



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

LAÍS OTAVIANO MESQUITA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO Xba1 DO GENE APOB ASSOCIADO À
SÍNDROME METABÓLICA**

BRASÍLIA
2021

LAÍS OTAVIANO MESQUITA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO Xba1 DO GENE APOB ASSOCIADO À
SÍNDROME METABÓLICA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutica, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Esp. Aline Ribeiro Barros

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA
2021

OM582a Otaviano Mesquita, Lais
Análise do polimorfismo XbaI do gene APOB associado à
síndrome metabólica / Lais Otaviano Mesquita; orientador Aline
Ribeiro Barros; co-orientador Izabel Cristina Rodrigues
da Silva. -- Brasília, 2021.
56 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2021.

1. Polimorfismo genético. 2. Polimorfismo XbaI. 3.
Apolipoproteína B. 4. Gene APOB. 5. Síndrome Metabólica. I.
Ribeiro Barros, Aline , orient. II. Cristina Rodrigues da
Silva, Izabel , co-orient. III. Título.

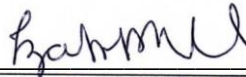
LAÍS OTAVIANO MESQUITA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO Xba1 DO GENE APOB ASSOCIADO À
SÍNDROME METABÓLICA**

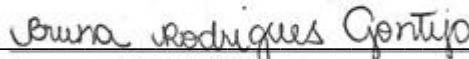
BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Prof^ª. Esp. Aline Ribeiro Barros
(Universidade de Brasília - FCE)



Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(Universidade de Brasília - FCE)



Bruna Rodrigues Gontijo
(Universidade de Brasília – FCE)



Caroline Ferreira Fratelli
(Universidade de Brasília – FCE)

BRASÍLIA
2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por tudo, especialmente por me capacitar, permitindo que eu conclua minha graduação, esta que, me proporcionou inúmeras experiências e crescimento intelectual e pessoal.

Aos meus pais, Gean e Telma, por acompanhar todas as etapas do meu crescimento com amor e dedicação, por todo esforço para garantir minha educação e formação de caráter.

À minha irmã, Larissa, que é inspiração diária, é suporte, é amor, que sempre esteve comigo, comemorou cada conquista e contribui a cada dia, para que eu seja uma pessoa melhor.

Aos amigos da vida, pelos conselhos e apoio, não somente durante o período de dedicação à graduação, mas de maneira geral, por fazerem parte da minha vida e serem motivo de empenho e dedicação. Da graduação, que me ajudaram ao longo do curso e tonaram meus dias letivos mais agradáveis e felizes. Do trabalho, por serem fonte de conhecimento e de felicidade, com os quais aprendo diariamente o real significado de profissionalismo e o amor pela profissão escolhida.

Aos professores do curso de farmácia da Faculdade de Ceilândia – UnB, pelos ensinamentos, pelo esforço e por mostrar o poder do conhecimento.

Agradeço imensamente às minhas orientadoras, Aline Ribeiro Barros e Prof^a Dra Izabel Cristina Rodrigues da Silva, pela dedicação, incentivo e paciência, por contribuírem de maneira tão essencial à minha formação.

Ao Farmacêutico Gabriel Seixas por trabalhar comigo na elaboração do projeto de TCC anterior à pandemia, pelo tempo e ensinamentos dispensados.

À banca examinadora nas pessoas de Caroline Fratelli e Bruna Gonçalves, por aceitarem o convite e serem peças fundamentais ao término deste trabalho.

Por fim, a todos que, de alguma maneira estiveram presentes da construção do saber nestes anos de graduação e na concepção deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	10
Quadro 1 – Componentes da Síndrome Metabólica segundo o NCEP-ATP III.....	10
Quadro 2 – Classificação de obesidade de acordo com o IMC.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
Tabela 1. Frequência de genótipos nos grupos caso e controle.....	11
Tabela 2. Frequência dos genótipos associada às alterações lipídicas.	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 SÍNDROME METABÓLICA	16
2.1.1 Insulina e a resistência à insulina	17
2.1.2 Hiperglicemia.....	18
2.1.3 Obesidade e a circunferência abdominal	19
2.1.4 Dislipidemia	20
2.1.5 Hipertensão arterial	21

2.1.6	Prevalência.....	21
2.1.7	Prevenção e Tratamento.....	22
2.2	APOLIPOPROTEÍNA B (ApoB).....	22
2.2.1	Polimorfismo APOB.....	24
2.3	POLIMORFISMO Xba1	24
3	JUSTIFICATIVA.....	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
	ARTIGO	31
	RESUMO	32
	ABSTRACT	33
	INTRODUÇÃO.....	34
	MÉTODOS.....	35
	RESULTADOS.....	37
	DISCUSSÃO	39
	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO A - Cadastro SIGEN.....	42

ANEXO B – Parecer comitê de ética (Doenças crônicas não transmissíveis – Síndrome Metabólica)	43
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE	45
ANEXO D - Termo de Guarda de Material Biológico.....	48
ANEXO E – Ficha de Identificação.....	50
ANEXO F – Normas do periódico	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Componentes da Síndrome Metabólica segundo o NCEP-ATP III.....	16
Quadro 2 – Classificação de obesidade de acordo com o IMC.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de genótipos nos grupos caso e controle.....	37
Tabela 2. Frequência dos genótipos associada às alterações lipídicas.	37

RESUMO

A Síndrome Metabólica (SM) compreende um conjunto de fatores de risco que predispõem ao aparecimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Seu aparecimento tem sido associado à indivíduos obesos e a presença de resistência à insulina. O estudo da Síndrome metabólica ainda é dificultado pela ausência de consenso no diagnóstico, no entanto, segundo os critérios definidos até o momento pelas organizações internacionais e aceitos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, o diagnóstico é baseado na presença de 3 dos 5 componentes a seguir: obesidade abdominal, hipertrigliceridemia, diminuição do HDL, hipertensão arterial e aumento da glicemia de jejum. Com o aumento da prevalência de SM, identificou-se a necessidade de ampliar os estudos na área, baseando-se nas recentes descobertas sobre a associação de polimorfismos do gene APOB e alterações em índices lipídicos. A apolipoproteína B (ApoB) é um componente estrutural chave, pois atua no metabolismo de todas as lipoproteínas aterogênicas, a concentração sérica de ApoB reflete o número de partículas aterogênicas, pois, cada partícula de lipoproteína de baixa densidade (VLDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) é coberta por 1 molécula de apolipoproteína B. Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo, associar a presença do polimorfismo com a Síndrome Metabólica e verificar as frequências genóticas nas alterações estudadas.

Palavras-chave: polimorfismo *Xba1*; gene APOB; síndrome metabólica.

ABSTRACT

Metabolic Syndrome (MetS) comprises a set of risk factors that predispose to the onset of cardiovascular disease and type 2 diabetes. Its onset has been associated with obese individuals and the presence of insulin resistance. The study of metabolic syndrome is still hampered by the lack of consensus in the diagnosis, however, according to the criteria defined so far by international organizations and accepted by the Brazilian Society of Cardiology, the diagnosis is based on the presence of 3 of the 5 components below: abdominal obesity, hypertriglyceridemia, decreased HDL, arterial hypertension and increased fasting glycemia. With the increase in the prevalence of MS, the need to expand studies in the area was identified, based on recent discoveries about the association of polymorphisms of the APOB gene and changes in lipid indexes. Apolipoprotein B (ApoB) is a key structural component, as it acts on the metabolism of all atherogenic lipoproteins, the serum concentration of ApoB reflects the number of atherogenic particles, as each particle of low density lipoprotein (VLDL) and low lipoprotein density (LDL) is covered by 1 apolipoprotein B molecule. Therefore, the present study aims to associate the presence of the polymorphism with the Metabolic Syndrome and to verify the genotypic frequencies in the studied alterations.

Keywords: *Xba1* polymorphism; APOB gene; metabolic syndrome.

1 INTRODUÇÃO

Na década de 80, um pesquisador chamado Gerald Reaven, observou que doenças frequentes como hipertensão arterial, alterações nas taxas de glicose e colesterol, muitas vezes, estavam associadas à obesidade. Além disso, essas condições estavam ligadas por um fator comum, chamado resistência insulínica (RI) (BERTOLAMI, 2004).

A obesidade está associada a uma diminuição expressiva na expectativa de vida e, também, a um aumento expressivo nas despesas na área de saúde. (ENGIN, 2017) Em contrapartida, o termo Síndrome Metabólica (SM), que se refere a um agrupamento de desordens metabólicas que predispõem ao surgimento de Doenças Cardiovasculares (DCV) e diabetes, está intimamente ligado à obesidade (ALBERTI et al., 2009).

Segundo Engin (2017), estudos epidemiológicos apontam que a ocorrência de SM varia entre 20% e 45% da população global e sua incidência vem aumentando a um ritmo alarmante, tornando-se um grande problema público e clínico em todo o mundo, neste ritmo espera-se que a incidência aumente aproximadamente 53% até 2035.

A patogênese da síndrome metabólica e seus componentes ainda são muito discutidos, acredita-se que a resistência à insulina e a obesidade abdominal tenham importante relação causal, demonstrando assim, grande influência do estilo de vida, dieta, padrões socioeconômicos e culturais dos indivíduos portadores da síndrome (RASK-MADSEN; KAHN, 2012a; SNIDERMAN; FARAJ; SNIDERMAN, 2007). Além disso as influências genéticas desempenham um papel crucial em seu desenvolvimento, diversos genes podem estar associados, no entanto, atualmente a compreensão da SM está amplamente ligada aos estudos relacionados à apolipoproteína tipo B (ApoB) (SNIDERMAN; FARAJ; SNIDERMAN, 2007).

O genoma humano é constituído por um conjunto de genes que são codificados pelo DNA (ácido desoxirribonucléico), formado por 4 bases que são ligadas em pares, são elas: adenina – timina; citosina – guanina. A sequência de DNA pode sofrer variações diversas: substituição de um único nucleotídeo, inserção

ou exclusão de um ou vários nucleotídeos, mudanças no número de repetição de sequências e mudanças maiores, na estrutura do cromossomo. Estas variações são referidas como polimorfismos quando sua frequência está entre 0,1% - 1% na população normal (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Mais de dez polimorfismos foram detectados dentro ou cercando o gene APOB, sendo um dos mais amplamente estudados o polimorfismo Xba1 que surge devido a uma única variação de base no exon 26 (na posição 2488° ACC → ACT), que não leva à alteração na sequência de aminoácidos, mas tem sido associado à variabilidade interindividual dos níveis de lipoproteína em várias populações (KODOGO et al., 2016).

O estudo da SM tem sido dificultado pela ausência de consenso na sua definição e nos pontos de corte dos seus componentes, com repercussões na prática clínica e nas políticas de saúde (SBD, 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é verificar a associação entre a presença de polimorfismo e SM e assim conseguir pistas para nortear a prevenção e tratamento da doença, de modo a evitar o desenvolvimento desenfreado de DCV e diabetes que tem sido observado em escala mundial.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SÍNDROME METABÓLICA

A Síndrome Metabólica (SM), também conhecida como síndrome de resistência à insulina é um fenômeno multidimensional complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência à insulina que se manifestam num indivíduo e afeta a qualidade de vida do mesmo. É uma doença da civilização moderna, associada à obesidade, como resultado da alimentação inadequada e do sedentarismo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

.A maioria das pessoas portadoras de SM sente-se bem e não tem sintomas, entretanto, estão na faixa de risco para o desenvolvimento de doenças graves, como as cardiovasculares (DCV), derrames e diabetes. Quando presente, a SM está relacionada a uma mortalidade geral duas vezes maior que na população normal, mortalidade cardiovascular três vezes maior e um risco cinco vezes maior de desenvolver diabetes tipo 2 (ALBERTI et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

O estudo da SM tem sido dificultado pela ausência de consenso na sua definição, com repercussões na prática clínica e nas políticas de saúde. Inicialmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza como ponto de partida a avaliação da resistência à insulina (RI) enquanto o National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) desenvolveu uma avaliação para uso clínico e não exige a comprovação de resistência à insulina, mas sim a presença de 3 dentre 5 dos fatores a seguir para estabelecer o diagnóstico: Obesidade abdominal, triglicérides elevados, colesterol de lipoproteína de alta densidade reduzido, pressão arterial elevada e glicose de jejum elevada (quadro 1) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

Quadro 1. Componentes da síndrome metabólica segundo o NCEP-ATP III

COMPONENTES	NÍVEIS
Obesidade abdominal por meio de circunferência abdominal	Homens > 102 cm
	Mulheres > 88 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL ou superior
HDL Colesterol	Homens < 40 mg/dL
	Mulheres < 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130 / 85 mmHg ou superior
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL
OBS: A presença de Diabetes mellitus não exclui o diagnóstico de SM	

Os consensos internacionais de cardiologia (IDF/NHLBI/AHA/WHF/IAS/IASO) optaram, após força tarefa para harmonização dos critérios diagnósticos de SM, por manter os critérios da NCEP-ATP III, salientando que diferentes sistemas de saúde podem adotar diferentes pontos de corte localmente por razões pragmáticas ou econômicas, de modo a garantir que o diagnóstico seja o mais confiável para diferentes grupos étnicos e particularmente para mulheres (ALBERTI et al., 2009).

Apesar de não fazerem parte dos critérios diagnósticos da síndrome metabólica, várias condições clínicas e fisiopatológicas podem ser a ela associadas, tais como: síndrome dos ovários policísticos, acanthosis nigricans, doença hepática gordurosa não-alcoólica, microalbuminúria, estados pró-trombóticos, estados pró-inflamatórios, de disfunção endotelial, hiperuricemia, entre outros (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

2.1.1 Insulina e a resistência à insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico secretado pelas células beta, da ilhota pancreática de Langerhans, que atua via receptores de glicoproteína localizados nos principais tecidos-alvo no fígado, músculo esquelético e adipócitos (MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018).

Esse hormônio desempenha um papel central na coordenação do metabolismo de lipoproteínas. No estado alimentado, triglicerídeos e outros nutrientes ficam disponíveis no intestino, ao ser liberada, a insulina atua no adipócito

para promover a captação de triglicerídeos e inibe a liberação de ácidos graxos livres. Isso promove o armazenamento de triglicerídeos para uso posterior. No jejum, este processo é invertido: os níveis de insulina caem e os ácidos graxos livres são liberados do adipócito para o fígado, onde são esterificados e secretados como VLDL (HAAS; ATTIE; BIDDINGER, 2013).

Além disso, a insulina é responsável também pela redução da glicose sanguínea, ao promover a entrada da glicose nas células do organismo, sendo assim, quando há resistência a esse hormônio, ele age menos nos tecidos, obrigando o pâncreas a produzir mais insulina (hiperinsulinemia), significando que, mais insulina do que o habitual está sendo necessária para evitar o aumento dos níveis de glicose no sangue (hiperglicemia) (MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018).

Alguns fatores cooperam para o aparecimento da RI: os genéticos, excesso de peso (principalmente na região abdominal) e a ausência de atividade física (GUO, 2014).

2.1.2 Hiperglicemia

A causa primária da hiperglicemia é a resistência à insulina, inicialmente, as células beta aumentam a secreção de insulina (hiperinsulinemia) como mecanismo compensatório para manter normais os níveis de glicose no sangue (euglicemia), dessa forma, depende da capacidade das células pancreáticas manter os níveis de insulina altos o suficiente para superar a resistência à insulina e limitar a hiperglicemia (GRUNDY, 2016; RASK-MADSEN; KAHN, 2012b).

No entanto, eventualmente, ocorrerá descompensação, havendo falha da insulina em manter a homeostase da glicose e como efeito observa-se hiperglicemia, que a longo prazo, pode levar o paciente a desenvolver Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (HAAS; ATTIE; BIDDINGER, 2013; MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018).

2.1.3 Obesidade e a circunferência abdominal

A obesidade é definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que apresenta risco à saúde (WHO, 2006). É avaliada a partir do cálculo de Índice de Massa Corporal (IMC), padrão internacional que divide o peso (em kg) pela altura ao quadrado (em metros). De acordo com o IMC os indivíduos são alocados em 5 categorias (quadro 2) (ENGIN, 2017). Além disso, a obesidade é resultado de uma ingestão de nutrientes maior do que o necessário para o metabolismo normal. Em termos metabólicos, a supernutrição representa um estado de desequilíbrio energético onde a ingestão de energia supera a capacidade de armazenamento, leva à acumulação de gordura ectópica e gera estresse metabólico (GRUNDY, 2016).

Quadro 2. Classificação de obesidade de acordo com o IMC

IMC = peso / (altura)²	
IMC	Classificação
18,6 – 24,9	Faixa normal
25 – 29,9	Sobrepeso
30 – 34,9	Obesidade grau I
35 – 39,9	Obesidade grau II (severa)
40 ou superior	Obesidade grau III (mórbida)

No entanto, o IMC não dá uma ideia precisa sobre a composição corporal que afeta os riscos para a saúde, como: a proporção do peso corporal que consiste em gordura ou a distribuição da mesma (ENGIN, 2017).

O tecido adiposo é considerado atualmente um tecido endócrino e biologicamente ativo (órgão parácrino). Os adipócitos sofrem hipertrofia e hiperplasia em resposta ao excesso nutricional e podem superar em número as células sanguíneas com indução de um estado hipóxico. A hipóxia pode levar as células a necrose com infiltração de macrófagos e produção de adipocitocinas, que incluem os mediadores pró-inflamatórios interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como o mediador pró-trombótico inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) (MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018).

Segundo Grundy (2016) a localização do tecido adiposo tem forte influência com relação ao desenvolvimento de doenças metabólicas. Enquanto a maior deposição de gordura na parte inferior do corpo (gluteofemoral) pode ser fator sugerido como protetor contra a SM, a obesidade predominante na parte superior do corpo, intraperitoneal (visceral) ou subcutânea, é associada a maior capacidade de desenvolver SM. No entanto, em ambos os casos os mecanismos não são bem descritos.

2.1.4 Dislipidemia

A obesidade está associada a alterações adversas no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas. Várias anormalidades lipídicas podem ser observadas em indivíduos obesos, a dislipidemia típica da SM consiste no aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos (TG), diminuição de HDL e LDL aumentado. (SRIVASTAVA et al., 2013) Quando associada com a resistência à insulina caracteriza o fenótipo lipoprotéico aterogênico e aumenta o risco de doença aterosclerótica coronariana prematura (BERTOLAMI, 2004).

O principal componente da aterogenia na dislipidemia é a elevação das lipoproteínas contendo ApoB, pois, cada partícula de lipoproteína aterogênica, que incluem lipoproteína de baixa densidade (LDL) e VLDL, contém uma molécula de ApoB, esta portanto, mede o número de partículas aterogênicas e o risco relaciona-se muito mais intimamente com ApoB do que com colesterol e LDL (GRUNDY, 2016; SNIDERMAN; FARAJ; SNIDERMAN, 2007).

O mecanismo pelo qual ocorre a desregulação dos adipócitos não é claramente entendido, mas é postulado um papel para o estresse oxidativo induzido pela obesidade, em estudos recentes houve uma correlação positiva entre o acúmulo de gordura e o estresse oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigênio e aumento da expressão de NADPH oxidase com diminuição concomitante expressão de enzimas antioxidantes (MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018).

2.1.5 Hipertensão arterial

Vários mecanismos foram propostos para explicar a relação entre pressão arterial elevada e obesidade. O consenso atual baseia-se na conjunção de diversos fatores, como: reabsorção renal aumentada de sódio (possivelmente resultante da resistência à insulina), expansão de volume intravascular, ativações da renina-angiotensina-sistema de aldosterona e sistema nervoso simpático, liberação de angiotensinogênio do tecido adiposo e resistência à insulina (GRUNDY, 2016).

2.1.6 Prevalência

De acordo com o relatório da International Diabets Federation (IDF) apresentado em 2006 a prevalência estimada da SM ao redor do mundo variava entre 20% e 25%, no entanto, essa estimativa está em crescente evolução.

No Brasil o estudo conduzido por Ramires, et. al (2018) mostra que a prevalência de SM em indivíduos acima de 18 anos para esta condição é de 9%, considerando os critérios de harmonização dos consensos internacionais de cardiologia sobre a SM, bem como variáveis independentes selecionadas com base no modelo que mostra o impacto de múltiplos fatores sociodemográficos, comportamentais e de comorbidades no estado de saúde da população.

Revelando ainda dados preocupantes, somente 23,8% da população não apresenta nenhum dos componentes da SM, e 67,3% apresentam entre um e dois componentes que podem levar a este desfecho, o que demonstra elevado número de indivíduos sob o risco de desenvolver a SM propriamente dita. Apontando também para relação positiva entre a prevalência da SM e o aumento da idade associada com variáveis sociodemográficas (idade, escolaridade, situação conjugal e região de moradia), comportamentais (autopercepção de saúde) e de comorbidades (AVC, DCV, excesso de peso, depressão e IRC) de forma diferente entre os sexos (RAMIRES et al., 2018).

As DCV constituem a primeira causa de morte no Brasil, devendo ser prioridade de saúde pública, por meio de políticas para sua prevenção e controle (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

2.1.7 Prevenção e Tratamento

Perder peso e praticar alguma atividade física são as melhores formas de prevenir e tratar a SM. Mas pode ser necessário o uso de medicamentos para tratar os fatores de risco. Entre eles estão os chamados "sensibilizadores da insulina", que ajudam a baixar a açúcar no sangue, os medicamentos antihipertensivos e os para baixar a gordura no sangue (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005).

No entanto, sabe-se que, a síndrome metabólica ainda não é totalmente compreendida e que, por si só, a obesidade, gordura visceral e resistência insulínica não são suficientes para avaliar o risco global de DCV. (ENGIN et al., 2014). Sendo assim, para melhor caracterizar a SM e o risco de desenvolver DCV, é amplamente considerada a associação com as apolipoproteínas, especialmente ApoA1 e ApoB, devido sua interação com as lipoproteínas aterogênicas, inflamação e obesidade abdominal (SNIDERMAN; FARAJ; SNIDERMAN, 2007).

2.2 APOLIPOPROTEÍNA B (ApoB)

Apolipoproteínas são proteínas que se ligam a lipídeos e constituem as lipoproteínas, estas, por sua vez, são bioconjuntos que contém proteínas e lipídeos. O sistema de lipoproteínas permite o transporte intercelular de colesterol e triglicerídeos, que desempenham papéis distintos no corpo. Os triglicerídeos são uma fonte importante de energia enquanto o colesterol é um componente estrutural de membranas e precursor de hormônios esteróides e bile (HAAS; ATTIE; BIDDINGER, 2013).

As apolipoproteínas são essenciais para o metabolismo lipídico, desempenhando funções como, transporte das moléculas hidrofóbicas no meio

aquoso plasmático, ligação a receptores específicos na superfície celular com direcionamento ao tecido alvo, regulação do colesterol total (CT) bem como ativação ou inibição de enzimas do metabolismo lipídico (LIMA, L.M.; MARIA DAS GRAÇAS CARVALHO, M.G.; SOUSA, 2007).

É a maior proteína monomérica sequenciada até agora, contendo 4.536 resíduos de aminoácidos. Seu gene foi mapeado para o braço curto do cromossomo 2, com um comprimento aproximadamente 43 kb e 29 exons (DUMAN et al., 2005).

A apolipoproteína B (ApoB) é a principal proteína funcional de transporte de colesterol para as células periféricas, está presente nos quilomícrons como ApoB-48 e nas lipoproteínas de densidade muito baixa (very low density lipoprotein - VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (intermediate density protein - IDL), e lipoproteína de baixa densidade (low density protein - LDL) como ApoB-100 (LIMA, L.M.; MARIA DAS GRAÇAS CARVALHO, M.G.; SOUSA, 2007).

A concentração plasmática de ApoB indica o número total de partículas potencialmente aterogênicas de VLDL, IDL E LDL, correlacionando-se com o nível de colesterol não-HDL, e assim constituindo um importante marcador para Doenças Cardiovasculares (DCV) (KOHEN AVRAMOGLU; ADELI, 2004).

O sequenciamento do gene APOB tornou possível estudar suas variações, a nível de DNA. (DUMAN et al., 2006) O RNA mensageiro mede 14,1 kb e codifica uma proteína que consiste em 4536 aminoácidos, de peso molecular previsto de 512 kDa. Polimorfismos desse gene foram identificados pelo uso de anticorpos monoclonais e mais recentemente, por restrição de comprimento de fragmento (GENEST et al., 1990).

Belfki, et al. (2011) relatou que a concentração de ApoB é um melhor marcador de risco para DCV do que a concentração de LDL. Em vários estudos clínicos recentes, a proporção ApoB / ApoA 1, que reflete o equilíbrio do colesterol entre potencialmente aterogênicos e partículas de lipoproteína anti-aterogênica, essa relação foi considerada como um melhor preditor de risco cardiovascular do que qualquer índice de colesterol.

2.2.1 Polimorfismo APOB

Variações na sequência de DNA podem assumir várias formas: substituição de um único nucleotídeo, inserção ou exclusão de um ou vários nucleotídeos, mudanças no número de repetições de sequências e mudanças maiores na estrutura do cromossomo. Dependendo da frequência de sua ocorrência e sua capacidade de causar doenças, estas variações são referidas como polimorfismos (com uma frequência de 0,1% na população normal) ou mutações (com uma frequência >1% e geralmente resultando em doença) (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Os polimorfismos estão em todas as regiões do genoma humano incluindo regiões intergênicas, regiões codificantes (que codificam para proteínas), regiões regulatórias (que controlam a expressão do gene) e regiões intrônicas (que separam as regiões de codificação ou éxons dentro de um gene). A grande maioria é funcionalmente neutra, não influenciando na estrutura ou função da proteína, sendo seu estudo de interesse apenas evolutivo. No entanto, em virtude de sua posição, podem alterar o código genético de forma a afetar a transcrição do gene, a estabilidade do mRNA, o splicing de RNA ou a estrutura e função da proteína (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

O gene APOB é altamente polimórfico, nele já foram descritas algumas mutações e vários polimorfismos. Polimorfismos no comprimento de fragmento de restrição (RFLPs) do gene APOB mostraram que este está associado à variação nos níveis séricos de lipídios em diferentes populações (DUMAN et al., 2006).

2.3 POLIMORFISMO Xba1

O polimorfismo rs693 conhecido como polimorfismo *APOB* 2488 Xba1 é assim denominado pois, a enzima de restrição Xba1 tem seu sítio de corte no exon 26 do gene APOB, refere-se a uma troca de um nucleotídeo, a qual resulta em uma mutação silenciosa, que não afeta a codificação de aminoácidos da ApoB (DUMAN et al., 2005; OLIVEIRA, 2005).

O polimorfismo *Xba1* se trata da troca de um nucleotídeo citosina por uma timina na terceira posição do códon 2488 (ACC - ACT), que codifica para o mesmo aminoácido, treonina. A presença de timina resulta em um sítio de restrição para a enzima *Xba1*, originando o alelo X+, e sua ausência, o alelo X-. Essa variação determina três possíveis genótipos X+X+, X+X- e X-X-. O fragmento de 710 pares de bases (pb) presente no éxon 26, é clivado pela enzima *Xba1* durante a digestão enzimática em dois fragmentos, um de 433 e outro de 277 pb no alelo X+, e não é clivado no alelo X- (OLIVEIRA, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

A Síndrome Metabólica (SM) é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular usualmente relacionados obesidade, é uma condição da era moderna desencadeada por hábitos como: má alimentação e sedentarismo, além de possuir fatores genéticos ligados à presença de polimorfismo.

Consciente da importância do assunto e considerando a relevância dos estudos referentes ao polimorfismo e sua aplicação na prática clínica, tendo em vista, ainda, a compreensão do estado de saúde da população estudada e possibilidade de proporcionar mais qualidade de vida a estes indivíduos.

O estudo da associação entre doenças e variações polimórficas de genes é empregado para demonstrar o papel de fatores genéticos na etiologia de doenças multifatoriais e desta forma identificar as melhores maneiras de prevenir e tratar essas comorbidades.

Além disso, enquanto farmacêutica em formação, entendo que, das áreas de atuação do profissional farmacêutico, a área de análises clínicas, que visa diagnosticar/confirmar doenças, bem como complementar a informação sobre a mesma, dar prognóstico, preditiva de resposta a terapias específicas, ou mesmo para aconselhamento genético e informações sobre doenças hereditárias é de grande importância, especialmente se observados os padrões de adoecimento da sociedade atual.

É necessário que os profissionais desta área estejam preparados para identificar os mais diversos tipos de doenças, incluindo as de cunho molecular, sua etiologia, patogênese, repercussões, consequências e complicações, auxiliando assim na profilaxia e tratamento das mesmas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a associação do polimorfismo Xba1 do gene *APOB* em uma amostra populacional de indivíduos com síndrome metabólica do Distrito Federal (DF).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a frequência do polimorfismo Xba1 do gene *APOB* em indivíduos com Síndrome Metabólica;
- b) Determinar as frequências genotípicas do polimorfismo *Xba1* com a Síndrome Metabólica;
- c) Verificar a possível associação entre o polimorfismo Xba1 e características presentes na Síndrome Metabólica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, K. G. M. M. et al. **Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; And international association for the study of obesity** *Circulation*, out. 2009.

BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 30, n. 6, p. 593–601, 2004.

BELFKI, H. et al. The Apolipoprotein B/Apolipoprotein A 1 ratio in relation to metabolic syndrome and its components in a sample of the Tunisian population. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 91, n. 2, p. 622–625, out. 2011.

BERKINBAYEV, S; RYSULY, M; MUSSAYEV, A; BLUM, K; BAITASOVA, N; MUSSAGALIYEVA, A; DZHUNUSBEKOVA, G; MAKHATOV, B; MUSSAYEV, A A; YESHMANOVA, A; LESBEKOVA, R; MARCHUK, Y; AZHIBEKOVA, R; OSCAR-BERMAN, M; KULMAGANBETOV, M. Apolipoprotein Gene Polymorphisms (APOB, APOC111, APOE) in the Development of Coronary Heart Disease in Ethnic Groups of Kazakhstan. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**, v. 05, n. 02, 2014.

BERTOLAMI, M. C. Alterações Do Metabolismo Lipídico No Paciente Com Síndrome Metabólica. **Revista Sociedade Cardiologia Estado de São Paulo**, v. 14, n. 2, p. 551–556, 2004.

DE CARVALHO VIDIGAL, F. et al. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: A systematic review. **BMC Public Health**, v. 13, n. 1, 2013.

DU, R. et al. Serum apolipoprotein B is associated with increased risk of metabolic syndrome among middle-aged and elderly Chinese: A cross-sectional and prospective cohort study. **Journal of Diabetes**, v. 11, n. 9, p. 752–760, 2019.

DUMAN, B. S. et al. Genetic variations of the apolipoprotein B gene in Turkish patients with coronary artery disease. **Annals of Human Biology**, v. 32, n. 5, p. 620–629, set. 2005.

DUMAN, B. S. et al. Apolipoprotein B gene variants are involved in the determination of blood glucose and lipid levels in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, n. 3, p. 261–267, 2006.

ENGIN, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, p. 1–17, 2017.

ENGIN, A. A. B. et al. Obesity and Lipotoxicity. **Journal of Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2014.

GENEST, J. J. I. et al. **DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene in patients with premature coronary artery disease** *Atherosclerosis*. [s.l: s.n.].

GRUNDY, S. M. Metabolic syndrome update. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 26, n. 4, p. 364–373, 2016.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: Insights from mouse models into disease mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, 2014.

HAAS, M. E.; ATTIE, A. D.; BIDDINGER, S. B. **The regulation of ApoB metabolism by insulin** **Trends in Endocrinology and Metabolism**, ago. 2013.

KODOGO, V. et al. Apolipoprotein B Gene Polymorphisms and Dyslipidemia in HIV Infected Adult Zimbabweans. **The Open AIDS Journal**, v. 10, n. 1, p. 190–198, 7 out. 2016.

KOHEN AVRAMOGLU, R.; ADELI, K. **Hepatic Regulation of Apolipoprotein B** **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**. [s.l.] Kluwer Academic Publishers, 2004.

LIMA, L.M.; MARIA DAS GRAÇAS CARVALHO, M.G.; SOUSA, M. O. Apo B/Apo A-I Ratio and Cardiovascular Risk Prediction. **Arq Bras Cardiol**, v. 88(6), p. 187–190, 2007.

MCCRACKEN, E.; MONAGHAN, M.; SREENIVASAN, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. **Clinics in Dermatology**, v. 36, n. 1, p. 14–20, 2018.

OLIVEIRA, M. I. A. **ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS Xba I E Eco RI DO GENE DA APOLIPOPROTEÍNA B COM A DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E DIABETES MELLITUS TIPO 2**. [s.l.: s.n.].

PELEGRINI, A. **PREVALÊNCIA DE FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES EM ADOLESCENTES E ASSOCIAÇÃO DA LIPEMIA SÉRICA COM A VARIABILIDADE NOS POLIMORFISMOS DOS GENES APOA5 e APOB, COMPOSIÇÃO CORPORAL E APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA EM ADOLESCENTES E PAIS**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

RAMIRES, E. K. N. M. et al. Prevalence and factors associated with metabolic syndrome among brazilian adult population: National health survey – 2013. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 5, p. 455–466, 1 maio 2018.

RASK-MADSEN, C.; KAHN, C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2052–2059, 2012a.

RASK-MADSEN, C.; KAHN, C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 9, p. 2052–2059, set. 2012b.

SBD, D. Síndrome metabólica em crianças e adolescentes. **Diretrizes SBD**, p. 337–341, 2015.

SNIDERMAN, A. D.; FARAJ, M.; SNIDERMAN, A. **Apolipoprotein B**,

apolipoprotein A-I, insulin resistance and the metabolic syndrome *Curr Opin Lipidol.* [s.l.] Wolters Kluwer Health | Lippincott, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diagnóstico e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 1–27, 2005.

SRIVASTAVA, N. et al. Association of apolipoprotein B XbaI gene polymorphism and lipid profile in northern Indian obese. **Indian Journal of Human Genetics**, v. 19, n. 1, p. 26–31, 2013.

STARCEVIC, J. N. et al. Die Polymorphismen XbaI (rs693) und EcoRI (rs1042031) des ApoB Gens sind bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 mit Carotisplaques, aber nicht mit der Intima-Media-Dicke assoziiert. **Vasa - European Journal of Vascular Medicine**, v. 43, n. 3, p. 171–180, 2014.

ARTIGO

Análise do polimorfismo Xba1 do gene APOB associado à síndrome metabólica

Analysis of the Xba1 polymorphism of the APOB gene associated with metabolic syndrome

Laís O. Mesquita¹; Aline R. Barros¹; Marina M. Stival; Luciano R. de Lima;
Silvana S. Funghetto; Izabel C. R. da Silva¹

1. Universidade de Brasília – FCE, Brasília, Brasil

2.

RESUMO

Introdução: A Síndrome Metabólica compreende um conjunto de fatores de risco que predispõem ao aparecimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Seu aparecimento tem sido associado à indivíduos obesos e a presença de resistência à insulina. A apolipoproteína B é um componente estrutural chave, pois atua no metabolismo lipídico de todas as lipoproteínas aterogênicas. O polimorfismo *Xba1* do gene APOB tem sido associado a alterações de perfil lipídico e desenvolvimento de doenças ateroscleróticas. **Objetivo:** O presente estudo tem por objetivo, associar a presença do polimorfismo com a Síndrome Metabólica e verificar as frequências genótípicas nas alterações estudadas em uma população do DF. **Métodos:** Foi realizado um estudo caso controle com 187 pacientes, divididos em grupo caso (125) e controle (62), sendo associadas as alterações de HDL , Colesterol e LDL, com a presença ou não do polimorfismo *Xba1* do gene APOB. **Conclusão:** não houve associação entre a presença do polimorfismo e a ocorrência de síndrome metabólica ou alterações lipídicas.

Unitermos: polimorfismo *Xba1*; gene APOB; síndrome metabólica.

ABSTRACT

Introduction: Metabolic Syndrome comprises a set of risk factors that predispose to the onset of cardiovascular disease and type 2 diabetes. Its onset has been associated with obese individuals and the presence of insulin resistance. Apolipoprotein B is a key structural component, as it acts on the lipid metabolism of all atherogenic lipoproteins. The APOB gene Xba1 polymorphism has been associated with changes in the lipid profile and development of atherosclerotic diseases. **Objective:** The present study aims to associate the presence of the polymorphism with the Metabolic Syndrome and to verify the genotypic frequencies in the alterations studied in a population of the DF. **Methods:** A case-control study was carried out with 187 patients, divided into case (125) and control (62) groups, associated with changes in HDL, cholesterol and LDL, with or without the APOB gene Xba1 polymorphism. **Conclusion:** there was no association between the presence of polymorphism and the occurrence of metabolic syndrome or lipid changes.

Keywords: Xba1 polymorphism; APOB gene; metabolic syndrome.

INTRODUÇÃO

De acordo com os critérios de harmonização, definidos pela Federação Internacional de Diabetes junto à Associação Americana do Coração e Instituto coração, pulmão e sangue, a Síndrome Metabólica (SM) se trata de um grupo de distúrbios clínicos, definidos com base em pelo menos três dos cinco fatores a seguir: aumento da circunferência da cintura, pressão arterial elevada, elevação da glicose no sangue em jejum, hipertrigliceridemia e diminuição do colesterol de lipoproteína de alta densidade¹.

A SM ocorre mais comumente em pessoas obesas, resultado das mudanças significativas nos hábitos de vida das populações, motivados pelas modificações nos padrões socioeconômicos e culturais ao longo dos anos. Está associada a uma mortalidade geral duas vezes maior que na população normal, mortalidade cardiovascular três vezes maior e um risco cinco vezes maior de desenvolver Diabetes tipo 2. Tais distúrbios metabólicos podem ser explicados pelo desenvolvimento de um estado pró-inflamatório derivado do excesso de calorias e supernutrição e, talvez, outras condições inflamatórias crônicas que induzem à resistência à insulina (RI), com o potencial para prejudicar várias vias biológicas, sendo a RI um elo comum entre todos os componentes da SM^{1,4,7,8}.

Estimativas recentes sobre a prevalência de SM a nível mundial, apontam que 20-25% da população adulta possui a doença, nos Estados Unidos a prevalência foi de 22,9% entre 2009-2010, na América Latina a prevalência entre 2003-2005 foi de 18-29%, apresentando variação entre os territórios estudados, no Brasil a prevalência variou em torno de 29,2% em indivíduos entre 19-64 anos em diferentes regiões do país⁴.

Muitos genes polimórficos foram ligados ao risco de desenvolver doenças cardiovasculares (DCV), incluindo, principalmente, genes ligados ao metabolismo lipídico, no qual está incluída a Apolipoproteína B (ApoB), esta desempenha papel central, no transporte e metabolismo de lipoproteínas de diferentes densidades, através da regulação do colesterol total (CT) e concentrações de LDL em plasma^{2,3,6}.

Apo B é uma proteína monomérica que contém 4536 resíduos de aminoácidos. Seu gene foi mapeado para o braço curto do cromossomo 2, com um comprimento aproximado de 43 kb e 29 exons. O sequenciamento do gene APOB tornou possível estudar suas variações em o nível de DNA³.

O polimorfismo *Xba1* surge devido a uma única variação de base no exon 26, que possui 710 pb, na posição 2488^o, onde há a troca de uma citosina por uma timina (ACC → ACT) que não leva a alteração na sequência de aminoácidos, e consequentemente não altera a proteína produzida, treonina, sendo assim, considerada uma mutação silenciosa. Esta mudança de base cria um local de corte para a enzima de restrição *Xba1*, assim o fragmento de 710 bp, é clivado pela enzima *Xba1* durante a restrição enzimática em dois fragmentos um de 433 e outro de 277 bp no alelo X+, e não é clivado no alelo X- (ausência de polimorfismo), determinando 3 possíveis genótipos: X+X+, X+X-, X-X-^{6,9,10}.

Há mais de 20 anos os polimorfismos APOB tem sido associados ao desenvolvimento de aterosclerose. Atualmente vários estudos clínicos, relatam que a proporção ApoB/ApoA1, é um melhor preditor de risco cardiovascular do que qualquer nível de colesterol, pois reflete o equilíbrio do colesterol entre partículas potencialmente aterogênicas (LDL) e partículas de lipoproteína anti-aterogênica (HDL)^{2,12}. O estudo de Du et al. (2019) relata ainda que, ApoB sérica foi significativamente associada com aumento do risco de SM prevalente e incidente entre uma população de chineses de meia-idade e idosos.

O objetivo deste estudo é observar a frequência do aparecimento dos genótipos X+/X+, X-/X+ e X-/X- de modo a associar ou não a SM com a presença do polimorfismo e, desta forma, colaborar para o melhor entendimento dos fatores que predispõem ao aparecimento da síndrome, além de facilitar o diagnóstico, prevenção e tratamento.

MÉTODOS

Participantes da Pesquisa

Trata-se de um estudo transversal do tipo caso-controle realizado com 189 pacientes provenientes das Unidades Básicas de Saúde (UBS) número 06 e 08 de

Ceilândia, Brasília-DF. Sendo 127 participantes do grupo caso, destas 67 apresentavam LDL alterado e 58 não, enquanto no grupo controle (sem síndrome metabólica) 33 pacientes apresentavam LDL alterado e 29 não, totalizando 62 indivíduos. As características clínicas dos participantes foram registradas em fichas de identificação (anexo E).

Critérios de inclusão/exclusão e aspectos legais

A pesquisa foi aprovada por meio do Parecer nº 1.355.211, do Comitê de Ética em Pesquisa da FEPECS/SES-DF, CAAE nº: 50367215.5.000.5553, conforme ANEXO B, deste trabalho.

Na seleção das participantes do estudo foram utilizados os seguintes critérios: Inclusão: Ser do sexo feminino; Ter idade \geq 60 anos; Ser capaz de compreender, verbalizar e responder as questões propostas; e expressar o aceite de participação como sujeito da pesquisa após esclarecimento dos objetivos e métodos de pesquisa, por assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (anexo C). Foram critérios de Exclusão: Ser portadora de doenças mentais ou de neoplasias em tratamento; Ter passado por cirurgia cardíaca nos últimos seis meses; e fazer uso de vitaminas ou suplemento alimentar.

Procedimentos Técnicos e Laboratoriais

Cerca de 5mL de sangue venoso periférico foi coletado em tubos com EDTA. A partir do sangue coletado foi extraído o DNA com auxílio do *Mini Kit PureLink® Genomic*, da empresa Invitrogen (catálogo #K1820-02, lote #19339891). O DNA obtido foi quantificado por meio de espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop® (*Thermo Fisher Scientific Inc.*).

A genotipagem foi realizada através da técnica de PCR qualitativa. Utilizando em cada reação: 8,0 μ L de DNA genômico na concentração final de 2,5 ng/ μ L; 12,5 μ L de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl); 6,25 μ L de MgCl₂ 50 mM (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil); 6,25 μ L de desoxirribonucleotídeo trifostato (dNTPs); 2,5 mM; (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil); 2 μ L de Taq-Polimerase, (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil), 10 U/ μ L; 2,5 μ L de cada oligonucleotídeo (10 μ M, *IDT*

technologies), completando com água Milli-Q para um volume final de 53 µL por reação.

As seguintes sequências de oligonucleotídeos foram utilizadas para a análise do polimorfismo *Xba1* do gene APOB:

F-5'-GGAGACTATTCAGAAGCTAA-3';

R-5'-GAAGAGCCTGAAGACTGACT-3'.

As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento à 58°C por 1 minuto, extensão à 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto da PCR (fragmento de 710pb) foi digerido utilizando a enzima *Xba1*, o sítio de corte gera dois fragmentos, um de 277pb e 433pb. As amostras foram submetidas a banho-maria a 37°C durante 2 horas e os produtos da digestão foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 2% com brometado por cerca de duas horas a 50W, sendo visualizados em Transluminador com fonte UV acoplado com fotodocumentador (L-PIX Touch).

RESULTADOS

Para análise estatística foi utilizado o programa SPSS versão 25.0. Para a comparação entre os genótipos foi aplicado o teste qui-quadrado de Pearson. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). De acordo com a Tabela 1 e 2 a seguir:

Tabela 1. Frequência dos genótipos nos grupos caso e controle

Síndrome metabólica	
Sim	Não

		Contagem	N % da coluna	Contagem	N % da coluna	P valor
APOB <i>Xba1</i>	X+/X+	23	18,1%	9	13,6%	0,287
	X-/X+	78	61,4%	37	56,1%	
	X-/X-	26	20,5%	20	30,3%	

Teste Qui-Quadrado. Nível de significância 5%.

Tabela 2. Frequência dos genótipos associada às alterações lipídicas.

		Síndrome metabólica										
		Sim					Não					
		HDL					HDL					
		alterado		Normal			alterado		Normal			P valor
		Contagem	N % da coluna	Contagem	N % da coluna	P valor	Contagem	N % da coluna	Contagem	N % da coluna	P valor	
APOB <i>Xba1</i>	X+/X+	7	19,4%	16	17,8%	0,093	0	0,0%	9	14,5%	0,562	
	X-/X+	26	72,2%	51	56,7%		2	50,0%	35	56,5%		
	X-/X-	3	8,3%	23	25,6%		2	50,0%	18	29,0%		
		COLESTEROL TOTAL					COLESTEROL TOTAL					
		alterado		Normal			alterado		Normal			P valor
		Contagem	N % da coluna	Contagem	N % da coluna	P valor	Contagem	N % da coluna	Contagem	N % da coluna	P valor	
APOB <i>Xba1</i>	X+/X+	9	13,2%	14	23,7%	0,142	5	14,7%	4	12,5%	0,781	
	X-/X+	47	69,1%	31	52,5%		20	58,8%	17	53,1%		
	X-/X-	12	17,6%	14	23,7%		9	26,5%	11	34,4%		
		LDL					LDL					
		Alterado		Normal			Alterado		Normal			P valor
		Contagem	N % da coluna	Contagem	N % da coluna	P valor	Contagem	N % da coluna	Contagem	N % da coluna	P valor	
APOB <i>Xba1</i>	X+/X+	8	11,9%	15	25,9%	0,12	5	15,2%	4	13,8%	0,673	
	X-/X+	45	67,2%	31	53,4%		20	60,6%	15	51,7%		
	X-/X-	14	20,9%	12	20,7%		8	24,2%	10	34,5%		

Teste Qui-Quadrado. Nível de significância 5%.

A análise dos genótipos relacionada à presença de SM mostra que: X-/X+ (heterozigoto) apresenta predominância em ambos os grupos estudados, representando 61,4% no grupo caso e 56,1% no grupo controle. E ainda que: o genótipo X-/X- (homozigoto), com 30,3%, é mais presente em indivíduos do grupo controle e o genótipo X+/X+ (homozigoto) não tem grande variação entre os grupos, representando 18,1 e 13,6%, nos grupos caso e controle, respectivamente.

Quanto à avaliação de alterações lipídicas, houve predominância do genótipo heterozigoto ($X-/X+$) para as 3 alterações lipídicas estudadas em ambos os grupos, conforme tabelas 1 e 2.

DISCUSSÃO

O estudo de Du et al., (2019), realizado em uma coorte de 10.340 adultos, destes 2.794 possuíam SM, com idade >40 anos em Xangai, China entre 2010-2015, e utilizando IC de 95% mostrou que, houve associação significativa de ApoB com a incidência de SM, especialmente entre indivíduos com triglicerídeos e peso em faixas normais.

Na Índia, o estudo realizado por Srivastava et al., (2013) compreendendo obesos (60 homens e 72 mulheres) e não obesos (79 homens e 53 mulheres) adultos com idades compatíveis, mostra que o genótipo $X+/X+$ não diferiu significativamente entre os dois grupos. Quando analisada a associação entre os genótipos presentes no polimorfismo *Xba1* de APOB e o perfil lipídico, não foi verificada associação com nenhuma das variáveis.

No estudo realizado por Berkinbayev et al., (2014), com 448 homens, entre 30-55 anos, das nacionalidades Cazaque e Uigur que residem no Cazaquistão, foi descrito aumento do nível de ApoB nos Cazaques e Uigures do grupo caso. No entanto a análise genotípica revelou que não houve diferença significativa entre os níveis de lipídeos no plasmáticos em relação a presença dos genótipos associados ao polimorfismo *Xba1*, sugerindo que o polimorfismo não afetou o sistema de transporte de lipídeos.

Apesar dos indícios de inúmeros estudos apontarem para a associação entre o polimorfismo *Xba1* e as alterações de perfil lipídico, desenvolvimento de doenças ateroscleróticas e diabetes, ainda não é possível definir esta associação como definitiva, já que, faz-se necessário então, considerar que diversas condições clínicas e fisiopatológicas que podem estar envolvidas no aparecimento da SM, além da necessidade de considerar critérios como: idade, alimentação, história pregressa, etnia, condições socioeconômicas, dentre outros fatores.

CONCLUSÃO

Este estudo verificou que não houve associação estatística significativa entre a presença do polimorfismo e a suscetibilidade à SM. Ao avaliar a variação dos níveis de HDL, Colesterol total e LDL, observou-se, ainda, que não houve associação estatística significativa que permita relacionar as alterações lipídicas com a presença do polimorfismo.

No entanto, considerando as informações obtidas a partir dos estudos citados, bem como as variações étnicas envolvidas, verificamos que, ainda são necessários estudos acerca do assunto, de modo a explorar a possibilidade de haver influência ou não da presença do polimorfismo *Xba1* com as alterações lipídicas e desenvolvimento de SM.

REFERÊNCIAS

1. ALBERTI, K. G. M. M. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; And international association for the study of obesity. *Circulation*. 2009; 120: 1640-1645.
2. BELFKI, H. et al. The Experimental and Molecular Pathology Apolipoprotein B/Apolipoprotein A1 ratio in relation to metabolic syndrome and its components in a sample of the Tunisian population. *Elsevier*. 2011; 91(2): 622–625.
3. BERKINBAYEV, S. et al. Apolipoprotein Gene Polymorphisms (APOB, APOC111, APOE) in the Development of Coronary Heart Disease in Ethnic Groups of Kazakhstan. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*. 2014; 05 (02): 216.
4. VIDIGAL, F. C. et al. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: A systematic review. *BMC Public Health*. 2013; 13 (1): 1198.
5. DU, R. et al. Serum apolipoprotein B is associated with increased risk of metabolic syndrome among middle-aged and elderly Chinese: A cross-sectional and prospective cohort study. *Journal of Diabetes*. 2019; 11 (9): 752–760.
6. DUMAN, B. S. et al. Apolipoprotein B gene variants are involved in the determination of blood glucose and lipid levels in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Cell Biochemistry and Function*. 2006; 24 (3): 261–267.
7. RAMIRES, E. K. N. M. et al. Prevalence and factors associated with metabolic syndrome among brazilian adult population: National health survey *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2013; 110 (5): 455–466.
8. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diagnóstico e tratamento. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005; 84:1–27.
9. KODOGO, V. et al. Apolipoprotein B Gene Polymorphisms and Dyslipidemia in HIV Infected Adult Zimbabweans. *The Open AIDS Journal*. 2016; 10

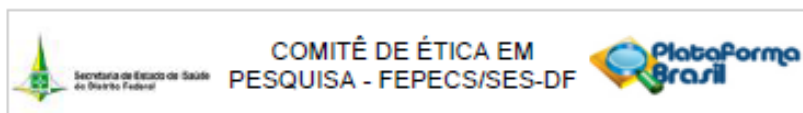
(1):190–198.

10. PELEGRINI, A. Prevalência de fatores de risco cardiovasculares em adolescentes e associação da lipemia sérica com a variabilidade nos polimorfismos dos genes *apoa5* e *apob*, composição corporal e aptidão cardiorrespiratória em adolescentes e pais. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011. Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Educação Física.

11. SRIVASTAVA, N. et al. Association of apolipoprotein B XbaI gene polymorphism and lipid profile in northern Indian obese. *Indian Journal of Human Genetics*. 2013; 19 (1): 26–31.

12. STARCEVIC, J. N. et al. Die Polymorphismen XbaI (rs693) und EcoRI (rs1042031) des ApoB Gens sind bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 mit Carotisplaques, aber nicht mit der Intima-Media-Dicke assoziiert. *Vasa - European Journal of Vascular Medicine*. 2014; 43 (3): 171–180.

ANEXO B – Parecer comitê de ética (Doenças crônicas não transmissíveis – Síndrome Metabólica)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Abordagem das Condições Crônicas Não Transmissíveis na Atenção Primária à Saúde

Pesquisador: Marina Morato Stival

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 50367215.5.0000.5553

Instituição Proponente: Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal / FEPECS/ SES/ DF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.355.211

Apresentação do Projeto:

Conforme o Parecer 1.314.141

Objetivo da Pesquisa:

Conforme o Parecer 1.314.141

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme o Parecer 1.314.141

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme o Parecer 1.314.141

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme o Parecer 1.314.141

Recomendações:

Recomenda-se em Pesquisas futuras, pautar-se nas recomendações do Conselho Nacional de Saúde, em Resolução de número 466 de 12/12/2012. O instrumento de coleta de dados foi anexado ao Projeto, na forma do recomendado pelo CEP/FEPECS. O colegiado havia solicitado justificativas quanto ao projeto de pesquisa não necessitar a análise da CONEP. A pesquisadora

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde
do Distrito Federal

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FEPECS/SES-DF



Continuação do Parecer: 1.355.211

apresentou longa e satisfatória justificativas, em anexo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador assume o compromisso de garantir o sigilo que assegure o anonimato e a privacidade dos sujeitos da pesquisa e a confidencialidade dos dados coletados. Os dados obtidos na pesquisa deverão ser utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo, e somente poderá se iniciar após a aprovação do CEP. O pesquisador deverá encaminhar relatório final, após a pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_598464.pdf	22/11/2015 17:42:01		Aceito
Outros	Instrumentos.pdf	22/11/2015 17:41:05	Marina Morato Stival	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_CEP.pdf	22/11/2015 17:39:21	Marina Morato Stival	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	17/10/2015 10:02:42	Marina Morato Stival	Aceito
Outros	termosconcordancia.pdf	07/10/2015 20:48:35	Marina Morato Stival	Aceito
Outros	CurriculoMarinaMoratostival.pdf	07/10/2015 20:47:29	Marina Morato Stival	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOAbordagemDCNT.pdf	07/10/2015 20:41:25	Marina Morato Stival	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	07/10/2015 20:39:19	Marina Morato Stival	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904

UF: DF Município: BRASÍLIA

Telefone: (81)3325-4955 Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Abordagem das Condições Crônicas Não Transmissíveis na Atenção Primária à Saúde

O (a) Senhor (a) está sendo convidada a participar do projeto: Abordagem das Condições crônicas não transmissíveis na atenção primária à saúde. O nosso objetivo é Investigar o processo saúde-doença de indivíduos que vivem com hipertensão arterial e diabetes *mellitus* em Regional Administrativa do Distrito Federal.

O (a) senhor (a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (a).

A sua participação será através de uma avaliação realizada na Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília (FCE-UnB) para: medida de sua composição corporal pelo DXA, uma balança, e coleta de 15ml de sangue do seu braço para realização de exames que permitem conhecer um pouco melhor como “funciona” estas doenças, do ponto de vista genético. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis. Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local.

Além disso você participará de uma entrevista e responderá perguntas de um questionário com um tempo estimado de 1 hora. Será respeitado o tempo de cada um para respondê-lo. Depois será agendada uma visita em sua casa para que um pesquisador vá até sua casa e faça uma entrevista e observe sua casa. Esta visita poderá durar até 1 hora. Informamos que a Senhor (a) pode se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para a senhor (a).

A sua participação neste estudo poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido. Os resultados estarão sempre disponíveis a você. Caso seja de seu desejo, os resultados serão discutidos

com você pela equipe deste trabalho. Sua participação poderá ainda ajudar no maior conhecimento sobre **Condições Crônicas Não Transmissíveis**, principalmente em relação às causas genéticas da doença.

Sua participação é voluntária e não alterará o seguimento e tratamento da doença que você já está fazendo. Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis. Caso você decida não participar, isto não afetará o seguimento e tratamento normal nem o seu relacionamento com seu médico. Conforme previsto pelas leis brasileiras você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade da Ceilândia da Universidade de Brasília, no banco de amostras "**Condições Crônicas Não Transmissíveis**", sob a responsabilidade dos pesquisadores. Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Os resultados da pesquisa serão divulgados em eventos científicos e na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda do pesquisador.

Se o Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dar(a). Marina Morato Stival, na instituição Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília telefone: 8178-3397 ou 3107-8418, no horário: 08:00 às 18:00.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidas através do telefone: (61) 3325-4955.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Nome / assinatura:

Pesquisador

Brasília, ___ de _____ de _____

ANEXO D - Termo de Guarda de Material Biológico

Termo de guarda de material biológico de todos os participantes da pesquisa.

Termo de Guarda de Material Biológico

Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda de seu material biológico (sangue). Você poderá autorizar ou não a guarda de seu material biológico. A decisão é sua.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia, no banco de amostras “Gpesen”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva e será utilizado somente para verificar os polimorfismos genéticos do presente estudo.

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com seu nome. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número, mantendo-se assim o sigilo e respeito à confidencialidade dos seus dados.

Se for de seu interesse, você terá acesso aos resultados dos seus exames.

O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar a frequência de determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) em indivíduos saudáveis.

Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca seu nome ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

A qualquer momento você terá acesso a seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar seu material biológico do banco onde se encontra armazenado.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda de meu material biológico (sangue) decorrente da presente pesquisa.

Assinatura do participante

Brasília, ____ de _____ de _____

ANEXO E – Ficha de Identificação

IDENTIFICAÇÃO

1. Dados Pessoais

Nome: _____

Sexo: F () M ()

Telefone: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos

Estado Civil: _____

Endereço: _____

Nacionalidade: _____ Naturalidade: _____

Cor: () Branca () Parda () Negra () Outros

Nível de escolaridade: _____

Ocupação: _____

Possui familiares: () Sim () Não

Filhos: _____

Renda mensal: _____

Renda familiar: _____

Reside em casa: () própria () alugada () cedida

Número de moradores na casa: _____

Religião: _____

Diagnóstico: () HAS Tempo de diagnóstico: _____ () DM

Tempo de diagnóstico: _____

Tipo de DM: () Insulino-dependente () Não Insulino-Dependente

Outras doenças: _____

Paciente do grupo controle: () Sim () Não

2- Hábitos

Tabagismo () Não () Sim. Há quantos anos?

Etilista () Não () Sim. Há quantos anos? _____

Realiza exercícios físicos? () Não () Sim. Com que frequência? _____

Tipo de exercício: _____

Sono: () Normal () Insônia () Sonolência () Dificuldade para adormecer

Volume de líquido ingerido diariamente:

Água: _____ mL Refrigerantes: _____ mL Sucos: _____ mL

Outros: _____ mL

Usa adoçantes? () Não () Sim Com que frequência?

Lazer: _____

3- Alimentação

Nº de refeições por dia: _____

Tem restrição alimentar? () S () N

Se sim, a qual alimento? _____

Faz dieta alimentar: () Sim () Não

4- Sexualidade

() Ativa () Inativa () Uso de preservativo () mais de um parceiro

5. Antecedentes familiares

() Diabetes () Hipertensão arterial () Cardiopatias () Neoplasias

Outros:

6. Antecedentes ginecológicos

Menarca: _____ Menopausa: _____

ANEXO F – Normas do periódico

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC). É indexado na Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periodica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, de atualização, experimentais, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol, mas o texto completo será publicado apenas em inglês, com resumo em português ou espanhol.

ANÁLISE DOS TRABALHOS

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

ESTRUTURA DO TEXTO

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original, inédita, que possam ser replicados ou generalizados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas.

Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir.

REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

Exemplos:

- **Artigos de periódicos (um só autor)** Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da 'política racial' do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.
- **Artigos de periódicos (até seis autores)** Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.
- **Artigos de periódicos (mais de seis autores)** Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency

of anti-H. pylori antibodies in Brazilian blood donors. Braz J Med Biol Res. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.

☐ **Artigo de periódico on-line** Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.

☐ **Livros no todo (dois autores)** Eyre HJ, Lange DP. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.

☐ **Capítulos ou parte de livro editado por outro autor** Mendenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.

☐ **Parte de livro em meio eletrônico** São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). Entendendo o meio ambiente. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.

☐ **Evento em meio eletrônico** Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

☐ **Tese ou dissertação** Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

☐ **Citações no texto** Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

Tabelas e figuras

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O GNPapers aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png, e com resolução de no mínimo 300 dpi.

O direito à privacidade do paciente não deve ser infringido. Imagens que eventualmente permitam a identificação pessoal somente poderão ser utilizadas com consentimento por escrito do paciente ou responsável, quando da submissão do manuscrito.

Abreviações e nomes de medicamentos

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parêntese.