

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO - PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU - MESTRADO INTERDISCIPLINAR EM
DESENVOLVIMENTO COMUNITÁRIO**

SIMONE MADER DALL'AGNOL

**POLIMORFISMO DO *APOE* E A SUA RELAÇÃO COM O NÍVEL DE ATIVIDADE
FÍSICA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL, HIPERTENSOS DIABÉTICOS E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IRATI

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO - PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU - MESTRADO INTERDISCIPLINAR EM
DESENVOLVIMENTO COMUNITÁRIO**

SIMONE MADER DALL'AGNOL

**POLIMORFISMO DO *APOE* E A SUA RELAÇÃO COM O NÍVEL DE ATIVIDADE
FÍSICA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL, HIPERTENSOS DIABÉTICOS E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação Interdisciplinar em Desenvolvimento
Comunitário, da Universidade Estadual do Centro
Oeste – UNICENTRO.

Linha de Pesquisa: Processos do desenvolvimento
humano nos contextos comunitários

Orientador: Prof. Phd. Luis Paulo Gomes
Mascarenhas

IRATI

2018

Catálogo na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

DALL'AGNOL, Simone Mader.

D144p Polimorfismo do *APOE* e a sua relação com o nível de atividade física em indivíduos portadores de acidente vascular cerebral, hipertensos diabéticos e indivíduos saudáveis / Simone Mader Dall'Agnol. – Irati, PR : [s.n.], 2018.
73f.

Orientador: Prof. PhD. Luis Paulo Gomes Mascarenhas

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Desenvolvimento Comunitário. Linha de Pesquisa: Processos do desenvolvimento humano nos contextos comunitários. Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.

1. Apolipoproteínas E. 2. Doença Cardiovascular. I. Mascarenhas, Luís Paulo Gomes. II. UNICENTRO. III. Título.

CDD 616.8014



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM DESENVOLVIMENTO COMUNITÁRIO

TERMO DE APROVAÇÃO

SIMONE MADER DALL'AGNOL

POLIMORFISMO DO APOE E A SUA RELAÇÃO COM O NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL, HIPERTENSOS DIABÉTICOS E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Dissertação aprovada em 30/10/2018 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação Interdisciplinar em Desenvolvimento Comunitário, área de concentração Desenvolvimento Comunitário, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Luis Paulo Gomes Mascarenhas

Instituição: UNICENTRO

Prof.^a Dr.^a Daiana Novello

Instituição: UNICENTRO

Prof. Dr. Fabiano de Macedo Salgueirosa

Instituição: UP

Irati, 30 de outubro de 2018

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Salvatore Renna – Padre Salvador, 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR

Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR

Campus de Irati: PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR

À Deus, em agradecimento, por seu
cuidado e amor. Eu te amo meu Pai!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Dr. Luis Paulo Gomes Mascarenhas por ter confiado à mim o desafio da pesquisa genética, pelas orientações e incentivo em todos os momentos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva, por me aceitar em seu laboratório, por toda a ajuda com as análises e por me mostrar o fantástico mundo da pesquisa na biologia molecular.

Aos professores doutores Daiana Novello e Fabiano Salgueirosa, pela aceitação em participar da banca e contribuição nesta pesquisa.

A todos os colegas do laboratório da Ambiotec da Unicentro, em especial Cláudia Gobatto e Daiane Secco, pela mão que me conduziu nas pipetagens, pelas conversas, pela paciência, por vibrarem comigo em cada resultado, por todo o auxílio nos inúmeros processos, gratidão eterna queridos!

Aos participantes, que doaram seu tempo e material genético contribuindo para esta pesquisa.

A família, meus amados pais, Dirceu e Luiza, que mesmo perante as dificuldades sempre me incentivaram no caminho do estudo. Ao meu esposo e companheiro Marcelo, pelos abraços, pelo apoio e palavras de incentivo, pela compreensão em todos os momentos da minha ausência. Gratidão!

As amigas Lelia, Cláudia, Kelly, em especial minha amiga irmã Franciele, por me incentivar a iniciar esta caminhada, por estarem presentes em palavras e ações e colaborar direta ou indiretamente com este trabalho. Gratidão!

Aos colegas de mestrado Denise, Meiry, Jociane e Nei pela ajuda e companheirismo em cada etapa desta caminhada.

A Fundação Araucária, pelo incentivo e apoio financeiro a esta pesquisa.

“O sentido da vida é encontrar o seu dom. O propósito da vida é compartilhá-lo.” (Pablo Picasso).

RESUMO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade entre doenças crônicas não transmissíveis e são responsáveis por 30% de todas as mortes globais, constituindo um grande e crescente fardo nos países de baixa e média renda. Uma estratégia eficaz para estudar a atribuição dos fatores genéticos em doenças multifatoriais e poligênicas é representada pela abordagem dos polimorfismos genéticos. Isso envolve primeiro identificar uma variante molecular dentro de um gene relevante, analisando sua distribuição em uma população-alvo e depois avaliando a possível associação entre os diferentes polimorfismos e a presença da doença. Dentre esses marcadores moleculares estão a Apolipoproteína E (ApoE) que é um receptor de lipoproteína de baixa densidade e desempenha um papel crucial no metabolismo do colesterol. Estudos apontam que os polimorfismos do gene *ApoE* atuam na modulação dos efeitos da atividade física, exercício físico e até mesmo na gordura corporal. Logo, esta pesquisa objetivou verificar a relação do polimorfismo do gene *ApoE* com o nível de atividade física de indivíduos saudáveis e portadores de doenças cardiovasculares. Constituíram a amostra 117 indivíduos adultos, de ambos os sexos, entre 36 e 89 anos de idade. Os indivíduos foram organizados em 3 grupos: Grupo A (portadores de Acidente Vascular Cerebral - AVC) composto por 43 indivíduos; Grupo B (hipertensos diabéticos) constituído de 40 pessoas; e 34 compuseram o Grupo C (saudáveis). O questionário Internacional de Atividade Física - IPAQ (versão curta) foi aplicado para aferir o nível de atividade física realizada pelo indivíduo na semana anterior. Também foi aplicado um questionário auto administrado, o qual englobou dados sociodemográficos, culturais e de saúde dos indivíduos. Em seguida deu-se início ao raspado da mucosa oral e posterior extração do DNA para a avaliação genética dos polimorfismos do *ApoE*. Quanto as análises, inicialmente foi realizado o cálculo amostral, adotando-se nível de confiança de 95%. Verificou-se a normalidade dos dados após as caracterizações dos grupos, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os valores relativos foram analisados por meio do teste de qui-quadrado (χ^2). Quando observado diferença significativa em alguma variável com a associação entre genótipos ou alelos ApoE foram expressos como odds ratio (OR) com intervalos de confiança (IC) de 95% usando o modelo de regressão logística. As associações foram testadas aplicando os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher. A regressão de Poisson com Estimador Robusto foi aplicada para calcular a Razão de prevalência entre Atividade física e genótipo. A árvore de decisão foi aplicada para detectar os padrões de proporções de genótipo associados as combinações das demais variáveis. Utilizou-se um $p < 0,05$ como nível de significância. A idade média dos participantes foi de 59,4 anos ($\pm 12,39$), em que 66,6% mulheres, 71,7% casados (as), 69,2% denominavam-se brancos (as), 45,2% possuíam como renda mensal de 1-2 salários mínimos. Outras doenças cardiovasculares foram relatadas por 28,2% dos indivíduos. A variável câncer foi apontada por 7,6% da amostra; doença respiratória em 9,4%; 18,8% afirmou ter depressão e 43,5% declarou ser fumante ou ter sido fumante por mais de 10 anos. As médias das frequências alélicas encontradas nos três grupos foram as seguintes: ϵ 3 (69,2%); ϵ 2 (15,8%) e ϵ 4 (15,0%). O presente estudo revelou que as frequências alélicas foram similares das encontradas em outras regiões do mundo, prevalecendo a presença do alelo ϵ 3 na amostra. Foram observadas associações significativas entre a presença do alelo ϵ 2 e ser portador de AVC bem como de diabetes e hipertensão. O genótipo ϵ 2 ϵ 3 apresentou associação significativa nos portadores de AVC, assim como observamos que o genótipo ϵ 3 ϵ 3 se expressou significativamente em menor frequência neste mesmo grupo. Os dados obtidos neste estudo sugerem que os portadores do genótipo ϵ 3 ϵ 3, com destaque para os homens, foram os que se associaram aos maiores tempos de atividade física semanal.

Palavras-chave: Doenças Cardiovasculares; Acidente Vascular Cerebral; Apolipoproteínas E; Atividade Física.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality among chronic noncommunicable diseases and account for 30% of all global deaths, making up a large and growing burden in low- and middle-income countries. An effective strategy to study the attribution of genetic factors in multifactorial and polygenic diseases is represented by the approach of genetic polymorphisms. This involves first identifying a molecular variant within a relevant gene by analyzing its distribution in a target population and then evaluating the possible association between the different polymorphisms and the presence of the disease. Among these molecular markers are Apolipoprotein E (ApoE) which is a low density lipoprotein receptor and plays a crucial role in cholesterol metabolism. Studies indicate that *ApoE* gene polymorphisms act in the modulation of the effects of physical activity, physical exercise and even body fat. Therefore, this research aimed to verify the relationship of *ApoE* polymorphism with the level of physical activity of healthy individuals and patients with cardiovascular diseases. The sample consisted of 117 adult individuals, of both sexes, between 36 and 89 years of age. The subjects were organized into three groups: Group A (patients with Cerebral Vascular Accident - Stroke) composed of 43 individuals; Group B (diabetic hypertensive) consisting of 40 people; and 34 made up Group C (healthy). The International Physical Activity Questionnaire - IPAQ (short version) was applied to assess the level of physical activity performed by the individual in the previous week. A self-administered questionnaire was also applied, which included sociodemographic, cultural and health data of individuals. Afterwards, the oral mucosa was scraped and the DNA extracted for the genetic evaluation of ApoE polymorphisms. Regarding the analyzes, the sample calculation was initially performed, adopting a 95% confidence level. Data were normal after characterization of the groups using the Shapiro-Wilk test. The relative values were analyzed using the chi-square test (χ^2). When observed a significant difference in some variable with the association between genotypes or ApoE alleles were expressed as odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) using the logistic regression model. The associations were tested using the chi-square test and Fisher's exact test. Poisson regression with Robust Estimator was applied to calculate the Prevalence Ratio between Physical Activity and Genotype. The decision tree was applied to detect the patterns of proportions of genotype associated to the combinations of the other variables. A $p < 0.05$ was used as the level of significance. The mean age of participants was 59.4 years (± 12.39), in which 66.6% women, 71.7% married, 69.2% were white, 45.2% had a monthly income of 1-2 minimum wages. Other cardiovascular diseases were reported by 28.2% of the individuals. The cancer variable was indicated by 7.6% of the sample; respiratory disease in 9.4%; 18.8% reported having depression and 43.5% reported being a smoker or having been smoker for more than 10 years. The averages of the allele frequencies found in the three groups were as follows: $\epsilon 3$ (69.2%); $\epsilon 2$ (15.8%) and $\epsilon 4$ (15.0%). The present study revealed that the allelic frequencies were similar to those found in other regions of the world, with the presence of the $\epsilon 3$ allele prevailing in the sample. Significant associations between the presence of the $\epsilon 2$ allele and being a carrier of stroke as well as diabetes and hypertension were observed. Genotype $\epsilon 2\epsilon 3$ showed a significant association in stroke patients, as we observed that $\epsilon 3\epsilon 3$ genotype was significantly less frequent in this group. The data obtained in this study suggest that patients with the $\epsilon 3\epsilon 3$ genotype, especially men, were associated with higher weekly physical activity times.

Palavras-chave: Cardiovascular Diseases; Stroke; Apolipoproteins E; Physical activity.

LISTA DE TABELAS, QUADROS, GRÁFICOS E FIGURAS

Figura 1: Amostras de DNA evidenciadas pela eletroforese em gel de Agarose.

Artigo 1:

Tabela 1: Caracterização dos participantes do estudo de acordo com os Grupos.

Tabela 2: Distribuição das frequências Alélicas e Genotípicas da ApoE entre os Grupos A (AVC); B (hipertensos diabéticos) e C (saudáveis).

Artigo 2:

Figura 1: Arvore de decisão. Distribuição dos genótipos em relação a classificação da amostra em ATIVO e SEDENTÁRIO.

Tabela 1: Prevalência da atividade física em relação ao genótipo entre homens e mulheres.

REF: Referência genótipo € 4€ 4.

Tabela 2: Prevalência da atividade física em relação ao genótipo entre homens e mulheres.

REF: Referência genótipo € 2€ 3

Figura 2 (A): Relação entre os grupos e os minutos de atividade física semanal praticados por homens e mulheres.

Figura 2 (B): Relação entre os genótipos e os minutos de atividade física semanal praticados por homens e mulheres.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA- Angiopatia Cerebral Amilóide
ApoE- Apolipoproteína E
AVC- Acidente Vascular Cerebral
AVCh- Acidente Vascular Cerebral hemorrágico
AVCi- Acidente Vascular Cerebral isquêmico
CT- Colesterol Total
DA- Doença de Alzheimer
DAC- Doença Arterial Coronariana
DCNT- Doenças Crônicas não Transmissíveis
DCV- Doença Cardiovascular
DIC- Doenças Isquêmicas do Coração
DM- Diabetes Mellitus
DM1- Diabetes Mellitus tipo 1
DM2- Diabetes Mellitus tipo 2
DNA- Ácido desoxirribonucleico
GWAS- *Genome-Wide association studies*
HDL- lipoproteína de alta densidade
HDLR- Receptor de lipoproteína de alta densidade
HI- Hemorragia intracerebral
IC- Intervalo de Confiança
IMC- Índice de Massa Corporal
IPAQ- Questionário Internacional de Atividade Física
LDL- lipoproteína de baixa densidade
LDLR- Receptor de lipoproteína de baixa densidade
OMS- Organização Mundial da Saúde
OR- Odds Ratio
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
RNA- Acido Ribonucleico
SM- Síndrome Metabólica
TCE- Traumatismo cranioencefálico
TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 APRESENTAÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS.....	5
1.2.1 GERAL.....	5
1.2.2 ESPECÍFICOS	5
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 APOE E SEU GENE.....	6
2.2 APOE X DOENÇAS CARDIOVASCULARES	6
2.3 OBESIDADE E O GENE APOE.....	8
2.4 ATIVIDADE FÍSICA E O GENE APOE	9
2.4 SAÚDE E DESENVOLVIMENTO COMUNITÁRIO.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO.....	12
3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	13
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	13
3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	14
3.5 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE DADOS.....	14
3.5.1 COLETA DE DADOS PESSOAIS E APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA (IPAQ).....	14
3.5.2 COLETA DA MUCOSA ORAL	14
3.5.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	15
3.5.4 AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA.....	15
3.5.5 GENOTIPAGEM DA APOE	16
3.6 ANÁLISE E PROCESSAMENTOS DOS DADOS	16
4 RESULTADOS	17
4.1 ARTIGO 1.....	17
Análise de dados	22
4.2 ARTIGO 2.....	34
Análise de dados	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

A segunda metade do século 20 testemunhou grandes mudanças no padrão das doenças, além de melhorias acentuadas na expectativa de vida, este período é caracterizado por mudanças profundas na dieta e estilos de vida, que por sua vez, contribuiu para uma epidemia de doenças não transmissíveis. Nos países em desenvolvimento, o efeito da transição nutricional e do aumento concomitante da prevalência de doenças cardiovasculares foi de ampliar a desigualdade entre as necessidades e recursos de cuidados de saúde (WHO, 2003).

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de mortalidade entre doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e é responsável por 30% de todas as mortes globais, constituindo um grande e crescente fardo nos países de baixa e média renda. Mundialmente a doença cardíaca e a doença cerebrovascular são responsáveis pela maior mortalidade entre as doenças cardiovasculares, representando 7,6 milhões e 5,7 milhões de mortes por ano, respectivamente, e estão entre as principais causas de incapacidades (RASELLA et al., 2014). Em 2013, no Brasil, as DCV foram responsáveis por 28,1% de todas as mortes no país. Não apenas a mortalidade, mas também a morbidade associada a DCV é uma crescente preocupação em saúde pública (MASSA et al., 2016).

O custo das internações por DCV é considerado o maior dentre as causas de internações hospitalares no Brasil. Destacam-se as doenças isquêmicas do coração (DIC) e as doenças cerebrovasculares (DCBV). Ambos os grupos apresentam fatores de risco comuns, sendo eles hipertensão, obesidade, sedentarismo, hábitos alimentares inadequados, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, dislipidemias e resistência à insulina (GUIMARÃES et al., 2015).

Além da DCV, destacam-se ainda dentre as DCNT o diabetes, o câncer e a doença crônica respiratória. Devido ao seu grande impacto mundial, tanto por causa do alto grau de mortalidade como dos fatores de risco para outras doenças, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou procedimentos preventivos para o enfrentamento das DCNT (DUNCAN et al., 2012). Malta et al. (2013) relatam que no Brasil, as DCNT são as responsáveis pelas maiores taxas de morbimortalidade, além de representar a maior proporção dos gastos com assistência ambulatorial e hospitalar.

Associado a DCV destaca-se a elevação da prevalência de diabetes mellitus. Esta tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas e varia entre as comunidades, com uma etiologia variável por diferentes fatores ambientais e genéticos. Estimativas globais indicam que o número total de adultos com idade entre 20-79 anos com diabetes vai subir de 415 milhões em 2015 para 642 milhões em 2040. Da mesma forma, sua prevalência vai aumentar de 8,8% para 10,4% no mesmo período (MALHÃO et al., 2016).

Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças em que a produção ou função de insulina defeituosa resulta na desregulação dos níveis de glicose no sangue. As formas mais comuns de diabetes, DM1 (diabetes tipo 1) e DM2 (diabetes tipo 2), podem ser consideradas em extremos do espectro etiológico, com DM1 causado por autoimunidade contra células beta pancreáticas, resultando em deficiência de insulina e DM2 iniciado por alterações metabólicas que tornam os tecidos alvo resistentes à insulina (DOOLEY et al., 2016). O DM2 é considerado um problema de saúde pública global, que ameaça as economias de todas as nações, particularmente os países em desenvolvimento. Alimentada por urbanização rápida, transição nutricional e estilos de vida cada vez mais sedentários, a epidemia cresceu em paralelo com o aumento mundial da obesidade. Os avanços recentes dos estudos de associação genética ampla “*genome-wide association studies*” (GWAS) contribuíram substancialmente para a compreensão da fisiopatologia do diabetes, mas os loci genéticos atualmente identificados são insuficientes para explicar diferenças étnicas no risco de diabetes (MCCARTHY, 2010; HU, 2011).

A hipertensão é uma das doenças mais comuns que afetam os seres humanos. É um desafio importante para a saúde pública devido à morbidade associada a essa patologia. A hipertensão é uma síndrome cardiovascular progressiva, decorrente de etiologias complexas e inter-relacionadas. Os marcadores precoces da síndrome estão frequentemente presentes antes que a elevação da pressão arterial seja mantida, portanto, a hipertensão não pode ser classificada unicamente por limiares discretos de pressão arterial. A progressão da doença está associada à anormalidades cardíacas e vasculares funcionais e estruturais que danificam o coração, rins, cérebro, vasos e outros órgãos e levam a morbidade e morte prematuras (ELABD et al., 2013).

Apesar dos avanços na compreensão e no tratamento da hipertensão, a sua prevalência continua a aumentar. Estima-se que cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo (26% dos adultos) são acometidos por essa condição, e esse valor pode ascender a 1,5 bilhão (29%) até o ano 2025 (KEARNEY et al., 2005). Lopez-Jaramillo et al. (2014) relatam ainda que indivíduos com diabetes e hipertensão têm um maior risco de

desenvolver doença renal, cardíaca coronariana, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (AVC). O AVC é um importante problema de saúde que está entre as causas mais comuns de morte e incapacidade. Muitos sobreviventes enfrentam as consequências a longo prazo do AVC, que geralmente são complexas e heterogêneas e podem resultar em problemas em vários domínios de funcionamento (GOLJAR et al., 2010). Meschia et al. (2014) relatam que em indivíduos com ≥ 65 anos de idade, 6 meses após o episódio do AVC, 26% se apresentam dependentes de suas atividades diárias e 46% apresentam déficits cognitivos. Este evento muda a vida não só daqueles que sofrem o AVC, mas também de sua família e outros cuidadores.

O AVC é dividido em dois subtipos diferentes: acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) e acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCh). Ambos envolvem uma rede complexa multifatorial de doenças com uma clara predisposição genética, provavelmente expressa através da interação de múltiplos genes e diversos fatores de risco ambientais (ZHANG et al., 2003; KONIALIS et al., 2016). São várias as vias fisiológicas que estão envolvidas na fisiopatologia do AVCi, dentre elas citam-se o metabolismo lipídico, a resposta inflamatória crônica local e sistêmica, a coagulação, a regulação da pressão sanguínea, a adesão celular e polimorfismos genéticos. Informações acerca do perfil lipídico e o estudo dos polimorfismos dos genes, que codificam proteínas estruturais e enzimas relacionadas com o metabolismo dos lipídeos, podem revelar a prevalência das dislipidemias em uma dada população, possibilitando assim ações direcionadas para o controle e prevenção das doenças ateroscleróticas como o AVCi (FLAUZINO et al., 2014).

Alterações no metabolismo de lipídeos de carboidratos estão entre os fatores de risco cardiovascular conhecidos, no entanto, conhecer os níveis de colesterol, triglicerídeos ou glicose não têm sido suficiente para identificar com precisão a origem e a evolução das DCV e do diabetes em relação ao AVC. Assim, novas técnicas estão sendo desenvolvidas na tentativa de predição do AVC dentre elas, a análise molecular. Essa técnica se tornou muito difundida para a identificação de diferentes variantes genéticas, como polimorfismos de nucleotídeo, micro RNAs (ácido ribonucleico) e as variações no número de cópias, associados à obesidade, DM2 e síndrome metabólica. Desta forma o principal interesse desta técnica se localiza na identificação de pessoas que possam ter maior risco e/ou menor resultado para certas doenças (FLORES-ALFARO et al., 2015).

A etiologia na maioria dos acidentes vasculares cerebrais é multifatorial e poligênica: multifatorial para o papel fundamental dos fatores de risco ambientais;

poligênica pelo papel concomitante de mais de um gene. Uma estratégia eficaz para estudar a atribuição dos fatores genéticos em doenças multifatoriais e poligênicas é representada pela abordagem dos polimorfismos genéticos. Isto envolve primeiro identificar uma variante molecular (polimorfismo) dentro de um gene relevante, analisando sua distribuição em uma população-alvo e depois avaliando a possível associação entre os diferentes polimorfismos e a presença da doença (VENTI; PARNETTI; GALLAI, 2002).

Dentre esses marcadores moleculares para o AVC estão a Apolipoproteína E (ApoE) que é um receptor de lipoproteína de baixa densidade e desempenha um papel crucial no metabolismo do colesterol. O gene ApoE tem três isoformas comuns: E2, E3, E4 e um único locus cromossômico na região 19q13.2 na sua identificação conhecida até o momento (XUE et al., 2012).

Estudos como os de Konialis et al. (2016) evidenciaram que o alelo E4 da ApoE tem papel importante como fator de risco para o AVCi e doença coronariana porém, estas pesquisas, não relatam a interação deste fator com outras condições crônicas como a diabetes e a hipertensão, destacando assim a relevância de pesquisas na área.

Um número expressivo de estudos tem encontrado forte associação entre o alelo E4 do gene da ApoE com doenças cardiovasculares, demência do tipo Alzheimer e outras morbidades (NASCIMENTO; GLANER; NÓBREGA, 2012; NASSIF, HOPPE e SALBEGO, 2013; ZENDE et al., 2013; MC AULEY e MOONEY, 2015). Essas associações levaram ao estabelecimento de investigações para averiguar que fatores ambientais poderiam amenizar este risco genético. Dentre estes fatores destaca-se a prática de atividade física, contudo, o número de investigações verificando o impacto da atividade física na modulação dos fatores de risco cardiovasculares em portadores de polimorfismos da ApoE ainda são muito incipientes. O efeito da atividade física no organismo parece ir além da modulação de componentes cardiorrespiratórios e fisiológicos. Também, permite controlar ou minimizar alterações metabólicas crônicas de origem genética que, sem intervenção, determinam risco a doenças geriátricas como as cardiovasculares e as demências. Este é o caso do gene da Apo E (ANTONINI et al., 2011).

Compreender a distribuição dos fatores de risco e seus agentes protetores é de suma importância para intervir sobre o processo saúde-doença, com vistas ao desenvolvimento de políticas públicas específicas para a melhoria da qualidade de vida da população, permitindo ainda, por meio destas, o monitoramento dessas ações. Essa intenção está em

concordância com as organizações e instituições internacionais, sendo prioridade de todos os governos o combate às doenças crônicas, conforme estabelecido na Reunião de Alto Nível da Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas, ocorrida em setembro de 2011 (MALTA et al., 2013).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GERAL

Verificar a associação entre o nível de atividade física e o polimorfismo do *ApoE* entre indivíduos portadores de Acidente Vascular Cerebral, hipertensos diabéticos e indivíduos saudáveis.

1.2.2 ESPECÍFICOS

- Descrever as características dos participantes do estudo de acordo com os grupos estudados;
- Caracterizar e correlacionar a frequência genotípica e alélica da *ApoE* entre os grupos;
- Descrever o nível de atividade física da amostra;
- Evidenciar as correlações entre os grupos ativo e sedentário com o polimorfismo encontrado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O surgimento de doenças crônicas como o desafio predominante para a saúde global é indiscutível. Em seu relatório de 2010 sobre o estado global dos desafios apresentados pelas doenças crônicas, a OMS observou que condições não transmissíveis - incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas - representavam quase dois terços das mortes em todo o mundo. Pesquisas relacionadas indicam os principais fatores de risco que causam o desenvolvimento global dessas doenças, incluindo hipertensão arterial, tabagismo e exposição ao fumo de segunda mão, alto índice de massa corporal (IMC), inatividade física, consumo de álcool e dietas baixas em frutas e vegetais e com alto teor de sódio e gorduras saturadas (BAUER et al., 2014).

2.1 A APOE E SEU GENE

A ApoE é uma glicoproteína sérica composta por 299 aminoácidos. É sintetizada principalmente no fígado, porém outros órgãos e tecidos também a sintetizam incluindo cérebro, baço, rins, gônadas, glândulas supra-renais e macrófagos (ZENDE et al., 2013). Orth e Bellosta (2012) e Liu et al. (2012) relatam ainda que devido a sua expressão em diferentes órgãos e tecidos sugere-se que a ApoE colabora ainda em outros processos biológicos além daqueles relacionados ao transporte de lipídeos, sendo eles relacionados à imunidade inata, ao funcionamento cerebral normal e a inúmeras doenças neurodegenerativas.

O gene ApoE é um dos genes mais estudados sendo responsável pela estabilização e solubilização de lipoproteínas circulantes em nosso corpo e também responsável pelo desenvolvimento da doença arterial coronariana (DAC). A ApoE atua como um ligante de alta afinidade para vários receptores de lipoproteínas hepáticas, como o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) e a proteína relacionada a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e está envolvido no processo de incorporação celular de várias lipoproteínas para transporte e digestão. É associada a outras glicoproteínas plasmáticas, como lipoproteínas de alta densidade (HDL) e quilomicrons. Em humanos, o gene que codifica a ApoE está localizado no braço longo do cromossomo 19 (q13.2) e é conhecido por ser polimórfico (CHAUDHARY et al., 2012).

O locus do gene estrutural para a ApoE do plasma é polimórfico com três alelos comuns, designados como E2, E3 e E4. Conseqüentemente, três fenótipos homozigotos (E2/E2, E3/E3, E4/E4) e três heterozigotos (E3/E2, E4/E2 e E4/E3) são encontrados na população geral (ZENDE et al., 2013). Chaudhary et al. (2012) descrevem ainda que o polimorfismo melhor estudado ocorre em função de duas mutações nos aminoácidos 112 e 158 da cadeia polipeptídica que forma a ApoE, onde uma arginina substitui uma cisteína determinando três alelos principais: E2, E3 (mais comum) e E4, produzindo 3 isoformas: ApoE2 (Cys112, 158Cys), ApoE3 (Cys112, 158Arg) e ApoE4 (Arg112, 158Arg).

2.2 APOE X DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A variabilidade genética da ApoE é um dos principais determinantes dos níveis plasmáticos de lipoproteínas. Além disso, as frequências de genótipos ApoE diferem entre

afro-americanos e caucasianos. A variação dos genótipos de ApoE tem sido forte e consistentemente associada aos níveis de lipídios plasmáticos e ao risco de DAC (ANUURAD et al., 2009).

Um dos primeiros estudos que descrevem a associação do polimorfismo da ApoE e doenças cardiovasculares foi relatado por Utermann, Pruin e Steinmetz (1979). Estes autores observaram que numa população saudável, indivíduos portadores do polimorfismo E2 apresentavam menores concentrações de colesterol LDL quando comparados aos que apresentavam a homozigose E3/E3. Bouthillier, Sing e Davignon (1983) foram os precursores em relatar que indivíduos portadores do alelo E4 apresentam níveis de colesterol LDL mais elevados quando comparados aos homozigotos para o alelo E3.

Recentemente estudos como o de Tabatabaei-Malazy et al. (2012) descrevem que devido a ApoE ser polimórfica na sua variação genética pode afetar seus efeitos anti-ateroscleróticos. Os mesmos autores relatam que ao contrário do alelo E3, o alelo E4 está associado à hipercolesterolemia, aumento dos níveis de LDL, HDL e aterosclerose. Zende et al. (2013) acrescentam que a prevalência dos fenótipos contendo E4 é significativamente maior em doenças cardiovasculares e cerebrovasculares como infarto do miocárdio, hipertensão, doença cardíaca coronária e derrame. Chaudhary et al. (2012) e Tabatabaei- Malazy et al. (2012) relatam ainda que a presença do alelo E2 pode conferir um efeito protetor nessas condições já que está associado a níveis plasmáticos reduzidos de colesterol LDL e menor risco de DAC. Entretanto, Wilson et al. (1996) declararam que o papel cardiovascular do ApoE2 é incerto devido à sua tendência a aumentar o triglicérido. Além do mais, a homozigose ApoE2 associada a certos transtornos pode vir a desenvolver hiperlipidemia familiar tipo III e aterosclerose prematura.

Um estudo realizado no estado do Rio Grande do Sul, o qual teve por objetivo analisar a associação do gene da ApoE e fatores de risco em idosos longevos (mais de 80 anos), verificou que o polimorfismo E3E3 apresentou associação com a variável obesidade, e que indivíduos com genótipo E3E4, apresentaram níveis elevados de LDL-colesterol e fibrinogênio superando os indivíduos com o genótipo E3E3 (SCHWANKE et al., 2002).

Shcherbak (2001) relatou que o polimorfismo da ApoE pode estar associado à predisposição a complicações diabéticas sendo estas, micro e macrovasculares. Esta associação foi demonstrada entre o polimorfismo do gene da ApoE e a nefropatia diabética. Entretanto Ukkola et al. (1993) afirmaram em seu estudo que no DM2 o alelo

E2 protege contra complicações macro e microvasculares e o alelo E4 tende a aumentar o risco de complicações vasculares.

Estudos em animais e humanos mostraram o importante papel do gene ApoE no desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina. Os estudos populacionais estabeleceram uma correlação direta entre obesidade e desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Fenótipos incluindo hipertensão, dislipidemia, obesidade e diabetes no mesmo assunto podem ser devidos a um fundo genético compartilhado. No entanto, a importância dos diferentes fatores de risco para o DM2 difere entre as populações étnicas (TABATABAEI-MALAZY et al., 2012). Tendo evidências da sua capacidade de afetar os níveis de lipídios, o polimorfismo do gene ApoE pode ser um dos fatores que influenciam o desenvolvimento tanto do DM2 quanto da DAC (CHAUDHARY et al., 2012).

A genotipagem do gene ApoE em pacientes com hipertensão tornou-se uma ferramenta importante na medicina personalizada, pois os pacientes portadores dos alelos E4 correm alto risco de desenvolver doença arterial coronariana e requerem monitoramento especial do perfil lipídico e da pressão arterial (ELABD et al., 2013). Também Sparks (1997) já havia encontrado em seu estudo evidências que o alelo E4 foi mais frequente em hipertensos, indivíduos com doença coronariana e portadores da doença de Alzheimer (DA). A ApoE tem consistentemente mostrado interações significativas gênero-ambiente, modulando sua associação com os parâmetros lipídicos plasmáticos, bem como o risco cardiovascular e cerebrovascular (ZENDE et al., 2013).

2.3 OBESIDADE E O GENE APOE

A obesidade é um importante problema de saúde e cada vez mais prevalente, que predispõe a doenças metabólicas e cardiovasculares (YUE e MAZZONE, 2010). Torres-Perez et al. (2016) descrevem que esta importante condição faz parte de um grupo de fatores de risco para a síndrome metabólica (SM) que incluem obesidade central, hipertensão arterial, hiperglicemia e dislipidemia. A forte hereditariedade desses constituintes (próxima a 30%), sugere que a SM pode ser influenciada por fatores genéticos e também ambientais (MUTCH e CLÉMENT, 2006). Posteriormente Povel et al. (2011) descreveram numerosos genes e suas variantes sendo associados à SM, dentre eles o gene ApoE. De acordo com Zarkesh et al. (2012) a ApoE é um determinante

genético da doença cardiovascular por sua influência nos fatores relacionados à obesidade e nos perfis lipídicos.

Além de contribuir para o desenvolvimento de morbidades importantes como doença de Alzheimer e doença cardiovascular, a presença do alelo E4 contribui para o desenvolvimento da SM pois pode afetar todos os componentes desta. A expressão da ApoE4 no adipócito, produz efeitos prejudiciais e interfere nas vias de detecção de insulina, que tem uma importância primordial no desenvolvimento da SM. Embora a ApoE seja primariamente sintetizada no fígado, ela também pode ser produzida no tecido adiposo e desempenha um papel importante na regulação da gordura corporal (TORRES-PEREZ et al., 2016). Em um estudo transversal de base populacional de uma população chinesa idosa em Pequim, Tao et al. (2011) avaliaram o polimorfismo genético da ApoE e sua relação com a síndrome metabólica, definida pelo National Cholesterol Education Program modificado e Critérios da Federação Internacional de Diabetes. Após avaliação de mais de 2.300 idosos os autores observaram que nos homens, os níveis de triglicérides em jejum foram maiores naqueles portadores dos alelos E2 e E4. O alelo E4 também foi associado a indivíduos com nível mais baixo de HDL.

O primeiro trabalho a estudar os polimorfismos da ApoE em indivíduos com obesidade extrema, indicam que as isoformas estão relacionadas não apenas à obesidade extrema, mas também à presença ou ausência de SM. Esta pesquisa, realizada por Ferreira et al. (2011), demonstrou que num grupo de 147 indivíduos obesos grau III, a ausência da SM foi observada em 44% dos indivíduos com o alelo E4. Da mesma forma, os genótipos contendo o alelo E4 (E4/E4 e E3/E4) tenderam fortemente a ser mais frequente nos indivíduos sem síndrome metabólica. Esses dados sugerem que o alelo E4 está associado a menos complicações da obesidade. Schwanke et al. (2002) realizaram um estudo com 70 idosos longevos com o propósito de estabelecer uma correlação entre os genótipos da ApoE com fatores de risco e morbidades cardiovasculares. Alguns dados encontrados demonstraram que os indivíduos com E3/E3 em média, tenderam ao sobrepeso, enquanto que tanto indivíduos E3/E4 quanto E2/E3 apresentaram um índice de massa corporal médio dentro da faixa da normalidade.

2.4 ATIVIDADE FÍSICA E O GENE APOE

A atividade física é conhecida por promover uma boa saúde geral e vascular,

umentar a capacidade funcional e qualidade de vida, e, portanto, é recomendada para todas as faixas etárias (ROVIO, 2008). A longo prazo, a atividade física parece ter uma influência positiva na prevenção de DCNT (REINER et al., 2013).

De acordo com Nascimento, Glaner e Nóbrega (2012) altos valores de consumo de oxigênio estão relacionados a menores concentrações séricas de Colesterol Total (CT), LDL, triglicerídeos bem como menores valores da razão CT/HDL. Estes mesmos autores relatam ainda que a prática de exercícios físicos viabiliza reduções nos níveis de triglicerídeos e aumento nos níveis de HDL séricos.

As concentrações de colesterol de lipoproteínas de alta densidade e suas subfrações protetoras estão inversamente relacionadas à DAC e DCV. Essa relação inversa de HDL-C para risco de DCV é forte, graduada e independente de outros níveis lipídicos de lipoproteína plasmática e fatores de risco não lipídicos. Um dos loci de genes mais importantes conhecidos por influenciar o metabolismo de HDL-C é o gene ApoE. O ApoE afeta a ligação hepática, absorção e catabolismo de várias classes de lipoproteínas associadas ao HDL-C e suas subfrações (OBISESAN et al., 2008).

Estudos apontam que os polimorfismos do gene da ApoE atuam na modulação dos efeitos da atividade física, exercício físico e até mesmo na gordura corporal (LEON et al., 2004; HAGBERG et al., 1999; BERNSTEIN et al., 2002; MARQUES-VIDAL et al., 2003).

Um estudo desenvolvido por Hagberg et al. (1999) demonstrou que posteriormente a um programa de 9 meses de exercícios de resistência, foi encontrado nos homens portadores do alelo E2 (E2/2 e E2/3), em relação àqueles com E3 (E3/3) e E4 (E3/4), benefícios relacionados a um maior aumento (de duas a três vezes) das concentrações séricas de HDL e sua subclasse dois (HDL2). Dados similares também foram encontrados por Leon et al. (2004) os quais submetem indivíduos a um programa de treinamento com ciclo ergômetro por 26 semanas numa frequência de 3 vezes na semana. O alelo E2 também demonstrou uma melhor resposta em mulheres brancas, constatando que as portadoras do genótipo E2/3 e E3/3, em comparação àqueles com o E4/4, apresentaram um maior aumento das concentrações de HDL após o referido treinamento.

Após o programa de treinamento aeróbico, Leon et al. (2004) evidenciaram que houve uma diminuição acentuada também nas concentrações de LDL nos indivíduos euro-descendentes de ambos os sexos, portadores do alelo E2 (E2/2+E2/3 e E2/4) em comparação àqueles com os genótipos E3/3, E3/4 e E4/4. Em homens afrodescendentes, a maior redução foi observada nos portadores do genótipo E2/4 e E4/4, em comparação

aqueles com o E2/3. Também Bernstein et al. (2002) em estudo realizado em Genebra, com mais de 1.500 indivíduos de ambos os sexos entre 35 e 74 anos, demonstraram que existem indícios de que a atividade física intensa reduz as concentrações de triglicerídeos, de forma mais pronunciada em indivíduos do sexo masculino portadores do alelo E4 (E3/4+E4/4). Mesmo com esses achados um estudo recente afirma que há controvérsia com relação ao polimorfismo do gene ApoE na resposta lipídica ao exercício (YU et al., 2014). Nessa perspectiva reconhecer a interação entre distúrbios genéticos relacionados às DCNT é de suma importância no tocante à prevenção, diagnóstico e prognóstico dessas condições numa população, consolidando a relação da comunidade com a investigação científica.

2.4 SAÚDE E DESENVOLVIMENTO COMUNITÁRIO

Entre as principais causas de óbitos no mundo, as DCNT geram elevado número de mortes prematuras, perda de qualidade de vida com alto grau de limitação nas atividades de trabalho e de lazer, além de impactos econômicos para as famílias, comunidades e a sociedade em geral, agravando as desigualdades e aumentando a pobreza. No entanto, seu impacto pode ser revertido por meio de intervenções amplas de promoção de saúde, para redução de seus fatores de risco, e pela melhoria da atenção à saúde, detecção precoce e tratamento oportuno (MALTA, MORAIS NETO e SILVA JUNIOR 2011).

A primeira conferência internacional sobre promoção da saúde regida em Ottawa no Canadá, considera que o termo Promoção da saúde descreve o processo de capacitação da comunidade para atuar na melhoria de sua qualidade de vida e saúde, incluindo uma maior participação no controle deste processo. Para atingir um estado de completo bem-estar físico, mental e social os indivíduos e grupos devem saber identificar aspirações, satisfazer necessidades e modificar favoravelmente o meio ambiente (DE OTTAWA, 1986).

A promoção da saúde envolve diversos setores da sociedade, devendo haver entre estes uma cooperação na tentativa de buscar soluções para os problemas de saúde da comunidade. Entretanto se faz necessária a combinação de estratégias que envolvam ações do Estado, da comunidade, dos indivíduos e dos sistemas de saúde para que esta condição se torne possível (SOUZA et al., 2005). No âmbito da saúde, 'comunidade' é

uma categoria onipresente nas áreas da promoção, prevenção e da pesquisa das relações entre aspectos socioculturais e da saúde (CASTIEL, 2004).

A biologia molecular tem colaborado no sentido de fornecer recursos para geneticistas e epidemiologistas aprofundarem-se nos mecanismos moleculares que agem na variação da distribuição de doenças nas famílias e nas populações. A divulgação da sequência do genoma humano abriu uma nova era para a biologia, a medicina e a saúde pública estabelecendo progressivamente a compreensão e os conceitos atuais sobre os mecanismos de prevenção, diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças crônicas com expressão epidemiológica em saúde pública (GATTÁS FIGARO, FILHO WÜNSCH e SEGRE, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO E LOCAL DO ESTUDO

A presente pesquisa propõe um estudo do tipo transversal, quase-experimental com delineamento *Ex post facto*. De acordo Gil (2002), o propósito básico dessa pesquisa é verificar a existência de relações entre variáveis. Na pesquisa *ex post facto* o pesquisador não dispõe de controle sobre a variável independente, que constitui o fator presumível do fenômeno, porque ele já ocorreu.

Os dados dos indivíduos diabéticos hipertensos foram coletados em unidades representativas do programa Hiperdia - sistema de gestão clínica de hipertensão arterial e diabetes mellitus da atenção básica da cidade de Guarapuava – PR. Dos indivíduos portadores de AVC, os dados foram coletados no setor de Fisioterapia Neurofuncional das Clínicas Integradas Guairacá, de propriedade da Faculdade Guairacá (FAG), e na Clínica Escola de Fisioterapia da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), ambas estabelecidas na cidade de Guarapuava - PR. As informações dos indivíduos saudáveis foram coletadas em uma academia e praças desta mesma cidade.

Todo o processo de extração de DNA e sua análise foram realizados no Laboratório de Biologia (AMBIOTEC) da UNICENTRO Campus Cedeteg.

3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A amostra foi selecionada de forma intencional, não probabilística, entre os indivíduos atendidos nas Clínicas Integradas Guairacá, na Clínica Escola de Fisioterapia da UNICENTRO, em unidades representativas do programa Hiperdia e em espaço fechado (academia) e aberto (praça) da cidade de Guarapuava - PR. Constituíram esta amostra 117 indivíduos adultos, de ambos os sexos, entre 36 e 89 anos de idade. Os participantes foram organizados em 3 grupos: Grupo A (AVC) composto por 43 indivíduos; Grupo B (hipertensos e diabéticos) constituído de 40 pessoas; e 34 compuseram o Grupo C (saudáveis).

A presente pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética e pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava-PR, sob o protocolo 2.124.874 e resolução 466/2012 do conselho nacional de saúde, sendo financiada pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (ANEXO 1).

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios foram estabelecidos de acordo com os grupos da seguinte forma:

- Grupo A: indivíduos com $30 \geq$ anos de idade, ambos os sexos, possuir diagnóstico clínico de AVC, estar sob atendimento fisioterapêutico nas clínicas já mencionadas e obter classificação de sedentário ou insuficiente ativo pelo Questionário Internacional de atividade física – IPAQ versão curta.
- Grupo B: indivíduos com $30 \geq$ anos de idade, ambos os sexos, possuir diagnóstico clínico de hipertensão e/ou diabetes, ser cadastrado no programa Hiperdia e obter classificação de ativo ou muito ativo de acordo com o IPAQ.
- Grupo C: indivíduos com $30 \geq$ anos de idade, ambos os sexos, frequentar local aberto ou fechado para a prática de atividade física, não possuir diagnóstico de doença cardiovascular e obter classificação de ativo ou muito ativo de acordo com o IPAQ.

3.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

- Preenchimento incompleto do questionário auto administrado;
- Impossibilidade da leitura dos polimorfismos na análise genética.

3.5 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE DADOS

3.5.1 COLETA DE DADOS PESSOAIS E APLICAÇÃO DO QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA (IPAQ)

Os participantes foram abordados nos locais de atendimentos já mencionados, sendo exposto aos mesmos os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa. Em seguida, após concordância e assinatura através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO 2), foi aplicado um questionário auto administrado (APÊNDICE 1), o qual englobou dados sociodemográficos, culturais e de saúde dos indivíduos. Feito isso, os participantes responderam ao IPAQ versão curta (ANEXO 3). Segundo Gonçalves et al. (2016), este questionário afere o nível de atividade física realizada pelo indivíduo na semana anterior. A classificação foi realizada de acordo com a descrição de Matsudo et al. (2001), sendo considerado como pessoas inativas ou com atividade física insuficiente escores abaixo de 150 minutos de atividades por semana, já pessoas fisicamente ativas ou muito ativas possuem escores de 150 minutos ou mais de atividade por semana. O escore relativo a atividade física realizada na semana anterior foi calculado como sendo a soma dos minutos de atividade moderada (por exemplo, pedalar leve na bicicleta, dançar ou fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim) mais duas vezes os minutos de atividade vigorosa (por exemplo, correr, fazer ginástica aeróbica e jogar futebol).

3.5.2 COLETA DA MUCOSA ORAL

Concluída a coleta dos dados pessoais, deu-se início ao raspado da mucosa oral e posterior extração do DNA (ácido desoxirribonucleico) para a avaliação genética dos polimorfismos da ApoE, utilizando como base o protocolo de extração de Abrão et al. (2005). Cada participante foi orientado a bochechar previamente com 100 ml de água destilada e na sequência foi raspado a face interna das bochechas com swabs (cotonetes)

estéreis e individuais da marca ABSORVE®, realizando movimentos circulares por aproximadamente 30 vezes. Imediatamente, os cotonetes tiveram a porção externa das hastes cortadas e colocadas em microtubos de 2 ml. As amostras foram identificadas e armazenadas em geladeira por um período de 2 a 30 dias antes da extração.

3.5.3 EXTRAÇÃO DO DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o método extração com NaCl descrito por Abrão et al. (2005), seguindo as seguintes etapas: aos tubos contendo o *swab* foram adicionados 200 µl de TES (Tris HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; SDS 0,6%) e 5 µl de proteinase K (10mg/ml) e incubados por 2 h a 42 °C. Após a incubação, a haste foi retirada e acrescentado ao conteúdo do tubo 42 µl de NaCl saturado (6 M), agitando manualmente com vigor. O tubo foi centrifugado por 1 minuto a 15.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado a ele 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g. O etanol absoluto foi descartado e em seguida adicionado 1 ml de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o *pellet*. Na sequência os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g e o sobrenadante desprezado. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais uma vez e, após desprezado o sobrenadante. Os tubos permaneceram abertos por 30 min para evaporação do etanol residual. Em seguida o DNA foi dissolvido em 60 µl de TE 10:0,1 (Tris HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM) e congelado.

3.5.4 AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

Para amplificação das amostras foi utilizada a técnica Reação em Cadeia da polimerase - PCR, a qual originalmente foi descrita por Saiki et al. (1985). É uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de sequências específicas de DNA ou de RNA. A PCR foi executada de acordo com o método descrito por Hixson e Vernier (1990), utilizando-se os primers apo EF 5'- TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3' (25- mer) e apo ER 5'- ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3' (26- mer). A mistura da reação (10 µml total), foi preparada com 0,5 µml de cada primer, 1 µml DNTPs, 0,2 de Taq Polimerase, 1 µml de tampão, 0,3 µml MgCl₂, 4 µml de água ultrapura e 2,5 µml do

DNA da amostra. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 30", seguida de 25 ciclos de anelamento à 60 °C por 30", extensão à 70 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 10 min. A eficiência da PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (2%) com brometo de etídio, observando-se a presença de uma banda de 240 pares de base (pb) sob luz ultravioleta (Figura 1).

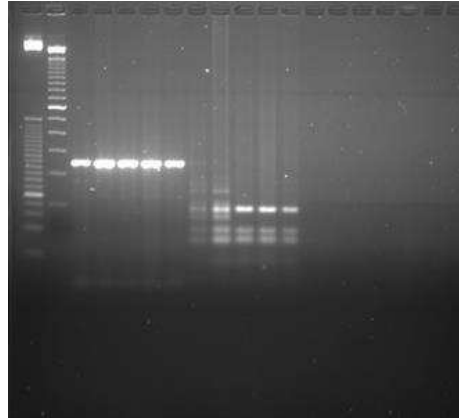


Figura 1. Amostras de DNA evidenciadas pela eletroforese em gel de agarose.

3.5.5 GENOTIPAGEM DA APOE

A genotipagem seguiu o protocolo utilizado por Schwanke et al. (2002), a qual consistiu da digestão do produto da PCR (10 µl) com 0,25 µl da enzima de restrição HhaI (Gibco), em 1 µl tampão C, 3,65 µl de água ultrapura e 0,1 µl de BSA. A digestão foi incubada a 370 °C, por três horas e, em seguida, analisada em gel de poliacrilamida (15%), utilizando-se um marcador de peso molecular de 25 pb ladder. As bandas características de cada alelo foram, então, analisadas e identificadas.

3.6 ANÁLISE E PROCESSAMENTOS DOS DADOS

Para o cálculo amostral, adotando-se foi utilizado nível de confiança de 95%. Posteriormente, verificou-se a normalidade dos dados após as caracterizações dos grupos, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os dados são apresentados como estatística descritiva, utilizando-se os valores de frequência, valores médios e desvio padrão. Os valores relativos foram analisados por meio do teste de qui-quadrado (χ^2). Foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$ para apontar as diferenças significativas. Quando

observado diferença significativa em alguma variável com a associação entre genótipos ou alelos ApoE foram expressos como odds ratio (OR) com intervalos de confiança (IC) de 95% usando o modelo de regressão logística. As associações foram testadas aplicando os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher. A regressão de Poisson com Estimador Robusto foi aplicada para calcular a Razão de prevalência entre Atividade física e genótipo. Por fim, a árvore de decisão foi aplicada para detectar os padrões de proporções de genótipo associados as combinações das demais variáveis. Utilizou-se um $p < 0,05$ como nível de significância. A análise estatística foi realizada com o programa SPSS, versão 18.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

O artigo a seguir foi elaborado com o propósito de responder aos seguintes objetivos específicos:

- 1: Descrever as características dos participantes do estudo de acordo com os grupos estudados;
- 2: Caracterizar e correlacionar a frequência genotípica e alélica da ApoE entre os grupos.

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DA APOE EM INDIVÍDUOS DIABÉTICOS HIPERTENSOS, PORTADORES DE AVC E SAUDÁVEIS

ASSOCIATION BETWEEN APOE POLYMORPHISM IN HYPERTENSIVE DIABETES, STROKE AND HEALTHY CARRIERS

Resumo

Objetivo: Descrever as características dos participantes do estudo de acordo com os grupos estudados bem como caracterizar e correlacionar a frequência genotípica e alélica da ApoE entre os grupos. **Métodos:** Amostra de 117 indivíduos adultos, de ambos os sexos, entre 36 e 89 anos de idade. Estes compuseram 3 grupos: Grupo A (portadores de AVC) composto por 43 indivíduos; Grupo B (diabéticos hipertensos) constituído de 40 indivíduos; e Grupo C (saudáveis). O DNA foi obtido a partir de amostras do raspado da

mucosa oral e os genótipos foram determinados por PCR. **Resultados:** A idade média dos participantes foi de 59,4 anos ($\pm 12,39$), em que 66,6% mulheres, 71,7% casados (as), 69,2% denominavam-se brancos (as), 45,2% possuíam como renda mensal de 1-2 salários mínimos. Outras doenças cardiovasculares foram relatadas por 28,2% dos indivíduos. A variável câncer foi apontada por 7,6% da amostra; doença respiratória em 9,4%; 18,8% afirmou ter depressão e 43,5% declarou ser fumante ou ter sido fumante por mais de 10 anos. As médias das frequências alélicas encontradas nos três grupos foram as seguintes: $\epsilon 3$ (69,2%); $\epsilon 2$ (15,8%) e $\epsilon 4$ (15,0%). **Conclusões:** A maioria da amostra foi composta por mulheres, com predomínio da etnia branca. A frequência alélica que prevaleceu na amostra deste estudo foi do alelo $\epsilon 3$. Foram constatadas associações significativas entre a presença do alelo $\epsilon 2$ e ser portador de AVC bem como de diabetes e hipertensão. O genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ foi expressamente maior no grupo AVC em comparação com os outros grupos. Observamos também que o genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ se expressou significativamente em menor frequência no grupo A em comparação aos grupos B e C.

Palavras-chave: Hipertensão; Diabetes Mellitus; Acidente Vascular Cerebral; Apolipoproteínas E.

Abstract

Objective: To describe the characteristics of the study participants according to the studied groups as well as to characterize and correlate the genotypic and allelic frequency of ApoE between the groups. **Methods:** A sample of 117 adult individuals, of both sexes, between 36 and 89 years of age. These comprised three groups: Group A (carriers of stroke) composed of 43 individuals; Group B (hypertensive diabetics) consisting of 40 individuals; and Group C (healthy). DNA was obtained from oral mucosa scraping samples and genotypes were determined by PCR. **Results:** The mean age of participants was 59.4 years (± 12.39), in which 66.6% women, 71.7% married, 69.2% were referred to as white, 45, 2% had a monthly income of 1-2 minimum wages. Other cardiovascular diseases were reported by 28.2% of the individuals. The cancer variable was indicated by 7.6% of the sample; respiratory disease in 9.4%; 18.8% reported having depression and 43.5% reported being a smoker or having been smoker for more than 10 years. The averages of the allele frequencies found in the three groups were as follows: $\epsilon 3$ (69.2%); $\epsilon 2$ (15.8%) and $\epsilon 4$ (15.0%). **Conclusions:** Most of the sample consisted of women, predominantly white. The allele frequency that prevailed in this study sample was of the

€ 3 allele. Significant associations between the presence of the € 2 allele and being a carrier of stroke as well as diabetes and hypertension were found. Genotype € 2€ 3 was expressively higher in the AVC group compared to the other groups. We also observed that the € 3€ 3 genotype was significantly less expressed in group A compared to groups B and C.

Keywords: Hypertension; Diabetes Mellitus; Stroke; Apolipoproteínas E.

INTRODUÇÃO

A prevalência de diabetes tipo 2 (DM2) e hipertensão arterial sistêmica (HAS) está aumentando em todo o mundo, paralelamente à epidemia de obesidade. Estima-se que o DM2 afete mais de 370 milhões de pessoas e a HAS não controlada mais de 970 milhões, representando grandes desafios para a saúde pública (SUNG et al., 2017). Segundo Wang et al. (2017), a hipertensão e o diabetes coexistem frequentemente. Estima-se que a prevalência de hipertensão entre pessoas com DM é de mais de 70%, e a simultaneidade destas duas condições, pode aumentar consideravelmente o risco de Doença Cardiovascular (DCV).

A carga econômica e de saúde associados à hipertensão, diabetes e DCV sugerem uma necessidade urgente de desenvolver estratégias eficazes de saúde pública para prevenir e controlar essas condições de saúde comuns (WANG et al., 2017).

A HAS é um importante fator de risco para complicações vasculares associadas a diabetes, pois a própria hipertensão é caracterizada por disfunção vascular e lesão. A DCV é um complexo processo inflamatório que leva ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica. O principal processo patológico associado à DCV é a aterosclerose, que, em indivíduos com diabetes, é acelerada com ampla distribuição de lesões vasculares (PETRIE; GUZIK; TOUYZ, 2017). Essa associação, eleva as taxas de complicações macro e microvasculares, incluindo infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, retinopatia, nefropatia e acidente vascular cerebral (AVC) (HORR e NISSEN, 2016).

O AVC é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo (ONG et al., 2016; XU et al., 2016). Os fatores de risco associados a essa condição podem estar relacionados ao estilo de vida, exposições ambientais e ocupacionais bem como os fatores de risco metabólicos (FEIGIN et al., 2016). Das et al. (2016) acrescentam, ainda, o fator genético ligado a gênese desta patologia. Dentre os fatores de risco modificáveis

estão o diabetes, hipertensão e a hiperlipidemia. A estes somam-se ainda a imobilidade física, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo e obesidade (ALLOUBANI; SALEH; ABDELHAFIZ, 2018). O AVC Destaca-se por ser a principal causa de deficiências funcionais, com 20% dos sobreviventes necessitando de cuidados institucionais após os 3 meses e entre 15% a 30% com incapacidade permanente. As consequências a curto e longo prazo do AVC demonstraram ter impacto no status socioeconômico dos pacientes e dos seus cuidadores (MURRAY et al., 1996).

A contribuição de fatores genéticos para a patogênese do AVC é evidenciada pela associação de variantes genéticas específicas ao risco deste. Os estudos de genes humanos candidatos ao AVC isquêmico têm sido inconsistentes até o momento e podem ser atribuídos aos efeitos confusos da heterogeneidade étnica e fenotípica (VIJAYAN et al., 2016).

Dentre os numerosos genes estudados, o que se destaca nesta interação com o AVC é a Apolipoproteína E (ApoE). O gene que codifica a proteína está situado no cromossomo 19q13.2 e produz um polipeptídeo de 299 aminoácidos. Os polimorfismos produzem 3 alelos ou isoformas que diferem entre si nos resíduos de aminoácidos, ϵ 2 (cys112, cys158), ϵ 3 (cys112, arg158) e ϵ 4 (arg112, arg158) que dão origem a 6 genótipos possíveis (ϵ 2 ϵ 2; ϵ 2 ϵ 3; ϵ 2 ϵ 4; ϵ 3 ϵ 3; ϵ 3 ϵ 4 e ϵ 4 ϵ 4) sendo ϵ 3 o alelo mais comum encontrado na população (DAS et al., 2016). A ApoE está presente nas partículas de lipoproteína plasmática na circulação, desempenhando um papel importante no transporte do colesterol, sendo um regulador chave dos níveis lipídicos do plasma. A função antiaterogênica da ApoE, surge em grande parte do seu papel na redução dos níveis de colesterol plasmático, promovendo a eliminação de lipoproteínas ricas em triglicérides da circulação (PHILLIPS, 2014).

A investigação acerca da genética das doenças e de seus mecanismos moleculares têm crescido consideravelmente. O curso do surgimento das doenças não é uma propriedade de agentes, mas sim de sistemas complexos desenvolvendo-se num contexto populacional (MENDONÇA, 2001).

MÉTODOS

Delineamento e Participantes

O presente estudo trata-se de uma pesquisa descritiva de corte transversal. Foram

avaliados 117 indivíduos adultos, de ambos os sexos, entre 36 e 89 anos de idade. Os indivíduos foram organizados em 3 grupos: Grupo A (portadores de AVC) composto por 43 indivíduos; Grupo B (diabéticos hipertensos) constituído de 40 pessoas; e 34 compuseram o Grupo C (saudáveis). Os critérios de inclusão estabelecidos igualmente para os três grupos incluíram homens e mulheres adultos. De acordo com os grupos os critérios foram estabelecidos da seguinte forma: Grupo A: possuir diagnóstico clínico de AVC, estar sob atendimento fisioterapêutico em clínicas-escola da cidade de Guarapuava-PR. Grupo B: possuir diagnóstico clínico de diabetes e hipertensão, ser cadastrado no programa Hiperdia. Grupo C: não possuir diagnóstico clínico de doença cardiovascular.

Após concordância e assinatura através do TCLE, foi aplicado um questionário auto administrado, o qual englobou dados sociodemográficos, culturais e de saúde dos indivíduos.

Concluída a coleta dos dados pessoais, deu-se início ao raspado da mucosa oral e posterior extração do DNA para a avaliação genética dos polimorfismos da Apolipoproteína E, utilizando como base o protocolo de extração de Abrão et al. (2005). Cada participante foi orientado a bochechar previamente com 100 ml de água destilada e na sequência foi raspado a face interna das bochechas com swabs estéreis e individuais. Imediatamente os cotonetes tiveram a porção externa das hastes cortadas e colocadas em microtubos de 2 ml. As amostras foram identificadas e armazenadas em geladeira por um período de 2 a 30 dias antes da extração.

Para a extração do DNA seguiu-se as seguintes etapas: aos tubos contendo o *swab* foram adicionados 200 µl de TES e 5 µl de proteinase K e incubados por 2 h a 42 °C. Após a incubação, a haste foi retirada e acrescentado ao conteúdo do tubo 42 µl de NaCl saturado (6 M), agitando manualmente com vigor. O tubo foi centrifugado por 1 minuto a 15.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado a ele 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g. O etanol absoluto foi descartado e em seguida adicionado 1ml de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o *pellet*. Na sequência os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g e o sobrenadante desprezado. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais uma vez e, após desprezado o sobrenadante. Os tubos permaneceram abertos por 30min para evaporação do etanol residual. Em seguida o DNA foi dissolvido em 60 µl de TE 10:0,1 (Tris HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM) e congelado.

Para amplificação das amostras foi utilizada a técnica PCR, esta foi executada de acordo com o método descrito por Hixson e Vernier (1990), utilizando-se os primers apo

EF 5' e apo ER 5'. A mistura da reação (10 µml total), foi preparada com 0,5 µml de cada primer, 1µml DNTPs, 0,2 de Taq Polimerase, 1µml de tampão, 0,3 µml MgCl₂, 4 µml de água ultrapura e 2,5 µml do DNA da amostra. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 30", seguida de 25 ciclos de anelamento à 60 °C por 30", extensão à 70 °C por 1min e uma extensão final a 72 °C por 10 min. A eficiência da PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (2%) com brometo de etídio, observando-se a presença de uma banda de 240 pares de base (pb) sob luz ultravioleta.

A genotipagem seguiu o protocolo utilizado por Schwanke et al. (2002), a qual consistiu da digestão do produto da PCR (10 µl) com 0,25 µl da enzima de restrição HhaI (Gibco), em 1 µl tampão C, 3,65 µl de água ultrapura e 0,1 µl de BSA. A digestão foi incubada a 370 °C, por três horas e, em seguida, analisada em gel de poliacrilamida (15%), utilizando-se um marcador de peso molecular de 25pb ladder. As bandas características de cada alelo foram, então, analisadas e identificadas.

Análise de dados

Inicialmente foi realizado o cálculo amostral, adotando-se nível de confiança de 95%. Posteriormente, verificou-se a normalidade dos dados após as caracterizações dos grupos, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os dados são apresentados como estatística descritiva, utilizando-se os valores de frequência, valores médios e desvio padrão. Os valores relativos foram analisados por meio do teste de qui-quadrado (χ^2). Foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$ para apontar as diferenças significativas. Quando observado diferença significativa em alguma variável com a associação entre genótipos ou alelos ApoE foram expressos como odds ratio (OR) com intervalos de confiança (IC) de 95% usando o modelo de regressão logística. A análise estatística foi realizada com o programa SPSS, versão 18.

RESULTADOS

Cento e cinquenta e um (151) indivíduos foram entrevistados e passaram pelo processo do raspado da mucosa oral, entretanto, não foi possível obter a genotipagem de 34 amostras. Assim, a amostra final foi composta de 117 indivíduos dos quais obteve-se

a genotipagem para o polimorfismo da ApoE. Destes, 43 indivíduos compuseram o grupo A (AVC), 40 o grupo B (diabéticos hipertensos) e 34 o grupo C (saúdáveis).

Na Tabela 1 estão descritas as características iniciais da amostra de acordo com os grupos. A idade média foi de 59,4 anos ($\pm 12,39$), em que 66,6% mulheres, 71,7% casados (as), 69,2% denominavam-se brancos (as), 45,2% possuíam como renda mensal de 1-2 salários mínimos. Outras doenças cardiovasculares foram relatadas por 28,2% dos indivíduos. A variável câncer foi apontada por 7,6% da amostra; doença respiratória em 9,4%; 18,8% afirmou ter depressão e 43,5% declarou ser fumante ou ter sido fumante por mais de 10 anos.

Tabela 1. Caracterização dos participantes do estudo de acordo com os Grupos.

VARIÁVEIS	GRUPO A (AVC) n: 43	GRUPO B (Diabéticos hipertensos) n: 40	GRUPO C (Saúdáveis) n: 34	TOTAL GERAL
Idade média (anos)	64,2	61,0	51,4	59,4 \pm 12,39
Sexo feminino	23 (19,6%)	33 (28,2%)	22 (18,8%)	78 (66,6 %)
Sexo masculino	20 (17,1%)	7 (5,9%)	12 (10,2%)	39 (33,3%)
Casados (as)	24 (20,5%)	31 (26,5%)	29 (24,7%)	84 (71,7%)
Branco (as)	26 (22,2%)	27 (23,0%)	28 (23,9%)	81 (69,2%)
Renda mensal 1-2 salários	27 (23%)	21 (17,9%)	5 (4,2%)	53 (45,2%)
Outras DCV	19 (16,2%)	14 (11,9%)	-	33 (28,2%)
Câncer	4 (3,4%)	4 (3,4%)	1 (0,85%)	9 (7,6%)
Doença Respiratória	5 (4,2%)	6 (5,1%)	-	11 (9,4%)
Depressão	17 (14,5%)	5 (4,2%)	-	22 (18,8%)
Fumante	26 (22,2%)	13 (11,1%)	12 (10,2%)	51 (43,5%)

As frequências alélicas e genótípicas entre os grupos estão descritas na Tabela 2. As médias das frequências alélicas encontradas nos três grupos foram as seguintes: ϵ 3 (69,2%); ϵ 2(15,8%) e ϵ 4 (15,0%).

Na comparação entre os grupos, foram encontradas diferenças estatísticas entre a presença do alelo ϵ 2 no grupo A em comparação aos outros dois grupos: grupo A em comparação com B (OR: 6,55; IC95%: 2,37; p=0,001); A em comparação com C (OR: 14,35; IC95%: 3,79; p=0,00).

Tabela 2. Distribuição das frequências Alélicas e Genótípicas da ApoE entre os grupos A (AVC); B (Hipertensos diabéticos) e C (Saudáveis).

	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	TOTAL GERAL
ApoE ALELOS				
ϵ 2	26 (30,2%)*	7 (8,8%)	4 (5,9%)	37 (15,8%)
ϵ 3	47 (54,7%)	61 (76,2%)	54 (79,4%)	162 (69,2%)
ϵ 4	13 (15,1%)	12 (15,0%)	10 (14,7%)	35 (15,0%)
ApoE GENÓTIPOS				
ϵ 2 ϵ 2	1 (2,3%)	-	1 (2,9%)	2 (1,7%)
ϵ 2 ϵ 3	18 (41,9%)*	5 (12,5%)	2 (5,9%)	25 (21,4%)
ϵ 2 ϵ 4	6 (14,0%)	2 (5,0%)	-	8 (6,8%)
ϵ 3 ϵ 3	11 (25,1%)**	23 (57,5%)	24 (70,6%)	58 (49,6%)
ϵ 3 ϵ 4	7 (16,3%)	10 (25%)	4 (11,8%)	21 (17,9%)
ϵ 4 ϵ 4	-	-	3 (8,8%)	3 (2,6%)
TOTAL	43 (36,7%)	40 (34,2%)	34 (29,1)	117 (100%)

* p<0,001. * Frequência do alelo ϵ 2 e do genótipo ϵ 2 ϵ 3 significativamente maior no grupo A em comparação com B e C. **Frequência do genótipo ϵ 3 ϵ 3 significativamente menor no grupo A em comparação com os grupos B e C.

Não foram encontradas diferenças estatísticas com relação as frequências dos alelos ϵ 3 e ϵ 4 entre os grupos. O alelo ϵ 3 do gene da ApoE obteve a maior taxa de distribuição, portanto, a taxa do genótipo ϵ 3/ ϵ 3 também foi a mais expressiva (49,6%).

Com relação a distribuição genotípica, os seis genótipos foram observados na amostra estudada. Não foram detectados os genótipos ϵ 2 ϵ 2 no grupo B, ϵ 2 ϵ 4 no grupo C

e $\epsilon 4\epsilon 4$ nos grupos A e B (Tabela 2). O genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ foi expressamente maior no grupo A. Observamos que o genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ se expressou significativamente em menor frequência no grupo A em comparação aos grupos B e C. Destaca-se que os genótipos $\epsilon 2\epsilon 2$ e $\epsilon 4\epsilon 4$ apresentaram-se em menor frequência em comparação aos outros genótipos. Não foram detectados os genótipos $\epsilon 2\epsilon 2$ e $\epsilon 2\epsilon 4$ nos grupos B e C respectivamente. O genótipo $\epsilon 4\epsilon 4$ foi observado apenas no grupo C.

DISCUSSÃO

O polimorfismo da ApoE é distribuído de forma desigual, com grandes diferenças nas frequências alélicas entre grupos humanos ao redor do mundo (REALES et al., 2014; FULLERTON et al., 2000; ADLER et al., 2017).

As frequências alélicas da ApoE observadas na pesquisa evidenciaram que o alelo $\epsilon 3$ foi o mais frequente (69,2%), seguido do $\epsilon 2$ (15,8%) e $\epsilon 4$ (15,0%), sendo que a maioria destes (69,2%), se declarou pertencente a etnia branca. Essas proporções concordam com relação à frequência da apresentação do alelo $\epsilon 3$ e diferem com relação aos alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ daquelas encontradas por Zannis et al. (1982) e Eisenberg, Kuzawa e Hayes (2010). Os autores relataram que o alelo $\epsilon 4$ se apresenta sensivelmente mais elevado na população mundial em comparação com o alelo $\epsilon 2$.

De acordo com Farrer et al. (1997), na população caucasiana, os alelos mais comuns da ApoE ocorrem na frequência de 77% ($\epsilon 3$), 15% ($\epsilon 4$) e 2% ($\epsilon 2$). Contudo, deve-se considerar a miscigenação presente na população brasileira, podendo provocar diferenças nas suas apresentações nas diferentes regiões do país, justificando assim os resultados encontrados. Além disso, não foram encontrados estudos relacionando o polimorfismo da ApoE em diferentes regiões do Brasil. Também, não foram identificadas pesquisas que investigassem a frequência do polimorfismo da ApoE em humanos no estado do Paraná.

No presente estudo, o único alelo que demonstrou associação significativa com o grupo A foi o alelo $\epsilon 2$, este se apresentou 14 vezes mais no grupo A (AVC) em comparação com o grupo C (saudáveis) e cerca de 6 vezes mais no grupo A em relação ao B (diabéticos hipertensos). A ApoE3 é considerada a forma original e está associada a níveis normais de colesterol plasmático, enquanto que as isoformas ApoE2 e ApoE4 possuem funcionalidades alteradas e estão associados à ocorrência de hiperlipidemias.

Níveis anormais de lipídios plasmáticos e as distribuições de lipoproteínas estão associados ao aumento do risco de DCV (MAHLEY, WEISGRABER e HUANG 2009; DAVIGNON et al., 1999).

A proteína ApoE tem um papel importante no transporte e metabolismo lipídico e também é significativamente expressa no cérebro. A ApoE é um dos genes comumente estudados nas doenças vasculares e neurodegenerativas. Além disso, tem sido demonstrado que o nível elevado de ApoE no plasma é um importante fator de risco para acidente vascular cerebral (KUMAR et al., 2013).

A literatura tem mostrado resultados consistentes sobre a associação do polimorfismo da ApoE com o AVC. Sudlow et al. (2006) avaliaram a potencial associação entre a ApoE e os vários tipos e subtipos patológicos de AVC que incluíram populações de diferentes etnias (países europeus, Estados Unidos, Brasil, Taiwan, China, Japão, Coreia e Bangladesh). Verificou-se que os genótipos contendo o alelo $\epsilon 4$ foram significativamente associados ao AVC isquêmico (AVCi) e hemorragia subaracnóide. As análises por grupos étnicos sugeriram haver uma relação mais forte entre a presença do alelo $\epsilon 4$ e o AVCi nas populações asiáticas do que em brancos ou outros grupos étnicos.

Também, McCarron, Delong e Alberts (1999) confirmam estes achados em sua meta-análise que envolveu pacientes com AVC e sujeitos controles pareados por idade e sexo. A análise global revelou uma frequência alélica $\epsilon 4$ significativamente maior nos pacientes portadores de AVC em comparação com os controles (0,14 versus 0,09; odds ratio, 1,68; IC de 95%, 1,36 a 2,09; $p < 0,001$). A presente pesquisa não evidenciou associação significativa do alelo $\epsilon 4$ com os indivíduos portadores de AVC, demonstrando haver um possível fator ambiental ou de outro polimorfismo gênico não investigado nesta pesquisa, influenciando a expressão deste polimorfismo nesta população. Suvatha et al. (2017) também encontraram uma associação significativa da frequência do alelo $\epsilon 2$ com o AVCh (OR = 3,59; IC95% = 1,11- 11,64; $p = 0,03$). Outra pesquisa de associação genética de larga escala composto de 2189 casos de Hemorragia intracerebral (HI) e 4041 controles, realizado por Biffi et al. (2010), demonstrou associação entre a HI lobar e os alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ bem como, evidenciaram relação entre o alelo $\epsilon 4$ e o risco de HI profunda. Ressaltamos que não foi possível relatar os dados dos polimorfismos associados aos diferentes tipos de apresentação do AVC e suas localizações devido a escassez de informações por parte dos seus portadores, porém, foram obtidas associações significativas entre a presença do alelo $\epsilon 2$ no grupo AVC em comparação com os saudáveis (OR: 14,35; IC95%: 3,79; $p: 0,00$).

Os portadores do alelo ϵ 2 também estão sobre representados em pacientes com hemorragia relacionada à angiopatia cerebral amiloide (ACA) assim como a maiores índices de gravidade de HI, incluindo o tamanho do hematoma, o resultado funcional e a mortalidade. A apoE2 liga-se com menor afinidade para receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) em comparação com apoE3 e apoE4 na periferia, levando a hiperlipoproteinemia, o que poderia prejudicar a vascularização cerebral e contribuir para ACA (TAI et al., 2016).

Os fatores de risco tradicionais para acidente vascular cerebral incluem hipertensão, tabagismo, diabetes, fibrilação atrial, hiperlipidemia e ser de origem africana ou asiática. Cada um desses fatores de risco pode ser pensado em termos de sua contribuição para um mecanismo específico de AVC, por exemplo: a hipertensão é uma das principais causas de AVC hemorrágico e isquêmico; enquanto que o diabetes, em virtude de levar à aterosclerose de grandes artérias, tem maior probabilidade de estar implicado no AVC isquêmico (HUMPHRIES e MORGAN, 2004). Observamos na pesquisa que dos 43 indivíduos portadores de AVC 41 possuem hipertensão, condição está tanto para o AVCi como para o hemorrágico.

Flobmann, Schulz e Rothwell (2004) afirmam que é improvável que condições patológicas muito diferentes, como é o caso dos AVCi e AVCh, estejam sob as mesmas influências genéticas, sugerindo assim novos estudos que correlacionem o polimorfismo da ApoE nas diferentes apresentações do AVC. A atual revelação encontrada neste estudo, colabora para afirmar que a presença do alelo ϵ 2 não confere fator protetivo como citado por Chaudhary et al. (2012) e Tabatabaei-Malazy et al. (2012) mas sim, outras variáveis genéticas ou fatores ambientais podem estar se sobrepujando.

Wei et al. (2017) em recente meta-análise, a qual objetivou verificar a associação de diferentes polimorfismos com o AVCi, evidenciou 81 estudos que entre outros objetivos avaliaram a associação do polimorfismo da ApoE e o AVC. O polimorfismo ApoE ϵ 4 aumentou significativamente o risco de AVCi, enquanto que a ApoE3 mostrou proteção à doença. Contudo, a associação do alelo ϵ 4 e o maior risco de AVC só foi confirmada na população caucasiana. Ressaltamos que no presente estudo o alelo ϵ 4 não obteve frequência destacada no grupo A, porém, assim como no estudo destacado acima, parece haver relação de proteção para os indivíduos portadores do alelo ϵ 3 no presente estudo, já que as maiores proporções deste alelo foram encontradas nos grupos B (hipertensos diabéticos) e C (saudáveis) e não no grupo A (AVC).

A distribuição dos alelos ϵ 3 e ϵ 4 foram semelhantes entre os grupos deste estudo.

Reales et al. (2014) afirmam que o polimorfismo ApoE4 pode ser vantajoso em ambientes pobres por aumentar a absorção de colesterol, porém tornar-se desvantajoso sob uma dieta ocidentalizada em que os níveis de colesterol total na população em geral são altos. De acordo com Eisenberg, Kuzawa e Hayes (2010), a distribuição espacial do alelo $\epsilon 4$ mostra um gradiente latitudinal duplo com maiores frequências para o Equador e polos, sugerindo um efeito seletivo positivo nessas áreas geográficas. No entanto, os fatores subjacentes explicando esses padrões geográficos de frequências gênicas permanece incerto. Esta afirmação explica a menor frequência deste alelo neste estudo, visto que a localização geográfica da amostra estudada se encontra distante das áreas citadas. Em resumo, a meta-análise de Casas et al. (2004) confirma a existência de uma causa genética comum para o AVC, mas sem um único "gene AVC" comum, exercendo um efeito importante. Em vez disso, é provável que vários alelos de suscetibilidade a AVC ajam individualmente, em conjunto ou em combinação com determinantes ambientais para causar o AVC.

Em relação às frequências genotípicas relacionadas ao polimorfismo do gene da ApoE, é importante destacar que ocorre variação destas conforme a população analisada. As frequências genotípicas observadas nesta pesquisa foram distintas das encontradas por outros estudos no Brasil, como é o caso de Schwanke et al. (2002) realizada no Rio Grande do Sul (RS) e em Brasília (DF) por Arruda et al. (2016), assim como de outras localidades da Europa (REALES et al., 2014; SINGH, SINGH e MASTANA, 2006). Entretanto, foi unânime a predominância do genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ em todas as populações estudadas, sendo que esta obteve uma frequência de 49,6% na amostra deste estudo. Foram correspondentes ao presente estudo as frequências genotípicas encontradas por Adler et al. (2017), bem como, as de Tang e Yang (2018). A primeira coletou dados numa população da Bósnia e Herzegovina, e a outra, obteve informações de Chongqing na China. Esta pesquisa mostrou uma associação significativa entre a presença do genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ no grupo portador de AVC assim como a menor frequência do genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ neste mesmo grupo. Song, Stampfer e Liu (2004) observaram que portadores do alelo $\epsilon 4$ apresentaram 42% mais risco de apresentar DCV em comparação com aqueles portadores do genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$, ao passo que os portadores do alelo $\epsilon 2$ não apresentaram nenhuma relação, consolidando a associação entre a presença do alelo $\epsilon 4$ com as DCV.

Bennet et al. (2007) revelaram que existem relações lineares de genótipos da ApoE os níveis de LDL e risco coronariano. Em comparação com indivíduos com o genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$, os portadores do alelo $\epsilon 2$ têm um risco 20% menor de doença coronariana e os

portadores do $\epsilon 4$ têm um risco ligeiramente maior. Dallongeville, Lussier-Cacan e Davignon (1992) também revelaram através de meta-análise, abrangendo populações de diferentes países, incluindo o Brasil, que portadores do genótipo $\epsilon 3\epsilon 4$ apresentaram maiores níveis de colesterol total quando comparados com portadores do genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$, consolidando novamente a informação do aumento do risco para desenvolvimento de DCV em sujeitos portadores de $\epsilon 4$, considerando-se que níveis elevados de colesterol total, apresentam associação significativa com doenças cardiovasculares.

A literatura tem sugerido que, em vez de representar um fator de risco, a presença do alelo $\epsilon 4$ exacerba a progressão ou dificulta os mecanismos de reparo na demência vascular, esclerose múltipla, AVC e traumatismo cranioencefálico (TCE), comparado ao ApoE3 (TAI et al., 2016). Como descrito, não encontramos relação da isoforma $\epsilon 4$ com o AVC na população estudada, ao contrário disso o alelo $\epsilon 4$ foi o menos frequente nesta população confirmando assim, com este achado, que a expressão do AVC não está somente correlacionada ao mecanismo genético, mas sim, a outros fatores de risco ambientais, ou o conjunto destes.

Diante dos dados aqui expostos, propõe-se que a análise genética vem no sentido de contribuir com a percepção mais detalhada de um grupo populacional, visualizando a real interação dos fatores inerentes e daqueles não próprios a comunidade, propondo assim uma melhor qualidade de vida e prevenção de doenças crônicas com alto poder de morbidade.

Das limitações enfrentadas por esta pesquisa, ressaltamos que apesar de termos detectado dados de todos os polimorfismos apresentados pela ApoE, nossa amostra foi pequena perante a importância desta análise genética, já que este é o primeiro estudo até o momento realizado nesta região do país. Outras limitações a serem citadas foi a escassez de dados quanto ao tipo de AVC apresentado pelo grupo A, limitando a discussão deste em relação ao polimorfismo encontrado neste grupo.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a maioria da amostra foi composta por mulheres, com predomínio da etnia branca. Assim como encontrado em outras regiões do mundo, a frequência alélica que prevaleceu na amostra deste estudo foi do alelo $\epsilon 3$. Foram constatadas associações significativas entre a presença do alelo $\epsilon 2$ e ser portador de AVC bem como de diabetes e hipertensão. O genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ foi expressamente maior no grupo AVC em comparação

com os outros grupos. O genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ se expressou significativamente em menor frequência no grupo A em comparação aos grupos B e C. Não foram constatadas associações significativas da presença do alelo $\epsilon 4$ e a existência de diabetes, hipertensão ou AVC como apontado pela literatura, sugerindo assim uma possível interferência de outros polimorfismos genéticos ou de fatores ambientais não investigados neste estudo, que exercem poder negativo na apresentação destas comorbidades.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, Milena Garcia et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 6, p. 978-82, 2005.

ADLER, Grażyna et al. Bosnian study of APOE distribution (BOSAD): a comparison with other European populations. **Annals of human biology**, v. 44, n. 6, p. 568-573, 2017.

ALLOUBANI, Aladeen; SALEH, Abdulmoneam; ABDELHAFIZ, Ibrahim. Hypertension and Diabetes Mellitus as a Predictive Risk Factors for Stroke. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2018.

BENNET, Anna M. et al. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. **Jama**, v. 298, n. 11, p. 1300-1311, 2007.

BIFFI, Alessandro et al. Variants at APOE influence risk of deep and lobar intracerebral hemorrhage. **Annals of neurology**, v. 68, n. 6, p. 934-943, 2010.

CASAS, Juan P. et al. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18 000 cases and 58 000 controls. **Archives of neurology**, v. 61, n.11, p. 1652-1661, 2004.

CHAUDHARY, Rajesh et al. Apolipoprotein E gene polymorphism: effects on plasma lipids and risk of type 2 diabetes and coronary artery disease. **Cardiovascular diabetology**, v. 11, n. 1, p. 36, 2012.

DALLONGEVILLE, J.; LUSSIER-CACAN, S.; DAVIGNON, J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. **Journal of lipid research**, v. 33, n. 4, p. 447-454, 1992.

DAS, Satrupa et al. Association of APOE (E2, E3 and E4) gene variants and lipid levels in ischemic stroke, its subtypes and hemorrhagic stroke in a south Indian population. **Neuroscience letters**, v. 628, p. 136-141, 2016.

DAVIGNON, Jean et al. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. **Clinica Chimica Acta**, v. 286, n. 1-2, p. 115-143, 1999.

DAVIGNON, Jean; GREGG, Richard E.; SING, Charles F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. **Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.**, v. 8, n. 1, p. 1-21, 1988.

DE ARRUDA, Alaine Lima et al. Associação entre o polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 23, n. 2, p. 41-46, 2016.

EISENBERG, Dan TA; KUZAWA, Christopher W.; HAYES, M. Geoffrey. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 143, n. 1, p. 100-111, 2010.

FARRER, Lindsay A. et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. **Jama**, v. 278, n. 16, p. 1349-1356, 1997.

FEIGIN, Valery L. et al. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 9, p. 913-924, 2016.

FLOßMANN, Enrico; SCHULZ, Ursula GR; ROTHWELL, Peter M. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. **Stroke**, v. 35, n. 1, p. 212-227, 2004.

FULLERTON, Stephanie M. et al. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 4, p. 881-900, 2000.

HIXSON, James E.; VERNIER, Daniel T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. **Journal of lipid research**, v. 31, n. 3, p. 545- 548, 1990.

HORR, Samuel; NISSEN, Steven. Managing hypertension in type 2 diabetes mellitus. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 3, p. 445-454, 2016.

HUMPHRIES, Steve E.; MORGAN, Laleh. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. **The Lancet Neurology**, v. 3, n. 4, p. 227-236, 2004.

KUMAR, Amit et al. Identification of genetic contribution to ischemic stroke by screening of single nucleotide polymorphisms in stroke patients by using a case control study design. **BMC neurology**, v. 13, n. 1, p. 136, 2013.

MAHLEY, Robert W.; WEISGRABER, Karl H.; HUANG, Yadong. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S183-S188, 2009.

MCCARRON, Mark O.; DELONG, David; ALBERTS, Mark J. APOE genotype as a

risk factor for ischemic cerebrovascular disease A meta-analysis. **Neurology**, v. 53, n. 6, p. 1308- 1308, 1999.

MENDONÇA, Gulnar Azevedo Silva. Tendências da investigação epidemiológica em doenças crônicas. 2001.

MURRAY, Christopher JL et al. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020: summary. 1996.

ONG, Cheung-Ter et al. Risk Factors for In-Hospital Mortality among Ischemic Stroke Patients in Southern Taiwan. **International Journal of Gerontology**, v. 10, n. 2, p. 86-90, 2016.

PETRIE, John R.; GUZIK, Tomasz J.; TOUYZ, Rhian M. Diabetes, hypertension and cardiovascular disease: Clinical insights and vascular mechanisms. **Canadian Journal of Cardiology**, 2017.

PHILLIPS, Michael C. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. **IUBMB life**, v. 66, n. 9, p. 616-623, 2014.

REALES, Guillermo et al. New insights into the distribution of APOE polymorphism in the Iberian Peninsula. The case of Andalusia (Spain). **Annals of human biology**, v. 41, n. 5, p. 443-452, 2014.

REINER, Miriam et al. Long-term health benefits of physical activity—a systematic review of longitudinal studies. **BMC public health**, v. 13, n. 1, p. 813, 2013.

SCHWANKE, Carla Helena Augustin et al. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, n. 6, p. 561-70, 2002.

SINGH, P. P.; SINGH, M.; MASTANA, S. S. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. **Annals of human biology**, v. 33, n. 3, p. 279-308, 2006.

SONG, Yiqing; STAMPFER, Meir J.; LIU, Simin. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. **Annals of internal medicine**, v. 141, n. 2, p. 137-147, 2004.

SUDLOW, Cathie et al. Does apolipoprotein E genotype influence the risk of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, or subarachnoid hemorrhage?: systematic review and meta-analyses of 31 studies among 5961 cases and 17 965 controls. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 37, n. 2, p. 364, 2006.

SUNG, Ki-chul et al. Inflammation in the Prediction of Type 2 Diabetes and Hypertension in Healthy Adults. **Archives of medical research**, v. 48, n. 6, p. 535-545, 2017.

SUVATHA, Arati et al. Apolipoprotein E polymorphism and the risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in a South Indian population. **Cellular &**

Molecular Biology Letters, v. 22, n. 1, p. 25, 2017.

TABATABAEI-MALAZY, Ozra et al. Apolipoprotein E gene polymorphism and its effect on anthropometric measures in normoglycemic subjects and type 2 diabetes. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 11, n. 1, p. 18, 2012.

TAI, Leon M. et al. The role of APOE in cerebrovascular dysfunction. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 5, p. 709-723, 2016.

TANG, Yishu; YANG, Yang. The Correlation Between ApoE Genetic Polymorphism and Serum Lipid Levels. **Cardiology and Cardiovascular Medicine**, v. 2, n. 2, p. 39-43, 2018.

VIJAYAN, Murali et al. MTHFR (C677T) CT genotype and CT-apoE3/3 genotypic combination predisposes the risk of ischemic stroke. **Gene**, v. 591, n. 2, p. 465-470, 2016.

WANG, Guijing et al. Annual Total Medical Expenditures Associated with Hypertension by Diabetes Status in US Adults. **American journal of preventive medicine**, v. 53, n. 6, p. S182-S189, 2017.

WEI, Loo Keat et al. Polymorphisms of MTHFR, eNOS, ACE, AGT, ApoE, PON1, PDE4D, and ischemic stroke: meta-analysis. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 26, n. 11, p. 2482-2493, 2017.

XU, Jie et al. A Comparison of mortality prognostic scores in ischemic stroke patients. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 2, p. 241-247, 2016.

ZANNIS, Vassilis I. et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. **Journal of lipid research**, v. 23, n. 6, p. 911-914, 1982.

4.2 ARTIGO 2

Os objetivos do presente artigo foram os seguintes:

- 1: Descrever o nível de atividade física da amostra;
- 2: Evidenciar as correlações entre os grupos ativo e sedentário com o polimorfismo encontrado.

NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA E POLIMORFISMO DO GENE *APOE* EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE AVC, HIPERTENSOS DIABÉTICOS E SAUDÁVEIS

Resumo

Objetivo: Descrever o nível de atividade física da amostra e identificar as possíveis correlações entre os grupos ativo e sedentário com o polimorfismo da ApoE. **Métodos:** Amostra de 117 indivíduos adultos, de ambos os sexos, entre 36 e 89 anos de idade. Estes compuseram 3 grupos: Grupo A (portadores de AVC) composto por 43 indivíduos; Grupo B (diabéticos hipertensos) constituído de 40 indivíduos; e Grupo C (saudáveis). Para a classificação do nível de atividade física foi aplicado o Questionário Internacional de atividade Física (IPAQ) versão curta. O DNA foi obtido a partir de amostras do raspado da mucosa oral e os genótipos foram determinados por PCR. **Resultados:** As mulheres compuseram a maior parte da amostra (66,7%). A classificação dos grupos pelo IPAQ e o número de indivíduos de cada grupo foram as seguintes: grupo A (43 indivíduos), obtiveram a classificação de sedentários ou insuficiente ativos e grupos B (40) e C (34) obtiveram classificação de ativos ou muito ativos. A distribuição das frequências alélicas foram as seguintes: ϵ 3 (69,2%), ϵ 2 (15,8%) e ϵ 4 (15,0%). O genótipo de maior frequência foi ϵ 3 ϵ 3 (49,6%), seguido de ϵ 2 ϵ 3 (21,4%), ϵ 3 ϵ 4 (17,9%), ϵ 2 ϵ 4 (6,8%), ϵ 4 ϵ 4 (2,6%) e ϵ 2 ϵ 2 (1,7%). Associações significativas foram encontradas entre os indivíduos ativos e o genótipo ϵ 3 ϵ 3, bem como ser sedentário e possuir o genótipo ϵ 2 ϵ 3 ($p < 0,001$). Indivíduos dos grupos diabéticos hipertensos e saudáveis, exibiram maior tempo de atividade física semanal em comparação com o grupo AVC ($p < 0,05$). Também foram encontradas associações significativas entre o genótipo ϵ 3 ϵ 3 e o maior tempo da prática de atividade física em homens. **Conclusões:** Os dados obtidos neste estudo sugerem que os

portadores do genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$, com destaque para os homens, foram os que se associaram aos maiores tempos de atividade física semanal. Além disso observamos que houve uma prevalência no genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ no grupo de indivíduos sedentários portadores de AVC.

Palavras-chave: Hipertensão; Diabetes Mellitus; Acidente Vascular Cerebral; Apolipoproteínas E; Atividade Física.

Abstract:

Objective: To describe the physical activity level of the sample and to identify the possible correlations between the active and sedentary groups with the ApoE polymorphism. **Methods:** A sample of 117 adult individuals, of both sexes, between 36 and 89 years of age. These comprised three groups: Group A (carriers of stroke) composed of 43 individuals; Group B (hypertensive diabetics) consisting of 40 individuals; and Group C (healthy). The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) short version was applied for the classification of the physical activity level. DNA was obtained from oral mucosa scraping samples and genotypes were determined by PCR. **Results:** Women comprised the majority of the sample (66.7%). The classification of the groups by the IPAQ and the number of individuals from each group were as follows: group A (43 individuals), classified sedentary or insufficient active groups and groups B (40) and C (34) obtained classification of assets or very active. The distribution of allele frequencies was as follows: $\epsilon 3$ (69.2%), $\epsilon 2$ (15.8%) and $\epsilon 4$ (15.0%). The highest frequency genotype was $\epsilon 3\epsilon 3$ (49.6%), followed by $\epsilon 2\epsilon 3$ (21.4%), $\epsilon 3\epsilon 4$ (17.9%), $\epsilon 2\epsilon 4$ (6.8%), $\epsilon 4\epsilon 4$ (2.6%) and $\epsilon 2\epsilon 2$ (1.7%). Significant associations were found between the active individuals and the genotype $\epsilon 3\epsilon 3$, as well as being sedentary and having the $\epsilon 2\epsilon 3$ genotype ($p < 0.001$). Individuals from the hypertensive and healthy diabetic groups showed a greater time of weekly physical activity compared to the AVC group ($p < 0.05$). Significant associations were also found between the $\epsilon 3\epsilon 3$ genotype and the longer time of physical activity in males. **Conclusions:** The data obtained in this study suggest that patients with the $\epsilon 3\epsilon 3$ genotype, especially men, were associated with the highest times of weekly physical activity. In addition, we observed a prevalence of $\epsilon 2\epsilon 3$ genotype in the group of sedentary individuals with stroke.

Keywords: Hypertension; Diabetes Mellitus; Stroke; Apolipoproteins E; Physical activity.

INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) são um problema de saúde global e uma ameaça à saúde e ao desenvolvimento humano. O fardo dessas doenças recai principalmente em países de renda baixa e média (SCHMIDT et al., 2001). Dentre estas cita-se a hipertensão e Diabetes Mellitus (DM2), as quais inicialmente são assintomáticas, e requerem tratamento a longo prazo. Sabe-se que estilos de vida saudáveis são essenciais não apenas na prevenção, mas também no tratamento dessas doenças cardiovasculares e metabólicas comuns. A redução da pressão arterial e os efeitos glicêmicos benéficos da moderação na ingestão de bebidas alcoólicas, atividade física, mudanças na dieta e redução de peso podem prevenir ou retardar o surgimento de hipertensão e DM e reduzir a necessidade de tratamento farmacológico (EVERT et al., 2014; WALTHER et al., 2017).

Possivelmente o desenvolvimento da hipertensão seja resultado de uma interação entre fatores ambientais e hereditários, contribuindo para o aumento do risco de distúrbios renais, cerebrais e cardíacos (WAHEED, HADI e SHAFEK, 2018). O risco de DM2 é determinado por uma interação de fatores genéticos e metabólicos. O aumento do risco para esta condição aumenta quando características como etnia, história familiar de diabetes e diabetes gestacional anterior combinam-se com idade avançada, excesso de peso e obesidade, dieta pouco saudável, inatividade física e tabagismo (WHO, 2016).

Indivíduos com diabetes e hipertensão têm um maior risco de desenvolver doença renal, cardíaca coronariana, insuficiência cardíaca e AVC (LOPEZ-JARAMILLO et al., 2014). Como a prevenção do AVC parece ser eficaz na redução da carga de incapacidades neurológicas, a identificação e quantificação dos fatores de risco, particularmente aqueles que são modificáveis, são de interesse significativo (AL-HASHEL et al., 2016).

Com a revolução industrial, o desenvolvimento de novas tecnologias permitiu que as pessoas reduzissem a quantidade de trabalho físico necessário para realizar muitas tarefas em suas vidas diárias. Desde então, a população mundial tem vivenciado a inatividade física, esta que tem contribuído de forma expressiva nas DCNTs (HALLAL et al., 2012).

Em todo o mundo, estima-se que a inatividade física causa 6 a 10% das principais doenças não transmissíveis de doença coronariana, DM2, câncer de mama e câncer do

cólon. Além disso, esse comportamento insalubre causa 9% de mortalidade prematura, ou mais de 3,2 das 57 milhões de mortes em 2008 (LEE et al., 2012). A atividade física é particularmente importante devido aos seus efeitos mais amplos sobre a saúde em geral e saúde cardiovascular em particular (TOLPPANEN et al., 2015).

Os estudos, como os relatados por Bernstein et al. (2002) e St-Amand et al. (1999), afirmam que há uma relação entre a modulação dos efeitos do exercício físico e o polimorfismo da ApoE, entretanto poucos estudos relatam essas associações com as principais doenças cardiovasculares.

MÉTODOS

Delineamento e Participantes

O presente estudo trata-se de uma pesquisa descritiva de corte transversal o qual avaliou 117 indivíduos adultos, de ambos os sexos, entre 36 e 89 anos de idade. Estes compuseram 3 grupos: Grupo A (portadores de AVC) composto por 43 indivíduos; Grupo B (diabéticos hipertensos) constituído de 40 indivíduos; e Grupo C (saudáveis). Os critérios de inclusão estabelecidos igualmente para os três grupos incluíram homens e mulheres adultos. De acordo com os grupos os critérios foram estabelecidos da seguinte forma: Grupo A: possuir diagnóstico clínico de AVC, estar sob atendimento fisioterapêutico em clínicas-escola da cidade de Guarapuava-PR e ser classificado como sedentário ou insuficiente ativo de acordo com o Questionário Internacional de atividade física (IPAQ). Grupo B: ser classificado como ativo ou muito ativo de acordo com o IPAQ e possuir ou não diagnóstico clínico de diabetes e hipertensão. Grupo C: obter classificação de ativo ou muito ativo de acordo com o IPAQ e não possuir doença cardiovascular associada. Após concordância e assinatura através do TCLE, foi aplicado um questionário auto administrado, o qual englobou dados sociodemográficos, culturais e de saúde dos indivíduos.

Concluída a coleta de dados pessoais, deu-se início ao raspado da mucosa oral e posterior extração do DNA para a avaliação genética dos polimorfismos da Apolipoproteína E, utilizando como base o protocolo de extração de Abrão et al. (2005). Cada participante foi orientado a bochechar previamente com 100 ml de água destilada e na sequência foi raspado a face interna das bochechas com swabs estéreis e individuais.

Imediatamente os cotonetes tiveram a porção externa das hastes cortadas e colocadas em microtubos de 2 ml. As amostras colhidas foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira por um período de 2 a 30 dias antes da extração.

Para a extração do DNA seguiu-se as seguintes etapas: aos tubos contendo o *swab* foram adicionados 200 µl de TES e 5µl de proteinase K e incubados por 2 h a 42 °C. Após a incubação, a haste foi retirada e acrescentado ao conteúdo do tubo 42 µl de NaCl saturado (6 M), agitando manualmente com vigor. O tubo foi centrifugado por 1 minuto a 15.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado a ele 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g. O etanol absoluto foi descartado e em seguida adicionado 1 ml de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o *pellet*. Na sequência os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g e o sobrenadante desprezado. A lavagem com etanol 70% foi repetida mais uma vez e, após desprezado o sobrenadante. Os tubos permaneceram abertos por 30min para evaporação do etanol residual. Em seguida o DNA foi dissolvido em 60 µl de TE 10:0,1 (Tris HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM) e congelado.

Para amplificação das amostras foi utilizada a técnica PCR, esta foi executada de acordo com o método descrito por Hixson e Vernier (1990), utilizando-se os primers apo EF 5' e apo ER 5'. A mistura da reação (10 µml total), foi preparada com 0,5 µml de cada primer, 1µml DNTPs, 0,2 de Taq Polimerase, 1µml de tampão, 0,3 µml MgCl₂, 4 µml de água ultrapura e 2,5µml do DNA da amostra. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 30", seguida de 25 ciclos de anelamento à 60 °C por 30", extensão à 70 °C por 1min e uma extensão final a 72 °C por 10min. A eficiência da PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (2%) com brometo de etídio, observando-se a presença de uma banda de 240 pares de base (pb) sob luz ultravioleta.

A genotipagem seguiu o protocolo utilizado por Schwanke et al. (2002), a qual consistiu da digestão do produto da PCR (10 µl) com 0,25 µl da enzima de restrição HhaI (Gibco), em 1 µl tampão C, 3,65 µl de água ultrapura e 0,1 µl de BSA. A digestão foi incubada a 370 °C, por três horas e, em seguida, analisada em gel de poliacrilamida (15%), utilizando-se um marcador de peso molecular de 25pb ladder. As bandas características de cada alelo foram, então, analisadas e identificadas.

Análise de dados

Os dados foram analisados nos softwares SPSS versão 25.0 e R versão 3.4.3. Os resultados foram apresentados em frequência absoluta e relativa, descritivamente. As associações foram testadas aplicando os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher. A regressão de Poisson com Estimador Robusto foi aplicada para calcular a Razão de prevalência entre Atividade física e genótipo. Por fim, a árvore de decisão foi aplicada para detectar os padrões de proporções de genótipo associados as combinações das demais variáveis. Utilizou-se um $p < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS

A amostra final foi composta de 117 indivíduos, havendo perda dos dados de 34 amostras durante a análise genética. As mulheres compuseram a maior parte da amostra (66,7%). A classificação dos grupos pelo IPAQ e o número de indivíduos de cada grupo foram as seguintes: grupo A (43 indivíduos), obtiveram a classificação de sedentários ou insuficiente ativos e grupos B (40) e C (34) obtiveram classificação de ativos ou muito ativos. A distribuição das frequências alélicas foram as seguintes: $\epsilon 3$ (69,2%), $\epsilon 2$ (15,8%) e $\epsilon 4$ (15,0%). O genótipo de maior frequência foi $\epsilon 3\epsilon 3$ (49,6%), seguido de $\epsilon 2\epsilon 3$ (21,4%), $\epsilon 3\epsilon 4$ (17,9%), $\epsilon 2\epsilon 4$ (6,8%), $\epsilon 4\epsilon 4$ (2,6%) e $\epsilon 2\epsilon 2$ (1,7%). Estes dados não foram apresentados em tabelas.

Para uma melhor visualização das proporções de genótipos associados a atividade física, foi aplicada a árvore de decisão representada na Figura 1. A divisão dos sujeitos foi determinada em ATIVO (grupos B e C) composto por 74 indivíduos e SEDENTÁRIO (grupo A), constituído de 43 indivíduos. Os diferentes perfis de genótipos determinam que existem associações significativas entre ser ativo e o genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$, bem como ser sedentário e possuir o genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$. Este resultado é significativo ao nível $p < 0,001$.

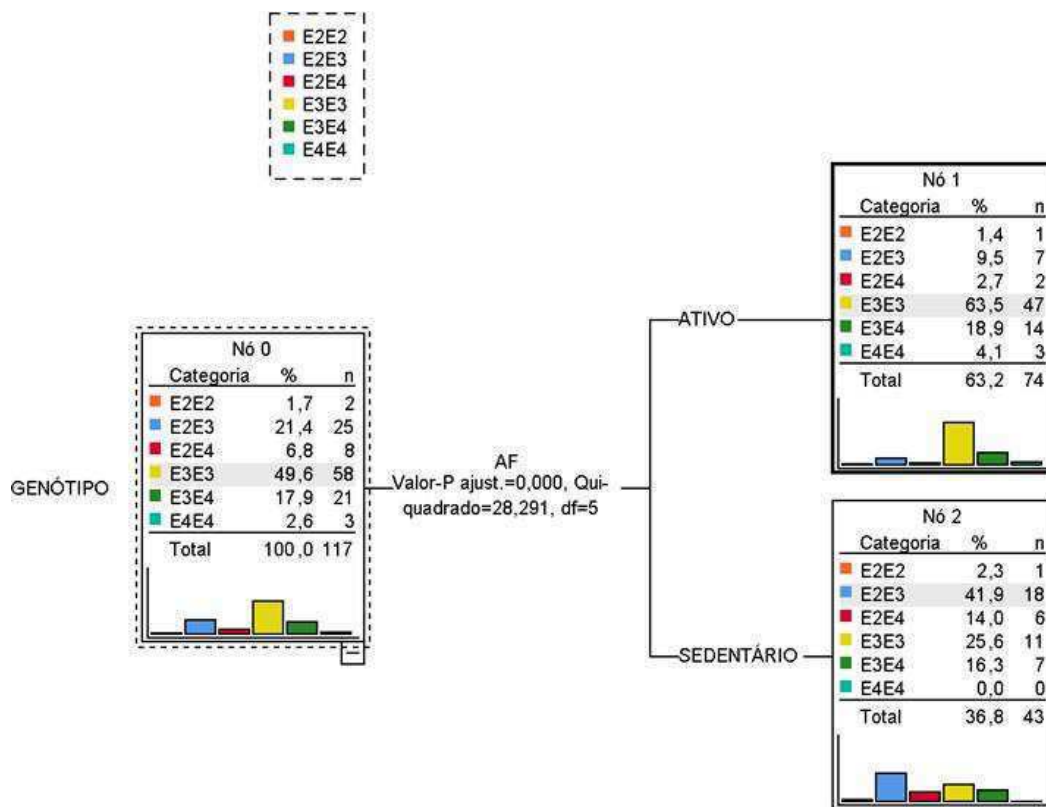


Figura 1. Arvore de decisão. Distribuição dos genótipos em relação a classificação da amostra em ATIVO e SEDENTÁRIO.

Para estimar a razão de prevalência entre atividade física e genótipo foi aplicada a regressão de Poisson, ajustada para grupo e minutos de atividade física, utilizando como referência os genótipos E4E4 e E2E3 nas tabelas 2 e 3 respectivamente. Estas referências foram estabelecidas por E4E4 apresentar significância através de testes de várias combinações e por E2E3 se apresentar com maior frequência relativa em sujeitos sedentários. Verifica-se na Tabela 1 que num intervalo de confiança (IC) de 95%, existe uma chance de cerca de 20% de que o genótipo E3E3 seja mais ativo que o E4E4 na população masculina. Não foram observadas razões de chance com significância para a referência do genótipo E2E3 como observado na Tabela 2.

Tabela 1: Prevalência da atividade física em relação ao genótipo entre homens e mulheres. REF:

Referência genótipo € 4€ 4

		P	RP	IC 95%	
HOMENS	€ 4€ 4	REF			
	€ 2€ 3	0,093	2,682	0,848	8,487
	€ 2€ 4	0,967	0,958	0,128	7,151
	€ 3€ 3*	0,005	1,211	1,059	1,385
	€ 3€ 4	0,051	1,346	0,999	1,813
MULHERES	€ 4€ 4	REF			
	€ 2€ 2	0,451	0,808	0,463	1,408
	€ 2€ 3	0,35	1,109	0,893	1,379
	€ 2€ 4	0,318	0,809	0,533	1,227
	€ 3€ 3	0,112	1,082	0,982	1,194
	€ 3€ 4	0,56	1,038	0,916	1,176

Notas: RP: Modelo de regressão de Poisson ajustada pelos minutos de atividade Física; IC 95%: intervalo de confiança de 95%. *prevalência significativa do genótipo € 3€ 3 ser mais ativo que € 4€ 4.

Tabela 2: Prevalência da atividade física em relação ao genótipo entre homens e mulheres. REF: Referência genótipo € 2€ 3

		P	RP	IC 95%	
HOMENS	€ 2€ 3	REF			
	€ 2€ 4	0,093	0,373	0,118	1,18
	€ 3€ 3	0,271	0,502	0,147	1,712
	€ 3€ 4	0,169	0,451	0,145	1,403
	€ 4€ 4	0,247	0,357	0,062	2,044
MULHERES	€ 2€ 3	REF			
	€ 2€ 2	0,35	0,901	0,725	1,12
	€ 2€ 4	0,541	0,936	0,756	1,158
	€ 3€ 3	0,806	0,976	0,803	1,186
	€ 3€ 4	0,156	0,729	0,471	1,128
	€ 4€ 4	0,307	0,728	0,396	1,338

Notas: RP: Modelo de regressão de Poisson ajustada pelos minutos de atividade Física; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Na Figura 2(A) está representada a relação dos grupos ajustada pelos minutos de atividade física realizada por semana (min/sem). Observamos que tanto para homens quanto para mulheres, os grupos diabéticos hipertensos e saudáveis, exibiram maior tempo de atividade física semanal em comparação com o grupo AVC ($p < 0,05$), sendo mais evidente esta diferença na população feminina. Já a Figura 2 (B) nos mostra a relação

entre os minutos de atividade física semanal e os genótipos, apresentados por homens e mulheres, evidenciando associação significativa entre o genótipo € 3€ 3 e o maior tempo da prática de atividade física nos homens.

Apesar de não terem sido encontradas associações significativas entre os outros genótipos, percebe-se que na população feminina os genótipos associados aos maiores tempos de atividade semanais foram € 3€ 3 e € 3€ 4, enquanto que os menos tempos foram € 2€ 2 e € 2€ 4.

Figura 2 (A): Relação entre os grupos e os minutos de atividade física semanal praticados por homens e mulheres.

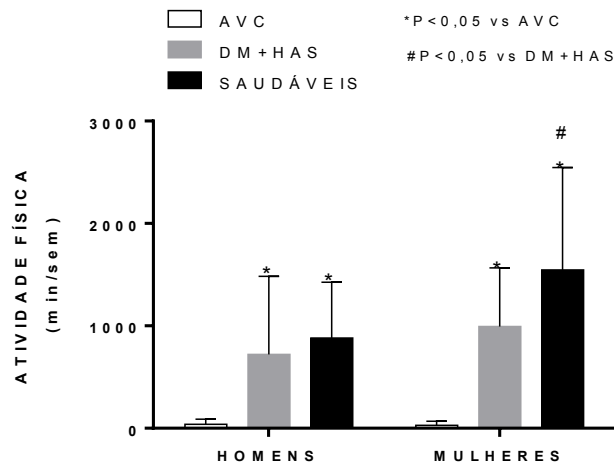
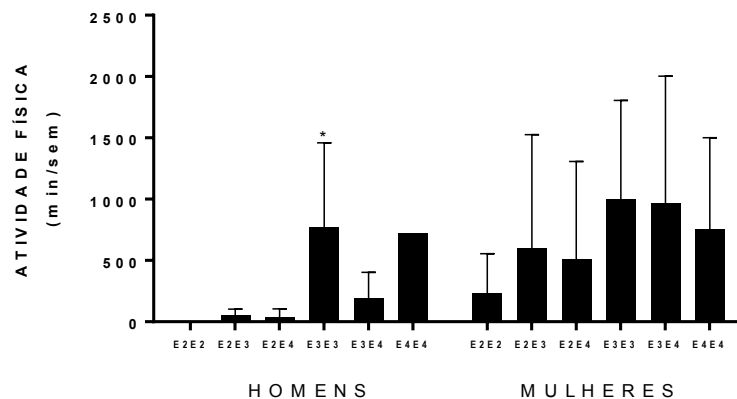


Figura 2 (B): Relação entre os genótipos e os minutos de atividade física semanal praticados por homens e mulheres



DISCUSSÃO

A distribuição da frequência alélica da ApoE na amostra revelou o que estudos genéticos populacionais apontam, a isoforma ApoE3 é o alelo mais frequente entre as populações humanas (HALLMAN et al. 1991; SANDHOLZER et al. 1995; BENKMANN et al. 1996; CORBO e SCACCHI, 1999; PANZA et al. 1999; SCHIELE et al., 2000). As frequências dos alelos ϵ 2 e ϵ 4 foram muito similares não obtendo diferença entre estas.

Neste estudo, foi investigado a ocorrência de relação entre o nível de atividade física entre indivíduos diabéticos hipertensos, portadores de AVC e em indivíduos saudáveis e os vários genótipos do gene da Apolipoproteína E. Os resultados obtidos mostraram haver uma relação entre o genótipo ϵ 3 ϵ 3 e os indivíduos ativos da amostra. Outro achado confirmou que este mesmo genótipo, para os homens, apresenta uma chance de prevalência de 20% ser mais ativo que ϵ 4 ϵ 4 (Tabela 1), sendo este dado também visualizado no gráfico 2 (B).

A maioria dos estudos encontrados correlacionam dados da interação entre o polimorfismo da ApoE e atividade física em marcadores de perfil lipídico e glicêmico. Este é o caso dos estudos realizados por Taimela et al. (1996), Thompson et al. (2004) e Seip et al. (2006). Os autores confirmaram que o polimorfismo da ApoE afeta a resposta lipídica ao treinamento físico. Outro achado foi de que as concentrações de LDL colesterol diminuíram e de HDL colesterol aumentaram, nos portadores do genótipo ϵ 3 ϵ 3 com o treinamento físico. Apesar de não obtermos dados dos perfis lipídicos, os indivíduos deste estudo possuíam semelhança quanto ao gênero e média de idade nos 3 grupos. Segundo Warburton, Nicol e Bredins (2006), a atividade física reduz o risco de doença cardiovascular, diabetes, hipertensão e obesidade. Levando em conta essa afirmação e considerando o que Malta e Silva Junior (2013) afirmam, ambos, diabetes e hipertensão, são fatores primordiais na apresentação do AVC. Podemos concluir, assim, que os portadores homozigotos da isoforma ApoE3, quando ativos, possuem um fator protetivo para a manifestação desta condição patológica.

Outra associação observada no presente estudo, foi entre o genótipo ϵ 2 ϵ 3 e os indivíduos sedentários, portadores de AVC (Figura 1). Dados similares foram encontrados num estudo que verificou a associação entre nível de atividade física, risco cardiovascular e o polimorfismo da ApoE em 255 idosos da cidade de Gravataí (RS) (ANTONINI et al. 2011). Os autores relataram que 60,6% da amostra eram ϵ 2 ϵ 3 e

sedentários, entretanto não foi relatado sobre as doenças associadas. Nascimento, Glaner e Nóbrega (2012) bem como Ferreira et al. (2013), afirmam que portadores do alelo $\epsilon 2$ são os que mais se beneficiam dos efeitos da atividade física sobre a lipemia. Sendo assim, presumimos que se os indivíduos do grupo A fossem ativos, poderiam ter se beneficiado de uma possível proteção para doenças cardiovasculares.

A atividade física e o exercício, em qualquer intensidade, têm papéis importantes no controle de DCV (WILCOX et al., 2001; IGNARRO; BALESTRIERI; NAPOLI, 2007; BOOTH; ROBERTS; LAYE, 2012). Se levarmos em conta somente a variável atividade física esta afirmativa justifica os dados encontrados, já que observamos que homens e mulheres dos grupos diabéticos hipertensos e saudáveis, exibiram maior tempo de atividade física semanal em comparação com o grupo AVC (gráfico 1), obtendo assim benefícios da prática física. Porém, sabemos que existem outras variáveis não mensuradas neste estudo, que podem sobrepujar o efeito do exercício nos indivíduos com AVC.

A atividade física parece diminuir os riscos de doença arterial coronariana (DAC) em portadores da APOE $\epsilon 4$ enquanto que estilos de vida sedentários, podem exacerbar os fatores de risco de DAC entre os portadores de $\epsilon 4$ (RAICHLEN e ALEXANDER, 2014). Como demonstrado na figura 1, o genótipo $\epsilon 4\epsilon 4$ manifestou-se em somente 3 indivíduos da população estudada, e estes integraram o grupo C (saudável ativo). No estudo transversal realizado por Bernstein et al. (2002), os autores sugerem que o aumento da atividade física pode compensar os efeitos potencialmente deletérios da presença do alelo $\epsilon 4$ no perfil lipídico, quando comparados com $\epsilon 2$ ou $\epsilon 3$. Além dessas evidências, o estudo revelou que a atividade física intensa reduz as concentrações de triglicerídeos, sendo de forma mais pronunciada nos homens portadores do alelo $\epsilon 4$ ($\epsilon 3/4+\epsilon 4/4$). Complementar a esse achado, Leon et al. (2004) revelam que as mulheres euro-descendentes portadoras do genótipo $\epsilon 4/4$, são as que exibem uma maior redução de triglicerídeos após um programa de exercícios aeróbios. Dessa forma, no presente estudo, a presença da homozigose para $\epsilon 4$ no grupo de indivíduos ativos saudáveis pode ser atribuída a uma carga de morbidade menor, demonstrando assim um efeito positivo da atividade física nestes indivíduos.

Das limitações encontradas neste estudo podemos relacionar a reduzida amostra, limitando os resultados de algumas análises. Também, reconhecemos que poderíamos contribuir com mais dados se não fosse pela ausência de marcadores bioquímicos que pudéssemos analisar e comparar os dados avaliados.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo sugerem que os portadores do genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$, com destaque para os homens, foram os que se associaram aos maiores tempos de atividade física semanal, se beneficiando dos efeitos da atividade física. Além disso, observamos que houve uma prevalência no genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ no grupo de indivíduos sedentários portadores de AVC. Entretanto, conclusões seguras não podem ser feitas acerca dessas interações, haja vista a interação de inúmeras variáveis não avaliadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, Milena Garcia et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 6, p. 978-82, 2005.

AL-HASHEL, Jasem Y. et al. Risk factors, subtypes, and outcome of ischemic stroke in Kuwait: A national study. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 9, p. 2145-2152, 2016.

ANTONINI, Tiago et al. Estudo de associação entre nível de atividade física, risco cardiovascular e o polimorfismo do gene da Apolipoproteína E em idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 1, p. 27-37, 2011.

BENKMANN, Heide G. et al. Distribution of apolipoprotein E genotypes in Asian Indians, Hungarians, and Papua New Guineans. **Anthropologischer Anzeiger**, p. 31-34, 1996.

BERNSTEIN, Martine S. et al. Physical activity may modulate effects of ApoE genotype on lipid profile. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 22, n. 1, p. 133-140, 2002.

BERNSTEIN, Martine S. et al. Physical activity may modulate effects of ApoE genotype on lipid profile. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 22, n. 1, p. 133-140, 2002.

BOOTH, Frank W.; ROBERTS, Christian K.; LAYE, Matthew J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1143, 2012.

CORBO, Rose Maria; SCACCHI, Renato. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE* 4 a 'thrifty' allele?. **Annals of human genetics**, v. 63, n. 4, p. 301-310, 1999.

EVERT, Alison B. et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. **Diabetes care**, v. 37, n. Supplement 1, p. S120-S143, 2014.

FERREIRA, Aparecido Pimentel et al. The effect of aerobic exercise intensity on attenuation of postprandial lipemia is dependent on apolipoprotein E genotype. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 1, p. 139-144, 2013.

HALLAL, Pedro C. et al. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. **The lancet**, v. 380, n. 9838, p. 247-257, 2012.

HALLMAN, D. Michael et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. **American journal of human genetics**, v. 49, n. 2, p. 338, 1991.

IGNARRO, Louis J.; BALESTRIERI, Maria Luisa; NAPOLI, Claudio. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. **Cardiovascular research**, v. 73, n. 2, p. 326- 340, 2007.

LEE, I.-Min et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **The Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 219-229, 2012.

LEON, Arthur S. et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with blood lipids and maximal oxygen uptake in the sedentary state and after exercise training in the HERITAGE family study. **Metabolism**, v. 53, n. 1, p. 108-116, 2004.

LÓPEZ-JARAMILLO, Patricio et al. Consenso latino-americano de hipertensão em pacientes com diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, n. 3, p. 205-225, 2014.

MALTA, Deborah Carvalho; SILVA JR, Jarbas Barbosa da. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 151-164, 2013.

NASCIMENTO, Thales Boaventura Rachid; GLANER, Maria Fátima; NÓBREGA, Otávio de Tolêdo. Influência do gene da apolipoproteína-E sobre a relação perfil lipídico, atividade física e gordura corporal. 2012.

PANZA, Francesco et al. Decreased frequency of apolipoprotein E ϵ 4 allele from northern to southern Europe in Alzheimer's disease patients and centenarians. **Neuroscience letters**, v. 277, n. 1, p. 53-56, 1999.

RAICHLIN, David A.; ALEXANDER, Gene E. Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan. **Trends in neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 247-255, 2014.

SANDHOLZER, C. et al. High frequency of the apo ϵ 4 allele in Khoi San from South Africa. **Human genetics**, v. 95, n. 1, p. 46-48, 1995.

SCHIELE, F. et al. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. **Atherosclerosis**, v. 152, n. 2, p. 475-488, 2000.

SCHMIDT, Maria Inês et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SCHWANKE, Carla Helena Augustin et al. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, n. 6, p. 561-70, 2002.

SEIP, Richard L. et al. The effect of apolipoprotein E genotype on serum lipoprotein particle response to exercise. **Atherosclerosis**, v. 188, n. 1, p. 126-133, 2006.

ST-AMAND, J. et al. Apolipoprotein E polymorphism and the relationships of physical fitness to plasma lipoprotein-lipid levels in men and women. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 5, p. 692-697, 1999.

TAIMELA, Simo et al. The effect of physical activity on serum total and low-density lipoprotein cholesterol concentrations varies with apolipoprotein E phenotype in male children and young adults: The Cardiovascular Risk in Young

Finns Study. **Metabolism- Clinical and Experimental**, v. 45, n. 7, p. 797-803, 1996.

THOMPSON, Paul D. et al. Apolipoprotein E genotype and changes in serum lipids and maximal oxygen uptake with exercise training. **Metabolism**, v. 53, n. 2, p. 193-202, 2004.

TOLPPANEN, Anna-Maija et al. Leisure-time physical activity from mid-to late life, body mass index, and risk of dementia. **Alzheimer's & Dementia**, v. 11, n. 4, p. 434-443. e6, 2015.

WAHEED, Huda Jaber; HADI, Huda Abdul Ridha; SHAFEK, Mostafa Abdulfatah. Vascular Endothelial Growth Factor as Predictive Marker for Hypertension in Iraqi Adults Patients. **Mustansiriya Medical Journal**, v. 15, n. 2, p. 4-4, 2018.

WALTHER, Diana et al. Hypertension, diabetes and lifestyle in the long-term—Results from a swiss population-based cohort. **Preventive medicine**, v. 97, p. 56-61, 2017.

WILCOX, Sara et al. Nutrition and physical activity interventions to reduce cardiovascular disease risk in health care settings: a quantitative review with a focus on women. **Nutrition reviews**, v. 59, n. 7, p. 197-214, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global report on diabetes**. World Health Organization, 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo revelou que as frequências alélicas foram similares das encontradas em outras regiões do mundo, prevalecendo a presença do alelo $\epsilon 3$ na amostra. Foram observadas associações significativas entre a presença do alelo $\epsilon 2$ e ser portador de AVC bem como de diabetes e hipertensão. O genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ apresentou associação significativa nos portadores de AVC, assim como observamos que o genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$ se expressou significativamente em menor frequência no grupo neste mesmo grupo. Não foram constatadas associações significativas da presença do alelo $\epsilon 4$ e a existência de diabetes, hipertensão ou AVC como apontado pela literatura. Os dados aqui encontrados também sugerem que os portadores do genótipo $\epsilon 3\epsilon 3$, com destaque para os homens, foram os que se associaram aos maiores tempos de atividade física semanal, se beneficiando dos efeitos da atividade física. Além disso observamos que houve uma prevalência no genótipo $\epsilon 2\epsilon 3$ no grupo de indivíduos sedentários portadores de AVC.

Por fim acreditamos que esta pesquisa de perfil genético, pode apresentar uma contribuição útil para futuros estudos prospectivos, tanto antropológicos quanto genéticos.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, Milena Garcia et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 6, p. 978-82, 2005.
- ADLER, Grażyna et al. Bosnian study of APOE distribution (BOSAD): a comparison with other European populations. **Annals of human biology**, v. 44, n. 6, p. 568-573, 2017.
- AL-HASHEL, Jasem Y. et al. Risk factors, subtypes, and outcome of ischemic stroke in Kuwait: A national study. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 9, p. 2145-2152, 2016.
- ALLOUBANI, Aladeen; SALEH, Abdulmoneam; ABDELHAFIZ, Ibrahim. Hypertension and Diabetes Mellitus as a Predictive Risk Factors for Stroke. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2018.
- ANTONINI, Tiago et al. Estudo de associação entre nível de atividade física, risco cardiovascular e o polimorfismo do gene da Apolipoproteína E em idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 1, p. 27-37, 2011.
- ANUURAD, Erdembileg et al. ApoE and ApoC-I polymorphisms: association of genotype with cardiovascular disease phenotype in African Americans. **Journal of lipid research**, v. 50, n. 7, p. 1472-1478, 2009.
- BAUER, Ursula E. et al. Prevention of chronic disease in the 21st century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA. **The Lancet**, v. 384, n. 9937, p. 45-52, 2014.
- BENKMANN, Heide G. et al. Distribution of apolipoprotein E genotypes in Asian Indians, Hungarians, and Papua New Guineans. **Anthropologischer Anzeiger**, p. 31-34, 1996.
- BENNET, Anna M. et al. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. **Jama**, v. 298, n. 11, p. 1300-1311, 2007.
- BERNSTEIN, Martine S. et al. Physical activity may modulate effects of ApoE genotype on lipid profile. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 22, n. 1, p. 133-140, 2002.
- BIFFI, Alessandro et al. Variants at APOE influence risk of deep and lobar intracerebral hemorrhage. **Annals of neurology**, v. 68, n. 6, p. 934-943, 2010.
- BODEN-ALBALA, Bernadette et al. Increased stroke risk and lipoprotein (a) in a multiethnic community: the Northern Manhattan Stroke Study. **Cerebrovascular Diseases**, v. 30, n. 3, p. 237-243, 2010.

BOOTH, Frank W.; ROBERTS, Christian K.; LAYE, Matthew J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1143, 2012.

BOUTHILLIER, Daniel; SING, C. F.; DAVIGNON, J. Apolipoprotein E phenotyping with a single gel method: application to the study of informative matings. **Journal of lipid research**, v. 24, n. 8, p. 1060-1069, 1983.

CASAS, Juan P. et al. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18 000 cases and 58 000 controls. **Archives of neurology**, v. 61, n. 11, p. 1652-1661, 2004.

CASTIEL, Luis David. Promoção de saúde e a sensibilidade epistemológica da categoria 'comunidade'. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 615-622, 2004.

CHAUDHARY, Rajesh et al. Apolipoprotein E gene polymorphism: effects on plasma lipids and risk of type 2 diabetes and coronary artery disease. **Cardiovascular diabetology**, v. 11, n. 1, p. 36, 2012.

CORBO, Rose Maria; SCACCHI, Renato. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE* 4 a thrifty'allele?. **Annals of human genetics**, v. 63, n. 4, p. 301-310, 1999.

DALLONGEVILLE, J.; LUSSIER-CACAN, S.; DAVIGNON, J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. **Journal of lipid research**, v. 33, n. 4, p. 447-454, 1992.

DAS, Satrupa et al. Association of APOE (E2, E3 and E4) gene variants and lipid levels in ischemic stroke, its subtypes and hemorrhagic stroke in a south Indian population. **Neuroscience letters**, v. 628, p. 136-141, 2016.

DAVIGNON, Jean et al. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. **Clinica Chimica Acta**, v. 286, n. 1-2, p. 115-143, 1999.

DAVIGNON, Jean; GREGG, Richard E.; SING, Charles F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. **Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.**, v. 8, n. 1, p. 1-21, 1988.

DE ARRUDA, Alaine Lima et al. ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE DA APOLIPOPROTEÍNA E FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES EM IDOSOS. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 23, n. 2, p. 41-46, 2016.

DE OTTAWA, Carta. Primeira conferência internacional sobre promoção da saúde. **Ottawa, novembro de**, 1986.

DOOLEY, James et al. Genetic predisposition for beta cell fragility underlies type 1 and type 2 diabetes. **Nature genetics**, v. 48, n. 5, p. 519, 2016.

DUNCAN, Bruce Bartholow et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de saúde pública= Journal of public health**. São Paulo. Vol. 46, supl. 1 (dez. 2012), p. 126-134, 2012.

EISENBERG, Dan TA; KUZAWA, Christopher W.; HAYES, M. Geoffrey. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 143, n. 1, p. 100-111, 2010.

ELABD, Dina et al. Apo E polymorphism among Egyptian patients with essential hypertension. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 4, p. 741-745, 2013.

EVERT, Alison B. et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. **Diabetes care**, v. 37, n. Supplement 1, p. S120-S143, 2014.

FARRER, Lindsay A. et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. **Jama**, v. 278, n. 16, p. 1349-1356, 1997.

FEIGIN, Valery L. et al. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 9, p. 913-924, 2016.

FERREIRA, Aparecido Pimentel et al. The effect of aerobic exercise intensity on attenuation of postprandial lipemia is dependent on apolipoprotein E genotype. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 1, p. 139-144, 2013.

FERREIRA, D. C. et al. Association of apolipoprotein E polymorphisms and metabolic syndrome in subjects with extreme obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 17-18, p. 1559-1562, 2011.

FLAUZINO, Tamires et al. Polimorfismos genéticos associados ao metabolismo lipídico envolvidos na fisiopatologia do acidente vascular encefálico isquêmico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 163-180, 2014.

FLORES-ALFARO, Eugenia et al. Marcadores genéticos relacionados con el desarrollo de síndrome metabólico y riesgo de enfermedad coronaria cardiaca. **Acta Universitaria**, v. 25, n. 1, 2015.

FLOßMANN, Enrico; SCHULZ, Ursula GR; ROTHWELL, Peter M. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. **Stroke**, v. 35, n. 1, p. 212-227, 2004.

FROHLICH, J. et al. Gender Differences in Plasma Levels of Lipoprotein (a) in Patients with Angiographically Proven Coronary Artery. **Physiol. Res**, v. 53, p. 481-486, 2004.

FULLERTON, Stephanie M. et al. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 4, p. 881-

900, 2000.

GATTÁS FIGARO, Gilka Jorge; FILHO WÜNSCH, Victor; SEGRE, Marco. Genética, biologia molecular e ética: as relações trabalho e saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, 2002.

GIL, Antônio Carlos. Como classificar as pesquisas. **Como elaborar projetos de pesquisa**, v. 4, p. 44-45, 2002.

GOLJAR, Nika et al. Functioning and disability in stroke. **Disability and rehabilitation**, v. 32, n. sup1, p. S50-S58, 2010.

GONÇALVES, E. C. A. et al. Baixos níveis de atividade física em servidores públicos do sul do Brasil: associação com fatores sociodemográficos, hipercolesterolemia e diabetes. **Revista Andaluza de Medicina del Deporte**, v. 10, n. 2, p. 54-59, 2017.

GUIMARÃES, Raphael Mendonça et al. Diferenças regionais na transição da mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil, 1980 a 2012. 2015.

HAGBERG, James M. et al. Apolipoprotein E genotype and exercise training—induced increases in plasma high-density lipoprotein (HDL)-and HDL2-cholesterol levels in overweight men. **Metabolism**, v. 48, n. 8, p. 943-945, 1999.

HALLAL, Pedro C. et al. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. **The lancet**, v. 380, n. 9838, p. 247-257, 2012.

HALLMAN, D. Michael et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. **American journal of human genetics**, v. 49, n. 2, p. 338, 1991.

HIXSON, James E.; VERNIER, Daniel T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. **Journal of lipid research**, v. 31, n. 3, p. 545- 548, 1990.

HORR, Samuel; NISSEN, Steven. Managing hypertension in type 2 diabetes mellitus. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 3, p. 445-454, 2016.

HU, Frank B. Globalization of diabetes. **Diabetes care**, v. 34, n. 6, p. 1249-1257, 2011.

HUMPHRIES, Steve E.; MORGAN, Laleh. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. **The Lancet Neurology**, v. 3, n. 4, p. 227-236, 2004.

IGNARRO, Louis J.; BALESTRIERI, Maria Luisa; NAPOLI, Claudio. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. **Cardiovascular research**, v. 73, n. 2, p. 326- 340, 2007.

KATHIRESAN, Sekar et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of

cardiovascular events. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 12, p. 1240-1249, 2008.

KATHIRESAN, Sekar; SRIVASTAVA, Deepak. Genetics of human cardiovascular disease. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1242-1257, 2012.

KEARNEY, Patricia M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **The lancet**, v. 365, n. 9455, p. 217-223, 2005.

KONIALIS, Christopher et al. The APOE E4 Allele Confers Increased Risk of Ischemic Stroke Among Greek Carriers. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, v. 25, n. 3, p. 471-478, 2016.

KOSTNER, G. M. et al. Lipoprotein Lp (a) and the risk for myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 38, n. 1-2, p. 51-61, 1981.

KUMAR, Amit et al. Identification of genetic contribution to ischemic stroke by screening of single nucleotide polymorphisms in stroke patients by using a case control study design. **BMC neurology**, v. 13, n. 1, p. 136, 2013.

LEE, I.-Min et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **The Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 219-229, 2012.

LEON, Arthur S. et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with blood lipids and maximal oxygen uptake in the sedentary state and after exercise training in the HERITAGE family study. **Metabolism**, v. 53, n. 1, p. 108-116, 2004.

LIU, Baoqiong et al. Genetics of intracerebral hemorrhage: Insights from candidate gene approaches. **Neurology India**, v. 60, n. 1, p. 3, 2012.

LÓPEZ-JARAMILLO, Patricio et al. Consenso latino-americano de hipertensão em pacientes com diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, n. 3, p. 205-225, 2014.

MAHLEY, Robert W.; WEISGRABER, Karl H.; HUANG, Yadong. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S183-S188, 2009.

MALHÃO, Thainá Alves et al. Sex differences in diabetes mellitus mortality trends in Brazil, 1980-2012. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0155996, 2016.

MALTA, Deborah Carvalho et al. Prevalência de fatores de risco e proteção para doenças crônicas não transmissíveis em adultos: estudo transversal, Brasil, 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 3, p. 423-434, 2013.

MALTA, Deborah Carvalho; MORAIS NETO, Otaliba Libânio de; SILVA JUNIOR,

Jarbas Barbosa da. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 425-438, 2011.

MALTA, Deborah Carvalho; SILVA JR, Jarbas Barbosa da. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 151-164, 2013.

MARANHÃO, R. et al. Lipoprotein (a) plasma levels in normal subjects and patients with coronary disease confirmed by coronary cineangiography. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 56, n. 2, p. 121-125, 1991.

MARANHÃO, Raul Cavalcante et al. Lipoprotein (a): structure, pathophysiology and clinical implications. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 103, n. 1, p. 76-84, 2014.

MARQUES-VIDAL, Pedro et al. Obesity and alcohol modulate the effect of apolipoprotein E polymorphism on lipids and insulin. **Obesity**, v. 11, n. 10, p. 1200-1206, 2003.

MASSA, Kaio Henrique Correa et al. Environmental factors and cardiovascular diseases: the association of income inequality and green spaces in elderly residents of São Paulo, Brazil. **BMJ open**, v. 6, n. 9, p. e011850, 2016.

MATSUDO, Sandra et al. Questionário Internacional De Atividade Física (Ipaq): Estudo De Validade E Reprodutibilidade No Brasil. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 6, n. 2, p. 5-18, 2012.

MC AULEY, Mark T.; MOONEY, Kathleen M. Computationally modeling lipid metabolism and aging: a mini-review. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 13, p. 38-46, 2015.

MCCARRON, Mark O.; DELONG, David; ALBERTS, Mark J. APOE genotype as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease A meta-analysis. **Neurology**, v. 53, n. 6, p. 1308- 1308, 1999.

MCCARTHY, Mark I. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 24, p. 2339-2350, 2010.

MENDONÇA, Gulnar Azevedo Silva. Tendências da investigação epidemiológica em doenças crônicas. 2001.

MESCHIA, James F. et al. Guidelines for the primary prevention of stroke. **Stroke**, v. 45, n. 12, p. 3754-3832, 2014.

MURAI, A. et al. Lp (a) lipoprotein as a risk factor for coronary heart disease and cerebral infarction. **Atherosclerosis**, v. 59, n. 2, p. 199-204, 1986.

MURRAY, Christopher JL et al. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990

and projected to 2020: summary. 1996.

MUTCH, David M.; CLÉMENT, Karine. Unraveling the genetics of human obesity. **PLoS genetics**, v. 2, n. 12, p. e188, 2006.

NASCIMENTO, Thales Boaventura Rachid; GLANER, Maria Fátima; NÓBREGA, Otávio de Toledo. Influência do gene da apolipoproteína-E sobre a relação perfil lipídico, atividade física e gordura corporal. **Rev. bras. cineantropom. desempenho hum**, v. 14, n. 2, p. 221- 231, 2012.

NASSIF, Melissa Calegari; HOPPE, Juliana; SALBEGO, Christianne Gazzana. Colesterol, apoeε4 e estatinas: Implicações na doença de alzheimer. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 17, n. 5/6, p. 46-49, 2013.

NI, Xiaoqing; ZHANG, Jiawei. Association between 9p21 genomic markers and ischemic stroke risk: evidence based on 21 studies. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90255, 2014.

OBISESAN, Thomas O. et al. APOE genotype affects black-white responses of high-density lipoprotein cholesterol subspecies to aerobic exercise training. **Metabolism**, v. 57, n. 12, p. 1669-1676, 2008.

ONG, Cheung-Ter et al. Risk Factors for In-Hospital Mortality among Ischemic Stroke Patients in Southern Taiwan. **International Journal of Gerontology**, v. 10, n. 2, p. 86-90, 2016.

ORTH, Matthias; BELLOSTA, Stefano. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. **Cholesterol**, v. 2012, 2012.

PANZA, Francesco et al. Decreased frequency of apolipoprotein E ε4 allele from northern to southern Europe in Alzheimer's disease patients and centenarians. **Neuroscience letters**, v. 277, n. 1, p. 53-56, 1999.

PETRIE, John R.; GUZIK, Tomasz J.; TOUYZ, Rhian M. Diabetes, hypertension and cardiovascular disease: Clinical insights and vascular mechanisms. **Canadian Journal of Cardiology**, 2017.

PHILLIPS, Michael C. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. **IUBMB life**, v. 66, n. 9, p. 616-623, 2014.

POVEL, CM1 et al. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. **Obesity reviews**, v. 12, n. 11, p. 952-967, 2011.

RAICHLIN, David A.; ALEXANDER, Gene E. Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan. **Trends in neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 247-255, 2014.

RASELLA, Davide et al. Impact of primary health care on mortality from heart and cerebrovascular diseases in Brazil: a nationwide analysis of longitudinal data. **Bmj**, v. 349, p. g4014, 2014.

REALES, Guillermo et al. New insights into the distribution of APOE polymorphism in the Iberian Peninsula. The case of Andalusia (Spain). **Annals of human biology**, v. 41, n. 5, p. 443-452, 2014.

REINER, Miriam et al. Long-term health benefits of physical activity—a systematic review of longitudinal studies. **BMC public health**, v. 13, n. 1, p. 813, 2013.

RIQUE, Ana Beatriz Ribeiro et al. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev Bras Med Esporte**, v. 8, n. 6, p. 244-54, 2002.

ROVIO, Suvi. **The effect of physical activity and other lifestyle factors on dementia, Alzheimer's disease and structural brain changes**. Institutionen för neurobiologi, vårdvetenskap och samhälle/Department of Neurobiology, Care Sciences and Society, 2008.

SAIKI, R. K. et al. Polymerase chain reaction. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SANDHOLZER, C. et al. High frequency of the apo ϵ 4 allele in Khoi San from South Africa. **Human genetics**, v. 95, n. 1, p. 46-48, 1995.

SCHIELE, F. et al. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. **Atherosclerosis**, v. 152, n. 2, p. 475-488, 2000.

SCHMIDT, Maria Inês et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SCHREINER, Pamela J. et al. Lipoprotein [a] and Incident Ischemic Stroke. **Circulation**, v. 97, n. 8, p. 818, 1998.

SCHWANKE, Carla Helena Augustin et al. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, n. 6, p. 561-70, 2002.

SCHWANKE, Carla Helena Augustin et al. Análise da associação entre polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovasculares em idosos longevos. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, n. 6, p. 561-70, 2002.

SEIP, Richard L. et al. The effect of apolipoprotein E genotype on serum lipoprotein particle response to exercise. **Atherosclerosis**, v. 188, n. 1, p. 126-133, 2006.

SHCHERBAK, Natalia S. Apolipoprotein E gene polymorphism is not a strong risk factor for diabetic nephropathy and retinopathy in Type I diabetes: case-control study. **BMC medical genetics**, v. 2, n. 1, p. 8, 2001.

SINGH, P. P.; SINGH, M.; MASTANA, S. S. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. **Annals of human biology**, v. 33, n. 3, p. 279-308, 2006.

SONG, Yiqing; STAMPFER, Meir J.; LIU, Simin. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. **Annals of internal medicine**, v. 141, n. 2,

p. 137-147, 2004.

SOUZA, Aline Corrêa de et al. A educação em saúde com grupos na comunidade: uma estratégia facilitadora da promoção da saúde. **Revista gaúcha de enfermagem. Porto Alegre. vol. 26, n. 2 (ago. 2005), p. 147-153, 2005.**

SPARKS, D. Larry. Coronary artery disease, hypertension, ApoE, and cholesterol: a link to Alzheimer's disease?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 826, n. 1, p. 128- 146, 1997.

ST-AMAND, J. et al. Apolipoprotein E polymorphism and the relationships of physical fitness to plasma lipoprotein-lipid levels in men and women. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 5, p. 692-697, 1999.

SUDLOW, Cathie et al. Does apolipoprotein E genotype influence the risk of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, or subarachnoid hemorrhage?: systematic review and meta-analyses of 31 studies among 5961 cases and 17 965 controls. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 37, n. 2, p. 364, 2006.

SUNG, Ki-chul et al. Inflammation in the Prediction of Type 2 Diabetes and Hypertension in Healthy Adults. **Archives of medical research**, v. 48, n. 6, p. 535-545, 2017.

SUVATHA, Arati et al. Apolipoprotein E polymorphism and the risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in a South Indian population. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 22, n. 1, p. 25, 2017.

TABATABAEI-MALAZY, Ozra et al. Apolipoprotein E gene polymorphism and its effect on anthropometric measures in normoglycemic subjects and type 2 diabetes. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 11, n. 1, p. 18, 2012.

TAI, Leon M. et al. The role of APOE in cerebrovascular dysfunction. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 5, p. 709-723, 2016.

TAIMELA, Simo et al. The effect of physical activity on serum total and low-density lipoprotein cholesterol concentrations varies with apolipoprotein E phenotype in male children and young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Metabolism- Clinical and Experimental**, v. 45, n. 7, p. 797-803, 1996.

TANG, Yishu; YANG, Yang. The Correlation Between ApoE Genetic Polymorphism and Serum Lipid Levels. **Cardiology and Cardiovascular Medicine**, v. 2, n. 2, p. 39-43, 2018.

TAO, Meng Hua et al. Different associations of apolipoprotein E polymorphism with metabolic syndrome by sex in an elderly Chinese population. **Metabolism**, v. 60, n. 10, p. 1488-1496, 2011.

THOMPSON, Paul D. et al. Apolipoprotein E genotype and changes in serum lipids and maximal oxygen uptake with exercise training. **Metabolism**, v. 53, n. 2, p. 193-

202, 2004.

TIRET, L. Genetics of cardiovascular diseases—from single mutations to the whole genome. **Journal des Maladies Vasculaires**, v. 33, p. S7, 2008.

TOLPPANEN, Anna-Maija et al. Leisure-time physical activity from mid-to late life, body mass index, and risk of dementia. **Alzheimer's & Dementia**, v. 11, n. 4, p. 434-443. e6, 2015.

TORRES-PEREZ, Elena et al. Apolipoprotein E4 association with metabolic syndrome depends on body fatness. **Atherosclerosis**, v. 245, p. 35-42, 2016.

UKKOLA, Olavi et al. Apolipoprotein E phenotype is related to macro- and microangiopathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 101, n. 1, p. 9- 15, 1993.

UTERMANN, G.; PRUIN, N.; STEINMETZ, A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. **Clinical genetics**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 1979.

VENTI, Michele; PARNETTI, Lucilla; GALLAI, Virgilio. Genetics of ischemic stroke. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 24, n. 7-8, p. 531-534, 2002.

VIJAYAN, Murali et al. MTHFR (C677T) CT genotype and CT-apoE3/3 genotypic combination predisposes the risk of ischemic stroke. **Gene**, v. 591, n. 2, p. 465-470, 2016.

VIRANI, Salim S. et al. Associations between lipoprotein (a) levels and cardiovascular outcomes in African Americans and Caucasians: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Circulation**, p. CIRCULATIONAHA. 111.045120, 2011.

WAHEED, Huda Jaber; HADI, Huda Abdul Ridha; SHAFEK, Mostafa Abdulfatah. Vascular Endothelial Growth Factor as Predictive Marker for Hypertension in Iraqi Adults Patients. **Mustansiriya Medical Journal**, v. 15, n. 2, p. 4-4, 2018.

WALTHER, Diana et al. Hypertension, diabetes and lifestyle in the long-term—Results from a swiss population-based cohort. **Preventive medicine**, v. 97, p. 56-61, 2017.

WANG, Guijing et al. Annual Total Medical Expenditures Associated with Hypertension by Diabetes Status in US Adults. **American journal of preventive medicine**, v. 53, n. 6, p. S182-S189, 2017.

WEI, Loo Keat et al. Polymorphisms of MTHFR, eNOS, ACE, AGT, ApoE, PON1, PDE4D, and ischemic stroke: meta-analysis. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 26, n. 11, p. 2482-2493, 2017.

WHO, Joint; CONSULTATION, FAO Expert. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. 2003.

WILCOX, Sara et al. Nutrition and physical activity interventions to reduce cardiovascular disease risk in health care settings: a quantitative review with a focus on women. **Nutrition reviews**, v. 59, n. 7, p. 197-214, 2001.

WILSON, Peter WF et al. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 16, n. 10, p. 1250-1255, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global report on diabetes**. World Health Organization, 2016.

XU, Jie et al. A Comparison of mortality prognostic scores in ischemic stroke patients. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 2, p. 241-247, 2016.

XUE, Pei et al. A meta-analysis of apolipoprotein E gene $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ polymorphism for gallbladder stone disease. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45849, 2012.

YU, Bo et al. Association of apolipoprotein E polymorphism with maximal oxygen uptake after exercise training: a study of Chinese young adult. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 40, 2014.

YUE, Lili; MAZZONE, Theodore. Endogenous adipocyte apoE is co-localized with caveolin at the adipocyte plasma membrane. **Journal of lipid research**, p. jlr. M011809, 2010.

ZANNIS, Vassilis I. et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. **Journal of lipid research**, v. 23, n. 6, p. 911-914, 1982.

ZARKESH, Maryam et al. Is there any association of apolipoprotein E gene polymorphism with obesity status and lipid profiles? Tehran Lipid and Glucose Study (TLGS). **Gene**, v. 509, n. 2, p. 282-285, 2012.

ZENDE, P. D. et al. Apolipoprotein e gene polymorphism and its effect on plasma lipids in arteriosclerosis. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 10, p. 2149, 2013.

ZHANG, Lin-Feng et al. Proportion of different subtypes of stroke in China. **Stroke**, v. 34, n. 9, p. 2091-2096, 2003.

APÊNDICE 1**QUESTIONÁRIO AUTO ADMINISTRADO**

Nome: _____

1. Sexo: Masculino Feminino**2. Idade:**

_____ Anos completos.

3. Estado Civil: Solteiro(a) Casado(a) Separado(a) / Divorciado(a) Viúvo(a) Vivo com companheira Vivo com companheiro**4. Naturalidade:** Brasileiro(a) Estrangeiro(a) naturalizado(a)

Qual país? _____

5. Estado de origem: _____**6. Em seu município de origem você morava na região:** Urbana (cidade) Rural (fazenda, sítio, chácara, aldeia, vila agrícola, etc.)**7. Município em que mora hoje:** _____**8. Com quem você mora? (múltipla escolha)** Pais Cônjuge Companheiro (a) Filhos Sogros

- Parentes
- Amigos
- Empregados domésticos
- Outros
- (ou) Sozinho (a)

9. Em relação à cor da pele, você se considera:

- Branco
- Pardo
- Negro
- Amarelo (oriental)
- Vermelho (indígena)
- Prefiro não declarar

10. Entre seus familiares, há pessoas que tem a cor da pele diferente da sua?

- Sim, uma
- Sim, algumas
- Sim, a maioria
- Não

11. Atualmente você:

- Apenas estuda
- Trabalha e estuda
- Apenas trabalha
- Está desempregado (a)
- Está de licença ou incapacitado de estudar / trabalhar
- Está aposentado (a)
- Não trabalha nem estuda

12. Qual é a sua renda familiar mensal?

- Menos de 1 salário mínimo (até R\$937)
- De um a dois salários mínimos (entre R\$937 e R\$1.874)
- De dois a cinco salários mínimos (entre R\$1.874 e R\$4.685)
- De cinco a dez salários mínimos (entre R\$4.685 e R\$9.370)
- Mais de dez salários mínimos (acima de R\$9.370)
- Prefiro não declarar

13. Quantas pessoas (contando com você) contribuem para a renda da sua família?

- Uma
- Duas
- Três
- Quatro
- Cinco
- Seis
- Sete
- Oito
- Nove
- Dez
- Mais. Quantas? ____

14. Apresenta ou já apresentou:
Hipertensão? Sim() Não()

Se sim, há quanto tempo? _____

15. Diabetes? Sim() Não()

() tipo 1 () tipo 2 () faz uso de insulina

16. Câncer? Qual? Sim() Não()

17. Doença cardíaca? Sim() Não()

18. Doença respiratória. Qual? _____ Sim() Não()

19. Depressão? Sim() Não()

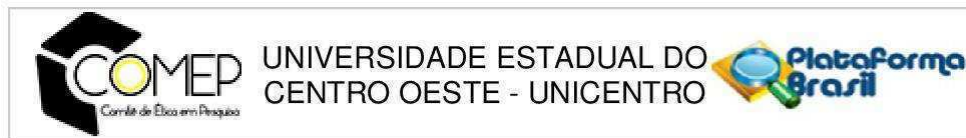
20. Doença neurológica? Qual? _____ Sim() Não()

21. Fuma ou já fumou no passado? Sim() Não()

22. Faz uso habitual de algum medicamento. Qual? _____
Sim() Não()

23. Quantas vezes por semana pratica atividade física? () não pratico 1vez() 2vezes()
3vezes() mais de 3 vezes()

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE FÍSICA NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM POLIMORFISMO DA APOLIPROTEINA E

Pesquisador: Simone Mader Dall'Agnol

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66921317.0.0000.0106

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Patrocinador Principal: Fundação Araucária

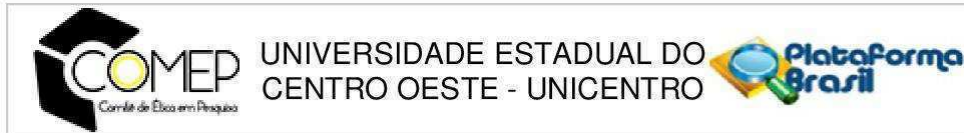
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.124.874

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apreciação do projeto de pesquisa intitulado ATIVIDADE FÍSICA NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM POLIMORFISMO DA APOLIPROTEINA E, de interesse e responsabilidade do(a) proponente Simone Mader Dall'Agnol, a presente pesquisa propõe um estudo do tipo transversal, quase-experimental com delineamento Ex post facto. Os dados serão coletados nas dependências das unidades representativas do programa Hiperdia - sistema de gestão clínica de hipertensão arterial e diabetes mellitus da atenção básica (Bom Sucesso, Vila Carli e Morro Alto) da cidade de Guarapuava-PR, nas dependências das Clínicas Integradas Guairacá de propriedade da Faculdade Guairacá (FAG), e nas dependências da Clínica Escola de Fisioterapia da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) na cidade de Guarapuava - PR. Todo o processo de extração de DNA e sua análise serão realizados nas dependências do Laboratório de Biologia (AMBIOTEC) da UNICENTRO Campus Cedeteg. A amostra será composta por 150 indivíduos de ambos os gêneros, os quais serão divididos em três grupos: Grupo G1 (indivíduos participantes do Programa Hiperdia das Unidades Básicas de Saúde do Bom Sucesso, Vila Carli e Morro Alto da cidade de Guarapuava-Pr); Grupo G2 (pacientes com diagnóstico clínico de Acidente Vascular Cerebral das clínicas escola de fisioterapia da UNICENTRO e Faculdade Guairacá); e Grupo G3 (indivíduos sem histórico clínico de doenças cardiovasculares). Após concordância através do TCLE

Endereço: Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 2.124.874

será aplicado um questionário auto-administrado (APÊNDICE IV), o qual contará com os dados sociodemográficos culturais e de saúde tais como: idade, sexo, etnia, escolaridade, situação conjugal, diagnóstico de hipertensão, diabetes, entre outras. A composição corporal será avaliada através da bioimpedância utilizando-se da Balança HBF-514C de Controle Corporal de Corpo Inteiro – Omron a qual permitirá uma maior precisão na avaliação da composição corporal. Em seguida será avaliada a função cardíaca através do eletrocardiograma Wincardio Air que permitirá identificar se algum dos participantes do estudo apresenta alterações cardíacas significativas. Na determinação da força de membros inferiores, relação direta com o nível de atividade física, será aplicado o teste de salto na Plataforma de saltos jump test Hidrofit. Este consiste que o voluntário realize diferentes saltos em diversas intensidades sobre uma plataforma que registra os dados em um software analisando a potência anaeróbica dos membros inferiores. Para verificar o nível de atividade física será aplicado o Questionário Internacional de Nível de Atividade Física (IPAQ) versão curta (ANEXO II). Segundo Gonçalves et al., (2016), este questionário afere o nível de atividade física realizada pelo indivíduo na semana anterior. O mesmo é composto por oito questões as quais geram cinco categorias de acordo com as respostas relatadas sendo estas: muito ativo; ativo; irregularmente ativo A; irregularmente ativo B e sedentário. Em seguida será coletado células da mucosa oral e extração do DNA dos participantes para a avaliação genética dos polimorfismos da Apoproteína E, utilizando como base o protocolo de extração de Abrão et al., (2005). Os voluntários serão orientados a bochechar previamente com 100ml de água destilada e a coleta será realizada raspando a face interna das bochechas com swabs (cotonetes) estéreis, realizando movimentos circulares aproximadamente 30 vezes. Em seguida os cotonetes terão a porção externa das hastes cortadas e colocadas em microtubos de 2ml. As amostras colhidas serão armazenadas em geladeira por período de 2 a 30 dias antes da extração.

Objetivo da Pesquisa:

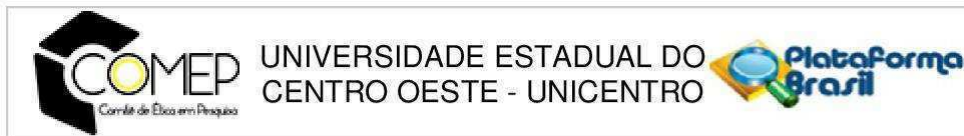
Objetivo Primário:

Verificar a influência da atividade física na apresentação fenotípica do polimorfismo da Apolipoproteína E entre os indivíduos analisados.

Objetivo Secundário:

Comparar o polimorfismo do gene da Apolipoproteína E entre indivíduos que sofreram AVE, portadores de hipertensão e/ou diabetes e sem patologia. Correlacionar o polimorfismo da Apo E com a composição corporal e força em membros inferiores

Endereço: Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 2.124.874

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos da presente pesquisa incluem constrangimento do colaborador ao responder o questionário IPAQ, o questionário autoadministrado e ao realizar o teste de bioimpedância na balança de controle corporal, porém isto será atenuado com a aplicação dos mesmos sendo efetuados em um ambiente individual, estando somente presentes o colaborador e o pesquisador, o qual estará presente para que sejam sanadas possíveis dúvidas referentes ao preenchimento dos dados. Outro possível risco é a ocorrência de queda durante o procedimento para avaliação da força em membros inferiores na plataforma de força. Caso isto ocorra o colaborador será amparado e encaminhado a uma unidade de saúde sendo todos os gastos cobertos pelo pesquisador, porém o pesquisador tomará as devidas precauções para que o colaborador realize o teste com segurança, dando-lhe apoio caso necessitar e retirando qualquer objeto das proximidades da realização do teste. Mesmo sendo tomadas as devidas precauções e orientações quanto a coleta do material para a avaliação genética, poderá ocorrer lesão da mucosa oral durante o procedimento da raspagem da mesma. Caso isto ocorra o indivíduo será amparado, sendo levado a uma unidade básica de saúde e todos os custos serão por conta do pesquisador. Os voluntários serão assistidos e auxiliados a todo o momento pelo pesquisador, tornando o risco muito baixo a todos os participantes. O Comitê de ética em pesquisa (COMEP) será informado de todos os efeitos adversos ou fatores relevantes que alterem o curso normal do estudo.

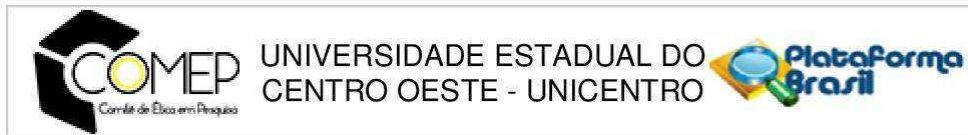
Benefícios:

A presente pesquisa se apresenta com forte impacto econômico já que conhecendo a variabilidade genética e sua interação com fenótipos complexos que resultam da predisposição para doenças crônicas, medidas protetoras podem ser implantadas e executadas gerando menos custos governamentais estimulando assim novas políticas públicas na prevenção do AVE. Ademais, esta pesquisa, expressa caráter de impacto social, já que a população atingida pela mesma terá uma melhor percepção das causas envolvidas nos processos de doenças crônicas podendo estas se precaverem das consequências associadas a estas doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa apresenta relevância científica com método adequado para atingir aos objetivos propostos

Endereço: Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 2.124.874

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- (1) Folha de rosto: de acordo assinada pela vice-coordenadora do programa de pós graduação em desenvolvimento comunitário Cristina Fuginaga.
- (2) Carta de anuência: de acordo, sendo assinada pela diretora da clinica escola da guairaca, Bianca Garcia; pelo diretor da clinica escola de fisioterapia da UNICENTRO Luciano Pavan Rossi e pela secretária de saúde municipal Renata Cristina Freitas Brito Araujo.
- (3) TCLE: de acordo
- (4) Cronograma de acordo.
- (5) Orçamento: de acordo
- (6) Projeto completo: anexado
- (7) Instrumento para coleta dos dados: anexado

Recomendações:

Ressalta-se que segundo a Resolução CNS/MS-466/2012, item XI – DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, parágrafo f), é de responsabilidade do pesquisador "manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PROJETO CONSIDERADO APROVADO: A presente pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/2012. Este CEP considera que todos os esclarecimentos necessários foram devidamente prestados, estando este projeto de pesquisa apto a ser realizado, devendo-se observar as informações presentes no item "Recomendações".

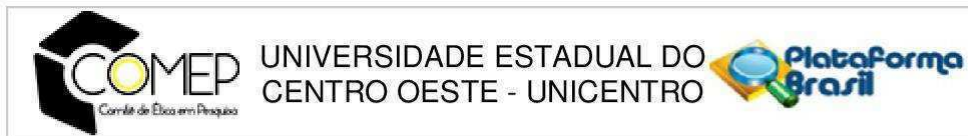
Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO

Em atendimento à Resolução CNS/MS- 466/2012, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e relatório final em até trinta dias após o término da pesquisa.

Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê.

Endereço: Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carlí **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 2.124.874

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_874976.pdf	11/05/2017 16:40:14		Aceito
Folha de Rosto	folha_ass_11_05.pdf	11/05/2017 16:36:38	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Orçamento	orcamento_plataforma.pdf	03/03/2017 18:16:48	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Outros	SEC_SAUDE_ASS.pdf	03/03/2017 15:19:01	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_auto_administrado_pdf.pdf	03/03/2017 15:17:29	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Outros	lpaq_versao_curta_questionario.pdf	03/03/2017 15:16:26	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Outros	CHECK_LIST_COMEP_MESTRADO_pdf.pdf	03/03/2017 15:14:13	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Outros	carta_autorizacao_unicentro.pdf	03/03/2017 15:13:14	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Outros	carta_autorizacao_guairaca.pdf	03/03/2017 15:12:18	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_PDF.pdf	03/03/2017 15:09:17	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado_plataforma_03_03.pdf	03/03/2017 15:08:29	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_pdf.pdf	03/03/2017 15:06:13	Simone Mader Dall'Agnol	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GUARAPUAVA, 19 de Junho de 2017

Assinado por:
Roberta Leticia Krüger
(Coordenador)

Endereço: Rua Simeão Camargo Varella de Sá, 03 - Campus CEDETEG - (ao lado do Departamento de Nutrição)
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-080
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep_unicentro@yahoo.com.br

ANEXO 2

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PROPESP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COMEP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado(a) Colaborador(a),

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa **Atividade física na modulação da expressão gênica em polimorfismo da apolipoproteína E**, sob a responsabilidade do **professor Luis Paulo Gomes Mascarenhas e da aluna Simone Mader Dall’Agnol**. O presente estudo tem como objetivo investigar a influência da atividade física na apresentação de alterações genéticas que podem levar a doenças crônicas cardiovasculares como o acidente vascular cerebral (AVC), além disso, analisar se essas alterações estão presentes em portadores de AVC. Também tem como objetivo correlacionar essas alterações genéticas com a composição corporal e a força dos membros inferiores.

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo COMEP/UNICENTRO.

DADOS DO PARECER DE APROVAÇÃO

emitido Pelo Comitê de Ética em Pesquisa, COMEP-UNICENTRO

Número do parecer:

Data da relatoria: ___/___/201___

1. PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA: Ao participar desta pesquisa você estará ajudando a demonstrar a população os benefícios da atividade física na diminuição da apresentação de doenças crônicas como o AVC. A participação no estudo será respondendo os questionários oferecidos pelo pesquisador de forma simples, clara e objetiva. Serão aplicados dois questionários: um levantará dados do perfil socioeconômico cultural e o outro irá mensurar o quanto de atividade física o colaborador (a) realiza na semana. Para a avaliação genética será coletado de sua boca uma quantidade de células através da raspagem da sua bochecha interna. Este material será coletado utilizando de cotonetes específicos para essa coleta e após seu material será analisado em laboratório especializado. Em todos os momentos da coleta o pesquisador estará sempre junto para esclarecer possíveis dúvidas. Lembramos que a sua participação é voluntária, você tem a liberdade de não querer participar, e pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter iniciado o preenchimento dos questionários ou ter passado pelas avaliações e coletas de exames, sem nenhum prejuízo para você.

2. RISCOS E DESCONFORTOS: A coleta dos dados dos questionários de perfil socioeconômico cultural (auto administrado) e do questionário que avalia o nível de atividade física (IPAQ) poderão trazer algum desconforto mínimo como constrangimento ou a presença de dúvidas quanto as perguntas, isto será reduzido pela presença constante da pesquisadora para que sejam sanadas as dúvidas. Durante o procedimento de coleta de células da mucosa da bochecha poderá haver risco mínimo de lesão deste tecido durante o procedimento da raspagem da mesma. Caso isto ocorra, o (a) colaborador (a) será amparado (a), sendo levado (a) a uma unidade básica de saúde e todos os custos serão por conta da pesquisadora. Este risco será amenizado pois a pesquisadora fará toda a coleta com delicadeza e técnica para que o material seja coletado sem gerar nenhum dano ao (a) colaborador (a). Caso você necessite de algum



Comitê de Ética em Pesquisa da UNICENTRO – COMEP
Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Campus CEDETEG
Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Vila Carli / CEP: 85040-080 – Guarapuava – PR
Bloco de Departamentos da Área da Saúde /Telefone: (42) 3629-8177

tratamento por se sentir prejudicado por causa da pesquisa, ou sofrer algum dano decorrente da pesquisa, a pesquisadora se responsabiliza pela assistência integral, imediata e gratuita.

3. BENEFÍCIOS: Os benefícios esperados com o estudo são no sentido de apresentar forte impacto econômico já que conhecendo alterações genéticas específicas medidas protetoras podem ser implantadas e executadas gerando menos custos para o governo, estimulando assim medidas de prevenção do AVC. Também apresenta como benefício melhorar a percepção dos colaboradores diante das causas envolvidas nos processos de doenças crônicas podendo estas se precaverem das consequências associadas a estas doenças.

4. CONFIDENCIALIDADE: Todas as informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer ou que sejam conseguidas por prontuários, fichas de avaliação ou questionários serão utilizadas somente para esta pesquisa. Seus (Suas) respostas, dados pessoais, dados de exames genéticos, avaliações físicas ficarão em segredo e o seu nome não aparecerá em lugar nenhum dos(as) questionários nem quando os resultados forem apresentados.

5. ESCLARECIMENTOS: Se tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, pode procurar a qualquer momento o pesquisador responsável.

Nome do pesquisador responsável:

- Luis Paulo Gomes Mascarenhas

Endereço: PR 153, Km 7, s/n - Riozinho, Irati - PR, 84500-000

Telefone para contato: (42) 3421-3000

Horário de atendimento: quartas, quintas e sextas das 8:00 às 18:00 hrs.

- Simone Mader Dall'Agnol

Endereço: Rua Quintino Bocaiuva 421, bairro Trianon

Telefone para contato: (42) 98825-8976/ (42) 3035-7189

Horário de atendimento: segunda à sexta das 8:00 às 18:00 hrs.

6. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS: Caso o(a) Sr.(a) aceite participar da pesquisa, não receberá nenhuma compensação financeira.

7. CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO: Se o(a) Sr.(a) estiver de acordo em participar deverá preencher e assinar o Termo de Consentimento Pós-esclarecido que se segue, em duas vias, sendo que uma via ficará com você.

=====

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador(a) da cédula de identidade _____, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando



Comitê de Ética em Pesquisa da UNICENTRO – COMEP
 Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Campus CEDETEG
 Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Vila Carli / CEP: 85040-080 – Guarapuava – PR
 Bloco de Departamentos da Área da Saúde / Telefone: (42) 3629-8177

quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa.
E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Guarapuava, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante / Ou Representante legal

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Acadêmico



Comitê de Ética em Pesquisa da UNICENTRO – COMEP
Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Campus CEDETEG
Endereço: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Vila Carli / CEP: 85040-080 – Guarapuava – PR
Bloco de Departamentos da Área da Saúde / Telefone: (42) 3629-8177

ANEXO 3



QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA –
VERSÃO CURTA -

Nome: _____
Data: ____/____/____ Idade : ____ Sexo: F () M ()

As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: ____ Minutos: ____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar

moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias _____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?
_____horas _____minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?
_____horas _____minutos

