

ICESP / FACULDADES PROMOVE

**INDICADORES ANTROPOMÉTRICOS E FATORES DE  
RISCO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO A ASPECTOS  
IMUNOLÓGICOS E GENÉTICO EM IDOSOS**

APARECIDO PIMENTEL FERREIRA

Brasília

2011

APARECIDO PIMENTEL FERREIRA

**INDICADORES ANTROPOMÉTRICOS E FATORES DE  
RISCO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO A ASPECTOS  
IMUNOLÓGICOS E GENÉTICO EM IDOSOS**

Projeto de Pesquisa submetido ao Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa (NIP) da Faculdade ICESP/ Faculdades Promove como requisito obrigatório, para participação do processo seletivo do Edital ICESP / Faculdades Promove: 01/2011, referente ao Programa Institucional Interno de Criação, Consolidação e Apoio a Grupos de Pesquisa.

Proponente: Dr. Aparecido Pimentel Ferreira

Brasília

2011

**Título do Grupo:** Grupo de Estudos em Fisiologia e Saúde - GEFS

**Líder do grupo:** Aparecido Pimentel Ferreira

**Área predominante:** Saúde

**Resumo:**

**Introdução:** alguns indicadores antropométricos têm sido comumente analisados como preditores de ocorrências relevantes tais como Síndrome Metabólica e risco para doenças cardiovasculares. Adicionalmente, alguns genes estão associados ao risco aumentado de aparecimento de fatores de risco cardiovascular. **Objetivo:** verificar a associação entre indicadores antropométricos e fatores de risco cardiovascular em idosos em detrimento a aspectos imunológicos e genéticos. **Materiais e Métodos:** a amostra será constituída por 200 idosos residentes em instituições de abrigo a idosos na cidade de Brasília. Os critérios de inclusão serão: ser residente em casa de abrigos para idosos, ter mais de 65 anos de idade, assinar o termo TCLE e participar de todas as coletas de dados. Para realização do presente estudo será necessário verificar as medidas antropométricas e fatores de risco cardiovascular nos idosos. Para a seleção dos pontos de corte de cada um dos indicadores antropométricos que possa apresentar associação com os fatores de risco cardiovasculares será adotada a análise a partir da técnica das curvas ROC (receiver operating characteristic). A curva ROC será gerada pela plotagem da sensibilidade no eixo y em função de 1 - especificidade - no eixo x. O critério utilizado para obtenção dos pontos de corte serão os valores com sensibilidade e especificidade mais próximos entre si e não inferiores a 60%. A significância estatística de cada análise será verificada pela área sob a curva ROC e pelo intervalo de confiança a 95% (IC95%). A análise estatística dos dados será realizada por meio dos programas Stata<sup>tm</sup>, versão 9.1, e SPSS 11.5.

## Quadro Avaliativo

<b>Crêterios de análise</b>	<b>Nota</b>	<b>Nota máxima</b>
Titula�o do proponente do projeto (especialista = 1 ponto, mestre = 2 pontos, doutor, pós doutor e livre docente =3 pontos).		3
Experiência em orienta�o de trabalhos de conclusão de curso (gradua�o = 1 ponto, especializa�o = 2 pontos, mestrado e doutorado = 3 pontos).		3
Envolvimento do Projeto (alunos de apenas um curso = 1 ponto, alunos de mais de um curso = 2 pontos).  Observa�o: se envolve a comunidade = mais 1 ponto.		3
Publica�es do grupo de professores proponentes do projeto (uma publica�o nacional = 0.5 ponto; uma publica�o Qualis B = 1 ponto; uma publica�o Qualis A = 2 pontos; mais de 3 publica�es entre os Qualis A e B = 3 pontos).		3
Mérito técnico-científico, originalidade, defini�o dos objetivos e a sua adesão aos termos deste edital.		2
Adequa�o do método a ser utilizado no projeto ao(s) objetivo(s) proposto(s).		2
Aplicabilidade e relevância para o desenvolvimento científico, tecnológico, econ�mico, ambiental e social aplicada às diferentes áreas do conhecimento.		2
O potencial multiplicador do projeto para a gera�o de conhecimento e produtos tecnológicos.		1
Infraestrutura disponível na institui�o para a realiza�o das atividades de pesquisa relativas ao desenvolvimento dos projetos propostos.		1

**Pesquisadores:**

<b>Nome</b>	<b>Titulação</b>	<b>CPF</b>	<b>Data de nascimento</b>
Aparecido Pimentel Ferreira	Doutor	90561066949	28/09/1977
Nanci Maria de França <sup>1</sup>	Doutora	06512478547	20/04/1960
Otávio de Toledo Nóbrega <sup>2</sup>	Doutor	64597148191	11/10/1973
Édis Rodrigues Junior	Mestre	78447356191	09/03/1977
Diogenes de Moraes	Especialista		16/07/1973
Joaquim Xavier da Silva <sup>3</sup>	Mestre	47801000110	09/09/1974

<sup>1</sup> Professora da Universidade Católica de Brasília – UCB

<sup>2</sup> Professor da Universidade de Brasília – UnB

<sup>3</sup> Professor da Univesidade Paulista - UNIPe do Hospital Regional da Asa Norte – HRAN

**Discentes:**

<b>Nome</b>	<b>Curso</b>	<b>CPF</b>	<b>Data de nascimento</b>
Moisés Wesley de Macedo Pereira	Enfermagem		
Simone Soares da Silva	Biomedicina		
Alaine Lima de Arruda	Enfermagem		
Ana Paula Barreto	Enfermagem		
Daniela Silva Luz	Enfermagem		
Elisa H. R. V. Boas	Enfermagem		
Jeieli Viana	Enfermagem		
Jaqueline Porto	Enfermagem		
Luma Fernandes	Enfermagem		
Luana Castro	Enfermagem		
Lucimar de Carvalho	Enfermagem		
Márcia P. da Silva	Enfermagem		
Marcelo Seixas	Enfermagem		
Wesley Nascimento	Enfermagem		

## **Linhas de Pesquisa:**

### **Linha 1: Indicadores Antropométricos e Fatores de Risco Cardiovascular**

**Área de aplicação:** prática clínica, epidemiologia, prevenção e tratamento dos fatores de risco cardiovascular

#### **Objetivos:**

- 1 - Verificar a prevalência de fatores de risco cardiovascular em idosos de Brasília
- 2 – Verificar a associação entre os diversos indicadores antropométricos e os fatores de risco cardiovasculares
- 3 – Estabelecer pontos de corte com boa sensibilidade e especificidade para cada um dos indicadores antropométricos para a população idosa.

**Palavras Chaves:** indicadores antropométricos, fatores de risco cardiovascular e idosos.

#### **Pesquisadores relacionados à linha de pesquisa:**

Aparecido Pimentel Ferreira

Nanci Maria de França

Édis Rodrigues Junior

Diogenes de Moraes

### **Linha 2: Associação de Aspectos Imunológicos e Genéticos com Fatores de Risco Cardiovascular**

**Área de aplicação:** prática clínica, epidemiologia, prevenção e tratamento dos fatores de risco cardiovascular, genética.

#### **Objetivos:**

- 1 - Verificar a prevalência de fatores de risco cardiovascular em idosos de Brasília de acordo com o perfil genético.
- 2 – Verificar a associação entre os diversos indicadores antropométricos e os fatores de risco cardiovasculares de acordo com o perfil genético.
- 3 – Estabelecer pontos de corte com boa sensibilidade e especificidade para cada um dos indicadores antropométricos para a população idosa em detrimento ao perfil genético.

**Palavras Chaves:** indicadores antropométricos, fatores de risco cardiovascular, genética e idosos.

**Pesquisadores relacionados à linha de pesquisa:**

Aparecido Pimentel Ferreira

Nanci Maria de França

Otávio de Toledo Nóbrega

Édis Rodrigues Junior

Joaquim Xavier da Silva

## 1 Introdução

Alguns indicadores antropométricos, como circunferência da cintura (CC), índice de massa corporal (IMC), relação cintura/quadril (RCQ) e razão cintura/estatura (RCE) tem sido comumente analisados como preditores de ocorrências relevantes tais como Síndrome Metabólica (SM)<sup>1</sup>, risco para doenças cardiovasculares (RCV)<sup>2</sup>, relação entre indicadores antropométricos, obesidade e risco coronariano<sup>3,4,5</sup>.

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem importante ocorrência clínica, principalmente por serem consideradas a maior causa de morte a nível mundial, sendo a doença arterial coronariana a mais recorrente entre adultos. As DCV são mais prevalentes em países em desenvolvimento, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>6</sup>, 17,1 milhões de mortes por ano são causadas pelas DCV. Já no Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (MS)<sup>7</sup> As DCV mataram cerca de 300 mil pessoas em 2006, quase 30% do total de óbitos registrados. Os RCV são um dos parâmetros fundamentais para prevenir as DCV.

Atualmente, tem se destacado a necessidade de se observar a progressão das DCV e sua história natural. Além disso, observar se os RCV são influenciados por características físicas que podem ser modificadas por alterações nos hábitos de vida<sup>8</sup>.

Nesse aspecto, a obesidade tem um papel significativo na ocorrência de DCV tanto em adultos<sup>4</sup> quanto em crianças. Segundo estudo realizado por Ferreira e cols.<sup>9</sup> crianças obesas apresentam vários fatores de risco para desenvolvimento das DCV e SM. Em Framingham foram recrutados 5209 residentes saudáveis entre 30-60 anos para realização de um estudo cardiovascular por interesse do governo americano<sup>10</sup>. Desde estudo identificou-se os principais fatores de risco cardiovascular: hipertensão arterial, níveis elevados e/ou reduzidos de HDL – colesterol, tabagismo, diabetes mellitus e idade<sup>11</sup>, podendo também ser considerados sobrepeso/obesidade, inatividade física, dieta aterogênica, estresse, história familiar de DCV prematura e fatores genéticos e raciais<sup>12</sup>. Oliveira e cols.<sup>5</sup> apontam a adiposidade abdominal como um dos melhores preditores de DCV.

O aumento do número de pessoas acima de 60 anos de idade no Brasil é algo que vem ocorrendo a bastante tempo. As estimativas para o ano de 2020 de acordo com os últimos censos realizados apontam para a possibilidade de o número de idosos no país ultrapassarem os 30 milhões, devendo representar quase 13% da população<sup>13</sup> (FIBGE, 2002). O aumento da expectativa de vida é um fenômeno visível em quase todos os países do mundo, todavia é sabido que o envelhecimento expõe as pessoas a um número maior de doenças crônicas.



O aumento da expectativa de vida nas últimas décadas se deve ao declínio nas taxas de mortalidade e fecundidade e estes dois fatores associados promovem a base demográfica para o envelhecimento real da população, com isto ocorreu uma rápida transição demográfica, epidemiológica e nutricional, e esta transição deu origem ao aumento da prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs) dentre elas o diabetes, a obesidade, os níveis séricos elevados de colesterol e triglicerídeos e a hipertensão arterial<sup>14</sup>. No Brasil e na maioria dos países desenvolvidos, as DCNTs são as principais causas de morte após os 65 anos<sup>15</sup>.

Ultimamente vários estudos têm concentrado esforços para entender a associação entre aspectos genéticos e as DCNTs, pois sabe-se que alguns genes apresentam associação significativa e positiva com diversos fatores de risco e com as mais variadas doenças crônicas. Podendo citar os genes da ApoE – Alzheimer e perfil lipídico, ECA – Hipertensão arterial, IL-6 – Diabetes e Resistência à Insulina, TNF – Diabetes e Resistência à Insulina, além dos genes: KLOTO, ACTN3, ApoA V, ApoB.

Para Beranek, et al. 2002, o diabetes e a intolerância à glicose apresentam como principais fatores para o seu aparecimento questões genéticas, além de questões relacionadas ao estilo de vida. Assim, Goyenechea, et al. 2007 ao analisar a associação do gene da IL-6 relacionado ao diabetes e a intolerância à glicose, verificou que pessoas com excesso de peso, diagnosticadas através do IMC e que apresentavam a presença do alelo C do gene IL-6 (-174G>C) mostrou forte associação com um risco aumentado de desenvolvimento de desordens metabólicas, especialmente a resistência à insulina.

Yoshioka, et al. 2006<sup>14</sup>, analisaram a associação do gene TNF e o seu papel na resistência à insulina e diabetes em 251 pessoas e verificaram que este gene apresentou associação com o diabetes melitos. Pois sabe-se que o TNF tem um papel importante na resistência à insulina, interferindo na via de sinalização da insulina. Desta forma, outros estudos apresentaram evidências de uma associação positiva entre o gene do TNF e a resistência à insulina e/ou diabetes<sup>15</sup> (Nicaud, et al. 2002).

Uma possível contribuição do presente trabalho, seria a constatação de indicadores antropométricos que estão associados a fatores de risco cardiovasculares como método de baixo custo e de fácil aplicação, na predição de doenças cardiovasculares a luz de alguns perfis genéticos.

## **2 Objetivos**

Verificar a prevalência de fatores de risco cardiovascular em idosos de Brasília.

Verificar a associação entre os diversos indicadores antropométricos e os fatores de risco cardiovasculares.

Estabelecer pontos de corte com boa sensibilidade e especificidade para cada um dos indicadores antropométricos para a população idosa.

Verificar a prevalência de fatores de risco cardiovascular em idosos de Brasília de acordo com o perfil genético.

Verificar a associação entre os diversos indicadores antropométricos e os fatores de risco cardiovasculares de acordo com o perfil genético.

Estabelecer pontos de corte com boa sensibilidade e especificidade para cada um dos indicadores antropométricos para a população idosa em detrimento ao perfil genético.

### **3 Materiais e métodos**

#### **3.2 Delineamento e caracterização do estudo**

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

#### **3.2 Critérios éticos**

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

#### **3.3 Amostra**

A amostra será constituída por 200 idosos residentes em instituições de abrigo a idosos na cidade de Brasília.

#### **3.4 Critérios de Inclusão**

Ser residente em casa de abrigos para idosos.

Ter mais de 65 anos de idade.

Assinar o termo TCLE.

Participar de todas as coletas de dados.

#### **3.5 Procedimentos do estudo**

Para realização do presente estudo será necessário verificar as medidas antropométricas e fatores de risco cardiovascular nos idosos.

##### **3.5.1 Variáveis analisadas**

Serão analisadas variáveis antropométricas e relacionadas aos fatores de risco cardiovasculares, variáveis bioquímicas e genéticas.

### **3.6 Fatores de risco cardiovascular**

Os fatores de risco cardiovascular serão identificados mediante aplicação de anamnese clínica e constatação mediante diagnóstico médico da presença de fatores de risco cardiovascular, além de análises bioquímicas quando necessário.

### **3.7 Variáveis antropométricas**

#### **3.7.1 Circunferência da cintura**

A cintura será medida estando o sujeito com o mínimo de roupa possível, na distância média entre a última costela flutuante e a crista ilíaca.

#### **3.7.2 Circunferência do quadril**

A circunferência do quadril será medida com a fita métrica passando pelos trocânteres femurais (duas medidas) de cada circunferência.

#### **3.7.3 Índice de massa corporal**

O índice de massa corporal (IMC) será determinado pela divisão do peso/estatura<sup>2</sup>.

#### **3.7.3 Índice de conicidade**

O índice de conicidade (índice C) será determinado por meio das medidas de peso, estatura e circunferência da cintura (CC), utilizando-se a equação matemática:

$$\text{Índice C} = \frac{\text{CircunferênciaCintura(m)}}{0,109 \sqrt{\frac{\text{PesoCorporal(kg)}}{\text{Estatura(m)}}}}$$

#### **3.7.4 Índice cintura/estatura**

O índice de cintura/estatura será determinado por meio das medidas de cintura e estatura, por meio da divisão da cintura pela estatura.

#### **3.7.5 Relação Cintura/quadril**

A relação cintura/quadril será determinado por meio das medidas de cintura e quadril, por meio da divisão da cintura pelo quadril.

### **3.7.6 Coleta de sangue e análises clínicas**

Será realizada punção venosa utilizando o sistema vacutainer com EDTA. O sangue colhido será submetido à centrifugação a 600xg durante 10 min. para separação do plasma e dos elementos figurados do sangue. Parte do plasma será destinada às avaliações bioquímicas a serem realizadas por procedimentos de rotina em análises clínicas. Outra parte será estocada a  $-70^{\circ}\text{C}$  para a posterior avaliação humoral das citocinas. Elementos figurados serão mantidos refrigerados para realização das análises genômicas. Esse componente do projeto será realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital da Universidade Católica de Brasília e no Laboratório de Imunogerontologia da Universidade Católica de Brasília.

### **3.8 Análise genética**

A abordagem a ser utilizada no estudo de polimorfismos de base única (SNPs) ao longo dos genes de citocinas (IL-6, TNF e IFN- $\gamma$ ) e genes relacionados à DCNT (ECA, ApoA V, ApoE e Kloto) consistirá na identificação de HPTag SNPs (*haplotype tag SNPs*) ao longo destes genes. Polimorfismos serão identificados no banco de dados dbSNPs e HapMap. Uma vez identificados, os SNPs serão genotipados por reações de sequenciamento de DNA, ou alternativamente por PCR em sistema multiplex. Para sequenciamento, iniciadores serão desenhados utilizando o software Primer, preferivelmente para amplificação de fragmentos entre 100 a 200 pb contendo o SNP a ser genotipado. A reação de sequenciamento será realizada utilizando a técnica de parada de cadeia com ddNTPs marcados com moléculas fluorescentes em sistema automatizado da empresa Applied Biosystems. Os eletroferogramas serão analisados automaticamente com o programa de computador Staden 1.0.6. Para genotipagem por baterias de multiplex, iniciadores alelo-específicos incluindo o SNP a ser genotipado serão desenhados, sendo a formação de grampos e auto-complementaridade avaliada com o programa Autodimer (Vallone e Butler, 2004). Este componente do projeto será realizado no Laboratório de Imunogerontologia da Universidade Católica de Brasília.

### **3.9 Análise estatística**

Para a seleção dos pontos de corte de cada um dos indicadores antropométricos que possa apresentar associação com os fatores de risco cardiovasculares será adotada a análise a partir da técnica das curvas ROC (receiver operating characteristic).

A curva ROC será gerada pela plotagem da sensibilidade no eixo y em função de  $1 - \text{especificidade}$  - no eixo x. Por um lado, a sensibilidade refere-se à porcentagem dos

indivíduos que apresentaram o desfecho (no presente estudo, a presença de fatores de risco cardiovasculares) e que foram corretamente diagnosticados por meio do indicador (isto é, verdadeiro-positivo). Por outro lado, a especificidade descreve a porcentagem dos indivíduos que não apresentam o desfecho e foram corretamente diagnosticados por meio do indicador (isto é, verdadeiro-negativo).

O critério utilizado para obtenção dos pontos de corte serão os valores com sensibilidade e especificidade mais próximos entre si e não inferiores a 60% (Moreira et al. 2008). A significância estatística de cada análise será verificada pela área sob a curva ROC e pelo intervalo de confiança a 95% (IC95%). Nesse sentido, um indicador perfeito apresenta a área sob a curva ROC de 1,00, ao passo que a linha diagonal representa a área sob a curva ROC de 0,50. Para um indicador apresentar uma habilidade discriminatória significativa, a área sob a curva ROC deve estar compreendida entre 1,00 e 0,50, e quanto maior a área, maior o poder discriminatório do respectivo indicador.

O IC95% é outro determinante da capacidade preditiva. Portanto, para o indicador antropométrico verificado ser considerado preditor significativo dos fatores de risco cardiovasculares, o limite inferior do IC (Li-IC) não pode ser  $< 0,50$  (Schisterman et al, 2001). A análise estatística dos dados será realizada por meio dos programas Stata<sup>tm</sup>, versão 9.1, e SPSS 11.5.

## Referências

Moreira SR, Ferreira AP, Lima RM, Arsa G, Campbell CSG, Simões HG, et al. Predicting insulin resistance in children: anthropometric and metabolic indicators. *J Pediatr.* 2008;84(1):47-52

Schisterman EF, Faraggi D, Reiser B, Trevisan M. Statistical inference for the area under the receiver operating characteristic curve in the presence of random measurement error. *Am J Epidemiol.* 2001;154(2):174-9.

1. Ferreira AP, Ferreira CB, Brito CJ, Pitanga FJG, Moraes CF, Naves LA, Nóbrega OT, França NM. Predição da Síndrome Metabólica em Crianças por Indicadores Antropométricos. *Arq Bras Cardiol* 2011; 96(2): 121-125.

2. Bergmann GG, Gaya A, Halpern R, Bergmann MLA, Rech RR, Constanzi CB, Alli LR. Circunferência da cintura como instrumento de triagem de fatores de risco para doenças cardiovasculares em escolares. *J Pediatr.* 2010; 86(5): 411 – 416.

3. Pitanga FJG, Lessa I. Associação entre indicadores antropométricos de obesidade e risco coronariano em adultos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. Rev Bras Epidemiol 2007; 10(2): 239-48.
4. Pitanga FJG, Lessa I. Indicadores antropométricos de obesidade como instrumento de triagem para risco coronariano elevado em adultos na cidade de Salvador – Bahia. Arq. Bras. Cardiol. 2005; 85(1): 26 – 31.
5. Oliveira MAM, Fagundes RLM, Moreira EAM, Trindade EBSM, Carvalho T. Relação de indicadores antropométricos com fatores de risco para doença cardiovascular. Arq. Bras. Cardiol. 2010 94(4): 478-485.
6. [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/), acessado em 13/4/2011.
7. [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=10817](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10817), acessado em 13/4/2011.
8. Rodrigues SL, Baldo MP, Mill JG. Associação entre a razão cintura – estatura e hipertensão e síndrome metabólica: estudo de base populacional. Arq Bras Cardiol 2010; 95(2) : 186-191.
9. Ferreira AP, Oliveira CER, França NM. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR). J Pediatr. 2007; 83 (1): 21 – 26.
10. Polanczyk CA. Fatores de risco cardiovascular no Brasil: os próximos 50 anos! Arq. Bras. Cardiol. 2005; 84(3): 199 - 201.
11. Wilson PWF, D'Agostinho RB, Levy D, Belanger AM, Silbershartz A, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation. 1998; 97: 1837-1847.
12. Smith SC; Rod J; Pearson TA; Fuster V; Yusuf S, Faergeman O, et al. Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention: a scientific statement from the World Heart and Stroke Forum. Circulation. 2004; 109: 3112-21.

13. FIBGE - Fundação IBGE. Informações estatísticas e geocientíficas (informação on line). Disponível em <http://www.ibge.gov.br> (2002 ago 1).

14. KAC, G.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. Cad. Saúde Públ., Rio de Janeiro, v. 19, p. S4-S5, 2003. Suplemento 1.

15. CUNHA, S. F. C. da; CUNHA, D. F. da; Geriatria In: NETO, F.T. Nutrição clínica. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003. cap. 24, p.281.

16. Nicaud V, Raoux S, Poirier O, Cambien F, O'Reilly DS, Tiret L. The TNF alpha/G-308A polymorphism influences insulin sensitivity in K. Yoshioka et al. / Metabolism Clinical and Experimental 55 (2006) 1406– 1410 1409 offspring of patients with coronary heart disease: the European Atherosclerosis Research Study II. Atherosclerosis 2002;161:317- 25.