de LDL nas células, produzida no fígado, faz parte das lipoproteína aterogênicas, como as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) , lipoproteína intermediária (IDL) e a de baixa densidade (LDL), sendo o colesterol nesses casos variável. A ApoB tem sido associada com doença arterial coronariana, formação de placas ateroscleróticas. Mutação do gene que codifica a Apo B100 pode causar hipercolesterolemia, através da deficiência no acoplamento da LDL ao receptor celular. (OLIVEIRA, 2005; FORTIN et al, 2007; SPOSITO et al, 2007).

A apolipoproteína E é uma proteína polimórfica, constituída por uma cadeia de 299 aminoácidos. O polimorfismo do gene da Apo E está localizado no braço longo do cromossomo 19q13. A mutação desse polimorfismo ocorre nas posições 112 e 158 da cadeia polipeptídica. As três isoformas mais comuns são Apo E2, Apo E3, Apo E4, assim são possíveis seis genótipos 3 homozigotos (E2E2, E3E3, e E4E4) e três heterozigotos (E2E3, E3E4 e E4E4). A literatura aborda que o E3 é o mais frequente, segundo alguns estudos o alelo E2 estar relacionado com maior longevidade por ser detectado com maior frequência em idosos com idade entre 90 e 100 anos, enquanto o alelo E4 é raro em senis, sendo esse um dos fatores por ser

o alelo mais bem estudado entre as três isoformas. No alelo E4 ocorre uma alteração na conformação da proteína que desencadeia o aumento de LDL colesterol no plasma sanguíneo. Esse aumento faz a molécula reagir com os radicais livres fazendo uma oxidação da molécula de LDL. Esta molécula consegue escapar do sangue passar pelos vasos sanguíneos e se alojar no tecido conjuntivo, fazendo um transporte reverso. Esse alelo tem sido detectado com maior prevalência em populações africanas e tem sido associado com maiores níveis plasmático, sendo um fator predisponente para doenças coronarianas, aterosclerose, demências e fraturas ósseas. (DONOHOE et al, 1999; SCHWANKE et al, 2002; ANTONINI et al, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

A investigação desses genes é de grande importância para determinar o perfil genético dos idosos, sua relação com as DCVs, quais os genes estão mais propensos a desenvolver cardiopatias, a influência alélica no processo de envelhecimento, e baseia-se na busca por medidas que possam retardar manter o controle e prevenir esses eventos.

3. OBJETIVO

O presente estudo tem por objetivo verificar a presença dos polimorfismos dos genes das apolipoproteínas Apo A-V, Apo B, Apo E e sua associação com os fatores de riscos cardiovasculares em idosos residentes em Instituições Asilar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo se caracteriza por um estudo transversal e descritivo e será realizado com população de pessoas idosas.

4.2. CRITÉRIOS ÉTICOS

O estudo deverá ser submetido e aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa e pela direção das instituições envolvidas para que possa iniciar a coleta dos dados. Todos os participantes deverão receber orientações quanto aos riscos e benefícios do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3. AMOSTRA

A amostra será composta por 200 idosos residentes em instituições asilar do Distrito Federal, escolhidos de forma aleatória. Será realizada a extração do DNA genômico total logo após será realizado o processo de genotipagem da apo E, da apo B e da Apo A-V, bem como a realização de anamnese para identificação dos fatores de riscos cardiovasculares.

4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Residir em uma instituição asilar.

Idade superior a 60 anos.

Assinar o TCLE.

Participar da coleta de todos os dados.

Não usar medicação que altere no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas.

4.5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Será verificada a presença de fatores de riscos cardiovasculares nos idosos, coleta sanguínea de uma das veias anticubital do antebraço (preferência basilica), para extração do DNA. O procedimento obedecerá rigidamente técnica asséptica e antissepsia do local da coleta com algodão embebido em álcool a 70%, os materiais utilizados serão descartados em locais apropriados de acordo com o laboratório de análises bioquímicas das Faculdades PROMOVE de Brasília.

4.5.1. Variáveis analisadas

Serão realizadas análises do perfil genético dos idosos associados com os fatores de risco cardiovasculares.

4.5.1.1 Fatores de risco cardiovascular.

Os fatores de risco cardiovasculares serão identificados mediante aplicação de anamnese clínica e constatação por meio de diagnóstico médico da presença de fatores de risco cardiovascular, auxiliado pela análise bioquímica de amostra de sangue.

4.5.1.2. Análise do perfil genético

A metodologia utilizada será a mesma do estudo realizado por Ferreira, 2010 por apresentar eficácia nos procedimentos adotados.

4.5.1.3. Extração do DNA genômico

Será coletado 5 ml de sangue em tubos vacutainer estéril, contendo etilnodiaminotetracético (EDTA), serão armazenados em temperatura ambiente 80°C. O DNA genômico de alto peso molecular será extraído dos leucócitos periférico com o método salting out.

O processo de extração do DNA, envolve 3 etapas:

1-Quebra de células para remover membranas lipídicas através da adição de um tampão com detergente; ou tampão A composto por sacarose (0.32M) Tris He1 (10mM, PH 7,6) MgCL2 (5mM) e o detergente não iônico Triton X 100 (1%). Depois de homogeneizado o sangue, um volume inicial de 750 ul será colocado em um microtubo de 1,5 ml, em seguida adiciona 750 ul d o tampão A, levado para centrifuga a 25000 rpm por 20 minutos para condensar o pellet, descartando o sobrenadante.

2-Etapa: remover as proteínas celulares e histonas ligadas ao DNA por meio da adição de uma protease, precipitação com sódio e procedimento de extração com fenol, o pellet foi suspenso em um composto chamado tampão B (25 mM de EDTA com Ph 8.0 e 7.5 m.M de NaCl), sendo adicionados o SDS (Sodium dodecil sulfato) a 10% e proteinase K (10mg/ml) para ativar enzimas. Após a incubação será

adicionado NaCl (6M) para precipitar o DNA, será feita nova centrifugação da mistura para precipitar as impurezas do fundo do tubo.

3- Precipitação do DNA em álcool será transferido o sobrenadante obtido no item anterior e adicionado etanol absoluto, na proporção de 2 vezes o volume contido no tubo. Será misturado cuidadosamente para visualizar nesse momento a precipitação do DNA. Após será feita outra centrifugação com a finalidade de aderir o DNA no fundo dos microtubos, descartando em seguida o sobrenadante com muito cuidado para não perder o pellet. Após a evaporação completa do etanol será adicionada 100 μ l de TE (tampão de extração) para conservar o DNA.

4.5.1.4. Quantificação do DNA

A concentração do DNA extraído previamente será estimada por meio de gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. Em cada poço do gel será aplicado um volume de 8 μ l, dos quais 2 μ l será tampão de carregamento e 6 μ l do DNA extraído e conservado em TE. Será utilizado como padrão para quantificação o lambda DNA em concentrações de 20,100, 200 e 400ng/ μ l. Depois aproximadamente 30 minutos de eletroforese a 60 Volts, o gel será fotografado em luz ultravioleta, sendo as “bandas” formadas pelo DNA comparadas com as dos marcadores, e, por meio da inspeção visual realizada a quantificação do DNA. Após a quantificação, todas as amostras de DNA serão diluídas em TE, de forma que fiquem numa concentração final de 5 ng/ μ l e prontas para seguir para o processo de amplificação.

4.5.1.5. Amplificação do DNA

Os segmentos polimórficos do gene da apoE serão amplificados de acordo com o método descrito por DONOHOE et al. 1999 (66), com modificações. Para tanto, serão desenvolvidas duas reações em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reactions* – PCR) independentes com base no sistema de amplificação refrataria a mutações (*Application Refractory Mutation system ARMS*). Segundo este sistema, primers serão desenhados de modo que cada nucleotídeo da extremidade 3' do respectivo primer pareasse com A ou G codantes dos aminoácidos arginina ou cisteína respectivamente ocupantes das posições 112 e158 do gene. Assim, serão desenhados os primers Cys158.

(5'ATGCCGATGACCTGCAGAATT-3')Arg158 (5'ATGCCGATGACCTGCAGAATC-3'),Cys112 (5'CGCGGACATGGAGGACGTTT-3') e Arg112

(5'CGCGGACATGGAGGACGTTT-3'), de modo que os dois primeiros serão capazes de amplificar as variações da posição 158, enquanto os dois últimos, a região do códon polimórfico 112. Adicionalmente, será utilizado o primer comum ApoE (5'-GTTCAGTGATTGTCGCTGGGCA-3') para compor par com os primers Arg/Cys158 ou Arg/Cys112 e produzir produtos de amplificação de 588 e 451 pares de base (pb) respectivamente. Cada genótipo será determinado pela realização simultânea de duas reações de PCR, no qual a primeira (Mix A) será constituída pelos primers Cys158 (25µM) Cys112(25µM) e ApoE (25µM). A segunda reação (MixB) contendo a combinação de primers Arg158 (25µM), Arg112 (25µM) e ApoEr (25µM). Cada reação utilizará 50 ng de DNA genômico, 200 µmol/L de cada desoxinucleotídeo, 10 mM de tampão Tris-HCl [PH 9,2], 1,5mM de MgCl₂, 25mM de KCl, 80 g/L de dimetilsulfoxido (DMSO). 1 U de Taq Polimerase, 10 µg/ml de ovalbumina e água Milli Q qsq compondo um volume final de 25µL de reação. A desnaturação inicial do DNA na amplificação do PCR será adquirida com "hot start" a 80 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 45 segundos, anelamento a 66 °C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 45 segundos, seguido por um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 min.

4.5.1.6. Genotipagem da Apo E

Serão separados os fragmentos da reação da PCR por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,6% contendo 0,2mg/L de brometo de etídeo e tampão TAE a uma corrente constante de 60 volts, durante aproximadamente 40 minutos. Utilizará 8µL de cada reação(Mix A e B) conjuntamente com 2µL de tampão de amostra (azul bromofenol), O gel será visualizado sob iluminação ultravioleta seguido de foto documentação. A identificação dos genótipos será realizada em duplicata, sendo que as amostras que apresentarem conflitos serão submetidas a uma PCR de confirmação (FERREIRA, 2010).

4.5.1.7. Genotipagem da apo A-V

A genotipagem será feita através da amplificação pela técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) de um fragmento contendo SNP S19w ou C56

do gene da Apo A-V. As reações de PCR serão realizadas em termociclador passando por estas etapas: inicialmente o material será desnaturado a 96°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 96°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e uma última a 72°C por 10 minutos. (SCHUCH, 2007).

Para detectar esse polimorfismo o produto da PCR será digerido utilizando a enzima *taqI*, que possui especificidade pela sequência: 5'T*CGA.3'. Esses iniciadores fornecem um produto de PCR de 157 pb, o produto amplificado com a base 56c, correspondente ao aminoácido 19 S será cortado pela enzima que irá gerar dois com tamanhos de 134 pb e 23 pb. Os fragmentos serão detectados através de eletroforese em gel de agarose a 3,5%, e corado com brometo de Etídio para auxiliar no processo de identificação será utilizado como marcador de peso molecular de 50 pb. (SCHUCH, 2007).

4.5.1.8. Genotipagem da Apo B

Os fragmentos de DNA correspondente às regiões do gene da Apo B serão amplificados através da PCR, descrito no estudo realizado por OLIVEIRA, 2005.

Exon 26 do gene da apo B (polimorfismo Xba):

X1: F-5' - GGAGACTATTCAGAAGCTAA-3';

X2: R-5' - GAAGAGCCTGAAGACTGACT-3'.

Exon 29 do gene da apo B (polimorfismo EcoRI):

E3: F-5' - CTGAGAGAAGTGTCTTCGAAG 3';

E4: R-5' – CTCGAAAGGAAGTGTAATCAC 3'.

Os oligonucleotídeos iniciadores serão dissolvidos em água tipo MilliQ estéril na concentração de 100 pmol/ µL, e as soluções mantidas em freezer -20°C. Como solução de uso, uma mistura dos oligonucleotídeos iniciadores 5' e 3' será preparada a partir da solução de estoque, de forma a produzir uma solução contendo 10pmol/ µL, de cada iniciador.

A quantidade e a qualidade do produto da PCR serão obtidas através da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a 60 volts e 30 mili Amperes durante 1 hora em tampão TBE. 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89

mmol/L e EDTA 1mmol/L, pH 8,2).O DNA será corado com solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens serão obtidas com câmera CCD (sistema Biochemi, (UVP)). Inicialmente o procedimento de PCR-RFLP será realizado como descrito no estudo de OLIVEIRA MIA, 2005. O tempo da reação de PCR ultrapassa às 4 horas, permitirão protocolos de PCR quantidades de bandas inespecíficas, e os perfis eletroforéticos dos produtos de restrição permitirão a caracterização dos genótipos em estudo sem resultados confusos.

Na reação de restrição para identificação do exon 26 gene da ApoB usará a enzima XbaI (Amersham Biosciences). OLIVEIRA, 2005.

Descrição dos reagentes, reação e concentração final:

Enzima XbaI (12 U/µL), - 0,6 µL, - 0,36 U/µL, Albumina Bovina 0,1% - 2,0 µL - 0,01%, Tampão M (10X) - 2,0 µL - 1X, Produto de PCR do exon 26 5,0 µL - 5 a10ng/µL, Água Reagente tipo 1 estéril - 10,4 µL, Volume final - 20 µL, homogeneizar e deixar em Banho-Maria a 37° C por 4 horas

Na reação de restrição para identificação do exon 29 do gene da Apo B usará a enzima EcoRI (Amersham Biosciences). (OLIVEIRA, 2005)

Descrição dos reagentes, reação e concentração final:

Enzima EcoRI (15 U/µL) - 0,6 µL - 0,45 U/µ, Tampão H (10X) - 2,0 µL -1 X, Produto de PCR do exon 29 5,0 - µL5 -1010ng/µL, Água reagente tipo 1 estéril - 12,4 µL, Volume final - 20 µL, homogeneizar e deixar em Banho-Maria a 37° C por 4 horas.

4.5.2. Análise bioquímica

Será utilizada a mesma metodologia do estudo realizado por Ferreira et al 2007, por apresentar resultados positivos. Com base nesse estudo, a coleta de sangue será realizada em tubo a vácuo com gel separador sem anticoagulante; após a coleta, o sangue será centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm para separar o soro dos demais componentes do sangue, sendo que o soro será utilizado para as análises. Para dosagem de triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e níveis glicêmicos, utilizará kit enzimático colorimétrico processado no aparelho Autohumalyzer A5.

4.5.3. Análise Estatística

As comparações entre os genes serão verificadas por meio da análise múltipla de dados MANOVA.

Será adotado o nível de significância de ($p < 0,05$). Quando observado diferenças significativas em alguma variável, testes de comparações múltiplas LSD e Games-Howell serão conduzidos para identificação de contrastes relevantes entre as médias com e sem distribuição normal respectivamente. A análise estatística será realizada com o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows, versão 11.5. (FERREIRA, 2010)

4.5.4. Riscos e benefícios

Durante a coleta de sangue há o risco de contaminação, bem como o risco de lesão vascular e falha no processo de coagulação. Porém as determinações da agência de vigilância sanitária no que tange o assunto serão rigorosamente seguidas para que tal risco seja afastado.

No caso de iminente dano ao participante, é assegurado que a pesquisa será interrompida, garantindo a integridade do mesmo. Além disso, qualquer efeito inesperado será comunicado ao Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF.

Dessa forma, os riscos envolvidos nessa pesquisa se apresentam de maneira aceitável, pois os resultados desse trabalho podem apresentar uma nova forma de abordar os fatores de risco cardiovascular em idosos, proporcionando um método mais barato que os métodos atualmente utilizados e tão eficientes quanto. Assim, podem-se estabelecer condutas com o objetivo de prevenir esses fatores de risco de maneira rápida, além de identificar o perfil genético mais prevalente na população idosa.

Caso seja identificado em qualquer momento algum procedimento que possa prejudicar os voluntários, ou ocorra algum problema que comprometa o bom andamento do projeto, a pesquisa será interrompida.

4.5.5. Orçamento

O quadro abaixo elucida a maneira como o orçamento será distribuído:

Especificação	Quantidade	Valor unitário	Valor total
Kit para DNA	200	1,00	200,00
Kit ApoE	200	2,00	400,00
Kit Apo A	200	2,00	400,00
Kit Apo B	200	2,00	400,00
Kit para Glicemia	1	150,00	150,00
Kit para Triglicerídeos	1	150,00	150,00
Kit para HDL	1	200,00	200,00
Tubos Vacuteiner	600	0,25	150,00
Total			2.050,00

Quadro 1 - Demonstrativo de orçamento.

4.5.7. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Foi elaborado duas versões do TCLE, mantendo o mesmo teor, mas um será direcionado para o idoso e outro direcionado ao responsável do idoso, caso este não estiver apto a responder por si. O Termo foi escrito de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196/96 (anexo I e II).

4.5.8. Duração do estudo e responsabilidades

O estudo terá duração de aproximadamente doze meses após a aprovação do Comitê de Ética. Será responsabilidade do pesquisador Dr. Aparecido Pimentel Ferreira a condução da pesquisa, bem como a coordenação da mesma e dos monitores que auxiliaram nas coletas de dados. O fornecimento dos equipamentos e instalações para a realização dos exames, bem como a disponibilidade dos técnicos responsáveis pela manutenção, calibração e condução dos equipamentos será de responsabilidade da ICESP / Faculdades PROMOVE de Brasília.

O pesquisador se compromete a publicar os resultados sejam eles quais forem resguardando o anonimato dos participantes.

4.5.9. Retorno aos voluntários

Após todas as coletas e análises, os resultados serão impressos individualmente, e entregue aos participantes do estudo para que os mesmos ou responsáveis possam tomar as devidas providências de cuidados com a saúde, quando necessário. As dúvidas quanto aos resultados poderão ser tiradas em qualquer momento no Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa do ICESP / Faculdades PROMOVE de Brasília. As sugestões de modificações no estilo de vida que podem contribuir para uma melhora nos perfis genéticos e lipídicos, e diminuir assim, os riscos de possíveis doenças ocasionadas pela elevação dos valores plasmáticos de triglicerídeos e glicemia de jejum, os valores reduzidos de HDL, bem como as informações sobre os polimorfismos dos genes das apolipoproteínas E, A-V e B também serão fornecidas aos idosos.

5. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que o estudo fortaleça os achados da maioria das outras pesquisas que também analisaram a associação entre o polimorfismo dos genes das Apolipoproteínas Apo A-V, Apo B e Apo E e os fatores de risco cardiovasculares em idosos, indicando que alterações nesses genes em pessoas idosas apresenta uma maior predisposição às doenças cardiovasculares. Mas há uma grande possibilidade de existir um resultado diferente, até mesmo pelo fato desses genes não serem considerados os melhores indicadores desses fatores. Haja vista que outros estudos encontraram divergências nesse processo por serem genótipos raros nas populações idosas.

6. REFERÊNCIAS

1. Smeltzer SC, Bare BG, Hinkle JL e Cheever KH. Tratado de enfermagem Médico-Cirúrgica. Brunner e Suddarth, 10ª edição, vol. 12, 2008.
2. Santos. R.D, Sposito A. C Timeerman S, Armaganijan D, Maiguchi E. Departamento de Aterosclerose, Cardiologia Clínica e FUNCOR da Sociedade Brasileira de Cardiologia- Diretriz para Cardiologia sobre excesso de peso e Doença Cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Vol.78 suplemento I, 2002
3. Caderno de Atenção Básica Nº 14 – Prevenção clínica de doença cardiovascular, cerebrovascular e renal crônica. Ministério da Saúde, Secretaria de Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 1:6, 2:9.
4. Forti N e Diament J. Apolipoproteínas B e A-III: fatores de risco cardiovascular? Revista da associação médica brasileira, 2007; 53(3): 276-82.
5. Schuch JB. Nutrigenética dos níveis de triglicerídeos: Análise da interação entre hábitos alimentares e a variação no gene Apo AV em uma amostra da população da grande Porto Alegre, 2007.
6. Donohoe GG, Salomaki A, Lehtimaki T, Pulkkin K, Kairisto V. Rapid identification of Apolipoprotein e Genotypes by Multiplex Amplification Refractory Mutation System PCR and Capillary Gel Electrophoresis. Clinical Chemistry, 1999, 45.
7. Schwanke CHA, Cruz IBM, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. Arquivo brasileiro de cardiologia, 2002. 78: 561-70.

8. Antonini T, Castro L, Paz JA, Schwanke CHA, Schwanke A, Gottlieb MG, Bittencourt L, Ribeiro EE, Cruz IBM. Estudo de associação entre nível de atividade física, risco cardiovascular e o polimorfismo do gene da Apolipoproteína E em idosos. *Arquivo brasileiro de cardiologia*, 2009; 93: 221-230.9.
9. Richet Nouvelles. Ano 12. Nº 5, março de 2009.
10. Lima LM, Carvalho MG e Sousa MO. Índice Apo B/Apo A-I e Predição de Risco Cardiovascular. *Sociedade brasileira de cardiologia. Arquivo brasileiro de cardiologia*, 2007; 88(6): e187-e190.
11. Sposito A. C, Caramelli B, Fonseca F. H. A., Bertolome M. C. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol.88, abril de 2007.
12. Oliveira MIA. Associação dos polimorfismos XbaIE e EcoRI do gene da apolipoproteína B com a doença arterial coronariana e diabetes melitus tipo 2, Curitiba 2005.
13. Ferreira AP. Associação do genótipo da Apolipoproteína E as diferentes intensidades de exercício na lipídemia pós-prandial de diferentes homens jovens. Tese de doutorado Universidade Católica de Brasília, 2010.
14. Ferreira AP; Oliveira CER; França NM. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR). *J Pediatr*. 2007; 83(1): 21-6.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Termo De Consentimento Livre E Esclarecido (versão para o idoso)

1 – O pesquisador Dr. Aparecido Pimentel Ferreira, professor das Faculdades ICESP Promove de Brasília, e a aluna Alaine Lima de Arruda, estudante desta mesma instituição, pediram minha participação nesta pesquisa intitulada “Associação entre o Polimorfismo dos Genes das Apolipoproteínas Apo A-V, Apo B e Apo E os Fatores de Risco Cardiovasculares em Idosos”.

2 – Fui informado (a) dos propósitos da pesquisa e tomei conhecimento que minha participação na pesquisa consiste em coleta de exame de sangue para extração de DNA e genotipagem das Apolipoproteínas E, A-V e B (glicemia, HDL, triglicerídeos).

3 – Fui informado (a) que terei que estar em jejum de aproximadamente 10 a 12 horas no dia do exame de sangue e que a coleta será realizada por pessoas qualificadas e habilitadas, seguindo todas as recomendações da Vigilância Sanitária.

4 – Compreendo que existem riscos e desconfortos nesta pesquisa já descritos anteriormente, contudo fui informado (a) que todas as precauções serão tomadas para minimizar os riscos de contaminação (exame de sangue) com respaldo das ações recomendadas pela vigilância sanitária e os cuidados assegurados pela ética em pesquisa com seres humanos.

5 – Compreendo que caso eu tenha algum problema de saúde durante as realizações das medidas, receberei o tratamento ou cuidados médicos emergenciais e devidas orientações. Caso o tratamento seja em longo prazo, este não será mais de responsabilidade das Faculdades ICESP Promove de Brasília.

6 – Fui informado (a) que poderei interromper ou nem se quer iniciar as avaliações ou exames laboratoriais que se incluem nesta pesquisa, sem a necessidade de fornecer o motivo para a interrupção ou desistência.

7 – Compreendo que qualquer dúvida que venha a surgir antes durante ou após a pesquisa, será sanada pela aluna Alaine Lima de Arruda (61) 9209-0696 ou pelo pesquisador Dr. Aparecido Pimentel Ferreira pelo número (61) 8143-8333, no Campus das Faculdades ICESP Promove de Brasília.

8 – Compreendo que, caso ocorra algum imprevisto ou problema, se tiver dúvida quanto aos meus direitos como participante nesta pesquisa, ou se sentir que fui colocado em risco, posso contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF através do telefone (61) 3325-4955.

9 – Li as informações acima. Recebi as explicações sobre a natureza, demanda riscos e benefícios do projeto. Assumo conscientemente os riscos envolvidos e compreendo que posso retirar minha participação a qualquer momento, e que não estou desistindo de quaisquer reivindicações legais, a posterior. Uma cópia deste formulário de consentimento ficará em minha posse.

Assinatura do participante _____ Data:
____/____/____

10 – Certifico que expliquei ao indivíduo acima a natureza e o propósito, bem como os potenciais e possíveis riscos associados com a participação neste estudo, respondi a todas as questões que foram levantadas e testemunhei a assinatura acima.

11 – Forneci ao participante/sujeito uma cópia deste documento de consentimento assinado.

12 – Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF.

Assinatura _____ do _____ Pesquisador
responsável _____ Data: ____/____/____

Anexo 2 – Termo De Consentimento Livre E Esclarecido (versão para o responsável)

1 – O pesquisador Dr. Aparecido Pimentel Ferreira, professor das Faculdades ICESP Promove de Brasília, e aluna Alaine Lima de Arruda, estudante desta mesma instituição, pediram minha autorização para que o idoso por quem eu sou responsável participe da pesquisa intitulada “Associação entre o Polimorfismo dos Genes das Apolipoproteínas Apo A-V, Apo B e Apo E os Fatores de Risco Cardiovasculares em Idosos”.

2 – Fui informado (a) que a pesquisa tem como propósito verificar se existe associação entre os polimorfismos genéticos das apolipoproteínas E, A-V e B e os fatores cardiovasculares e tomei conhecimento que a participação de quem sou responsável na pesquisa consiste em coleta de exame de sangue para extração de DNA e genotipagem das Apolipoproteínas E, A-V e B (glicemia, HDL, triglicerídeos).

3 – Fui informado (a) que ele (a) terá que estar em jejum de aproximadamente 10 a 12 horas no dia do exame de sangue e que a coleta será realizada por pessoas qualificadas e habilitadas, seguindo todas as recomendações da Vigilância Sanitária.

4 – Compreendo que há o risco de contaminação, bem como o risco de lesão vascular e falha no processo de coagulação, além de possível hematoma local, e desconforto pela inserção da agulha, contudo fui informado (a) que todas as precauções serão tomadas para minimizar os riscos de contaminação (exame de sangue) com respaldo das ações recomendadas pela vigilância sanitária e os cuidados assegurados pela ética em pesquisa com seres humanos.

5 – Compreendo que caso ele (a) tenha algum problema de saúde durante as realizações das medidas, receberá o tratamento ou cuidados médicos emergenciais e devidas orientações. Caso o tratamento seja em longo prazo, este não será mais de responsabilidade das Faculdades ICESP Promove de Brasília.

6 – Fui informado (a) que poderemos interromper ou nem se quer iniciar as avaliações ou exames laboratoriais que se incluem nesta pesquisa, sem a necessidade de fornecer o motivo para a interrupção ou desistência.

7 – Compreendo que qualquer dúvida que venha a surgir antes durante ou após a pesquisa, será sanada pela aluna Elaine Lima de Arruda pelo número (61) 9209-0696 ou pelo pesquisador Dr. Aparecido Pimentel Ferreira pelo número (61) 8143-8333, no Campus das Faculdades ICESP Promove de Brasília.

8– Compreendo que, caso ocorra algum imprevisto ou problema, se tivermos dúvida quanto aos direitos dele (a) como participante nesta pesquisa, ou se sentirmos que ele (a) foi colocado (a) em risco, posso contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Forças Armadas através do telefone (61) 3234-4821.

9 – Fui informado que todo o ônus para realização de exames bem como qualquer outro custo relativo à pesquisa será de responsabilidade das Faculdades ICESP Promove de Brasília, me eximindo e eximindo o idoso por quem sou responsável assim, de qualquer gasto.

10 – Li as informações acima. Recebi as explicações sobre a natureza, demanda de riscos e benefícios do projeto. Assumo conscientemente os riscos envolvidos e compreendo que posso retirar nossa participação a qualquer momento, e que não estou desistindo de quaisquer reivindicações legais, a posterior. Uma cópia deste formulário de consentimento ficará em minha posse.

Assinatura do participante _____ Data:
____/____/____

10 – Certifico que expliquei ao indivíduo acima a natureza e o propósito, bem como os potenciais e possíveis riscos associados com a participação neste

estudo respondi a todas as questões que foram levantadas e testemunhei a assinatura acima.

11 – Furneci ao participante/sujeito uma cópia deste documento de consentimento assinado.

12 – Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Forças Armadas.

Assinatura _____ do _____ Pesquisador
responsável _____ Data: ____/____/____