

**FACULDADES INTEGRADAS PROMOVE DE BRASÍLIA**

**Associação do Genótipo Da IL-6 e TNF com os Fatores de  
Riscos Cardiovasculares em Idosos**

Elisa Helena Ramos Villas Boas

Brasília

2012

Elisa Helena Ramos Villas Boas

**Associação do Genótipo Da IL-6 e TNF com os Fatores de Riscos Cardiovasculares em Idosos**

Projeto de Pesquisa submetido ao Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa (NIP) da 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 fator de risco para o desenvolvimento de muitas doenças, dentre elas tem maior enfoque as que afetam o sistema cardiovascular. Com o avanço dos anos, o sistema cardiovascular pode ficar exposto a uma série de problemas, tais como arteriosclerose, diminuição da distensibilidade da aorta e das grandes artérias, comprometimento da condução cardíaca e redução na função barorreceptora. **Objetivo:** Verificar a associação entre o genótipo da IL-6 e TNF com os fatores de riscos cardiovasculares em idosos. **Materiais e Métodos:** Estudo transversal, descritivo realizado com 200 idosos residentes em abrigos escolhidos por conveniência que serão submetidos a coleta de sangue e genotipagem da IL-6 e FNT, bem como a verificação dos fatores de riscos cardiovasculares. Os dados obtidos serão analisados estatisticamente para comprovar as associações e será traçado um plano de cuidados para melhoramento do quadro de saúde o idoso.

**Palavras-chave:** Idosos; fator de risco cardiovascular; genótipo.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. JUSTIFICATIVA	7
3. OBJETIVO	8
4. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4.1. DELINEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	8
4.2. CRITÉRIOS ÉTICOS	8
4.3. AMOSTRA	8
4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	8
4.5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	8
4.5.1. GENOTIPAGEM DE IL-6 e TNF	8
4.5.2. VERIFICAÇÃO DOS FATORES DE RISCOS CARDIOVASCULARES	9
4.5.3 Análise Bioquímica	9
4.5.4 Riscos e benefícios	10
4.5.5 Orçamento	11
4.5.6. Cronograma	11
4.5.7. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	12
4.5.8 Duração do estudo e responsabilidades	12
4.5.9 Retorno ao voluntários	13
5. RESULTADOS ESPERADOS	14
6. Referências	14

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é um país envelhecido, haja vista que, a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) realizada em 2005, revelou que o número de pessoas com mais de 60 anos é superior a 18 milhões, o que corresponde a cerca de 10% da população total. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um país pode ser considerado estruturalmente envelhecido quando sua taxa de idosos, ou seja, com mais de 60 anos para países em desenvolvimento e acima de 65 anos, para países desenvolvidos, ultrapassa 7% da população total (VICTOR et al. 2008).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) esta realidade tende a se agravar, pois “no ano 2025, seremos a sexta população mundial em números absolutos de idosos”. Estima-se que cerca de 84% serão dependentes para realização de suas atividades de vida cotidianas e que no ano 2020 ocorrerá um aumento de 84 a 167% no número de idosos com dependência moderada ou grave. Coloca ainda que a expectativa de vida do brasileiro ao nascer cresceu mais de três anos na última década e passou de 69,3 anos, em 1997, para 72,7 anos, em 2007. As mulheres ainda vivem mais tempo: em média 76,5 anos, contra os 69 anos vividos pelos homens (GUARNIERI, 2008).

Com o avanço dos anos, o sistema cardiovascular passa por uma série de problemas, tais como arteriosclerose, diminuição da distensibilidade da aorta e das grandes artérias, comprometimento da condução cardíaca e redução na função barorreceptora. As estatísticas mostram que a maior causa de mortalidade e morbidade é a doença cardiovascular. A doença coronariana é a causa de 70 a 80% de mortes, tanto em homens como em mulheres e a insuficiência cardíaca congestiva, mais comum de internação hospitalar, de morbidade e mortalidade na população idosa. Ao contrário da doença coronariana, a insuficiência cardíaca congestiva continua aumentando. Assim, a preocupação maior é com as doenças cardíacas. Dentre as doenças cardíacas mais comuns nos idosos, podemos citar a insuficiência cardíaca congestiva, a doença coronariana, a cardiomiopatia hipertrófica, a doença valvar (estenose aórtica e valvopatias mitral) arritmias supraventriculares e ventiliares, hipertensão arteriais sistêmicas.

Os fatores de risco cardiovasculares mais frequentes na população idosa são a idade, o sexo, a raça, os antecedentes familiares, a hipertensão arterial, a obesidade, o estresse, a vida sedentária, o álcool, o tabaco, os anticoncepcionais, a alimentação rica em sódio e gordura (CAETANO et al.2008).

Atualmente, o que preocupa no idoso é a sua saúde global, tornando as importantes as comorbidades decorrentes de um estilo de vida inadequado e principalmente, de um elevado tempo de exposição a alguns fatores de risco cardiovasculares. Dentre as principais comorbidades presentes, podemos citar: diabetes melitus, doenças pulmonar, doença vascular periférica, doenças musculoesqueléticas, doenças renais, doenças hepáticas, doenças valvares degenerativas, doenças neoplásicas, depressão, rejeição, dificuldades de locomoção, doenças neurológicas (ZASLAVSKY, 2002).

As características fisiológicas, fisiopatológicas próprias e as necessidades diferenciadas, principalmente pelo aspecto socioeconômico, exigem uma preparação adequada e um atendimento integrado de saúde. Por essas razões, a preocupação com as comorbidades no idoso são tão importantes.

Parece que o aumento da idade associado à elevação sérica da IL-6 é responsável por algumas das mudanças fenotípicas da idade avançada, especialmente aquelas relacionadas à doença inflamatória crônica, particularmente associadas às complicações advindas dos fatores de riscos cardiovasculares (CHAHADE, 2010). A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa). Após a menopausa ou andropausa, os níveis de IL-6 são elevados mesmo na ausência de infecção, trauma ou estresse. A própria hiperglicemia característica da intolerância à glicose tem relação coma síntese imediata de marcadores como IL-6, com variações dos níveis séricos positivamente relacionados se com aumentos mais significativos na hiperglicemia em pulsos, situação comum no diabético.

A IL-6 desempenha papel importante no processo de ruptura ou erosão da placa de aterosclerose e, portanto, trata-se de um forte marcador independente do aumento da mortalidade por doença coronariana, prestando-se também à identificação de pacientes que se beneficiam de uma estratégia invasiva precoce. Em homens aparentemente saudáveis, níveis elevados de IL-6 estão associados ao risco aumentado de futuras isquemias miocárdicas. Os marcadores inflamatórios já estão bem estabelecidos no desenvolvimento da doença aterosclerótica e são úteis na predição do elevado risco cardiovasculares entre os indivíduos de meia-idade. Os pacientes com  $\geq 65$  anos, a IL-6 e TNF- $\alpha$  têm se mostrado bons preditores de desfechos cardiovasculares (LIMA, 2009).

A principal função do TNF- $\alpha$  é promover a resposta imune, por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Constitui-se no principal mediador da resposta inflamatória aguda. Desta forma, o TNF- $\alpha$  tem diversas ações benéficas ao organismo quando sintetizado em quantidades moderadas; porém, acredita-se que tenha importante ação deletéria quando produzido em quantidades excessivas (ROVERAN, 2009)

Entre as principais atuações destas citocinas, podemos também incluir a estimulação para a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais e a indução da produção e liberação de metaloproteinases de fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, entre outras células. O excesso destas atividades pode ser responsável pelo aumento de migração de leucócitos e de linfócitos da circulação para os tecidos inflamados, resultando na degradação e destruição teciduais (CHAHADE, 2010).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A pesquisa tem como relevância para o meio científico a investigação dos genótipos de IL-6 e TNF para os fatores de doenças cardiovasculares, assim podendo conhecer a fundo este mal que acomete nossa população idosa.

### 3. OBJETIVO

Verificar a associação entre o genótipo da IL-6 e TNF com os fatores de riscos cardiovasculares em idosos.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. DELINEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

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

#### 4.2. CRITÉRIOS ÉTICOS

Antes da coleta de dados o estudo deverá ser aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa e pela direção das instituições envolvidas. Os voluntários deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

#### 4.3. AMOSTRA

A amostra será constituída por 200 idosos residentes em Casas de Abrigo de Idosos do Distrito Federal, escolhidos por conveniência.

#### 4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Ser residente em casa de abrigos para idosos.
- Ter mais de 60 anos de idade.
- Assinar o termo TCLE.
- Participar de todas as coletas de dados.

#### 4.5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Para realização do presente estudo será necessário verificar os fatores de risco cardiovasculares e o perfil genético de IL-6 e TNF nos idosos.

##### 4.5.1 GENOTIPAGEM DE IL-6 E TNF

Para determinação dos alelos de IL-6, uma região de 628 pb do gene, contendo o polimorfismo de base única (SNP – *single nucleotide polymorphism*) -174



G>C da região promotora (rs1800795), foi amplificada usando um par de oligonucleotídeos: 5'-GAACACAGAAGAAGCTCAGATGACTGG-3' (direto) e 5'-AGGAGTTCATAGCTGGGCTCCTGGAG-3' (reverso). Já a variabilidade do gene TNF- $\alpha$  foi estudada mediante amplificação de um fragmento de 327 pb contendo o SNP -308 G>A (rs1800629) da região promotora do gene, usando os oligonucleotídeos A (5'-CCTCAAGCCTGCCACCAAGC-3'; direto) e B (5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'; reverso). Cada reação individual era composta por: 100ng de DNA; 10mM Tris-HCL pH 9,2; 25mM KCL; 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM dNTP; 20pmol de cada oligonucleotídeo; 0,5  $\mu$ g de ovalbumina e 1 unidade of *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, Minas Gerais, Brasil) em um volume final de 50  $\mu$ l. Após *hot start* por 1min a 80C° e uma etapa inicial de desnaturação por 2min a 94C°, cada ciclo de amplificação consistiu em 40seg a 94C°, 45seg a 64C° e 50seg a 72C° repetido por 36 vezes e finalizado por uma etapa de extensão a 72C° por 5min. Cada produto de PCR foi diretamente sequenciado em sistema ABI PRISM 3130 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, EUA), usando o oligonucleotídeo 5'-GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC-3' para produtos de IL-6 e o oligonucleotídeo A para produtos de TNF- $\alpha$ . Cada sequencia obtida foi examinada usando o pacote de programas em bioestatística *Staden* (MRC, Cambridge, Reino Unido) e confirmado por inspeção visual. (FERREIRA et al)

#### 4.5.2 FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

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

#### 4.5.3 Análise Bioquímica

A coleta de sangue será realizada em tubo à 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 colesterol, triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e glicose, utilizou-se kit enzimático colorimétrico processado no aparelho Autohumalyzer A5 (Human, 2004). Para dosagem de insulina, foi utilizado o Automated Chemiluminescence System ACS-180 (Ciba- Corning Diagnostic Corp., 1995, EUA).

A resistência à insulina será definida pelo método da homeostase glicêmica (HOMA-IR), que é o produto da insulina de jejum ( $\mu\text{UI/mL}$ ) e da glicemia de jejum ( $\text{mmol/L}$ ) dividido por 22,5.

As agulhas serão descartadas de forma segura, assim como, todos os outros materiais descartáveis contaminados, bem como os materiais biológicos analisados tanto no procedimento de coleta quanto nas análises sanguíneas conforme procedimento padrão adotado pelo Laboratório de Análises Bioquímicas do ICESP / Faculdades PROMOVE de Brasília.

#### 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 eficiente quanto. Assim, podem-se estabelecer condutas que ajam prevenindo esses fatores de risco de maneira rápida, além de estabelecer um real parâmetro para a população idosa, já que os estudos que abordam esse tema só têm como objeto de estudo a população de adultos não idosos.



<b>Cálculo amostral.</b>		X											
<b>Estudo piloto.</b>			X										
<b>Revisão de literatura.</b>				X	X								
<b>Treinamento dos avaliadores.</b>						X							
<b>Coleta de dados.</b>							X	X	X				
<b>Escrita do trabalho.</b>										X			
<b>Conclusão.</b>											X		
<b>Apresentação do relatório final e submissão de trabalho científico.</b>													X

#### 4.5.7. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Foi elaborado duas versões do TCLE, mantendo o mesmo teor, mas um era direcionado para o idoso e outro direcionado ao responsável do idoso, caso este não estivesse 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 ao 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 lipídicos e antropométrico e diminuir assim, os riscos de possíveis doenças ocasionadas pela elevação dos valores plasmáticos de triglicerídeos e glicemia de jejum, bem como valores reduzidos de HDL e marcadores antropométricos serão fornecidas.

## 5. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que o estudo corrobore com achados da maioria das outras pesquisas que também analisaram indicadores antropométricos, indicando o índice C e a RCCQ como melhores preditores. Porém há uma grande possibilidade de existir um resultado diferente, talvez não em relação a quais indicadores antropométricos são melhores preditores e sim em relação ao ponto de corte, haja vista que os outros estudos utilizaram uma população de adultos não idosos.

## 6. Referências

1. VICTOR, Janaina Fonseca et al. **Perfil sociodemográfico e clínico de idosos atendidos em Unidade Básica de Saúde da Família**, Acta Paul Enferm 2009;22(1):49-54.
- 2- GUARNIERI, Ana Paula. **O envelhecimento populacional brasileiro: uma contribuição para o cuidar**, *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, v.33, n. 3, p. 139-40 (2) (2008)
- 3- ZASLAVSKY, Cláudio, GUS Iseu. **Idoso. Doença Cardíaca e Comorbidades**, Arq. Bras. Cardiol. vol.79 no.6 São Paulo Dec. 2002.
- 4- LIMA, Mariana Cavazzoni, MASSABKI, Paulo Sérgio. **Fatores de risco para doenças cardiovasculares na artrite reumatoide: tabagismo e aterosclerose**, Rev Bras Clin Med, 2009;7:343-347.
- 5- CHAHADE, Wiliam Habib. **Considerações acerca das citocinas e da terapêutica imunobiológica na Doença (Artrite) Reumatoide**. Diretor do Serviço de Reumatologia do HSPE-FMO. Monitor científico da OMS (Genebra) para a América do Sul da "The bone and joint decade 2000-2010"

6- ROVERAN, Valquíria. **Expressão local do fator de necrose tumoral alfa (tnf- $\alpha$ ) na ruptura prematura de membranas.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet. vol.31 no.5 Rio de Janeiro May 2009

7 FERREIRA, Aparecido Pimentel et al. **Risco de distúrbio glicêmico em mulheres idosas ajustadas por antropometria e genótipos de citocinas.** Rev. Assoc. Med. Bras. vol.57 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2011

8 CAETANO, Joselany Afio et al. **Descrição dos fatores de risco para alterações cardiovasculares em um grupo de idosos.** Texto Contexto Enferm, Florianópolis, 2008 Abr-Jun; 17(2): 327-35.

**Edital ICESP/PROMOVE: 02/2012 - Bolsa de Iniciação Científica do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) - ICESP/PROMOVE**

**Anexo 1 - Formulário de instrução para solicitação da bolsa de iniciação científica**

**Dados do aluno**

Nome: Elisa Helena Ramos Villas Boas

Data de nascimento: 20/09/1967

Sexo: Feminino

Endereço: Chácara 17, Lote 19, Ponte Alta Norte Gama DF.

Telefones: (61) 3404-0517

E-mail: elisa\_mamis\_celestial@hotmail.com

**Vínculo com a instituição**

Curso: Enfermagem

Matrícula: 65ENF20101163

Semestre: 5º

Campus: Aguas Claras

**Dados do projeto de pesquisa**

Título: **Associação do Genótipo Da IL-6 e TNF com os Fatores de Riscos Cardiovasculares em Idosos**

Palavras chave (3 a 6 palavras): : Idosos; fator de risco cardiovascular; genótipo

**Introdução:** O envelhecimento é considerado fator de risco para o desenvolvimento de muitas doenças, dentre elas tem maior enfoque as que afetam o sistema cardiovascular. Com o avanço dos anos, o sistema cardiovascular pode ficar exposto a uma série de problemas, tais como arteriosclerose, diminuição da distensibilidade da aorta e das grandes artérias, comprometimento da condução cardíaca e redução na função barorreceptora. **Objetivo:** Verificar a associação entre o genótipo da IL-6 e TNF com os fatores de riscos cardiovasculares em idosos. **Materiais e Métodos:** Estudo transversal, descritivo realizado com 200 idosos residentes em abrigos escolhidos por conveniência que serão submetidos a coleta de sangue e genotipagem da IL-6 e FNT, bem como a verificação dos fatores de riscos



cardiovasculares. Os dados obtidos serão analisados estatisticamente para comprovar as associações e será traçado um plano de cuidados para melhoramento do quadro de saúde o idoso.

#### **4.5.3 Cronograma de execução**

##### **Primeira concessão**

Mês 1: **Revisão do delineamento do estudo e envio do trabalho à CEP.**

Mês 2: **Cálculo amostral**

Mês 3: **Estudo piloto**

Mês 4: **Revisão de literatura**

Mês 5: **Revisão de literatura**

Mês 6: **Treinamento dos avaliadores**

##### **Renovação da concessão**

Descrição sucinta das atividades a serem realizadas

Mês 7: **Coleta de dados**

Mês 8: **Coleta de dados**

Mês 9: **Coleta de dados**

Mês 10: **Escrita do Trabalho**

Mês 11 **Conclusão**

Mês 12 **Apresentação do relatório final e submissão de trabalho científico.**

#### **Dados do orientador**

Nome: Aparecido Pimentel Ferreira

Data de nascimento: 28/09/1977

Sexo: Masculino

Endereço: Quadra 210, lote 2, Ap 1704, CEP 71930-750

Titulação: Doutor

Telefones: 7819-2808

E-mail: cidopimentel@yahoo.com.br

**Parecer do orientador:**

*O projeto apresenta grande potencial de desenvolvimento e faz parte de um outro projeto desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia e Saúde.*

*A aluna já é aluna de Iniciação Científica a mais de um ano e apresenta grande capacidade de desenvolvimento das tarefas atribuídas, além de que tem interesse pela pesquisa científica e dispõe de tempo para a realização da pesquisa e coleta de dados.*

Assinatura do orientador

Documentos a serem anexados ao projeto (3 vias)

- 1 - Este formulário devidamente preenchido e assinado
- 2 - Histórico escolar do aluno (incluindo original fornecido pela secretaria)
- 3 - Currículo do orientador publicado na Plataforma Lattes
- 4 - Projeto de Pesquisa contendo: introdução, justificativa, objetivos, materiais e métodos e referências bibliográficas (padrão ABNT).

Brasília, 31 de maio de 2012

---

Assinatura do Aluno