



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

ELISA DE SOUZA ALVES

**VARIANTES ALÉLICAS CLÁSSICAS DO GENE APOLIPOPROTEÍNA B E PERFIL
LIPÊMICO DE IDOSOS**

BRASÍLIA, 2019

ELISA DE SOUZA ALVES

**VARIANTES ALÉLICAS CLÁSSICAS DO GENE APOLIPOPROTEÍNA B E PERFIL
LIPÊMICO DE IDOSOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega
Co-orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, 2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AAL474v Alves, Elisa de Souza
Variantes alélicas clássicas do gene Apolipoproteína B e
perfil lipêmico de idosos / Elisa de Souza Alves;
orientador Otávio de Tolêdo Nóbrega; co-orientador Izabel
Cristina Rodrigues da Silva. -- Brasília, 2019.
58 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Apolipoproteína B. 2. Polimorfismo genético. 3. Idoso.
4. Hiperlipidemia. I. Nóbrega, Otávio de Tolêdo, orient. II.
Silva, Izabel Cristina Rodrigues da, co-orient. III. Título.

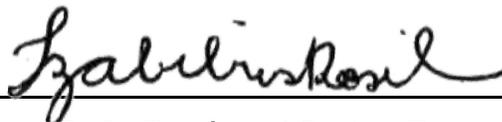
ELISA DE SOUZA ALVES

**VARIANTES ALÉLICAS CLÁSSICAS DO GENE APOLIPOPROTEÍNA B E PERFIL
LIPÊMICO DE IDOSOS**

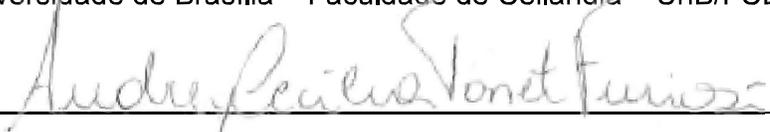
BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)



Co-Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)



Profa. Dra. Audrey Cecília Tonet Furioso
(Universidade de Brasília – Universidade Católica de Brasília – UnB/UCB)

BRASÍLIA, 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de ter cursado essa graduação, por ter permitido tamanho aprendizado e por todas as graças que me concedeu para conseguir superar as dificuldades e os desafios desse tempo. Obrigada por tudo e pra sempre.

Agradeço à minha família, minha mãe (Elizabete Maria de Souza Alves), meu pai (Helder Alves de Melo), meu irmão (Fernando Augusto de Souza Melo), e ao meu namorado (Gabriel Cantieri Taube da Conceição), por terem sido meu grande ponto de apoio e força ao longo desses 5 anos. Vocês são minha base e meus maiores incentivadores. Gratidão!

Aos meus professores, por colocarem o seu dom da docência à disposição, assumindo a nobre missão de formar profissionais qualificados e comprometidos. Em especial, agradeço ao meu orientador, Otávio de Tolêdo Nóbrega, por toda a paciência, ensinamentos e oportunidades, e por ser um excelente mestre.

Agradeço a todos os amigos, aqueles que conheci durante a graduação e os que a vida me trouxe, especialmente Raabe Andrade Veloso, Larissa Ribeiro Gonçalves e Thaís Vieira Marques, por toda a parceria e amizade, e por tornaram esses anos mais leves e especiais. Por fim, agradeço à Comunidade Católica da UnB/FCE e ao Setor Universitário da Arquidiocese de Brasília, por serem um sinal de paz e da presença de Deus dentro da universidade.

RESUMO

Introdução: O gene da apolipoproteína B (apo B) contém diversos sítios polimórficos descritos como modificadores do risco de eventos cardiovasculares.

Objetivo: Verificar a associação do polimorfismo *Xba* I (rs693) do gene da apolipoproteína B com fatores de risco aterosclerótico, incluindo perfil lipêmico, de um segmento da população brasileira idosa. **Métodos:** Características clínicas e antropométricas, dados bioquímicos e de ingestão calórica de 644 indivíduos idosos foram determinados. A análise genômica de *Xba* I foi realizada por meio de reação em cadeia da polimerase convencional seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP). Análises estatísticas foram realizadas para avaliar a ocorrência de diferenças das medidas na amostra conforme genótipos de apo B. Adotou-se o limiar de significância de $P \leq 0.05$ e todas as análises foram executadas com o Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (SPSS) para Windows (versão 17.0).

Resultados: Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *Xba* I e variações nos níveis séricos de LDL, colesterol total e lipídeos totais, sendo observadas médias mais elevadas para o genótipo homozigoto para o alelo T. **Conclusão:** Nossos resultados corroboram que variações genéticas na apolipoproteína B afetam o perfil lipêmico dos indivíduos, podendo contribuir para o risco aterosclerótico.

Palavras-chave: Apolipoproteína B, polimorfismo genético, idoso, hiperlipidemia.

ABSTRACT

Background: The apolipoprotein B (apo B) gene contains several polymorphic sites described as modifying the risk of cardiovascular events. **Aim:** To verify the association of the *Xba* I polymorphism (rs693) of the apolipoprotein B gene with atherosclerotic risk factors, including lipemic profile, of a segment of the elderly Brazilian population. **Methods:** Clinical and anthropometric characteristics, biochemical data and caloric intake of 644 elderly individuals were determined. Genomic analysis of *Xba* I was performed by conventional polymerase chain reaction followed by enzyme restriction (PCR-RFLP). Statistical analyzes were performed to evaluate the occurrence of differences of the measurements in the sample according to apo B genotypes. The significance threshold of $P \leq 0.05$ was adopted and all analyzes were performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows (version 17.0). **Results:** A statistically significant association was found between the *Xba* I polymorphism and serum LDL, total cholesterol and total lipid levels, with higher mean values for the homozygous genotype for the T allele. **Conclusion:** Our results corroborate that genetic variations in apolipoprotein B affect the lipemic profile of the individuals, and may contribute to the atherosclerotic risk.

Key-words: Apolipoprotein B, genetic polymorphism, elderly, hyperlipidemia.

LISTA DE SIGLAS

Apo B – Apolipoproteína B

CT – Colesterol total

DAC – Doença Arterial Coronariana

DCV – Doença cardiovascular

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HUB – Hospital Universitário de Brasília

HUCB – Hospital da Universidade Católica de Brasília

IDL – Lipoproteína de densidade intermediária

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LT – Lipídeos totais

PC-R – Proteína C-reativa

PCR – Reação em cadeia da polimerase

QM – Quilomícrons

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SPSS - Pacote Estatístico para as Ciências Sociais

TG – Triglicérides

TSH – Hormônio estimulante da tireóide

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Valores de referência e de alvo terapêutico do perfil lipêmico de adultos com mais de 20 anos.....4

Tabela 1. Análise de variáveis clínicas e bioquímicas da amostra utilizando MANOVA, de acordo com genótipos do gene *APOB*.....34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Níveis circulantes de LDL (A), de colesterol total (B) e de lipídeos totais (C) entre os portadores e não-portadores do alelo C do polimorfismo rs693 da Apo B.....	35
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
JUSTIFICATIVA.....	8
OBJETIVO.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
ARTIGO.....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	17
Materiais e Métodos.....	19
Resultados.....	23
Discussão.....	25
Agradecimentos.....	28
Referências Bibliográficas.....	29
ANEXO I	36
NORMAS DO PERIÓDICO.....	36
ANEXO II.....	47
Aprovação do comitê de ética.....	47

INTRODUÇÃO

De modo geral, as populações mundiais vêm sofrendo mudanças significativas na conformação de suas pirâmides populacionais, sobretudo no que diz respeito à razão entre os extratos etários. É perceptível o aumento da parcela de idosos como consequência do aumento da expectativa de vida. Este processo é observado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, graças a conquistas que dizem respeito a modificações sociais e urbanas, melhorias nutricionais e sanitárias em geral e avanços técnico-científicos que possibilitaram a conquista de maior longevidade. Esse envelhecimento populacional tem imprimido importantes mudanças no perfil epidemiológico da população, com alterações relevantes nos indicadores de morbimortalidade, como um aumento na prevalência de doenças crônicas, entre elas, as doenças cardiovasculares (DCV).¹

Em 2016, as DCV foram responsáveis por 44% das mortes por doenças não transmissíveis em todo o mundo.² No Brasil, as DCV representam uma das principais causas de óbito, tendo correspondido a 28,6 % de todas as causas de mortalidade em 2011.³ Um dos fatores de risco para a mortalidade e progressão das doenças cardiovasculares são as dislipidemias, assim como os contribuintes genéticos.⁴

Um grande número de polimorfismos genéticos está associado com a susceptibilidade a distúrbios cardiovasculares, principalmente aterosclerose, com ênfase para a variabilidade importante do gene da apolipoproteína B (apo B). A apo B é uma grande glicoproteína anfipática que apresenta duas isoformas: apo B-100, que é sintetizada nos hepatócitos; e apo B-48, uma versão abreviada que é sintetizada no intestino delgado e deriva do mesmo gene (*APOB*), mas a partir de uma modificação na transcrição do RNA mensageiro, onde uma uracila é substituída por uma citosina via complexo enzimático ApoBec.^{5,6}

A apo B é o componente proteico de algumas lipoproteínas e, como tal, possui três funções principais: modula a atividade de enzimas que agem sobre as mesmas; mantém a integridade estrutural do complexo das lipoproteínas; e facilita a captação celular destas, atuando como ligante para receptores de superfície celular específicos.⁵ A apo B-100 compõe a estrutura das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteína A, e, em

sua maioria (mais de 90%), está associada com as lipoproteínas de densidade baixa (LDL).⁷ Ela atua como ligante para o receptor de LDL e contribui para a captação celular de colesterol, contribuindo, dessa forma, para a remoção de LDL do plasma e a regulação da biossíntese do colesterol.⁸ A apo B-48 é a proteína estrutural de quilomícrons (QM) e é responsável pela sua formação e secreção.⁵ A apo B, portanto, desempenha um papel central na regulação dos níveis lipídicos plasmáticos e celulares.

O gene *APOB* (43 kilo-bases, kb) está mapeado no braço curto do cromossomo 2 (2p23-24), contém 29 éxons, 28 íntrons, e muitos sítios polimórficos descritos, como o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) *Xba* I.⁹ Este polimorfismo ocorre devido à troca de um nucleotídeo no éxon 26, que não provoca mudança na sequência de aminoácidos da apo B, e tem sido estudado quanto a sua associação com variações nos níveis lipêmicos em diferentes populações. No entanto, os resultados destes estudos são conflitantes e inconclusivos, o que demonstra a necessidade de novas investigações a fim de confirmar ou refutar o papel desse polimorfismo em relação ao perfil lipêmico e risco cardiovascular nos indivíduos.¹⁰

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As populações idosas apresentam maior risco de morbidade e mortalidade cardiovascular, uma vez que o processo do envelhecimento e as mudanças a ele associadas, principalmente fisiológicas, podem predispor ao desfecho da aterosclerose e de outras condições circulatórias. A prevalência de doença arterial periférica, doença cerebrovascular e aneurisma da aorta abdominal aumenta mais que o dobro a cada década de vida.¹¹

As doenças cardiovasculares englobam o grupo de desordens do coração e de vasos sanguíneos, que possuem etiologia multifatorial e um grande número de fatores de risco descritos.^{4,12} Essas doenças têm aumentado consideravelmente e representam um importante problema de saúde pública. A aterosclerose, condição inflamatória crônica caracterizada pela formação de ateromas no interior dos vasos, e a doença arterial coronariana (DAC), que é decorrente da obstrução das artérias coronárias, são alguns dos principais distúrbios cardiovasculares.¹³

A aterosclerose é um fenômeno de evolução lenta e silenciosa, por isso, suas manifestações clínicas surgem, geralmente, muitos anos após o início da degeneração vascular.¹⁴ Ela é designada como um espessamento e endurecimento da camada interna das artérias, que se inicia com a agressão do endotélio vascular por diversos fatores, como por exemplo as dislipidemias. A disfunção endotelial resultante dessa agressão aumenta a permeabilidade da camada íntima vascular às lipoproteínas plasmáticas, e o conseqüente depósito dessas moléculas na parede arterial, que é essencial para o início da aterogênese, ocorre proporcionalmente à concentração destas partículas no plasma.¹⁵

As etapas que sucedem para o desenvolvimento dos ateromas consistem em oxidação do LDL-colesterol infiltrado, recrutamento de monócitos (que se diferenciam em macrófagos) e de linfócitos, deposição de lipídeos e de elementos fibrosos, proliferação e migração de células musculares lisas da camada média arterial para a íntima, e síntese de matriz extracelular. Dessa forma, origina-se a placa aterosclerótica, que é constituída por uma cápsula fibrosa (células musculares lisas e matriz extracelular) que envolve um núcleo lipídico-necrótico. Essa massa

formada na parede dos vasos sanguíneos provoca a diminuição ou obstrução do lúmen vascular e, conseqüentemente, do fluxo sanguíneo no local, o que pode evoluir para problemas graves como doença cerebrovascular, doença vascular periférica e/ou infarto agudo do miocárdio.^{15,16}

Entre os fatores de risco para as DCV, pode-se destacar tabagismo, hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, dislipidemias, sedentarismo, obesidade, dieta aterogênica, idade, sexo masculino e estado pós-menopáusico. O fator genético também tem sido apontado como contribuinte para o desenvolvimento dos problemas cardiovasculares, pois determina o quanto estes indicadores de risco estão propensos a se instalar e, juntamente com os fatores ambientais, ajuda a explicar as variações interindividuais na susceptibilidade às DCV, especialmente no tocante à variabilidade dos genes para proteínas participantes do metabolismo lipídico. Os distúrbios desse metabolismo e as anormalidades nas lipoproteínas plasmáticas encontram-se entre os fatores de risco mais bem compreendidos e solidamente estabelecidos para aterosclerose.^{16,17}

As dislipidemias são desordens bioquímicas caracterizadas por níveis aumentados de apolipoproteína B (apo B), triglicérides, colesterol total e lipoproteína de densidade baixa (LDL-c) e/ou níveis diminuídos de apolipoproteína AI (apo-AI) e lipoproteína de densidade alta (HDL-c) na corrente sanguínea – condições que podem contribuir para a formação de placas aterogênicas e estar associadas com manifestações clínicas diversas.⁴ A Sociedade Brasileira de Cardiologia¹⁵ classifica as dislipidemias, de acordo com a sua etiologia, em: primárias, quando possuem origem genética; e secundárias, quando decorrentes de causa específica, como estilo de vida inadequado, medicamentos ou condições mórbidas. A Tabela I apresenta os valores de referência e de alvo terapêutico do perfil lipêmico para adultos com mais de 20 anos, de acordo com o risco cardiovascular individual determinado pelo médico. O valor de referência para lipídeos séricos totais é de 400 a 900 mg/dl.¹⁸

Tabela I. Valores de referência e de alvo terapêutico do perfil lipêmico de adultos com mais de 20 anos.

Lipídeos	Com jejum (mg/dl)	Sem jejum (mg/dl)	Categoria referencial
Colesterol total	< 190	< 190	Desejável
HDL-c	> 40	> 40	Desejável
Triglicérides	< 150	< 175	Desejável
Categoria de risco			
LDL-c	< 130	< 130	Baixo
	< 100	< 100	Intermediário
	< 70	< 70	Alto
	< 50	< 50	Muito alto
Não HDL-c	< 160	< 160	Baixo
	< 130	< 130	Intermediário
	< 100	< 100	Alto
	< 80	< 80	Muito alto

Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017.¹⁵

Os lipídeos plasmáticos (colesterol, triglicérides) são insolúveis em água e, por isso, são transportados por complexos macromoleculares – as lipoproteínas. Essas partículas são constituídas, também, por componentes proteicos denominados apolipoproteínas, que proporcionam estabilidade estrutural, solubilizam os lipídeos altamente hidrofóbicos, atuam como ligantes para receptores celulares e/ou agem como cofatores para enzimas que atuam no metabolismo lipídico.¹⁴ A apo B é considerada a maior das apolipoproteínas e é encontrada em duas isoformas: a apo B-48, que é sintetizada no intestino, faz parte dos QM e é essencial para a absorção intestinal da dieta de gorduras e vitaminas lipossolúveis, mas não tem um papel claro na função mediada pelo receptor de QM remanescente; e a apo B-100, que é sintetizada no fígado e constituinte das lipoproteínas LDL, VLDL, IDL e lipoproteína A, sendo responsável pela interação do LDL com os seus receptores celulares específicos e contribuindo, assim, para a captação celular de colesterol.¹⁶

As partículas de LDL-colesterol contêm menos fosfolipídeos e colesterol não esterificado, mas são consideradas as lipoproteínas mais aterogênicas, devido a sua maior susceptibilidade à oxidação, maior permeabilidade endotelial, menor afinidade ao seu receptor e maior interação com componentes da matriz extracelular. Mais de 90% do nível sérico total de apo B está associado com partículas de LDL. Ademais, cada lipoproteína aterogênica (LDL, VLDL, IDL e lipoproteína A) contém uma molécula de Apo B-100 e, por representar o número de partículas que contribuem para a formação de ateromas nos vasos, a apo B tem sido considerada o parâmetro mais exato para indicar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.^{19,20}

Como marcadores de risco cardiovascular, as concentrações de lipoproteínas estão associadas com variáveis ambientais, como dieta e estilo de vida em geral, mas a genética também desempenha um papel importante na modulação dessas concentrações. Diversos polimorfismos em genes codificadores de proteínas relacionadas com o metabolismo lipídico têm sido descritos por estarem associados com maior risco cardiovascular, e os loci das apolipoproteínas são alguns dos mais estudados, em razão do seu papel central nesse metabolismo.²¹

O gene *APOB*, localizado no braço curto do cromossomo 2, possui pelo menos 24 sítios polimórficos e, entre essas mutações, destaca-se o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) *Xba* I.¹⁹ Este polimorfismo refere-se à variação de um nucleotídeo no éxon 26 do gene *APOB*, que resulta em uma mutação silenciosa, isto é, que não afeta a sequência de aminoácidos da proteína. Ocorre a transição de um nucleotídeo citosina por uma timina na terceira posição do códon 2488 (ACC→ACT), que codifica o mesmo aminoácido, treonina.²² A presença de timina resulta em um sítio de restrição para a enzima *Xba* I, originando o alelo X^+ , e sua ausência, o alelo X^- . Essa variação determina três genótipos: X^+X^+ , X^+X^- e X^-X^- . O método que amplifica a parte do éxon 26 que contém o sítio de mutação gera um fragmento de 710 pb, o qual é clivado pela *Xba* I durante a restrição enzimática em dois fragmentos de 433 e 277 pb no alelo X^+ , e não é clivado no alelo X^- .¹⁷

A importância do polimorfismo *Xba* I do gene *APOB* como um fator de risco para doenças cardiovasculares e a sua influência no perfil lipêmico dos indivíduos tem sido estudada em diferentes populações. Alguns dos estudos encontraram associação entre este polimorfismo e doenças cardiovasculares, níveis aumentados

de apo B, colesterol total, triglicérides e LDL, e níveis diminuídos de HDL.^{4,8,10,23-25} O alelo X⁺, em geral, tem sido associado com doença arterial coronariana e dislipidemias.⁸ Entretanto, outros estudos não encontraram associação significativa entre esses parâmetros.^{20,22,26-28}

Starcevic e colaboradores¹⁹ verificaram prevalência da presença de placas ateroscleróticas nas artérias carótidas significativamente diferente entre os genótipos de *Xba* I, sendo que os homozigotos carreadores do alelo mutante X⁺ apresentaram a maior prevalência. Portadores do alelo X⁺ foram implicados com maior risco para placas nas artérias carótidas, e o risco foi ainda maior entre homozigotos. No entanto, essa associação foi independente de parâmetros lipêmicos e dos níveis séricos de apo B, pois não houve diferença estatisticamente significativa desses parâmetros entre os genótipos. Já em meta-análise desenvolvida por Caiqin Niu et al.⁴, verificou-se associação significativa entre o polimorfismo *Xba* I e níveis aumentados de apo B, triglicérides, colesterol total e LDL-c, e níveis diminuídos de HDL-c.

Portanto, tendo em vista que os resultados dos estudos a respeito da associação desse polimorfismo genético com o perfil lipêmico e o risco aterosclerótico são conflitantes e inconsistentes, é de suma importância que novos estudos sejam desenvolvidos, de modo a demonstrar, cada vez mais, o papel dos fatores genéticos na etiologia de doenças multifatoriais, como as doenças cardiovasculares.¹⁷

JUSTIFICATIVA

Em vista do aumento gradual do número de idosos e da prevalência de doenças cardiovasculares na população brasileira e no mundo, faz-se necessário buscar uma melhor compreensão dos fatores que influenciam o desenvolvimento e a progressão dessas condições. As DCV são multifatoriais e os fatores genéticos desempenham um papel importante na sua etiologia. A identificação dos contribuintes genéticos das DCV pode fornecer uma estimativa mais precisa do risco e definir o mecanismo responsável, quando analisadas em conjunto com os demais fatores influenciadores.¹⁷

As dislipidemias destacam-se como uma das condições que aumentam o risco dessas doenças, e as descobertas que envolvem polimorfismos relacionados ao metabolismo lipídico contribuem para se conhecer melhor os aspectos intrínsecos envolvidos na aterosclerose e outros distúrbios cardiovasculares. Devido ao seu papel central no metabolismo e transporte lipídicos, o estudo de variações no gene da apolipoproteína B pode ajudar a explicar a variação interindividual nos níveis lipêmicos e a susceptibilidade a problemas vasculares.¹⁰

Portanto, esse estudo é de importância para a comunidade científica e, também, no âmbito da profissão farmacêutica, uma vez que o profissional da saúde precisa conhecer as bases genéticas dos distúrbios vasculares, bem como os seus contribuintes ambientais, para que possa compreendê-las em sua totalidade e, assim, prestar um cuidado integral à saúde dos pacientes.

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é verificar a associação do polimorfismo *Xba* I (rs693) na região codante do gene da apolipoproteína B com fatores de risco aterosclerótico, incluindo perfil lipêmico, de um segmento da população brasileira idosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil 2009**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009.

2 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals**. Geneva: World Health Organization, 2018.

3 - MESQUITA, C. T. Relação entre Fatores Sociais e Doenças Cardiovasculares. **International Journal Of Cardiovascular Sciences**, Niterói, v. 2, n. 31, p.87-89, 2018.

4 - NIU, C. et al. Associations of the APOB rs693 and rs17240441 polymorphisms with plasma APOB and lipid levels: a meta-analysis. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 166, 2017.

5 - CONTOIS, J. H. et al. Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 3, p. 407-419, 2009.

6 - MANN, D. et al (Ed.). **Braunwald: Tratado de Doenças Cardiovasculares**. 10. ed. Elsevier, 2017. 2200 p.

7 - STARCEVIC, J. N. et al. Polymorphisms Xbal (rs693) and EcoRI (rs1042031) of the ApoB gene are associated with carotid plaques but not with carotid intima-media thickness in patients with diabetes mellitus type 2. **Vasa**, v. 43, n. 3, p. 171-180, 2014.

8 - LIU, Y. et al. Correlation between the Xba I polymorphism of apoB gene and serum lipid profiles in Li ethnic group. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, n. 1, p. 63-66, 2014.

9 - AL-BUSTAN, S. A. et al. Genetic association of APOB polymorphisms with variation in serum lipid profile among the Kuwait population. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 157, 2014.

10 - HASSAN, N. E. et al. Apolipoprotein B polymorphism distribution among a sample of obese Egyptian females with visceral obesity and its influence on lipid profile. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 177-183, 2015.

11 – STREJA, D.; STREJA, E. Management of Dyslipidemia in the Elderly. In: DE GROOT, L. J. et al. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279133/>>. Acesso em: 16 jun. 2018.

12 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. 2017. Disponível em: <[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 03 nov. 2018.

13 - LIBBY, P. Patogenia, prevenção e tratamento da aterosclerose. In: HARRISON, T. R.; FAUCI, A.; BRAUNWALD, E. ; KASPER, D. ; HAUSER, S. L.; LONGO, D.; JAMENSON, J. L.; LOSCALZO, J. Medicina interna. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2008. Seção 5, cap. 235, p. 1501-1507.

14 – BRITO, D. D. V. **Análise da frequência de mutações e tipificação de genótipos clinicamente relacionados às dislipidemias em crianças e jovens do estado de Minas Gerais**. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

15 – FALUDI, A. A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 1-76, 2017.

16 - HOFFMANN, L. **Associação entre o polimorfismo genético da apolipoproteína-B e fatores de risco cardíaco em pacientes da região dos Campos Gerais, PR**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro-oeste, Ponta Grossa, 2012.

17 - PELEGRINI, Andreia. **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. 2011. 138 f. Tese (Doutorado) - Curso de Educação Física, Centro de Desportos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

18 - SCEVOLA, D.; MATTEO, A. D.; GIGLIO, O.; SCEVOLA, S. Nutritional Status Assessment. In: MANTOVANI, G. et al. Cachexia and wasting: a modern approach. Milan: Springer, 2006. Seção 3, cap. 3.4, p. 93-110.

19 - STARCEVIC, J. N. et al. Polymorphisms XbaI (rs693) and EcoRI (rs1042031) of the ApoB gene are associated with carotid plaques but not with carotid intima-media thickness in patients with diabetes mellitus type 2. **Vasa**, v. 43, n. 3, p. 171-180, 2014.

20 - CASILLAS-MUÑOZ, F. et al. APOA1 and APOB polymorphisms and apolipoprotein concentrations as biomarkers of risk in acute coronary syndrome: relationship with lipid-lowering therapy effectiveness. **Medicina Clínica (English Edition)**, 2018.

21 - SOTOS-PRIETO, M.; PEÑALVO, J. L. Genetic variation of apolipoproteins, diet and other environmental interactions; an updated review. **Nutricion hospitalaria**, v. 28, n. 4, 2013.

22 - 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, 2013.

23 - TSUNODA, K. et al. Polymorphism of the apolipoprotein B gene and association with plasma lipid and lipoprotein levels in the Mongolian Buryat. **Biochemical genetics**, v. 50, n. 3-4, p. 249-268, 2012.

24 - KULMINSKI, A. M. et al. Uncoupling associations of risk alleles with endophenotypes and phenotypes: insights from the ApoB locus and heart-related traits. **Aging cell**, v. 16, n. 1, p. 61-72, 2017.

25 - LIU, F.; LU, W.; NIU, W. XbaI polymorphisms of apolipoprotein B gene: another risk factor of gallstone formation after radical gastrectomy. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 20, p. 2549, 2010.

26 - LOANGO, N. et al. Lipidos plasmaticos y polimorfismo Xbal del gen de la apo B-100 en un grupo de niños, y jovenes y sus padres plasma lipids and Xbal polymorphism on apo B-100 gene in a group of children and their parents. **Revista de Investigaciones Universidad del Quindío**, Armênia, v. 20, p.179-186, jun. 2010.

27 - BOGARI, N. M. et al. No association of apolipoprotein B gene polymorphism and blood lipids in obese Egyptian subjects. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 14, n. 1, p. 7, 2015.

28 - ZHANG, J. et al. Association between apolipoprotein B gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease (CHD): an update meta-analysis. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 4, p. 827-837, 2015.

ARTIGO

Título: Variantes alélicas clássicas do gene Apolipoproteína B e perfil lipêmico de idosos.

Running head: ApoB e lipemia em idosos

Elisa Souza Alves¹, Adriane Dallanora Henriques¹, Audrey Cecília Tonet-Furioso^{1,2}, Roberta Silva Paula¹, Lucy Oliveira Gomes², Clayton Franco Moraes^{1,2}, e Otávio Toledo Nóbrega^{1,2*}

¹ University of Brasília, Brazil.

² Catholic University of Brasília, Brazil.

*Corresponding author: O.T. Nóbrega, Graduation Program in Medical Sciences, University Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília – DF, Brazil. Phone: +55-61-3307-2520. E-mail: otavionobrega@unb.br; nobrega@pq.cnpq.br

Total de palavras no manuscrito: 3.028.

Total de palavras no resumo: 185.

Resumo:

Introdução: O gene da apolipoproteína B (*APOB*) contém diversos sítios polimórficos descritos como modificadores do risco de eventos cardiovasculares.

Objetivo: Verificar a associação do polimorfismo *Xba* I (rs693) de *APOB* com fatores de risco aterosclerótico, incluindo perfil lipêmico, de um segmento da população brasileira idosa.

Métodos: Características clínicas e antropométricas assim como dados bioquímicos e de ingestão calórica foram determinados em 644 indivíduos idosos. A análise do polimorfismo foi realizada por meio de reação em cadeia da polimerase convencional seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP). Análises estatísticas compararam medidas e proporções conforme diferentes arranjos genotípicos de *APOB*. **Resultados:** Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *Xba* I e variações nos níveis séricos de LDL, colesterol total e lipídeos totais, com valores médios mais elevados entre homozigotos para o alelo T comparados ao conjunto dos outros genótipos. Houve homogeneidade nos demais parâmetros analisados, com tendência por níveis reduzidos de apolipoproteína B circulante entre indivíduos TT. **Conclusão:** Nossos resultados corroboram que variações genéticas em *APOB* afetam o perfil lipêmico de indivíduos idosos, gerando padrão sugestivo de desordem secretória de partículas lipoproteicas, com possível implicação em risco aterosclerótico.

Palavras-chave: Apolipoproteína B, polimorfismo genético, idosos, perfil lipêmico.

Abstract:

Introduction: The apolipoprotein B (APOB) gene contains several polymorphic sites described as modifiers of the risk for cardiovascular events. **Objective:** To verify the association of *APOB Xba I* polymorphism (rs693) with atherosclerotic risk factors, including lipemic profile, of a segment of the elderly Brazilian population. **Methods:** Clinical and anthropometric characteristics as well as biochemical and caloric intake data were determined in 644 elderly individuals. Polymorphism analysis was performed by conventional polymerase chain reaction followed by enzyme restriction (PCR-RFLP). Statistical analyzes compared measures and proportions according to different *APOB* genotypic combinations. **Results:** A statistically significant association was found between the *Xba I* polymorphism and serum LDL, total cholesterol and total lipid levels, with important elevations among T homozygotes compared to the other genotypes altogether. There was homogeneity in all other analyzed parameters, with a tendency for reduced levels of circulating apolipoprotein B among TT individuals. **Conclusion:** Our results corroborate that genetic variations in *APOB* affect the lipemic profile of elderly individuals, generating a pattern suggestive of secretory disorder of lipoprotein particles, with possible implication in atherosclerotic risk.

Key-words: Apolipoprotein B, genetic polymorphism, elderly, lipemic profile.

Introdução

Com o envelhecimento, numerosas mudanças fisiológicas subjacentes ocorrem, e o risco de doenças crônicas aumenta (1). A doença cardiovascular (DCV) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, tendo sido responsável por cerca de 31% do total de mortes em 2016 (2). O principal contribuinte para o aumento dessas doenças é a aterosclerose, fenômeno inflamatório crônico que acomete leitos vasculares, havendo fatores de risco modificáveis (obesidade, fumo, hipertensão, dislipidemia, diabetes) e não modificáveis (idade, gênero e fatores genéticos) para seu desenvolvimento (3).

A literatura estabelece de forma consistente a associação entre dislipidemia e incidência de eventos vasculares, com forte contribuição etiológica pelo aumento dos níveis de triglicérides (TG), de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de apolipoproteína B (apoB), assim como por redução dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) (4,5). A retenção subendotelial de lipopartículas constituídas por apo B constitui evento necessário para o início da aterogênese, e altos níveis dessa apolipoproteína apresentam poder preditivo para eventos vasculares tão elevados quanto aquele do LDL (6,7).

Como marcadores de risco cardiovascular, as concentrações de lipoproteínas são influenciadas por condições ambientais como dieta e estilo de vida, configurações alélicas contribuem incidentalmente sobre essa associação (8). Estudos de associação genômica ampla (GWAS) identificaram diversos *loci* gênicos candidatos para a suscetibilidade às dislipidemias e à DCV, incluindo genes de apolipoproteínas (4,9). Considerando que apo B destaca-se como proteína estrutural chave em metabólitos aterogênicos (quilomícrons e lipopartículas de densidade muito baixa (VLDL), baixa (LDL) e intermediária (IDL)), e sendo o principal ligante do

receptor de LDL, o extenso *locus* do gene *APOB* (ENSG00000084674) sito a 2p23-24 contém diversos sítios polimórficos descritos como modificadores do risco de eventos cardiovasculares (9,10).

Neste contexto, estudos epidemiológicos demonstraram associação de polimorfismos do gene tanto com elevação sérica em colesterol total (CT) e subfrações lipêmicas (principalmente LDL e TG) como também com o desenvolvimento de aterosclerose, com ênfase para o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs693, também denominado *Xba* I, que constitui transição silenciosa (ACC → ACT) no éxon 26 (11). Em estudo caso-controle, portadores do alelo T apresentaram risco 1,7 a 2,2 vezes maior de dislipidemia quando comparados a não portadores, enquanto homozigose aumentou esse risco em 4 vezes (12). Também foi encontrada maior prevalência de placas ateroscleróticas em artérias carótidas de homozigotos para o alelo T (13). Alguns estudos encontraram, ainda, associação deste polimorfismo com DCV, níveis aumentados de apoB, CT, TG e LDL, e níveis diminuídos de HDL (5,14-17). Por outro lado, outros trabalhos encontraram associação nula entre esses parâmetros (9,11,18).

Ainda que a influência do gene *APOB* e de seu polimorfismo *Xba* I sobre a variabilidade interindividual em níveis lipêmicos e risco cardiovascular tenha sido extensivamente investigada, os resultados dos estudos são inconsistentes e conflitantes quanto aos principais parâmetros afetados, parecendo divergir conforme dieta e grupo populacional estudado. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo verificar a associação do polimorfismo *Xba* I (rs693) do gene da apolipoproteína B com fatores de risco aterosclerótico, incluindo perfil lipêmico, de um segmento da população brasileira idosa.

Materiais e Métodos

Amostra

A amostra do estudo inclui 644 pacientes não institucionalizados e não aparentados com idade de 60 anos ou mais, incluídos a partir de ambulatórios de clínica geriátrica localizados no Distrito Federal, Brasil, a saber: Serviço Geriátrico do Hospital da Universidade Católica de Brasília (HUCB) e o Centro Multidisciplinar do Idoso do Hospital Universitário de Brasília (HUB). O critério de inclusão foi a busca espontânea por cuidado primário ou secundário para eventos circulatórios. Os critérios de exclusão do estudo foram: condição inflamatória ativa e/ou infecciosa, neoplasias de qualquer tipo (atuais ou passadas), insuficiência renal importante (depuração de creatinina $< 25 \text{ ml/min/1,73m}^2$) acompanhada ou não de anormalidades nos níveis dos marcadores de função hepática. Não foi feita busca ativa por pacientes com qualquer condição específica.

A equação reproduzida por Whitley e Ball (19) foi usada para calcular o poder do estudo para detectar uma alteração mínima de 10 mg/dl nos níveis de LDL. Considerando que o desvio padrão global da variável foi da ordem de 30 mg/dl, a diferença padronizada a ser detectada foi $10/30 = 0,333$. Sendo assim, um número total de participantes necessários no estudo para detectar tal diferença foi determinado como 425 indivíduos, com poder de 80% e um ponto de corte de 0,05 como limiar de significância estatística, o que torna o estudo suficientemente capaz de detectar diferenças.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (parecer nº 1.072.651), e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre antes do início da coleta de dados à admissão, concedendo autorização expressa para constituição de biobanco

e para utilização de amostras e dados em estudos subsequentes. Ademais, o projeto possui cadastro junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o acesso A407626.

Avaliação clínica

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada nos ambulatórios de geriatria do HUB e do HUCB. Foram medidos os valores de pressão arterial sistólica e diastólica de acordo com a recomendação da VI Diretriz Brasileira para Hipertensão Arterial (20). Também foram levantados dados a respeito do uso de medicamentos para controle de dislipidemia. Na análise antropométrica, foram avaliados o índice de massa corporal (IMC) e a gordura corporal. Os pacientes foram pesados com roupas leves e sem sapatos. A altura foi mensurada com um estadiômetro manual montado na parede, com o paciente em pé, com os pés apoiados em uma superfície firme e nivelada e os braços ao lado do corpo. IMC foi obtido pela divisão do peso (em kg) pelo quadrado da altura (em m), enquanto a gordura corporal foi definida por absorciometria de raios X de dupla energia (DXA; modelo Lunar DPX-IQ, versão de software 4.7e, Lunar Radiation Corp., Madison, WI, EUA) realizada segundo recomendações do fabricante, com gordura absoluta (kg) convertida em relativa (%) ao peso corporal.

Análises bioquímicas

As análises bioquímicas incluíram a determinação de glicemia, colesterol total (CT), lipoproteína de densidade baixa (LDL-c), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-c), lipoproteína de densidade alta (HDL-c), triglicérides (TG), lipídeos totais (LT), proteína C-reativa (PC-R), apolipoproteína B (apoB), *clearance* de

creatinina, e hormônio estimulante da tireóide (TSH). Amostras de sangue venoso foram coletadas em tubos com ativador de coágulo após jejum de até 12 horas, com o material centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos a 5 °C para separar o soro. Os testes foram realizados seguindo as análises clínicas de rotina com reagentes da Boehringer Mannheim (Alemanha), e processadas em equipamento AutoHumalyzer (Human GMBH, Alemanha) ou nefelômetro (Dade Behring, Alemanha). A equação Friedewald foi usada para produzir estimativas de LDL-c (21).

Avaliação da dieta

O consumo energético total foi determinado por registro alimentar de 3 dias (2 dias da semana e 1 do fim de semana), preenchido em casa após cada paciente ser instruído por nutricionista clínico para registrar número e tamanho de porções na ingestão alimentar. Valores de ingestão individual foram expressos como média dos valores ingeridos nos três dias de registro. Para aumentar a confiabilidade sobre estes dados, os pacientes foram avaliados com versão validada em português do mini-exame do estado mental (22), sendo excluídos do estudo os pacientes com pontuação < 11/30 entre analfabetismo, < 17/30 entre aqueles com até 7 anos de educação formal, e < 25/30 para aqueles com 8 anos ou mais de educação formal (23). Os formulários foram retornados durante uma entrevista clínica na qual as quantidades e tipos de alimentos foram revisados. Dados ausentes foram obtidos e adicionados. O conteúdo da dieta foi calculado utilizando o software Diet-Pro[®], versão 4.0 (A.S. Sistemas, Minas Gerais, Brasil), configurado para tabelas de alimento internacionais e complementado com tabela para alimentos locais (24,25).

Extração de DNA e Genotipagem de APOB

Cada participante do estudo foi submetido a coleta de sangue para congelamento, por ocasião das análises bioquímicas realizadas. A extração de DNA foi realizada utilizando kits de extração padrão (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Brasil), segundo recomendações do fabricante. Todos os pacientes foram genotipados para a transição do gene *APOB* C/T (rs693).

Para a identificação dos genótipos, um segmento do gene *APOB* foi amplificado via reação em cadeia da polimerase (PCR) com emprego dos iniciadores 5'-GGAGACTATTTCAGAAGCTAA-3' e 5'-GAAGAGCCTGAAGACTGACT-3' (15). A termociclagem foi feita em aparelho Biocycler MJ96+/MJ96G Applied Biosystems, Brasil. A desnaturação inicial do DNA na amplificação foi obtida com *hot start* a 80 °C por 1 minuto e 94°C por 2 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 50 segundos, seguido por ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os produtos gerados na PCR (*amplicons*) foram submetidos à digestão pela *Xba* I (Promega, EUA), com sítio de reconhecimento específico correspondente a TCTAGA, a 37°C durante dez horas. Os padrões de restrição previstos eram: três fragmentos distintos (710, 277 e 433 pares de base; pb) para o genótipo heterozigoto (T/C), dois fragmentos (277 e 433 pb) para o genótipo homozigoto para o alelo T, e, para o genótipo homozigoto para o alelo C, esperava-se observar apenas o segmento de 710 pb. (15) Cada padrão de restrição esperado foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, com análise por visualização direta sob iluminação ultravioleta. Amostras que geraram conflito de interpretação foram submetidas a ciclo(s) adicional(is) de amplificação e digestão enzimática para confirmação, quando necessário.

Análises estatísticas

Para testar diferenças entre medidas clínicas e bioquímicas na amostra de acordo com os genótipos de *APOB*, nossas análises estatísticas compararam medidas de tendência central pelas análises multivariadas de covariância ou o teste de Kruskal-Wallis para variáveis contínuas distribuídas de forma normal ou não-normal, respectivamente. Frequências foram comparadas com o teste do qui-quadrado, incluindo a análise de frequências genotípicas pelo equilíbrio Hardy-Weinberg. A distribuição normal de todas as variáveis foi avaliada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Complementarmente, quando grupos genotípicos foram unidos, o teste *t* de Student foi usado para comparar traços contínuos com distribuição normal. Para estas análises, $P \leq 0,05$ será adotado como nível de significância. Todas as análises foram realizadas com o Pacote Estatístico para Ciências Sociais (Statistical Package for Social Sciences – SPSS) para Windows (versão 17.0).

Resultados

Neste estudo, são apresentados aspectos clínicos, antropométricos, bioquímicos e de estilo de vida de um conjunto de 644 indivíduos atendidos em serviços geriátricos. A genotipagem do SNP rs693 na amostra revelou que 37,6% apresentava genótipo homozigoto para o alelo C, enquanto 49,2% apresentava-se como heterozigoto e os 13,2% restantes correspondiam a homozigotos para o alelo T. A distribuição genotípica desse polimorfismo apresenta-se em conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,40$; $P = 0,236$).

Análises inferenciais conforme grupos genotípicos revelaram que a amostra apresentou um padrão homogêneo quanto a características basais como idade e gênero (Tabela 1). Do mesmo modo, variáveis antropométricas (IMC, gordura corporal), pressóricas (pressão sanguínea sistólica e diastólica) e de estilo de vida (ingestão calórica) não mostraram diferir significativamente entre grupos, havendo elevada prevalência de distúrbios metabólicos na amostra, a exemplo de 64% dos pacientes apresentarem sobrepeso (IMC > 25) e 46% apresentarem elevado percentual de gordura corporal (> 30% para mulheres e > 25% para homens) (26,27). Escores médios em patamares limítrofes (ou ligeiramente supra-fisiológicos) em parâmetros como triglicérides, colesterol total e pressão arterial sistólica igualmente ilustram esta importante frequência de desvios metabólicos.

Dentre as variáveis bioquímicas analisadas, houve influência importante das variantes alélicas produzidas pelo SNP rs693 sobre os níveis séricos de LDL colesterol ($P = 0,023$) e de lipídeos totais ($P = 0,027$), assim como uma tendência sobre a colesterolemia total ($P = 0,061$) assim como sobre a concentração sérica de apoB ($P = 0,067$) (Tabela 1). Quando considerados separadamente, homozigotos para o alelo T exibiram níveis séricos médios de LDL e de colesterol total cerca de 10 mg/dl mais elevados que o respectivo nível observado entre heterozigotos e homozigotos para o alelo C em conjunto (Figura 1). Análises complementares conforme a convenção de Cohen (28) permitem categorizar estas diferenças como de pequeno a moderado tamanho de magnitude de efeito (effect size; ES) entre grupos genotípicos dicotomizados (ES de 0,35 para LDL e de 0,25 para CT). Em linha, níveis lipêmicos totais se mostraram cerca de 50 mg/dl mais elevados em portadores do genótipo TT (ES de 0,41). Neste arranjo genotípico, a discrepância de apoB sérica entre homozigotos para T ($83,6 \pm 21,9$ mg/dl) e portadores do alelo C

(93,5 ± 24,2 mg/dl) mostrou-se marginalmente significativa ($P = 0,051$), ressaltando a tendência por níveis reduzidos entre indivíduos TT.

Outras variáveis séricas ou clínicas não se mostraram influenciar pelos genótipos estudados.

Discussão

A hiperlipidemia, com destaque para níveis elevados de LDL colesterol, tem sido relatada como contribuinte para doenças cardiovasculares. Os constituintes plasmáticos são determinados pela interação entre genética e ambiente, e variações genéticas mostraram ter relação próxima com a anormalidade do metabolismo lipídico e a patogênese da aterosclerose (29). Nesse sentido, um dos genes de particular interesse é o gene da apolipoproteína B e o seu polimorfismo *Xba* I, uma vez que o seu produto proteico tem papel essencial no metabolismo das partículas lipoprotéicas circulantes (3). Considerando que a população idosa é largamente afetada por distúrbios cardiovasculares, o presente estudo investigou a associação do polimorfismo *Xba* I (rs693) do gene da apolipoproteína B com fatores de risco aterosclerótico, incluindo perfil lipêmico, de um segmento da população brasileira idosa.

Nossos resultados revelam influência marcante do polimorfismo *Xba* I sobre níveis séricos de LDL, colesterol total e lipídeos totais, com escores médios mais elevados entre homozigotos para o alelo T mesmo em um cenário de base marcado por acentuada prevalência de dislipidemia. A elevação dos níveis dessas partículas no sangue é fator de risco reconhecido para distúrbios cardiovasculares (30). Estudo prévio encontrou que um aumento de 0,7 mmol/l (≈ 27 mg/dl) nos níveis médios de

colesterol total resulta em um aumento de 25 a 30% na incidência de doenças coronarianas, e em um aumento de 15 a 20% na incidência de acidente vascular cerebral isquêmico (31). Neste sentido, pode-se considerar que nosso resultado apresenta relevância clínica para além de significância estatística por implicar de forma modesta (porém consistente) o SNP rs693 de *APOB* com exacerbação de fatores notoriamente aterogênicos.

Um corpo substancial da literatura tem investigado a associação do polimorfismo rs693 com níveis lipêmicos, e nossos resultados estão em linha com outros estudos na mesma vertente, a exemplo de Niu et al. (14) que encontrou associação significativa do SNP com níveis elevados de CT, LDL, triglicérides e apoB. Outros estudos apresentam resultados divergentes, com ausência de associação entre esse SNP e o perfil lipêmico dos indivíduos (9,18,19), apesar de meta-análise sobre o tema indicar níveis aumentados de CT, TG e LDL entre portadores do alelo T (29). A conhecida heterogeneidade genética entre grupos populacionais e uma interação gene-ambiente podem ao menos em parte ser responsáveis pelas inconsistências observadas na literatura, sobretudo por diferenças intra- e inter-populacionais em dieta e estilo de vida no mundo (11). Neste aspecto, nossos resultados foram controlados para uma possível influência da dieta na variação dos níveis lipêmicos pela determinação da ingestão calórica dos pacientes, a qual não variou entre genótipos. Ademais, o contingente amostral forneceu poder estatístico substancial para as estimativas de associação. Cabe considerar que as avaliações clínicas apontaram 88 (13,7%) dos pacientes como usuários de drogas hipolipemiantes. No entanto, não acreditamos que as análises inferenciais aqui apresentadas tenham sido severamente influenciadas pelo consumo desta classe de medicamentos uma vez que o teste do qui-quadrado não

revelou variações quantitativas na distribuição de usuários e não usuários de drogas antilipidêmicas entre quaisquer configurações genotípicas testadas ($P > 0,05$), agrupados ou não.

O mecanismo por trás da associação entre o polimorfismo *Xba I* e os níveis lipêmicos não é bem definido, uma vez que o SNP não provoca mudanças na sequência de aminoácidos do gene. Presume-se que este polimorfismo encontre-se em desequilíbrio de ligação com mutação funcional no próprio gene para apoB ou em uma sequência vizinha ao ponto de implicar em alterações estruturais e afetar níveis lipêmicos conforme observado aqui e alhures (10). Esta variação silenciosa do *Xba I* está distante apenas 600-900 pares de base dos dois domínios codantes do sítio de ligação ao receptor de LDL, e foi proposto estar em configuração haplotípica com variações alélicas que afetam essas regiões (9).

Saha et al. (32), por exemplo, mostrou forte desequilíbrio de ligação entre o SNP *Xba I* e o polimorfismo *Ins/Del* do gene *APOB*, cuja variante *Del* deste último apresenta-se igualmente associada de forma consistente com elevações séricas de LDL (33). Em estudo com amostra brasileira, verificou-se que o haplótipo formado pelos alelos *Del* e T exibe forte associação com um perfil lipêmico misto de maior risco para doença arterial coronariana (34). Um possível efeito do alelo *Del* sobre níveis séricos lipídicos (e risco vascular decorrente) também não é completamente compreendido. Foi proposto que os três aminoácidos (Leu-Ala-Leu) faltantes na variante *Del* de *APOB* podem alterar a hidrofobicidade do peptídeo sinal da proteína e, conseqüentemente, a translocação da apoB recém-sintetizada do citoplasma para o retículo endoplasmático, afetando a montagem e secreção de apoB de hepatócitos na forma de VLDL (35). Elevações de LDL e CT neste contexto são justificáveis uma vez que estudo em murinos mostrou que montagem deficitária de VLDL implica em

produção direta de LDL pelo fígado, enquanto mecanismo metabólico compensatório (36). Ademais, montagem e secreção deficitárias de VLDL podem determinar retenção hepática de colesterol e promover a degradação endógena de apoB, ao ponto de justificar a tendência por níveis reduzidos observada aqui (37). No entanto, a ausência de uma associação entre o SNP *Xba I* e VLDL em nosso estudo se contrapõe a estes argumentos. Ainda assim, efeitos do polimorfismo Ins/Del sobre o perfil circulante de LDL já foram relatados na ausência de efeito significativo sobre formas plasmáticas não-LDL de colesterol (38), podendo as alterações promovidas pelo haplótipo repercutirem mais sobre a composição que sobre a concentração das demais partículas lipoprotéicas.

Em resumo, nossos resultados corroboram que variações genéticas na apolipoproteína B afetam o perfil lipêmico de indivíduos idosos residentes nas condições urbanas brasileiras, podendo contribuir para o risco aterosclerótico. Frente à relativa heterogeneidade da literatura, e considerando que os distúrbios vasculares resultam de interações complexas entre gene(s) e ambiente, sugere-se o desenvolvimento de novos estudos que identifiquem efeitos fisiológicos das variações alélicas de *APOB* (incluindo dos polimorfismos *Xba I* e de outros com efeito forte), considerados à luz dos fatores ambientais com os quais interagem, de modo a contribuir para a compreensão da patogênese molecular da aterosclerose (39).

Agradecimentos

Agradecemos a todos os participantes do estudo pela dedicação e colaboração; os técnicos que auxiliaram na análise laboratorial e os médicos que

participaram da coleta dos dados. Sem essa ajuda, este estudo não poderia ter sido concluído.

Referências Bibliográficas

1 – WORLD HEALTH ORGANIZATION. World report on ageing and health. Geneva: World Health Organization, 2015.

2 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization, 2018.

3 – DAHESHPOUR, M. S.; FAAM, B.; HEDAYATI, M.; ESHRAGHI, P.; AZIZI, F. ApoB (Xbal) polymorphism and lipid variation in Teharnian population. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011; 113: 436–440.

4 – KODOGO, V.; ZHOU, D. T.; OCKTEDALEN, O.; DURU, K., STRAY-PEDERSEN, B.; GOMO, E. *Apolipoprotein B* Gene Polymorphisms and Dyslipidemia in HIV Infected Adult Zimbabweans. *The Open AIDS Journal* 2016; 10: 190-198.

5 – HASSAN, N. E.; EL-MASRY, S. A.; ZAROUK, W. A.; ELNEAM, A. I. A.; MAHMOUD, M. M. Apolipoprotein B polymorphism distribution among a sample of obese Egyptian females with visceral obesity and its influence on lipid profile. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 2015; 13: 177–183.

6 – WANG, Y.; LI, Y.; MA, T.; YANG, Y.; MA, X; LI, X.; et al. Association between apolipoprotein B genetic polymorphism and the risk of calcific aortic stenosis in Chinese subjects, in Xinjiang, China. *Lipids in Health and Disease* 2018; 17(1): 40.

- 7 – BENN, M. Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review. *Atherosclerosis* 2009; 206: 17–30.
- 8 – SOTOS-PRIETO, M., PEÑALVO, J. L. Genetic variation of apolipoproteins, diet and other environmental interactions; an updated review. *Nutr. Hosp.* 2013; 28: 999-1009.
- 9 – CASILLAS- MUÑOZ, F.; VALLE, Y.; MUÑOZ-VALLE, J. F.; MARTÍNEZ-FERNANDEZ, D. E.; REYNOSO-VILLALPANDO, G. L.; FLORES-SALINAS, H. E.; et al. APOA1 and APOB polymorphisms and apolipoprotein concentrations as biomarkers of risk in acute coronary syndrome: Relationship with lipid-lowering therapy effectiveness. *Medicina Clinica* 2018; 151(1): 1-7.
- 10 – XIAO, D.; HUANG, K.; CHEN, Q.; HUANG, B.; LIU, W.; PENG, Y.; et al. Four Apolipoprotein B gene polymorphisms and the risk for coronary artery disease: a meta-analysis of 47 studies. *Genes Genom.* 2015; 37: 621–632.
- 11 - SRIVASTAVA, N.; PRAKASH, J.; SRIVASTAVA, A.; AGARWAL, C. G.; PANT, D. C.; MITTAL, B. Association of apolipoprotein B Xbal gene polymorphism and lipid profile in northern Indian obese. *Indian journal of human genetics* 2013; 19(1): 26-31.
- 12 – RODRIGUES, A. C.; SOBRINO, B.; GENVIGIR, F. D. V.; WILLRICH, M. A. V.; ARAZI, S. S.; DOREA, E. L.; et al. Genetic variants in genes related to lipid metabolism and atherosclerosis, dyslipidemia and atorvastatin response. *Clinica Chimica Acta* 2013; 417: 8–11.
- 13 - STARCEVIC, J. N.; LETONJA, M. S.; PRAZNIKAR, Z. J.; MAKUC, J.; VUJKOVAC, A. C.; PETROVIC, D. Polymorphisms Xbal (rs693) and EcoRI (rs1042031) of the ApoB gene are associated with carotid plaques but not with carotid intima-media thickness in patients with diabetes mellitus type 2. *Vasa* 2014; 43(3): 171-180.
- 14 – NIU, C.; LUO, Z.; YU, L.; YANG, Y.; CHEN, Y.; LUO, X.; et al. Associations of the APOB rs693 and rs17240441 polymorphisms with plasma APOB and lipid levels: a meta-analysis. *Lipids in Health and Disease*, 2017; 16(1): 166-186.

- 15 - LIU, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; MA, R.; CAI, W.; LIN-JIANG, L.; et al. Correlation between the Xba I polymorphism of apoB gene and serum lipid profiles in Li ethnic group. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 2014; 7(1): 63-66.
- 16 - TSUNODA, K.; HARIHARA, S.; TANABE, Y.; DASHNYAM, B. Polymorphism of the apolipoprotein B gene and association with plasma lipid and lipoprotein levels in the Mongolian Buryat. *Biochem. Genet.* 2012; 50(3-4): 249-268.
- 17 - LIU, F. L.; LU, W. B.; NIU, W. X. XbaI polymorphisms of apolipoprotein B gene: another risk factor of gallstone formation after radical gastrectomy. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(20): 2549-2553.
- 18 - BOGARI, N. M.; ABDEL-LATIF, A. M.; HASSAN, M. A.; RAMADAN, A.; FAWZY, A. No association of apolipoprotein B gene polymorphism and blood lipids in obese Egyptian subjects. *Journal of Negative Results in BioMedicine* 2015; 14:7.
- 19 - WHITLEY, E.; BALL, J. Statistics review 4: Sample size calculations. *Critical Care* 2002; 6(4): 335-341.
- 20 – SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2010; 95(1):1-51.
- 21 - FRIEDEWALD W. T.; LEVY, R. I.; FRIEDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 1972; 18: 499–502.
- 22 - FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E.; MCHUGH, P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J.Psychiatr Res.* 1975; 12: 189–198.
- 23 - CASTRO-COSTA, E.; FUZIKAWA, C.; UCHOA, E.; FIRMO, J. O. A.; LIMA-COSTA, M. F. Norms for the mini-mental state examination: adjustment of the cut-off point in population-based studies (evidences from the Bambuí health aging study). *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2008; 66(3): 524-528.
- 24 - PHILIPPI, S. T. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. 2th. ed. São Paulo: Coronário; 2002, 135 p.

- 25 - PAULA, R. S.; SOUZA, V. C.; TOLEDO, J. O; FERREIRA, A. P.; BRITO, C. J.; GOMES, L.; et al. Habitual dietary intake and mediators of the inflammaging process in Brazilian older women. *Aging Clin. Exp. Res.* 2016; 28(3): 533-539.
- 26 - WHO Expert Committee on Physical Status: the Use and Interpretation of Anthropometry. Physical status: the use of and interpretation of anthropometry, report of a WHO expert committee. Geneva: World Health Organization. 1995.
- 27 - Position of the American Dietetic Association and the Canadian Dietetic Association: nutrition for physical fitness and athletic performance for adults. *J. Am. Diet. Assoc.* 1993; 93: 691-696.
- 28 – COHEN, J. A power primer. *Psychol Bull* 1992; 112 (1):155-159.
- 29 – GU, W.; ZHANG, M; WEN, S. Association between the APOB XbaI and EcoRI polymorphisms and lipids in Chinese:a meta-analysis. *Lipids in Health and Disease*, 2015; 14(123): 9.
- 30 – DUNCAN, M. S.; VASAN, R. S.; XANTHAKIS, V. Trajectories of Blood Lipid Concentrations Over the Adult Life Course and Risk of Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality: Observations From the Framingham Study Over 35 Years. *J. Am. Heart Assoc.* 2019; 8(11): 14.
- 31 – ZHANG, X.; PATEL, A.; HORIBE, H.; WU, Z.; BARZI, F.; RODGERS, A.; et al. Cholesterol, coronary heart disease, and stroke in the Asia Pacific region. *Int. J. Epidemiol.* 2003; 32: 563–572.
- 32 – SAHA, N.; TAY, J. S.; HENG, C. K.; HUMPHRIES, S. E. DNA polymorphisms of the apolipoprotein B gene are associated with obesity and serum lipids in healthy Indians in Singapore. *Clinical Genetics* 1993; 44(3): 113-120.
- 33 – Zhang, J. Z.; ZHENG, Y. Y.; YANG, Y. N.; LI, X. M.; FU, Z. Y.; DAI, C. F.; et al. Association between apolipoprotein B gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease (CHD): an update meta-analysis. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015; 16(4): 827-837.

- 34 – MACHADO, M. O.; HIRATA, M. H.; BERTOLAMI, M. C.; HIRATA, R. D. Apo B Gene Haplotype is Associated With Lipid Profile of Higher Risk for Coronary Heart Disease in Caucasian Brazilian Men. *J. Clin. Lab. Anal.* 2001; 15: 19–24.
- 35 – BENHIZIA, F.; GINSBERG, H. N.; HUMPHRIES, S. E.; TALMUD, P. J. Variation in the human apoB signal peptide modulates apoB17 translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 283(1): 149-157.
- 36 – PLONNÉ, D.; SCHULZE, H. P.; KAHLERT, U.; MELTKE, K.; SEIDOLT, H.; BENNETT, A. J.; et al. Postnatal development of hepatocellular apolipoprotein B assembly and secretion in the rat. *J. Lipid Res.* 2001; 42(11): 1865-1878.
- 37 – LIAO, W.; HUI, T. Y.; YOUNG, S. G.; DAVIS, R. A. Blocking microsomal triglyceride transfer protein interferes with apoB secretion without causing retention or stress in the ER. *J. Lipid Res.* 2003; 44(5): 978-985.
- 38 – KALLEL, A.; FEKI, M.; ELASMI, M.; SOUISSI, M.; SANHAJI, H.; OMAR, S.; et al. Apolipoprotein B Signal Peptide Polymorphism: Distribution and Influence on Lipid Parameters in Tunisian Population. *Physiol. Res.* 2007; 56(4): 411-417.
- 39 – CHEN, Y.; LIN, M.; LIANG, Y.; ZHANG, N.; RAO, S. Association Between Apolipoprotein B XbaI Polymorphism and Coronary Heart Disease in Han Chinese Population: A Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2016; 20(6): 304-311.

Tabela 1. Análise de variáveis clínicas e bioquímicas da amostra utilizando MANOVA, de acordo com genótipos do gene *APOB*.

	<i>APOB</i>			<i>P</i>
	(<i>XX</i>) CC (n = 242)	(<i>X⁺X</i>) TC (n = 317)	(<i>X⁺X⁺</i>) TT (n = 85)	
Idade (anos)	73,8 ± 10,0	73,7 ± 10,4	74,0 ± 10,2	0,970
Sexo (% masculino)	29,8	39,4	35,3	0,101
IMC (kg/m ²)	27,0 ± 5,0	27,1 ± 4,5	26,4 ± 5,2	0,464
Gordura corporal (%)	28,7 ± 11,8	26,7 ± 11,8	27,8 ± 11,7	0,313
Triglicérides (mg/dl)	137,8 ± 69,7	143,2 ± 82,2	140,4 ± 61,3	0,701
Colesterol total (mg/dl)	196,6 ± 35,3	194,2 ± 37,4	205,0 ± 42,0	0,061
LDL colesterol (mg/dl)	112,9 ± 28,2	110,6 ± 30,3	120,9 ± 36,6 ^a	0,023
VLDL colesterol (mg/dl)	29,1 ± 13,7	28,6 ± 13,6	29,3 ± 12,6	0,861
HDL colesterol (mg/dl)	53,8 ± 12,6	53,7 ± 12,8	54,4 ± 12,3	0,913
Lipídeos totais (mg/dl)	656,0 ± 126,2	660,9 ± 107,8	710,8 ± 145,8 ^b	0,027
ApoB (mg/dl)	94,8 ± 25,3	91,1 ± 22,9	83,6 ± 21,9	0,067
Glicose sérica (mg/dl)	101,5 ± 29,4	104,1 ± 33,0	95,2 ± 22,8	0,123
Pressão sanguínea sistólica (mm Hg)	140,2 ± 22,9	140,8 ± 23,1	138,2 ± 22,1	0,698
Pressão sanguínea diastólica (mm Hg)	80,4 ± 13,0	78,8 ± 13,0	78,6 ± 13,9	0,396
Proteína C-reativa (mg/l)	1,4 [0,5; 4,0]	1,4 [0,9; 3,2]	2,3 [0,9; 4,4]	0,213
Hormônio tireóide-estimulante (μU/ml)	2,0 [1,4; 3,4]	2,1 [1,3; 3,4]	2,2 [1,1; 3,1]	0,727
Ingestão calórica (10 ³ kcal)	2,01 ± 0,48	1,98 ± 0,43	1,94 ± 0,45	0,763

Dados expressos como média ± desvio padrão, mediana [e intervalo interquartil] ou proporção dentro do grupo. Letras sobrescritas indicam análises *post hoc* para múltiplas comparações usando o teste de Scheffé, produzindo $P < 0.05$ quando homocigotos T são comparados com o genótipo TC sozinho^(a) e quando comparados com cada outro genótipo^(b). IMC = índice de massa corporal; LDL = lipoproteína de baixa densidade; HDL = lipoproteína de alta densidade; VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa.

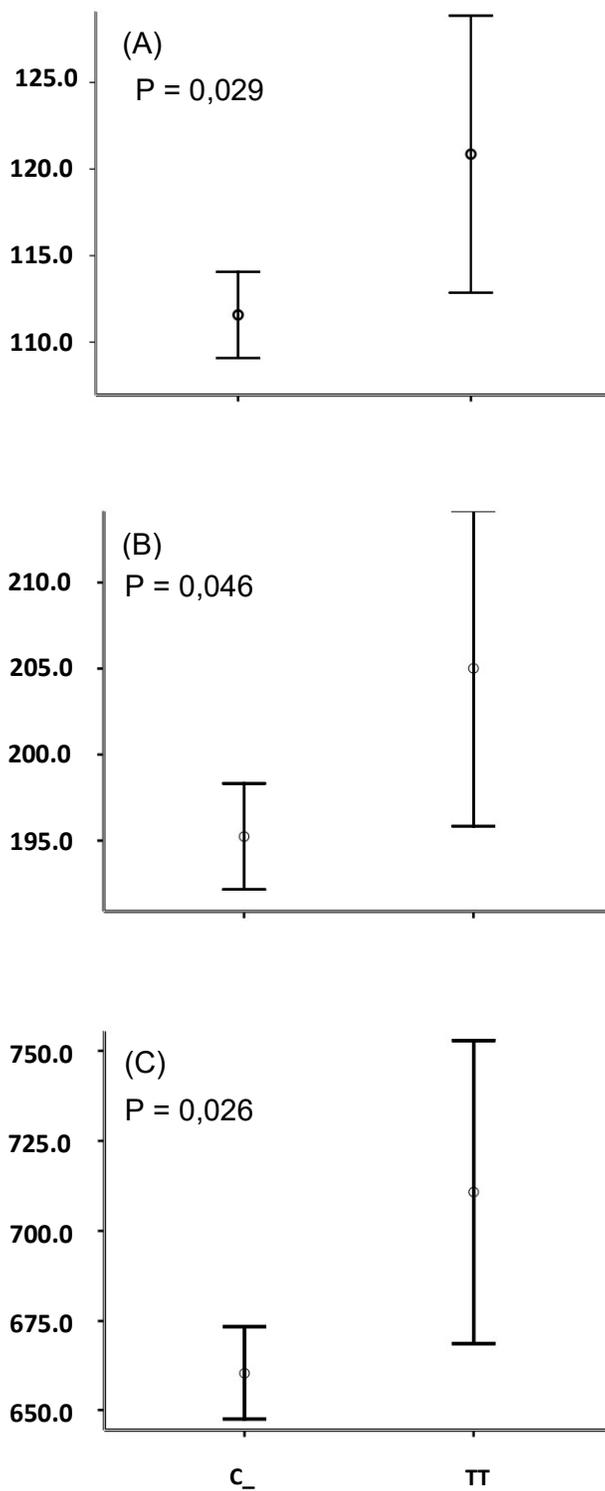


Figura 1. Níveis circulantes de LDL (A), de colesterol total (B) e de lipídeos totais (C) entre os portadores e não-portadores do alelo C do polimorfismo rs693 da Apo B. Significância foi verificada pelo teste *t* de Student. Barras verticais representam intervalos de dois desvios de erro padrão.

ANEXO I

NORMAS DO PERIÓDICO

Escopo e política

O objetivo da **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica** é publicar os resultados de pesquisas experimentais originais que contribuem significativamente para o conhecimento em ciências médicas e biológicas. Os principais critérios para aceitação são qualidade científica, originalidade e concisão. Será dada preferência a manuscritos que desenvolvam novos conceitos ou abordagens experimentais e não sejam meramente repositórios de dados. Artigos que relatam resultados negativos requerem justificativa especial para publicação. Os artigos metodológicos devem ser considerados para publicação, desde que descrevam novos princípios ou uma melhoria significativa de um método existente.

Preparação de manuscritos de pesquisa

A Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica publica artigos originais de pesquisa de grande relevância científica. Os manuscritos devem ser submetidos em inglês. Vamos considerar manuscritos de qualquer tamanho; Encorajamos a submissão de corpos de trabalho de corpo inteiro substanciais e manuscritos mais curtos que relatam descobertas novas que possam ser baseadas em um número limitado de experimentos. Os critérios-chave são que a pesquisa demonstra claramente sua novidade, sua importância para um determinado campo, bem como seu interesse para aqueles que estão fora dessa disciplina, e conclusões que são justificadas pelos dados.

Requisitos de autoria

Somente as pessoas que contribuíram diretamente para o conteúdo intelectual do artigo devem ser listadas como autores. Os autores devem atender a todos os critérios a seguir, permitindo assim que pessoas nomeadas como autores assumam responsabilidade pública pelo conteúdo do artigo.

- Concebido, planejado e realizado os experimentos que levaram ao papel ou interpretado os dados que apresenta, ou ambos.
- Escreveu o artigo ou revisou versões sucessivas.

- Aprovada a versão final.

Manter cargos de liderança administrativa, contribuir com pacientes e coletar e reunir dados, por mais importantes que sejam para a pesquisa, não são, por si só, critérios de autoria. Outras pessoas que fizeram contribuições substanciais e diretas ao trabalho, mas não podem ser consideradas autores, devem ser citadas na seção de Agradecimentos, com sua permissão, e uma descrição de suas contribuições específicas para a pesquisa deve ser dada.

Formato de texto

- O texto de um manuscrito só pode ser aceito como um arquivo do Microsoft Word criado com o MS Word como documento "doc", "docx" ou "rtf".
- Cada página deve conter o número da página no canto superior direito, começando com a página do título como página 1.
- Relate todas as medições no *Système International*, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) e unidades padrão quando aplicável .
- Não use abreviaturas no título e limite seu uso no resumo e no texto.
- A duração do manuscrito e o número de tabelas e figuras devem ser reduzidos ao mínimo.
- Assegure-se de que todas as referências sejam citadas no texto.
- Nomes genéricos devem ser usados para todos os medicamentos. Instrumentos podem ser referidos por nome próprio; o nome e o país ou endereço eletrônico do fabricante devem ser colocados entre parênteses no texto.

A Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica segue o formato de referência dos Requisitos Uniformes para Manuscritos Submetidos a Revistas Biomédicas, que podem ser encontrados no site da Biblioteca Nacional de Medicina (<http://www.icmje.org/>).

O estilo de escrita deve ser conciso e acessível. Os editores farão sugestões de como conseguir isso, bem como sugestões de cortes ou acréscimos que poderiam ser feitos ao artigo para fortalecer o argumento. Nosso objetivo é tornar o processo editorial rigoroso e consistente, mas não intrusivo ou arrogante. Os autores são

encorajados a usar sua própria voz e decidir a melhor forma de apresentar suas ideias, resultados e conclusões.

Embora encorajemos envios de todo o mundo, exigimos que os manuscritos sejam enviados em inglês americano. Como um passo para superar as barreiras de idioma, nós encorajamos os autores a procurar a assistência de serviços profissionais disponíveis na página inicial da revista / Serviço e Informação.

Notas de rodapé

Notas de rodapé de texto, se inevitáveis, devem ser numeradas consecutivamente em sobrescrito no manuscrito e escritas em uma página separada após o resumo.

Abreviaturas

As abreviaturas devem ser reduzidas ao mínimo. Defina todas as abreviaturas na primeira utilização no resumo e no texto. Abreviações não padrão não devem ser usadas a menos que apareçam pelo menos três vezes no texto.

- Explique todas as abreviaturas nas legendas abstract, text, figure e table quando aparecerem pela primeira vez. Mantenha o número de abreviações no mínimo.
- Não explique abreviações para unidades de medida [3 mL, não 3 mililitros (mL)] ou símbolos científicos padrão [Na, não sódio (Na)].
- Abrevie nomes longos de substâncias químicas e termos para combinações terapêuticas. Abrevie nomes de testes e procedimentos que são mais conhecidos por suas abreviações do que pelo nome completo (teste VDRL, SMA-12).
- Use abreviaturas em figuras e tabelas para economizar espaço, mas elas devem ser definidas na legenda.

Nomenclatura

O uso de nomenclatura padronizada em todos os campos da ciência e da medicina é um passo essencial para a integração e vinculação de informações científicas relatadas na literatura publicada. Reforçaremos o uso da nomenclatura correta e

estabelecida, sempre que possível: Encorajamos fortemente o uso de unidades do SI.

Nomes de espécies (por exemplo, *Homo sapiens*), genes, mutações, genótipos e alelos devem ser colocados em itálico. Use o nome recomendado consultando o banco de dados de nomenclatura genética apropriado, por exemplo, HUGO para genes humanos. Às vezes, é aconselhável indicar os sinônimos para o gene na primeira vez em que aparece no texto.

O nome internacional não proprietário recomendado (rINN) de medicamentos deve ser fornecido.

Categorias de manuscrito

Os autores devem indicar na carta de apresentação que o manuscrito deve ser um documento completo, comunicação breve, artigo de revisão, visão geral, conceitos e comentários ou relato de caso.

Trabalho completo

Cada manuscrito deve declarar claramente seu objetivo ou hipótese; o desenho experimental e os métodos utilizados (incluindo o cenário do estudo e período de tempo, pacientes ou participantes com critérios de inclusão e exclusão, ou fontes de dados e como estes foram selecionados para o estudo); as características essenciais de qualquer intervenção; as principais medidas de resultado; os principais resultados do estudo; e uma discussão colocando os resultados no contexto da literatura publicada.

O manuscrito deve conter:

- resumo de não mais do que 250 palavras
- não mais do que 6 palavras-chave
- um título em execução a ser usado como cabeçalho de página, que não deve exceder 60 letras e espaços
- o texto deve ser dividido em seções separadas (Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão), sem uma seção separada para conclusões

- não mais do que 40 referências (sem exceções)

Organização do manuscrito

A maioria dos artigos publicados na Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica será organizada nas seguintes seções:

- Título, Autores, Afiliações, Resumo, Palavras-Chave, Título em Execução, Autor para Correspondência e endereço de e-mail
- Introdução
- Material e métodos
- Resultados
- Discussão
- Agradecimentos
- Referências
- Tabelas com um breve título descritivo e legendas de notas de rodapé
- Figuras com um título descritivo curto, legendas descritivas e uniformidade no formato

Números de página contínuos são necessários para todas as páginas, incluindo figuras. Não há restrições de tamanho específicas para o manuscrito geral ou seções individuais. No entanto, pedimos que os autores apresentem e discutam suas descobertas de forma concisa. Reconhecemos que alguns artigos não serão melhor apresentados em nosso formato de artigo de pesquisa. Se você tiver um manuscrito que se beneficiaria de um formato diferente, entre em contato com os editores para discutir isso mais adiante.

Folha de rosto

Título - O título deve ser o mais curto e informativo possível, não deve conter acrônimos ou abreviaturas fora do padrão e não deve exceder duas linhas impressas.

Autores e Afiliações

Iniciais e sobrenome (s) do (s) autor (es) (combinados com números sobrescritos que identificam as instituições). Instituição (s) (Departamento, Faculdade,

Universidade, Cidade, Estado, País) de cada autor (em português se os autores forem do Brasil).

Resumo

Como os resumos são publicados separadamente pelos Serviços de Informações, eles devem conter dados sólidos suficientes, para serem apreciados pelo leitor. A Brazilian Journal publica resumos não estruturados em um único parágrafo. O resumo não deve exceder 250 palavras.

O resumo deve apresentar, de forma breve e clara, o objetivo, a abordagem experimental, novos resultados como dados quantitativos, se possível, e conclusões. Deve mencionar as técnicas utilizadas sem entrar em detalhes metodológicos e mencionar os resultados mais importantes.

As abreviaturas devem ser reduzidas ao mínimo e devem ser definidas tanto no resumo quanto no texto.

Por favor, não inclua citações de referência no resumo. Se o uso de uma referência for inevitável, a citação completa deve ser dada dentro do resumo.

Palavras-chave

Uma lista de palavras-chave ou termos de indexação (não mais de 6) deve ser incluída. Uma letra maiúscula deve ser usada para a primeira letra de cada palavra-chave, separada por um ponto-e-vírgula. A Revista recomenda o uso de títulos de assuntos médicos do Index Medicus para palavras-chave para evitar o uso de vários sinônimos como termos de entrada no índice para diferentes artigos sobre o mesmo assunto. Lembre-se, as palavras-chave são utilizadas pelo Banco de Dados Scielo (ver http://www.scielo.br/bjmb;articles_search/subject) para indexar artigos publicados.

Título em execução

Este título curto, para ser usado como título de página, não deve exceder 60 letras e espaços.

Autor correspondente

Um dos autores deve ser designado como o autor correspondente. É responsabilidade do autor correspondente garantir que a lista de autores seja precisa e completa. Se o artigo foi submetido em nome de um consórcio, todos os membros do consórcio e afiliações devem ser listados na seção Agradecimentos. Forneça o nome e endereço de e-mail do autor para quem a correspondência deve ser enviada.

Introdução

A introdução deve colocar o foco do manuscrito em um contexto mais amplo. Ao compor a Introdução, pense nos leitores que não são especialistas nesse campo. Isso deve indicar o propósito da investigação e justificativa para a realização da pesquisa e relacionamento com outros trabalhos no campo. Uma lista extensa ou revisão da literatura não deve ser usada. Se houver controvérsias ou divergências relevantes no campo, elas devem ser mencionadas para que um leitor não especialista possa aprofundar essas questões. A introdução deve concluir com uma breve declaração do objetivo geral dos experimentos e um comentário sobre o que foi alcançado.

Material e métodos

Informações suficientes devem ser fornecidas no texto ou por referência a artigos em periódicos geralmente disponíveis para permitir que o trabalho seja repetido.

Esta seção deve fornecer detalhes suficientes para a reprodução dos resultados. Protocolos para novos métodos devem ser incluídos, mas protocolos bem estabelecidos podem ser simplesmente referenciados. Encorajamos os autores a enviar, como arquivos separados,

Resultados

Os resultados devem ser apresentados de forma clara e concisa. Tabelas e figuras devem ser usadas apenas quando necessário para uma compreensão efetiva dos dados. A seção Resultados deve fornecer resultados de todos os experimentos necessários para apoiar as conclusões do artigo. Não há limite de palavras específicas para esta seção, mas uma descrição de experimentos que são periféricos à mensagem principal do artigo e que prejudicam o foco do artigo não

deve ser incluída. A seção pode ser dividida em subseções, cada uma com um subtítulo conciso. Grandes conjuntos de dados, incluindo dados brutos, devem ser enviados como arquivos suplementares; estes são publicados online ligados ao artigo. A seção Resultados deve ser escrita no tempo passado. Em algumas situações, pode ser desejável combinar Resultados e Discussão em uma única seção.

Discussão

O objetivo da Discussão é identificar resultados novos e relevantes e relacioná-los ao conhecimento existente. Informações dadas em outras partes do texto, especialmente em Resultados, podem ser citadas, mas todos os resultados não devem ser repetidos em detalhes na Discussão. A discussão deve enunciar as principais conclusões e interpretações do trabalho, incluindo algumas explicações sobre o significado dessas conclusões. Como as conclusões afetam as suposições e modelos existentes no campo? Como pesquisas futuras podem se basear nessas observações? Quais são as principais experiências que devem ser feitas? A discussão deve ser concisa e bem argumentada. Se garantido, os Resultados e Discussão podem ser combinados em uma seção.

Agradecimentos

Quando apropriado, reconheça brevemente a assistência técnica, conselhos e contribuições dos colegas. As pessoas que contribuíram para o trabalho, mas não se encaixam nos critérios para os autores, devem ser listadas na seção Agradecimentos, juntamente com suas contribuições. Doações de animais, células ou reagentes também devem ser reconhecidas. Você também deve garantir que qualquer pessoa mencionada nos Agradecimentos concorde em ser assim chamada. O apoio financeiro para a pesquisa e bolsas de estudo deve ser reconhecido nesta seção (agência e número de concessão).

Figuras

As figuras devem ser enviadas em versão de alta resolução (600 dpi).

Assegure-se de que os arquivos estejam em conformidade com nossas Diretrizes para Preparação de Figuras ao preparar suas figuras para produção e / ou

"Especificações de Qualidade de Imagem". O link contém informações importantes sobre a qualidade da imagem da PubMed Central, onde a Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica é indexada.

Observe que é de responsabilidade do (s) autor (es) obter permissão do proprietário dos direitos autorais para reproduzir figuras (ou tabelas) que tenham sido publicadas anteriormente em outro local. Para que todas as figuras sejam de acesso aberto, os autores devem ter permissão do detentor dos direitos se desejarem incluir imagens que tenham sido publicadas em outro local em acesso não aberto.

Tabelas

- As tabelas devem ser enviadas no Word (.doc) ou no Excel (.xls), não como uma imagem.
- As tabelas devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos no texto.
- As tabelas devem ter um título conciso e descritivo.
- Todas as informações explicativas devem ser dadas em uma nota de rodapé abaixo da tabela. Notas de rodapé devem ser usadas para explicar abreviações e fornecer informações estatísticas, incluindo testes estatísticos usados.
- Todas as abreviaturas devem ser definidas nesta nota de rodapé, mesmo que sejam explicadas no texto.
- As tabelas devem ser compreensíveis sem se referir ao texto.
- Tabelas ocupando mais de uma página impressa devem ser evitadas, se possível.
- Linhas verticais e diagonais não devem ser usadas em tabelas; em vez disso, o recuo e o espaço vertical ou horizontal devem ser usados para agrupar dados.
- Tabelas no Excel devem ser baseadas em células; não use elementos de imagem, caixas de texto, tabulações ou devoluções em tabelas.

Referências

Apenas manuscritos publicados ou aceitos devem ser incluídos na lista de referências. Resumos de reuniões, palestras de conferências ou trabalhos

submetidos mas ainda não aceitos não devem ser citados. Citação limitada de trabalho não publicado deve ser incluída apenas no corpo do texto. Todas as comunicações pessoais devem ser apoiadas por uma carta dos autores relevantes. Os autores são responsáveis pela exatidão e integridade de suas referências e pela citação correta do texto. Quando possível, referências que são facilmente disponíveis em inglês devem ser citadas.

O BJMBR usa o método de citação numerada (sequência de citação). As referências são listadas e numeradas na ordem em que aparecem no texto. No texto, as citações devem ser indicadas pelo número de referência entre parênteses. Múltiplas citações dentro de um único conjunto de parênteses devem ser separadas por vírgulas sem espaço (1,5,7). Onde houver 3 ou mais citações sequenciais, elas devem ser dadas como um intervalo (4-9).

Como todas as referências serão vinculadas eletronicamente (doi), se possível, aos trabalhos citados, a formatação adequada das referências é crucial. Para todas as referências, liste os 6 primeiros autores seguidos de et al., Título do artigo, Diário (abreviação), Ano, Volume, Páginas Completas, A Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica segue o formato de referência dos Requisitos Uniformes para Manuscritos Submetidos para Revistas Biomédicas, que podem ser encontradas no site da Biblioteca Nacional de Medicina (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Use as abreviaturas do diário Medline e siga o estilo de referência mostrado no site mencionado acima, com várias exceções. Veja abaixo para detalhes. Se o autor utilizar o programa "Reference Manager", copie o arquivo contendo o estilo da Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica e coloque-o na pasta "Estilos". Ao enviar o manuscrito, envie o arquivo produzido no Reference Manager (".rmd" e ".rmx") como anexo.

Por favor, use o seguinte estilo para a lista de referências:

- Artigos Publicados.

Primeiros 6 autores seguidos por et al., Título, Jornal (abreviação em itálico), Ano, Volume, Páginas Completas.

- Artigo aceito para publicação, mas ainda não publicado.

Primeiros 6 autores seguidos por et al., Título, Diário (abreviação), Ano de publicação esperado, (no prelo) no final da citação.

- Comunicação na Internet.

Certifique-se de que os URLs estejam ativos e disponíveis. Forneça DOI, se disponível.

- Livro, inteiro.

Autores, título do livro, edição, cidade, editora, ano.

ANEXO II
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores potenciais para distúrbios crônicos do envelhecimento humano

Pesquisador: Otávio de Toledo Nóbrega

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 42256214.4.3001.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.072.651

Data da Relatoria: 20/05/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de estudo de biomarcadores em sangue periférico de pacientes idosos de vários grupos avaliados prospectivamente em Brasília com participação do Banco de Encéfalos e da Urologia FMUSP.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar marcadores prognósticos por biologia molecular de sangue periférico de pacientes geriátricos com diversas síndromes clínicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco muito baixo, coleta única de pouco material(30ml)de população em acompanhamento ambulatorial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto multicêntrico, chefiada por pesquisador da UNB, e que será executado com materiais de várias frentes incluindo dois grupos da FMUSP que anuem com o projeto. O projeto foi avaliado e aprovado pela CE FM UNB, dentro da plataforma Brasil.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.072.651

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os TCLE são regionalizados e o acompanhamento dos pacientes de responsabilidade das unidades específicas, que são usualmente de cobertura SUS. Não há comentários inadequados e a leitura é fluida em geral, já que cada instituição corre com o seu TCLE. Há um pedido de dispensa de termo de assentimento para falecidos com material estocado, o que é interessante, mas há também um termo de assentimento para familiares.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 21 de Maio de 2015

Assinado por:
Roger Chammas
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br