



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

**GIOVANNA RODRIGUES DE PAULA**

**POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE NOS3 EM IDOSOS COM  
SÍNDROME METABÓLICA**

**BRASÍLIA, 2019.**

GIOVANNA RODRIGUES DE PAULA

**POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE NOS3 EM IDOSOS COM  
SÍNDROME METABÓLICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ceilândia, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

**Orientador (a): Prof<sup>a</sup> MSc. Ligia Canongia de Abreu Cardoso**

**Co – orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Rodrigues da Silva**

BRASÍLIA, 2019.

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

PP324p Paula, Giovanna Rodrigues de  
Polimorfismo da Região Promotora do Gene NOS3 em Idosos  
com Síndrome Metabólica / Giovanna Rodrigues de Paula;  
orientador Ligia Canongia de Abreu Cardoso Duarte; co  
orientador Izabel Cristina Rodrigues da Silva . --  
Brasília, 2019.  
57 p.

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

1. Polimorfismo Genético. 2. NOS3. 3. Síndrome Metabólica  
. 4. Hipertensão. 5. Osteoporose. I. Duarte, Ligia Canongia  
de Abreu Cardoso , orient. II. Silva , Izabel Cristina  
Rodrigues da , co-orient. III. Título.

GIOVANNA RODRIGUES DE PAULA

**POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE NOS3 EM IDOSOS COM  
SÍNDROME METABÓLICA**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientador (a): Profa. Msc. Ligia Canongia de Abreu Cardoso  
(Universidade de Brasília – FCE, UNIP e UNIPLAN)



---

Co-orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva  
(Universidade de Brasília - FCE)

---

Caroline Ferreira Fratelli

(Universidade de Brasília - FCE)

---

Aline Ribeiro Barros

(Universidade de Brasília - FCE)

BRASÍLIA, 2019.

*Dedico esse trabalho à minha família e aos docentes por sempre acreditarem no meu melhor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por todo discernimento, sabedoria e confiança durante o período da graduação. Por colocar as pessoas certas em minha vida durante esta caminhada que diariamente contribuem para o meu crescimento pessoal.

Aos meus pais, principalmente minha mãe por me incentivar e por ter um papel fundamental na minha educação e nas decisões que foram de extrema importância na minha vida, inclusive por me auxiliar na escolha de cursar farmácia na Universidade de Brasília – UnB/FCE.

A minha avó Joana e a minha prima Liz, que me fazem acreditar na pureza do ser humano e na capacidade que o amor tem de mudar vidas, por me ensinarem a confiar no futuro brilhante que posso construir.

Especialmente a minha orientadora Ligia Canongia, biomédica, mestre e futura doutora por toda ajuda e conhecimento compartilhado, e por demonstrar essa paixão pela pesquisa e pela docência.

A minha profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues pela dedicação e conhecimento transmitido durante a graduação, por todo amor à docência e por se preocupar com o futuro da pesquisa.

A Renata de Souza Freitas pelo trabalho realizado e pela colaboração crucial deste estudo.

As farmacêuticas Caroline Ferreira Fratelli e Aline Ribeiro Barros por aceitarem participar da banca examinadora deste trabalho, contribuindo com a construção deste estudo.

Aos colegas de laboratório em especial Camila Magalhães, Isabella Possatti, Marcela Santos e Maria Eduarda pelas experiências compartilhadas no laboratório e na vivência acadêmica.

Ao farmacêutico Renato Augusto, graduado na UnB-FCE por se tornar uma importante influência e um grande incentivo ao ser um dos primeiros a compartilhar sua experiência de laboratório na área de biologia molecular comigo.

## RESUMO

A síndrome metabólica é uma doença crônica não transmissível e um desafio para a saúde pública, caracterizada por fatores de risco que auxiliam no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, contribuindo para diferentes condições clínicas. O óxido nítrico (NO) é sintetizado no endotélio vascular pelo óxido nítrico sintase (NOS3), localizado no braço longo do cromossomo 7q36.1 é um fator importante para regulação da pressão arterial por sua função vasodilatadora. Com isto, o objetivo deste estudo foi verificar a frequência do polimorfismo na região promotora T-786C do gene *NOS3*, em uma amostra populacional de indivíduos brasileiros portadores da síndrome metabólica. O trabalho foi delineado e realizado como estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle. Foram padronizadas e executadas as análises moleculares do polimorfismo do gene *NOS3*, caracterizando 94 pacientes divididos em grupo caso e controle para hipertensão arterial e diabetes mellitus e 98 pacientes para osteoporose. O nível de significância adotado foi de 5%. Não foi apontada diferença estatística entre os grupos caso e controle na associação genotípica/alélica do polimorfismo. Os resultados apontaram que o polimorfismo na região promotora T-786C do gene *NOS3* não está associado a hipertensão, diabetes mellitus e osteoporose nas participantes do estudo, indicando que este polimorfismo não constitui um fator de risco significativo para tais condições clínicas. Estudos encontram dificuldade em correlacionar os diferentes polimorfismos do gene *NOS3*, sua ocorrência, frequência e desenvolvimento destas condições clínicas pela complexidade e os diversos fatores de risco que a síndrome metabólica apresenta.

**Palavras-chave:** Polimorfismo genético. *NOS3*. Síndrome Metabólica. Hipertensão. Osteoporose.

## ABSTRACT

Metabolic syndrome is a chronic noncommunicable disease and a public health challenge characterized by risk factors that assist in the development of cardiovascular diseases contributing to different clinical conditions. Nitric oxide (NO) is synthesized in the vascular endothelium by nitric oxide synthase (*NOS3*) located on the long arm of chromosome 7q36.1 and is an important factor in regulating blood pressure by its vasodilatory function. Thus, the aim of this study was to verify the frequency of polymorphism in the T-786C promoter region of the *NOS3* gene in a population sample of Brazilian individuals with metabolic syndrome. The study was designed and conducted as an observational, descriptive case-control study. Molecular analyzes of the *NOS3* gene polymorphism were standardized and performed, characterizing 94 patients divided into case and control group for hypertension and diabetes mellitus and 98 patients for osteoporosis. The adopted significance level was 5%. No statistical difference was found between the case and control groups in the genotypic/allelic association of polymorphism. The results showed that polymorphism in the T-786C promoter region of the *NOS3* gene is not associated with hypertension, diabetes mellitus and osteoporosis in the study participants, indicating that this polymorphism is not a significant risk factor for such clinical conditions. Studies find it difficult to correlate the different polymorphisms of the *NOS3* gene, and the occurrence, frequency and development of these clinical conditions by the complexity and the various risk factors that the metabolic syndrome presents.

**Keywords:** Genetic polymorphism. *NOS3*. Metabolic Syndrome. Hypertension. Osteoporosis

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DCNT – Doença Crônica Não Transmissível

DM – Diabetes Mellitus

DMO – Densidade Mineral Óssea

FEPECS - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL – Lipoproteína de Alta Tensidade

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDF - *International Diabetes Federation*

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

NCEP ATPIII - *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III*

NO – Óxido Nítrico

NOF - *National Osteoporosis Foudation*

NOS3 – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição

SES – DF - Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal

SM – Síndrome Metabólica

SNPs – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VEGF - *Vascular endothelial growth fator*

WHO - *World Health Organization*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos do gene <i>NOS3</i> para avaliar o polimorfismo T/C -786 do gene <i>NOS3</i> .....	24
Tabela 2. Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo do gene <i>NOS3</i> (T-786C) nos grupos de Hipertensão Arterial e controle.....	37
Tabela 3. Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo do gene <i>NOS3</i> (T-786C) nos grupos de Diabetes Mellitus e controle.....	38
Tabela 4. Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo do gene <i>NOS3</i> (T-786C) nos grupos de Osteoporose e controle.....	38
Tabela 5. Distribuição das características clínicas: HAS, Diabetes e Osteoporose relacionadas ao polimorfismo <i>NOS3</i> -786 T/C nos participantes do estudo.....	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> PCR do gene <i>NOS3</i> T-786C.....	25
<b>Figura 2.</b> Digestão enzimática do gene <i>NOS3</i> T-786C.....	26

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1	Síndrome Metabólica .....	14
2.2	Síndrome Metabólica e Densitometria Óssea .....	15
2.3	Epidemiologia.....	17
2.4	Óxido Nítrico Sintase Endotelial ( <i>NOS3</i> ).....	18
2.5	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP).....	20
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	OBJETIVO.....	21
5	MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
	Campo de estudo .....	21
	Amostra.....	22
	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE .....	22
	Termo de guarda de material biológico .....	23
	Preceitos Éticos.....	23
	Procedimentos Técnicos e Laboratoriais .....	24
	<i>Extração de DNA</i> .....	24
	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	24
	<i>PCR do gene NOS3</i> .....	25
	<i>RFLP do gene NOS3</i> .....	25
	Análise estatística .....	26
	REFERÊNCIAS.....	27
	ARTIGO.....	31
	Resumo.....	32
	Abstract.....	33

Introdução .....	34
Objetivo .....	35
Materiais e Métodos .....	35
População amostral.....	35
Procedimentos Técnicos e Laboratoriais .....	36
Análise estatística .....	37
Resultados .....	37
Discussão.....	40
Conclusão .....	41
Referências.....	41
ANEXOS.....	43

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno mundial. No Brasil a transição demográfica e epidemiológica provocou uma modificação na pirâmide etária da população, elevando a expectativa de vida com um aumento significativo da população idosa, o que está associado à redução das taxas de mortalidade e fecundidade (BARRETO, 2015). O processo de envelhecimento está relacionado com modificações morfológicas, psicológicas e fisiológicas em todo o organismo e com o aumento de complicações na saúde desta população, como as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) (MACHADO et al., 2017).

A síndrome metabólica (SM), uma DCNT é destacada como um conjunto de fatores de risco que auxiliam no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de outros agravos como diabetes e hipertensão arterial. Para o diagnóstico da SM dois critérios são mencionados pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da SM, a saber: o *International Diabetes Federation* (IDF) e *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III* (NCEP ATPIII). Acredita-se que fatores sociodemográficos, idade, estilo de vida, hábitos alimentares, sedentarismo, alcoolismo, tabagismo, condições clínicas (obesidade, hipertensão, níveis de colesterol) podem estar diretamente associadas com o desenvolvimento da SM (VIEIRA et al., 2014).

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada pela diminuição da densidade óssea pelo comprometimento da resistência óssea causada principalmente por mudanças fisiológicas relacionadas à idade na quantidade e distribuição do tecido ósseo, aumentando os riscos de fraturas pelo indivíduo. Fatores de risco modificáveis e não modificáveis, como genética, idade, altura, etnia, sedentarismo, tabagismo e abuso de álcool contribuem para o aumento na incidência de osteoporose. (CHO et al., 2008; COSTA et al., 2016).

O óxido nítrico (NO) é formado a partir da ativação da sintetase óxido nítrico endotelial (*eNOS* ou *NOS3*) que aumenta o metabolismo da L-arginina convertendo-a em L-citrulina e NO, possui função importante no controle cardiovascular, principalmente na vasodilatação. A atividade do gene *NOS3* pode ser determinada por fatores genéticos, como o polimorfismo T-786C na região promotora capaz de diminuir a atividade promotora e transcricional do *NOS3*, reduzindo a produção de

NO e aumentando as chances do desenvolvimento de hipertensão arterial e outras doenças cardiometabólicas.

No osso, o NO atua na inibição da reabsorção óssea *in vitro* e na regulação e remodelação óssea *in vivo*. Das isoformas a NOS3 é a que mais predomina neste tecido e desempenha uma função de mediação da formação óssea induzida por estrogênio. Isto foi visto em um experimento realizado em camundongos fêmeas, possivelmente relacionada à regulação pós-transcricional da atividade da NOS3 pelo estrogênio (ZAGO et al., 2010; CHO et al., 2008).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Síndrome Metabólica**

A Síndrome Metabólica (SM), associada à alta taxa de morbimortalidade é caracterizada por disfunções no metabolismo humano, como hiperglicemia, obesidade visceral, dislipidemia, hipertensão, estado pró-inflamatório e pró-trombótico. Utilizada como instrumento na prática clínica, auxilia na identificação de pacientes que apresentam risco metabólico de doenças cardiovasculares. Sua classificação leva em consideração um conjunto de fatores de risco cardiovasculares influenciados por alterações ambientais e genéticas (NEVES et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) na I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da SM, os fatores de risco mais importantes para a morbimortalidade relacionada às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são: hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, ingestão insuficiente de nutrientes encontrados em frutas, hortaliças e leguminosas, sobrepeso ou obesidade, sedentarismo e até mesmo o tabagismo. Cinco desses fatores de risco estão relacionados à alimentação e à atividade física, e três deles têm grande impacto no aparecimento da SM, como a predisposição genética, alimentação inadequada e inatividade física (TRATAMENTO, D. E. 2005).

Considerando o sedentarismo, indivíduos que não praticam nenhum tipo de atividade física que possuem um ou mais componentes da SM apresentam doenças crônicas associadas, como hipercolesterolemia e diabetes. Vale ressaltar que a

ausência da prática de atividade física, o sobrepeso e a obesidade são condições que potencializam as alterações cardiometabólicas e auxiliam no aumento da circunferência da cintura, fator este de extrema importância para o aparecimento da SM de acordo com a IDF, organização que tem como estratégia promover o cuidado, a prevenção e a cura do diabetes por meio do controle de fatores de risco capazes de serem modificados, por exemplo, a obesidade, qualidade nutricional e inatividade física (NETO et al., 2018).

Segundo o critério IDF, para o diagnóstico da SM é necessário que o indivíduo apresente circunferência abdominal elevada, e, pelo menos, dois dos seguintes componentes: Triglicérido  $\geq 150\text{mg/dL}$ ; HDL-c  $< 40\text{mg/dL}$  (homens), ou  $< 50\text{mg/dL}$  (mulheres); Pressão arterial (PA)  $\geq 130/85\text{mmHg}$ , ou uso de anti-hipertensivo, e Glicemia de jejum  $\geq 100\text{mg/dL}$ , ou diagnóstico prévio de Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) (NETO et al., 2018).

A *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III* (NCEP ATPIII), programa que tem como objetivo orientar e fornecer recomendações para o tratamento de dislipidemia, além de não destacar uma única etiologia para a SM possui critérios que auxiliam em estudos epidemiológicos.

Um estudo transversal utilizando os critérios NCEP ATPIII, realizado por Marcondes e colaboradores (2007) em 73 mulheres com síndrome dos ovários policísticos indicou uma maior prevalência de SM, em mulheres com obesidade mórbida, idade avançada e com índice de massa corporal maior que as participantes sem a síndrome. Salaroli et al. (2007) em Vitória – ES, realizaram um estudo transversal com 1.663 indivíduos entre 25 a 64 anos, mostrou um aumento na prevalência da SM conforme o avançar da idade, confirmando o trabalho de Rigo e colaboradores (2009), onde informam que os idosos são o grupo da população com maior prevalência de episódios cardiovasculares além de existir um risco maior para déficits cognitivos entre portadores da SM.

## **2.2 Síndrome Metabólica e Densitometria Óssea**

A osteoporose, umas das alterações da função óssea, assim como doenças cardiovasculares é um fator importante de morbidade e mortalidade em idosos e podem estar relacionadas em diferentes patologias, indicando que a diminuição da

densidade óssea pode estar associada a um maior risco de eventos cardiovasculares nesta população (SILVA, 2012).

É uma doença osteometabólica caracterizada pela diminuição da massa óssea, no qual a reabsorção excede a deposição óssea, resultando na fragilidade e fraqueza dos ossos, além do aumento da susceptibilidade a fraturas. A *National Osteoporosis Foudation* (NOF), fundação norte-americana que estuda sobre a osteoporose, caracteriza esta doença como um aumento da fragilidade óssea e risco de fratura, principalmente fraturas na coluna vertebral e no quadril, onde ocorre a maior parte da reabsorção óssea (BRASIL, 2014; SILVERTHORN, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) utiliza a medida da densidade mineral óssea (DMO) como critério de diagnóstico precoce da osteoporose, para medir a quantidade de conteúdo mineral nos ossos, por meio da densitometria óssea. A análise desse diagnóstico é feita a partir do *T-score*, valor resultante da diferença entre a DMO média de jovens normais e a DMO do indivíduo examinado, dividido pelo desvio-padrão da média de jovens normais. A diminuição da densidade óssea pode resultar na compressão das vértebras, causando deformidades e modificações posturais, como a cifose, que se torna mais prevalente com o avançar da idade e pós-menopausa. (FRAZÃO, 2006 e RODRIGUES, 2009).

A densitometria óssea também atua como um método de avaliação da composição corporal e parâmetros como massa óssea, massa magra e adiposa, além de classificar os tipos de obesidade em ginóide, corpo feminino em formato pêra com menor risco metabólico, e androide, corpo masculino em formato maçã com maior risco de complicação metabólica, auxiliando na avaliação de risco cardiovascular (SILVA et al., 2006).

Relacionado com a SM, mas sem estabelecer uma relação definida de que a menopausa aumenta o risco de SM, Mendes (2012) menciona em seu estudo que autores consideram que o período pós-menopausa iniciado um ano após o último ciclo menstrual, caracterizado pelo hiperandrogenismo, maior queda de estrogênios comparada com os andrógenos, pode levar à formação da aterosclerose, ou seja, aumento dos níveis de colesterol LDL e diminuição de HDL. Para Janssen et al. (2010) mulheres na pós-menopausa apresentam maior acúmulo de gordura visceral e abdominal, independente do processo de envelhecimento, fator considerado importante pelo IDF para o diagnóstico de SM.

O NO é um fator regulatório que relacionado ao desenvolvimento da osteoporose *in vitro* pode melhorar a função dos osteoblastos. Firat et al. (2009), em um estudo sobre densidade mineral óssea citou uma avaliação da expressão do NOS3 em osteócitos do colo do fêmur realizado por Loveridge et al., no qual se percebeu que a proporção de osteócito que expressa NOS3 diminui em situações de fratura de quadril do colo do fêmur quando comparado com o grupo controle. O NOS3 atua no controle da reabsorção óssea e o polimorfismo deste gene pode tornar o indivíduo susceptível ao desenvolvimento da osteoporose.

### **2.3 Epidemiologia**

Considerando como idosos aqueles indivíduos com idade a partir de 65 anos, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) publicou em 2016 uma Tábua completa de mortalidade para o Brasil, demonstrando que a expectativa de vida da população brasileira ao nascer teve um aumento considerável desde o início da transição demográfica, com uma variação significativa de 30 anos de 1940 a 2016, passando da expectativa de 45,5 para 75, 8 anos de vida. Por meio de uma projeção da população do Brasil e Unidades da Federação por sexo e idade para o período de 2000 a 2030, a expectativa de vida ao nascer no Distrito Federal é respectivamente, 74,4 e 85,5 anos para os sexos masculino e feminino, considerando a média nacional igual à 72,2 e 79,4 anos, ou seja, a longevidade dos brasileiros vem aumentando consideravelmente ao longo dos anos (BRASIL, 2017).

Esses dados auxiliam na compreensão do processo de transição epidemiológica, na análise de dados da expectativa de vida e a relação da condição socioeconômica como um importante indicador na taxa de mortalidade entre os sexos e faixas etárias dos diversos estados brasileiros (IBGE, 2016).

De acordo com a World Health Organization (WHO, 2014), as doenças crônicas não transmissíveis são responsáveis por 80% das mortes na maioria dos países, afetando principalmente os de baixa e média renda socioeconômica pela exposição dos indivíduos à fatores de risco. E entre eles estão a rápida urbanização não planejada com pouca infraestrutura, vidas cada vez mais sedentárias e aumento da ingestão de alimentos com baixo valor nutritivo. Com isso, as DCNT estão aumentando rapidamente sendo capazes de ultrapassar os níveis de doenças

transmissíveis, maternas, perinatais e nutricionais se tornando as causas mais comuns de morte até 2030.

Para a população idosa, as consequências das doenças crônicas não transmissíveis, como a SM, se tornam mais acentuadas, principalmente pelas mudanças fisiológicas associadas ao envelhecimento, redução no metabolismo, alteração da composição corporal e do estilo de vida (MENDES et al., 2012).

Um estudo transversal realizado por Vieira et al. (2014), utilizando os critérios de NCEP ATP III, com 133 idosos usuários da atenção básica do Sistema Único de Saúde em Goiânia, que visavam avaliar a prevalência e os fatores associados à SM nesta população, concluiu que as variáveis sexo, idade, cor da pele, estado civil, escolaridade, renda, tabagismo, ingestão de bebidas alcoólicas e prática de atividade física não estão associadas com a presença de SM. Por outro lado, o excesso de peso e o alto percentual de gordura corporal total são fatores diretamente associados à esta doença. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) como um dos componentes da SM foi a mais prevalente em ambos os sexos.

O excesso de peso associado à SM, calculado por meio do IMC, reflete no depósito de gordura no músculo esquelético favorecendo a resistência à insulina, limitando assim a sua secreção. Bulhões e Araújo (2007) em um estudo sobre resistência insulínica, avaliando 102 participantes hipertensos maiores de 18 anos da cidade de Salvador –BA, observaram que os valores de insulinemia de jejum eram significativamente maiores em indivíduos portadores de SM. Franco et al. (2009) em pesquisa realizada no Cuiabá – MT com 120 indivíduos hipertensos, analisou que 80% dos portadores de SM hipertensos apresentaram alto índice HOMA (Modelo de Avaliação da Homeostase, que auxilia no diagnóstico do Diabetes), valor similar a outros estudos sobre o papel da resistência à insulina na fisiopatogenia da SM.

#### **2.4 Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOS3)**

O óxido nítrico (NO) é um importante e potente vasodilatador, responsável pela manutenção da função endotelial e da homeostase na parede dos vasos sanguíneos, formado a partir da conversão da L-arginina em um intermediário pela ação de hemoproteínas da família citocromo P450, denominadas óxido nítrico

sintase (NOS), sendo elas a induzível (*iNOS*), neuronal (*nNOS*) e a endotelial (*eNOS*) (ZAGO, FATINI et al., 2004).

A enzima sintase do óxido nítrico endotelial (*eNOS*) ou isoforma III (*NOS3*) expressa por células endoteliais capaz de sintetizar NO possui papel central no controle do sistema cardiovascular, além de desempenhar importante função na prevenção das doenças cardiometabólicas (MALAGRINO et al., 2013; ZAGO, 2013; Flora Filho and Zilberstein, 2000).

O *NOS3* é um dos genes com função reguladora relacionados com a angiogênese, processo de desenvolvimento de novos vasos a partir dos já existentes, além de influenciar na tonicidade vascular, resistência à insulina, desenvolvimento de aterosclerose e diabetes tipo 2 (SALEH et al., 2015).

A expressão gênica sob baixa tensão de oxigênio possui alto impacto sobre a expressão do *NOS3*. A hipóxia prolongada e a isquemia inferior à expressão endotelial de *NOS3* contribuem na perda da biodisponibilidade de NO e na biologia celular endotelial, incluindo patologias cardiovasculares. Diferentes condições fisiopatológicas também são capazes de afetar a expressão do *NOS3* por meio de fatores de transcrição e pós-transcricionais que mantêm a homeostase do NO endotelial (KALINOWSKI, 2016).

A diminuição da produção do NO ou na biodisponibilidade para os tecidos, caracterizado pela disfunção endotelial causada pela redução da expressão do *NOS3* podem desenvolver alterações metabólicas importantes como o aumento do estresse oxidativo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como a dislipidemia, aterosclerose e desempenhar um papel na resistência à insulina e diabetes tipo II. A presença de polimorfismos no gene *NOS3* e a deficiência de cofatores que auxiliam na atividade enzimática podem afetar a expressão e atividade deste gene (MALAGRINO, 2013 e PICCOLI et al., 2008).

O gene codificador de proteína *NOS3* também conhecido como sintase de óxido nítrico 3 pela HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*), óxido nítrico sintase 3 ou sintase endotelial do óxido nítrico apresenta ID igual a 4846 e está localizado no braço longo do cromossomo 7q36.1 contendo 28 éxons (NCBI, 2019).

## 2.5 Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP)

O polimorfismo de nucleotídeo único ou de substituição única é uma variação genética resultante de mutações pontuais no genoma, no qual ocorre uma alternância dos nucleotídeos adenina, citosina, guanina e timina, em uma frequência alélica de uma porção mínima da população, aproximadamente uma vez a cada 1.000 pares de base no genoma humano (BROOKES, 1999).

Os SNPs podem estar presentes em regiões codificadoras ou não-codificadoras de um genoma apresentando consequências estruturais e funcionais significativas como possíveis alterações na suscetibilidade a doenças crônicas como, a hipertensão arterial, por exemplo, causada juntamente a fatores ambientais (MCLINNES et al., 2016).

O polimorfismo do gene *NOS3* caracterizado pela substituição de um único nucleotídeo (SNP) da região promotora T-786C (Tiamina por Citosina) é um dos mais estudados e clinicamente relevante, sendo associado à disfunção endotelial, mostrando que a presença de polimorfismo neste gene pode ser um fator que desencadeia doenças cardiovasculares.

## 3 JUSTIFICATIVA

Considerando os riscos e o impacto da síndrome metabólica na saúde da população, estando associada à fatores ambientais e genéticos, o presente estudo buscou investigar a frequência do polimorfismo da região promotora T-786C do gene *NOS3* e a provável relação entre o polimorfismo genético e a hipertensão, diabetes mellitus e osteoporose. Acredita-se com isso, que este estudo possa colaborar e contribuir para um possível diagnóstico e tratamento desta doença.

#### **4 OBJETIVO**

O objetivo geral deste estudo é analisar a frequência do polimorfismo da região promotora T-786C do gene *NOS3* em uma amostra populacional de idosos do Distrito Federal com Síndrome Metabólica e investigar associação com diferentes manifestações clínicas dos pacientes. Os objetivos específicos foram realizar levantamento bibliográfico sobre Síndrome Metabólica e polimorfismo *NOS3* T/C (-786), padronizar e executar as estratégias laboratoriais de biologia molecular (padronização, PCR e digestão enzimática) para estudo da frequência deste polimorfismo em idosos com Síndrome Metabólica na população do DF, e investigar uma possível associação entre o polimorfismo T-786C do gene *NOS3* com diferentes manifestações clínicas e prognóstico de pacientes com Síndrome Metabólica.

#### **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho trata-se de um estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle (caso: hipertensão arterial, diabetes mellitus e osteoporose e controle: normotensos, ausência de diabetes mellitus e osteoporose) em pacientes idosos com SM atendidos em duas Unidade Básica de Saúde do Distrito Federal - Brasil.

##### Campo de estudo

Realizou-se a pesquisa na Região Administrativa (RA) de Ceilândia situada no Distrito Federal. Com população estimada de 489.351 habitantes em 2015, desta população 16,90% são idosos, e 51,82% são do sexo feminino.

Os participantes da pesquisa foram provenientes das Unidades Básicas de Saúde (UBS) número 06 e 08 de Ceilândia. A UBS nº 06 é composta por seis equipes da Estratégia Saúde da Família (ESF) e a UBS nº08 que tem em sua composição seis equipes de ESF.

A escolha das UBS foi baseada nas atividades de extensão desenvolvidas semanalmente pelo grupo de pesquisa em Saúde, Cuidado e Envelhecimento de práticas da Faculdade de Ceilândia - UNB.

Para participar da pesquisa foi realizado um convite nas equipes ESF e posteriormente marcada uma palestra para explicação sobre a pesquisa, esclarecendo os objetivos e a justificativa do estudo, apontando os benefícios.

### Amostra

Amostra foi selecionada a partir de idosas que se voluntariaram a participar do estudo do estudo e faziam parte de alguma equipe de ESF das UBS nº06 e nº08. As idosas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a concordância foi agendado uma consulta de enfermagem, preenchimento da ficha de identificação, assinatura do Termo de Guarda de Material Biológico, e a realização da coleta de sangue.

Na seleção dos participantes do grupo caso foram utilizados os seguintes critérios: ser do sexo feminino; com idade maior ou igual que 60 anos; ser capaz de compreender, verbalizar e responder as questões propostas; expressar o aceite de participação como participantes da pesquisa após esclarecimento dos objetivos e métodos de pesquisa, por assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) de acordo com a resolução nº. 466/2012.

Os critérios de exclusão foram: ser portadora de doenças mentais ou de neoplasias em tratamento; ter passado por cirurgia cardíaca nos últimos seis meses;

As coletas de sangue foram realizadas após jejum noturno de 8 a 12 horas, por meio de punção venosa, em sistema fechado a vácuo (Vacutainer).

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

O TCLE (Anexo I), de acordo com a Resolução nº.466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) que dispõe sobre pesquisa com seres humanos, foi aplicado durante a palestra de explicação sobre a pesquisa nas Unidades Básicas de Saúde.

Todas as pacientes idosas que demonstraram interesse em participar da pesquisa receberam informações detalhadas sobre a pesquisa e assinaram o TCLE.

### Termo de guarda de material biológico

O termo de guarda de material biológico (Anexo II) foi obtido de todas as participantes do presente estudo. Este documento autoriza ou não o armazenamento de dados e materiais biológicos coletados durante a pesquisa. Todas as participantes tiveram acesso aos dados genéticos, assim como o direito de retirá-los do banco onde se encontram armazenados, a qualquer momento.

### Preceitos Éticos

Este projeto está inserido em um projeto maior denominado “Associação entre sarcopenia, fatores genéticos e parâmetros inflamatórios em mulheres idosas e as possíveis influências sobre o desempenho nas atividades de vida diária”, que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS) da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF) e aprovado com parecer de número 1.355.211 (Anexo III).

Todas as participantes foram informadas sobre os objetivos, métodos, benefícios e riscos da participação na pesquisa antes de assinarem o TCLE (Anexo I), concordando em participar como voluntárias nas etapas desta pesquisa. Tendo em vista tratar-se de uma coleta de sangue (acesso venoso periférico), os riscos são mínimos, pode gerar desconforto durante o procedimento de introdução da agulha durante a coleta, e eventualmente um pequeno hematoma no local puncionado. Antes de proceder com a coleta foi informada as participantes sobre a possibilidade de haver um pequeno incômodo de dor no momento.

Na possibilidade da desistência de participação na pesquisa a qualquer momento, as participantes foram informadas que não seria implicado prejuízos para si. Todas as etapas da pesquisa levaram em consideração a Resolução nº466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, a qual dispõe sobre as normas das pesquisas com a participação de seres humanos. Foram garantidos o sigilo e o anonimato das participantes. A privacidade foi preservada por meio da substituição dos nomes por números de identificação em cada instrumento de coleta de dados.

O aconselhamento as participantes visando a promoção da saúde e prevenção de doenças foi realizado durante a coleta de dados. Todas receberam cópia dos resultados dos exames laboratoriais e aquelas participantes que apresentaram alterações nos exames realizados foram encaminhadas para um

acompanhamento na UBS, e orientadas a agendar consulta com médico clínico na UBS ou em serviço de saúde de sua preferência.

### Procedimentos Técnicos e Laboratoriais

#### **Extração de DNA**

O DNA foi extraído do sangue periférico com uso do kit **Invisorb Spin Blood Mini Kit** (250) da empresa **Invitek** (catálogo #CA 10-0005, lote #1031100300, Alemanha). A concentração do DNA obtido foi estimada pelo espectrofotômetro (NANODROP Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). A concentração média alcançada foi de 20 mg/μL.

#### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A técnica da PCR permite que uma região selecionada do genoma seja amplificada milhões de vezes. A sequência de oligonucleotídeo utilizada para avaliar o polimorfismo está presente na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para avaliar o polimorfismo T/C -786 do gene *NOS3*.

Gene	Oligonucleotídeos	Referências
<i>NOS3</i> -786 TQC	<b>Forward</b> 5' TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A 3'  <b>Reverse</b> 5' GCC TCC ACC CCC ACC CTG TC 3'	(Glueck, Prince et al. 2015)

O equipamento utilizado foi o termociclador TC-512 (**Techne, EUA**).

### **PCR do gene NOS3**

Para a amplificação do gene *NOS3* na região promotora T-786C, na termociclagem foram realizadas as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 63°C por 30 segundos e extensão da fita de DNA a 72°C por 30 segundos. Extensão final a 72°C por 10 minutos gerando ao final um fragmento de 180pb (Figura 1).

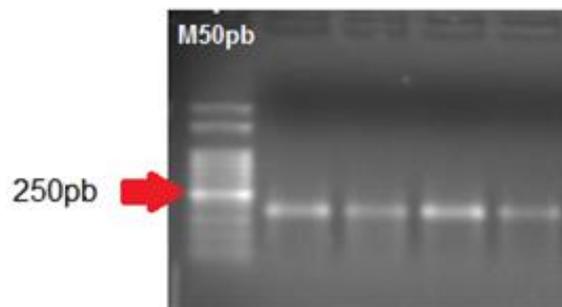


Figura 1. PCR do gene *NOS3* -786 T/C gerando um fragmento final de 180pb (Cardoso, 2017).

### **RFLP do gene NOS3**

A região promotora -786 T/C foi submetida à digestão enzimática, onde o produto gerado da PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *MspI* (*New England Biolabs, Inc.*, EUA). Para a digestão foi utilizado 10,0µL da PCR; 2,0MI de tampão (*New England Biolabs, Inc.*, EUA); 1µL de enzima *MspI* (10U/µL); 17µL completando com água ultrapura, obtendo um volume final de 20µL por reação. O sistema foi mantido a 37°C por 1 hora e 30 minutos.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio em uma potência de 50W por 1 hora e 30 minutos.

O alelo T criou um sítio de restrição, gerando os fragmentos de 140pb e 40pb e o alelo C possui dois sítios de restrição criando fragmentos de 90pb, 50pb e 40pb. Este polimorfismo T-786C foi dividido em genótipo T/C onde ambos os tipos de clivagem ocorreram nos dois alelos, T/T em que ocorreu uma clivagem nos dois alelos e genótipos C/C no qual a enzima clivou duas vezes os dois alelos (Figura 2).

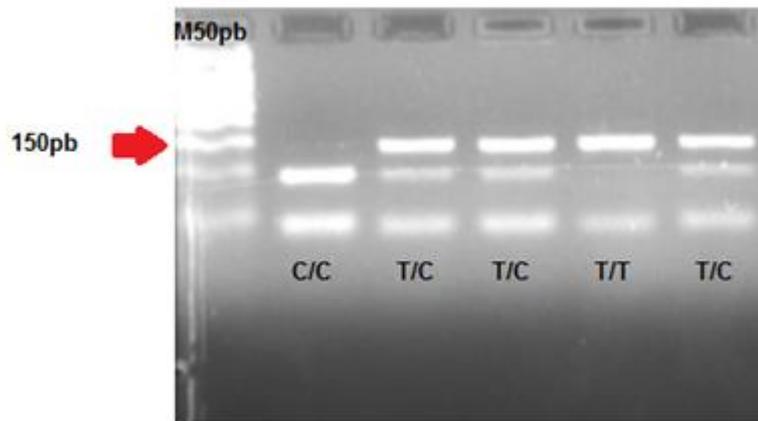


Figura 2. Digestão enzimática do gene *NOS3* T-786C, gerando os genótipos C/C, T/C e T/T (Cardoso, 2017).

#### Análise estatística

Para análise estatística da distribuição genotípica do polimorfismo *NOS3* T-786C em idosos portadores de síndrome metabólica e a associação com manifestações clínicas dos participantes foi realizado o teste qui-quadrado utilizando o programa SPSS versão 25.0, estabelecendo nível de significância de 0,05.

## REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n. 224, de 26 de março de 2014. **Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose.** Brasília; 2014.

Brookes, Anthony J. "The essence of SNPs." *Gene* 234.2 (1999): 177-186.

Bulhões K, Araújo L. Metabolic syndrome in hypertensive patients: correlation between antropometric data and laboratory findings. *Diabetes Care.* 2007; 30: 1624-6.

Cardoso, Ligia Canongia de Abreu. Polimorfismos genéticos dos genes CTLA4, NOS3 e CYP em pacientes diagnosticados com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH) e/ou aneurisma intracerebral em uma amostra do Distrito Federal. 2017.

Cho, K., et al. "Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene and bone density/ultrasound and geometry in humans." *Bone* 42.1 (2008): 53-60.

Costa, Angra Larissa Durans, et al. "Osteoporosis in primary care: an opportunity to approach risk factors." **Revista brasileira de reumatologia** 56.2 (2016): 111-116.

da Silva Barreto, Mayckel, Lígia Carreira, and Sonia Silva Marcon. "Envelhecimento populacional e doenças crônicas: Reflexões sobre os desafios para o Sistema de Saúde Pública." **Revista Kairós: Gerontologia** 18.1 (2015): 325-339.

de Araujo Silva, Tatiana Alves, et al. "Sarcopenia associada ao envelhecimento: aspectos etiológicos e opções terapêuticas." **Rev Bras Reumatol** 46.6 (2006): 391-397.

de Souza Zago, Vanessa Helena, et al. "Efeitos da atorvastatina e do polimorfismo T-786C do gene eNOS sobre parâmetros do metabolismo lipídico plasmático." **Arq Bras Cardiol** 100.1 (2013): 14-20.

Fatini C; Sofi F; Sticchi E; Gensini F; Gori AM, Fedi S et al. Genetics Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *American Heart Journal*, 2004, 147, 3.

Firat, Sibel Cubukcu, et al. "Evaluation of eNOS gene polymorphisms in relation to BMD in postmenopausal women." *Maturitas* 63.4 (2009): 352-356.

Flora Filho,R.; Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções.* **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2000, 46.3: 265-271.

Franco, Gilberto Paulo Pereira, et al. "Síndrome metabólica em hipertensos de Cuiabá-MT: prevalência e fatores associados." **Arq Bras Cardiol** 92.6 (2009): 472-8.

Frazão, Paulo, and Miguel Naveira. "Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica." **Revista Brasileira de Epidemiologia** 9 (2006): 206-214.

Garcia Lira Neto, José Cláudio, et al. Prevalência da Síndrome Metabólica e de seus componentes em pessoas com Diabetes Mellitus Tipo 2. **Texto & Contexto Enfermagem**, 2018, 27.3.

Glueck, C. J., et al. (2015). "The eNOS T786C mutation, Prinzmetal's Variant Angina, and amelioration of angina by L-arginine in 59 patients with intractable angina despite calcium channel blocker–nitrate therapy." **IJC Metabolic & Endocrine** 8: 13-19.

Janssen I, Powell LH, Kazlauskaitė R, Dugan SA. Testosterone and visceral fat in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) fat patterning study. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18:604-10.

Kalinowski, Leszek, et al. "Posttranscriptional and transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia: the role of microRNAs." **Cellular & molecular biology letters** 21.1 (2016): 16.

M. do P., Desenvolvimento e Gestão. **Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2016 Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2017.

Machado, Wyarlenn Divino, et al. "Idosos com doenças crônicas não transmissíveis: um estudo em grupos de convivência." **Revista Ciência & Saberes-Facema** 3.2 (2017): 445-451.

Malagrino, Pamella A., et al. Prevalência de dislipidemia em adultos de meia-idade com polimorfismo do gene NOS3 e baixa aptidão cardiorrespiratória. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** (2013): 33-43.

Mendes, Karina Giane, et al. "Prevalência de síndrome metabólica e seus componentes na transição menopáusicas: uma revisão sistemática." **Cadernos de Saúde Pública** 28 (2012): 1423-1437.

McInnes, Roderick R., Huntington F. Willard, and Robert Nussbaum. *Thompson & Thompson Genética Médica*. **Elsevier Brasil**, 2016.

National Center for Biotechnology Information. NOS 3 nitric oxide synthase 3 [Homo sapiens (human)]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846>> Acesso em 12 de maio de 2019.

Neves, Cristiane Vilas Boas, et al. "Associação entre síndrome metabólica e marcadores inflamatórios em idosos residentes na comunidade." **Cadernos de Saúde Pública** 35 (2019): e00129918.

Penalva, Daniele Q. Fucciolo. "Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento." **Revista de Medicina** 87.4 (2008): 245-250.

Piccoli, Jacqueline da Costa Escobar. "Estudo associativo entre três polimorfismos (-786T> C, 894G> T e VNTR INTRON 4 a/b) no gene que sintetiza para óxido nítrico sintase endotelial e síndrome coronariana aguda." (2007).

Rigo JC, et al. "Prevalence of metabolic syndrome in an elderly community: comparison between three diagnostic methods." **Arq Bras Cardiol** 2009; 93:85-91.

Rodrigues, A. C. C., C. A. P. Romeiro, and L. J. Patrizzi. "Avaliação da cifose torácica em mulheres idosas portadoras de osteoporose por meio da biofotogrametria computadorizada." **Brazilian Journal of Physical Therapy/Revista Brasileira de Fisioterapia** 13.3 (2009).

Saad, Maria Auxiliadora Nogueira, et al. Prevalência de síndrome metabólica em idosos e concordância entre quatro critérios diagnósticos. **Arq Bras Cardiol**, 2014, 102.3: 263-9.

Saleh, Abdelsalam, et al. "Angiogenesis related genes NOS3, CD14, MMP3 and IL4R are associated to VEGF gene expression and circulating levels in healthy adults." **BMC medical genetics** 16.1 (2015): 90.

Schincariol, L. P. (2011). "Identificação de marcadores SNP pelas técnicas de PCR-RFLP e Tetra-primer ARMS-PCR e suas associações com qualidade de bebida em café." **Instituto agrônomo curso de pós-graduação em agricultura tropical e subtropical**.

Silva, Henrique Carriço da. "Avaliação da densidade óssea, fraturas, composição corporal e metabolismo mineral e ósseo em pacientes com síndrome metabólica e síndrome coronariana aguda." (2012).

Silva Oliveira, Jamille; Silva de Oliveira Boery, Rita Narriman. Associação de variantes polimórficas com síndrome metabólica: uma revisão integrativa. **Jornal Vascular Brasileiro**, 2018, 17.2.

Silverthorn, Dee Unglaub. Fisiologia humana [recurso eletrônico]: uma abordagem integrada/ Dee Unglaub Silverthorn; tradução Ivana Beatrice Mânica da Cruz... [et al.]. - 5. ed. - Dados eletrônicos. - Porto Alegre: Artmed, 2010.

Tratamento, Diagnóstico E. I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2005, 84.Suplemento I.

Vieira, Edna Cunha, Maria do Rosário Gondim Peixoto, and Erika Aparecida da Silveira. "Prevalence and factors associated with Metabolic Syndrome in elderly users of the Unified Health System." **Revista Brasileira de Epidemiologia** 17 (2014): 805-817.

World Health Organization. "Envelhecimento ativo: uma política de saúde." (2005).

Who, 4. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. [s.l.] 4. World Health Organization, 2014. . Disponível em: <<https://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>>. Acesso em: 9 junho de 2019.

Zago, Anderson Saranz et al. "Efeito do exercício físico e do polimorfismo T-786C na pressão arterial e no fluxo sanguíneo de idosas." **Arq Bras Cardiol** 95.4 (2010): 510-517.

**ARTIGO**

**Título:** Polimorfismo da região promotora do gene *NOS3* em idosos com Síndrome Metabólica.

**Título em inglês:** Polymorphism of the promoter region of the *NOS3* gene in the elderly with Metabolic Syndrome.

**Autores:** De Paula, G.<sup>1</sup>, Freitas, R.<sup>2</sup>, Lima, L.<sup>3</sup>, Stival, M.<sup>3</sup>, Funghetto, S.<sup>3</sup>, Cardoso, L.<sup>2</sup>, Da Silva, I.<sup>3</sup>, Silva, C.<sup>4</sup>

**Afiliações:**

<sup>1</sup>Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia - UnB/FCE

<sup>2</sup>Centro Universitário do Distrito Federal (UDF)

<sup>2</sup>Faculdade LS

<sup>3</sup>Faculdade de Ceilândia

<sup>4</sup>Universidade de Brasília - UnB

**Resumo:** A síndrome metabólica (SM), uma condição clínica prevalente, considerada um desafio para a saúde pública e para os sistemas sanitários no século XXI, é uma doença crônica não transmissível destacada como um conjunto de fatores de risco que auxiliam no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de outros agravos à saúde como diabetes e hipertensão arterial. O gene *NOS3* localizado no braço longo do cromossomo 7q36.1 é um dos principais genes envolvidos na regulação da função endotelial através da enzima *eNOS*. Estudos associam o polimorfismo T-786C do gene *NOS3* com a diminuição da atividade transcricional e com esta redução da ação enzimática, o alelo C tem sido associado à diminuição da produção de NO aumentando as chances de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estudo realizado por Derebecka e colaboradores em 2010 utilizando camundongos e avaliando variantes alélicas do gene *NOS3*, entre eles o VNTR no íntron 4 e 23, levantou a hipótese de que a inibição da síntese de NO na parede dos vasos sanguíneos está associada à hipertensão. Desta forma, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a frequência do polimorfismo na região promotora do gene *NOS3* e investigar uma associação com a hipertensão arterial, o diabetes mellitus e a osteoporose em uma amostra populacional de idosos do Distrito Federal (Brasil), portadores da Síndrome Metabólica. Este trabalho foi delineado e realizado como estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle. O estudo contou com a participação de 99 participantes. O nível de significância adotado foi de 5%. Não foi apresentada diferença estatística entre os grupos caso e controle na associação genótipo/alelo do polimorfismo T-786C do gene *NOS3*. A presença do polimorfismo T-786C do gene *NOS3* não está associada a presença das manifestações clínicas (diabetes mellitus, hipertensão arterial e osteoporose) em pacientes idosos portadores de síndrome metabólica.

**Palavras – chave:** Polimorfismo Genético. *NOS3*. Síndrome Metabólica. Hipertensão. Osteoporose.

**Abstract:** Metabolic syndrome (MS), a prevalent clinical condition considered a challenge to public health and health systems in the 21st century, is a chronic noncommunicable disease highlighted as a set of risk factors that help in the development of cardiovascular diseases. and other health problems such as diabetes and arterial hypertension. The *NOS3* gene located on the long arm of chromosome 7q36.1 is one of the major genes involved in activating endothelial function through the *eNOS* enzyme. Studies associate the T-786C *NOS3* gene polymorphism with decreased transcriptional activity and with this reduction in enzymatic action, the C allele has been associated with decreased NO production increasing the chances of developing cardiovascular disease. A study by Derebecka and colleagues in 2010 using mice and evaluating allelic variants of the *NOS3* gene, including intron 4 and 23 VNTR, hypothesized that inhibition of NO synthesis in the blood vessel wall is associated with hypertension. Thus, the general objective of this study was to evaluate the frequency of polymorphism in the promoter region of the *NOS3* gene and to investigate its association with hypertension, diabetes mellitus and osteoporosis in a population sample of elderly people with metabolic syndrome. This study was designed and conducted as an observational, descriptive case-control study. The study was attended by 99 participants. The adopted significance level was 5%. There was no statistical difference between the case and control groups in the genotype/allele association of the T-786C *NOS3* gene polymorphism. The presence of the T-786C *NOS3* gene polymorphism is not associated with the presence of clinical manifestations (diabetes mellitus, hypertension and osteoporosis) in elderly patients with metabolic syndrome.

**Keywords:** Genetic polymorphism. *NOS3*. Metabolic Syndrome. Hypertension. Osteoporosis.

## Introdução

A Síndrome Metabólica (SM), uma condição clínica prevalente considerada um desafio para a saúde pública e para os sistemas sanitários no século XXI é caracterizada por fatores de risco de origem metabólica, como doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes mellitus e osteoporose.<sup>[1]</sup>

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de pessoas com diabetes quadruplicou desde 1980 e a prevalência tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas refletindo um aumento na prevalência de obesidade e sobrepeso e em altas taxas de mortalidade em todo o mundo, cerca de 1,5 milhões de mortes. No relatório da OMS sobre diabetes a obesidade é um fator que deve ser destacado, pois, dependendo do grau, aumenta a probabilidade do desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Uma pesquisa realizada pela Universidade de Brasília (UnB) por Oliveira em 2013 demonstrou que o sistema público de saúde gastou cerca de meio bilhão de reais no tratamento de doenças associadas à obesidade<sup>[2-3]</sup>.

A osteoporose é uma doença esquelética caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO) e a deterioração do tecido ósseo aumenta a susceptibilidade à fratura. Considerando a importância de fatores hereditários para características ósseas, estudos genéticos moleculares buscam identificar genes relacionados à osteoporose, entre eles o *NOS3*.<sup>[4]</sup>

Polimorfismos genéticos são variações genéticas em que o alelo menos comum corresponde a mais de 1% população. O polimorfismo de nucleotídeo único ou de substituição única (SNP) é uma variação genética resultante de mutações pontuais no genoma no qual ocorre uma alternância dos nucleotídeos adenina, citosina, guanina e timina em uma frequência alélica de uma porção mínima da população, aproximadamente uma vez a cada 1.000 pares de base no genoma humano.<sup>[5]</sup>

O gene *NOS3* é um dos principais genes envolvidos na regulação da função endotelial através da enzima eNOS, responsável pela síntese de NO no endotélio vascular. O NO é responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo tecidual e pelo controle do extravasamento tecidual, com função vasodilatadora fisiológica. O relaxamento do músculo liso vascular ocorre por meio de uma via de transdução de sinal mediada pelo nucleotídeo Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc),

favorecendo o crescimento de novos vasos sanguíneos, a angiogênese, induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF – *Vascular endothelial growth factor*) em vasos coronários, com isso ocorre a ativação das plaquetas promovendo a coagulação do sangue. Por fim, este mecanismo resulta na regulação da pressão arterial<sup>[6-7]</sup>.

## **Objetivo**

O objetivo deste estudo foi verificar, por meio de uma análise estatística, a frequência do polimorfismo na região promotora do gene *NOS3* e investigar associação com hipertensão arterial, diabetes mellitus e osteoporose em uma amostra populacional de idosas do DF portadoras da Síndrome Metabólica.

## **Materiais e Métodos**

O presente trabalho trata-se de um estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle com 98 participantes provenientes das Unidades Básicas de Saúde (UBS) número 06 e 08 de Ceilândia – DF, com idade igual ou maior que 60 anos portadoras de síndrome metabólica. O grupo caso foi composto por 71 participantes com diagnóstico de Hipertensão Arterial e/ou 49 com diagnóstico de Diabetes Mellitus e/ou 29 com diagnóstico de Osteoporose. O grupo controle foi composto por 23 participantes normotensos, 45 normoglicêmicos e 69 sem quadro clínico de osteoporose.

### População amostral

Na seleção dos participantes do grupo caso foram utilizados os seguintes critérios: ser do sexo feminino; com idade maior ou igual que 60 anos; ser capaz de compreender, verbalizar e responder as questões propostas; expressar o aceite de participação como participantes da pesquisa após esclarecimento dos objetivos e métodos de pesquisa, por assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) de acordo com a resolução n°. 466/2012.

Os critérios de exclusão foram: ser portadora de doenças mentais ou de neoplasias em tratamento; ter passado por cirurgia cardíaca nos últimos seis meses;

### Procedimentos Técnicos e Laboratoriais

As coletas de sangue foram realizadas após jejum noturno de 8 a 12 horas, por meio de punção venosa, em sistema fechado a vácuo.

O DNA foi extraído do sangue periférico com uso do kit **Invisorb Spin Blood Mini Kit** (250) da empresa **Invitek** (catálogo #CA 10-0005, lote #1031100300, Alemanha). A concentração do DNA obtido foi estimada pelo espectrofotômetro (NANODROP Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). A concentração média alcançada foi de 20 mg/μL.

As amostras de DNA obtidas foram submetidas à técnica da PCR que permite que uma região selecionada do genoma seja amplificada milhões de vezes. A sequência de oligonucleotídeo utilizada para avaliar o polimorfismo está presente na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para avaliar o polimorfismo T/C -786 do gene *NOS3*.

Gene	Oligonucleotídeos	Referências
<i>NOS3</i> -786 T/C	<b>Forward</b> 5' TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A 3'  <b>Reverse</b> 5' GCC TCC ACC CCC ACC CTG TC 3'	(Glueck, Prince et al. 2015)

O equipamento utilizado foi o termociclador TC-512 (**Techne, EUA**).

Para a amplificação do gene *NOS3* na região promotora T-786C, na termociclagem foram realizadas as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 63°C por 30 segundos e extensão da fita de DNA a 72°C por 30 segundos. Extensão final a 72°C por 10 minutos gerando ao final um fragmento de 180pb.

A região promotora -786 T/C foi submetida à digestão enzimática, onde o produto gerado da PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *MspI* (*New England Biolabs, Inc., EUA*). O sistema foi mantido a 37°C por 1 hora e 30 minutos.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio em uma potência de 50W por 1 hora e 30 minutos.

O alelo T criou um sítio de restrição, gerando os fragmentos de 140pb e 40pb e o alelo C possui dois sítios de restrição criando fragmentos de 90pb, 50pb e 40pb. Este polimorfismo T-786C foi dividido em genótipo T/C onde ambos os tipos de clivagem ocorreram nos dois alelos, T/T em que ocorreu uma clivagem nos dois alelos e genótipos C/C no qual a enzima clivou duas vezes os dois alelos (Figura 2).

### Análise estatística

Para análise estatística da distribuição genotípica do polimorfismo *NOS3* T-786C em idosos portadores de síndrome metabólica e a associação com manifestações clínicas dos participantes foi realizado o teste qui-quadrado utilizando o programa SPSS versão 25.0, estabelecendo nível de significância de 0,05.

### **Resultados**

A distribuição genotípica do polimorfismo *NOS3* T-786C associada aos grupos caso e controle de HAS estão descritas na tabela 2. Observa-se que 13 (18,3%) pacientes com HAS possuem genótipo TT, contra 6 (26,1%) do grupo controle com o mesmo genótipo. 54 (76,1%) participantes do grupo caso possuem genótipo TC, contra 16 (69,6%) do grupo controle. Por fim, 4 (5,6%) pacientes do grupo caso apresentam genótipo CC, contra 1 (4,3%) do grupo controle com o mesmo genótipo. Estas diferenças não foram estatisticamente significantes ( $P=0,715$ ).

Tabela 2. Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo do gene *NOS3* (T-786C) nos grupos de Hipertensão Arterial e controle.

		Hipertensão Arterial				P
		Sim		Não		
		N	%	N	%	
<i>NOS3</i> T-786C	TT	13	18,3%	6	26,1%	0,715
	TC	54	76,1%	16	69,6%	
	CC	4	5,6%	1	4,3%	

Na tabela 3 está descrita a distribuição genotípica do polimorfismo *NOS3* T-786C associada aos grupos caso e controle de DM. Foi observado que 11 (22,4%) pacientes do grupo caso possuem genótipo TT, contra 8 (17,8%) do grupo controle. 35 (71,4%) participantes do grupo caso possuem genótipo TC, contra 35 (77,8%) do grupo controle, enquanto, 3 (6,1%) do grupo caso apresentam genótipo CC, contra 2 (4,4%) do grupo controle. As diferenças não são estatisticamente significantes ( $P=0,777$ ).

Tabela 3. Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo do gene *NOS3* (T-786C) nos grupos de Diabetes Mellitus e controle.

		Diabetes Mellitus				P
		Sim		Não		
		N	%	N	%	
<i>NOS3</i> T-786C	TT	11	22,4%	8	17,8%	0,777
	TC	35	71,4%	35	77,8%	
	CC	3	6,1%	2	4,4%	

A tabela 4 apresenta a distribuição genotípica do polimorfismo *NOS3* T-786C associada aos grupos caso e controle de Osteoporose. Observa-se que 6 (20,7%) pacientes do grupo caso apresentam genótipo TT, contra 15 (21,7%) do grupo controle. 23 (79,3%) participantes do grupo caso possuem genótipo TC, contra 49 (71,0%) do grupo controle, enquanto, o grupo caso não possui participantes com genótipo CC e apenas 5 (7,2%) do grupo controle apresentam genótipo CC. Esta análise não apresenta diferença estatisticamente significativa ( $P= 0,316$ ).

Tabela 4. Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo do gene *NOS3* (T-786C) nos grupos de Osteoporose e controle.

		Osteoporose				P
		Sim		Não		
		N	%	N	%	
<i>NOS3</i> T- 786C	TT	6	20,7%	15	21,7%	0,316
	TC	23	79,3%	49	71,0%	
	CC	0	0,0%	5	7,2%	

As características clínicas, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), Diabetes Mellitus (DM) e Osteoporose foram correlacionadas ao polimorfismo *NOS3* T-786C, separadas por grupo (caso e controle). Na tabela 5 avalia-se a diferença da distribuição genotípica de indivíduos de acordo com as características clínicas associadas ao polimorfismo *NOS3* T-786C. Em relação às características clínicas não houve diferença estatística quando associada aos genótipos, conforme os valores de P obtidos, são eles: para HAS (P=0,550), para Diabetes Mellitus (P=0,571) e osteoporose (P=0,920).

Tabela 5. Distribuição das características clínicas: HAS, Diabetes e Osteoporose relacionadas ao polimorfismo *NOS3* T-786C nos participantes do estudo.

		Hipertensão Arterial				P	OR	IC
		Sim		Não				
		n	%	N	%			
<i>NOS3</i> T-786C	TT	13	18,3%	6	26,1%	0,550	1,57	(0,519 - 4,769)
	TC + CC	58	81,7%	17	73,9%			
		Diabetes Mellitus				P	OR	IC
		Sim		Não				
		n	%	N	%			
<i>NOS3</i> T-786C	TT	11	22,4%	8	17,8%	0,571	0,746	(0,270 - 2,060)
	TC + CC	38	77,6%	37	82,2%			
		Osteoporose				P	OR	IC
		Sim		Não				
		n	%	N	%			
<i>NOS3</i> T-786C	TT	6	20,7%	15	21,7%	0,920	0,939	(0,323 - 2,724)
	TC + CC	23	79,3%	54	78,3%			

## Discussão

Este estudo investigou a associação do polimorfismo T-786C do gene *NOS3* com hipertensão arterial, diabetes mellitus e osteoporose em pacientes idosas portadoras de síndrome metabólica atendidas em duas unidades básicas de saúde do Distrito Federal (Brasil).

Nota-se nesta pesquisa que não houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os grupos caso e controle ao relacioná-los com os genótipos TT, TC e CC. Este resulta contrapõe o estudo realizado por Nakayama, Yasue e colaboradores<sup>[8]</sup> com 359 participantes, 252 homens e 107 mulheres, no qual o polimorfismo *NOS3* T-786C foi um fator de risco para o infarto do miocárdio, além de apresentarem diferenças estatísticas significantes em relação a HAS, Diabetes e tabagismo ( $P < 0,001$ ).

Uma pesquisa realizada por Zago<sup>[9]</sup> analisou a associação do polimorfismo T-786C do gene *NOS3* sobre parâmetros do metabolismo lipídico plasmático, demonstrando que o promotor deste polimorfismo com a presença do alelo C diminui em cerca de 50% a atividade transcricional e com esta redução da ação enzimática, o alelo C tem sido associado à diminuição da produção de NO, aumento da disfunção endotelial e de doenças cardiovasculares.

Uma pesquisa realizada por Batista<sup>[7]</sup> sobre ancestralidade genética e marcadores de risco para doença cardiovascular em distritos do município de Ouro Preto em Minas Gerais (MG - Brasil), analisando diferentes SNP's, entre eles o *NOS3* G894T relacionando-os à hipertensão, conclui que as frequências alélicas e genotípicas não apresentam diferença entre os sexos, e que não há associação direta do polimorfismo *NOS3* G894T com HAS.

Cho et al.<sup>[10]</sup> analisando a falta de associação entre o polimorfismo *NOS3* Glu298Asp e fenótipos ósseos entre mulheres idosas, escolheu dezoito polimorfismos, entre eles o Glu298Asp e o T-786C com a hipótese de que aumentando a cobertura do gene é possível discernir associações entre os SNPs e densidade óssea e geometria estrutural na coluna, fêmur proximal e calcânhar.

Firat et al.<sup>[11]</sup> por sua vez, avaliou o polimorfismo T-786C do gene *NOS3* em relação à densidade mineral óssea (DMO) na coluna colo do fêmur e trocanter femoral em mulheres turcas na pós-menopausa e concluiu que não houve diferença genotípica significativa em relação aos valores de DMO medidos no grupo caso.

Uma meta-análise realizada por Zeng et al.<sup>[12]</sup> sobre nefropatia diabética avaliaram estudos de Miyamoto et al. (2010) e Ahluwalia et al. (2008) onde encontraram níveis séricos baixos de NO entre os portadores do alelo T-786C e pacientes diabéticos.

## Conclusão

O presente estudo demonstrou que o polimorfismo da região promotora T-786C do gene *NOS3* não está associado a hipertensão, diabetes mellitus e osteoporose nas pacientes idosas participantes desta pesquisa, indicando que este polimorfismo não constitui um fator de risco significativo para tais condições clínicas entre as participantes. Estudos encontram dificuldade em correlacionar os diferentes polimorfismos do gene *NOS3* e a ocorrência, frequência e desenvolvimento destas condições clínicas pela complexidade e os diversos fatores de riscos que a síndrome metabólica apresenta.

Para melhor compreensão do polimorfismo da região promotora T-786 do gene *NOS3* relacionado à fisiopatologia da hipertensão, diabetes e osteoporose sugere-se a realização de futuros estudos.

## Referências

- [1] Fernández-Bergés D, Félix-Redondo FJ, Lozanoc L, Pérez-Castánd JF, Sanz H, Leónf ACD, et al. Prevalencia de síndrome metabólico según las nuevas recomendaciones de la OMS. Estudio HERMEX. *Gac Sanit* 2011;25(6):519–524;.
- [2] Organização Mundial da Saúde. *Relatório global sobre diabetes: resumo executivo*. No. WHO / NMH / NVI / 16.3. Organização Mundial da Saúde, 2016. Disponível em: <https://www.sbcbm.org.br/relatorio-da-oms-sobre-diabetes-apresenta-um-perigoso-cenario-mundial/>. Acesso em: 18 out. 2019.
- [3] de Oliveira ML. Estimativa dos custos da obesidade para o Sistema Único de Saúde do Brasil [Tese de doutorado]. Brasília: Programa de Pós-graduação em Nutrição da Universidade de Brasília; 2013.
- [4] Xu X, Dong S, Guo Y, Yang T, Lei S, Papasian CJ, et al. Molecular Genetic Studies of Gene Identification for Osteoporosis: The 2009 Update. *Endocrine Reviews*, August 2010, 31(4):447–505;.

- [5] Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. THOMSON & THOMSON. 8th ed. Elsevier; 2016.
- [6] FLORA FILHO R, ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Ass Med Brasil* 2000; 46(3): 265-71;.
- [7] Batista AP. Ancestralidade genética e marcadores de risco para a doença cardiovascular em distritos do município de Ouro Preto, Minas Gerais; 2019.
- [8] Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. T27863C Mutation in the 5'-Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Associated With Myocardial Infarction, Especially Without Coronary Organic Stenosis. *The American Journal of Cardiology* Vol 86 September 15, 2000;.
- [9] Zago AS, Kokubun E, Fenty-Stewart N, Park J, Attipoe S, Hagberg J, et al. Efeito do Exercício Físico e do Polimorfismo T-786C na Pressão Arterial e no Fluxo Sanguíneo de Idosas. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(4): 510-517;.
- [10] Cho K, Demissie S, Dupuis J, Cupples LA, Kathiresan S, Beck TJ, et al. Polymorphisms in the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Bone Density/Ultrasound and Geometry in Humans. *NIH Public Access Bone* 2008 January ; 42(1): 53–60;.
- [11] Firat SC, Cetinb Z, Samanci N, Aydinc F, Balci N, Gungor F, et al. Evaluation of eNOS gene polymorphisms in relation to BMD in postmenopausal women. *Maturitas* 63 (2009) 352–356. 2009;.
- [13] Zeng Z, Li L, Zhang Z, Li Y, Wei Z, Huang K, et al. A meta-analysis of three polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) and their effect on the risk of diabetic nephropathy. *Hum Genet* (2010) 127:373–381. 2010 janeiro;.
- [12] Derebecka, Natalia, et al. "O polimorfismo no íntron 23 do gene da óxido nítrico sintetase endotelial (NOS3) não está associado à hipertensão". *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*- 49.1 (2002): 263-268.

## ANEXOS

### ANEXO I - 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 15 mL 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 o 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: Dr(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 obtidos 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 II - 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 III – Comitê de Ética em Pesquisa



### 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 468 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



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_PROJETO_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	Manna Morato Stival	Aceito

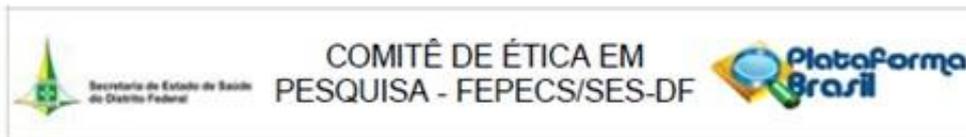
**Situação do Parecer:**

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: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.355.211

BRASILIA, 08 de Dezembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Helio Bergo**  
**(Coordenador)**

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

**ANEXO IV – Ficha de identificação****IDENTIFICAÇÃO****1. Dados Pessoais**

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: F ( ) M ( )

Telefone: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos

Estado Civil: \_\_\_\_\_

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 adiantes? ( ) Não ( ) Sim. Com que frequência? \_\_\_\_\_

Lazer: \_\_\_\_\_

### 3. Alimentação

Nº de refeições por dia: \_\_\_\_\_

Tem restrição alimentar? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, a qual alimento? \_\_\_\_\_

Faz dieta: ( ) 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 V

### **Normas da revista científica de escolha para publicação – Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML)**

#### **Artigos de revisão**

Serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

#### **Artigos originais**

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original que possam ser replicados. 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 Bibliográficas.

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 bibliográficas 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 SGP 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 parênteses.

### **Contato com a secretaria do JBPML**

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial Tel.: +55 (21) 3077-1400. E-mail: [jbpml@sbpc.org.br](mailto:jbpml@sbpc.org.br)