



**UnB**

**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Ceilândia**

**Curso de Farmácia**

**Joanilson Cabral Martins dos Santos Júnior**

**Polimorfismo do gene CHGA e associações com manifestações clínicas em pacientes com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e/ou Aneurisma.**

**Brasília-DF**

**2016**



**UnB**

**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Ceilândia**

**Curso de Farmácia**

**Joanilson Cabral Martins dos Santos Júnior**

**Polimorfismo do gene CHGA e associações com manifestações clínicas em pacientes com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e/ou Aneurisma.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília – UnB, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva.

Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Taís Cipriano.

**Brasília-DF**

**2016**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB**

Joanilson Cabral Martins dos Santos Júnior

**Polimorfismo do gene CHGA e associações com manifestações clínicas em  
pacientes com Acidente Vascular Encefálico AVEH e/ou Aneurisma.**

Banca Examinadora

---

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire  
(UniCEUB)

---

Dr.<sup>a</sup> Calliandra Maria de Souza Silva  
(UnB)

**Brasília-DF**

**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente e imensamente aos meus pais Cleci Memelak e Joaílson Cabral, que com grande dedicação puderam me dar todo o suporte necessário para que eu pudesse chegar aonde cheguei sempre me motivando e incentivando a me tornar uma melhor pessoa através dos estudos, e a minha irmã Tuanny Memelak, que mora comigo e que apesar de alguns desentendimentos, também vivencia todos os dias uma jornada semelhante e sabe que não é fácil estar morando longe de nossos pais.

Agradeço a Universidade de Brasília e aos professores da Faculdade de Ceilândia pela chance de poder estar realizando este sonho e por todo o conhecimento passado, especialmente a professora Izabel Cristina Rodrigues da Silva, sempre atenciosa, por toda a compreensão e confiança no desenvolvimento deste trabalho, e também as oportunidades que me proporcionou.

Aos meus estimados companheiros durante toda a fase de desenvolvimento dos experimentos no laboratório, Caroline Ferreira Fratelli e Alan Cristian, que por vários meses trabalharam comigo me ajudando em tudo o que eu precisasse, serei sempre grato.

Aos amigos que fiz durante a graduação, principalmente aqueles que ingressaram junto comigo e passaram por todas as dificuldades do curso e do campus da UnB Ceilândia. Àqueles com quem até dividi uma moradia durante um período da graduação, grandes amigos, obrigado por fazerem parte da minha vida nestes últimos anos.

E a todos os colegas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, muito obrigado!

## RESUMO

O estudo da associação entre polimorfismos do gene CHGA e sua influência no desencadeamento de acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) e aneurisma intracerebral tem sua importância quanto ao entendimento da patologia, que é multifatorial, para se obter dados que auxiliem no desenvolvimento de estudos clínicos e possível reversão e prevenção da situação patológica. Além dos riscos já recorrentemente aceitos sobre doenças vasculares, há uma crescente evidência da cromogranina sobre o papel genético na patofisiologia do AVEH e aneurisma. O gene CHGA também chamado de Secretogranina, é um grupo de proteínas presente em vários tipos de tecidos neuroendócrinos. É um marcador tumoral com grande utilidade em neoplasias endócrinas. Tem-se mostrado também como um importante marcador biológico das atividades simpáticas nervosas, e como prognóstico de doenças cardiovasculares. Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar a frequência do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* em uma amostra populacional de indivíduos brasileira do DF. Tratou-se de um estudo caso-controle de base populacional, no qual foram coletadas amostras de sangue destes grupos e submetidos a técnica laboratorial de PCR-RFLP para a genotipagem da amostra. Foi observada ausência de genótipo CC do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* nos participantes do estudo e uma presença significativa do genótipo heterozigoto GC. No entanto, a distribuição dos genótipos não diferiu estatisticamente nos grupos. Quanto à distribuição, dentro do grupo caso, de fatores epidemiológicos como idade, sexo, HAS, diabetes, tabagismo e etilismo, não se observou associação estatística com o polimorfismo do gene CHGA. Também não houve esta associação com as avaliações do prognóstico do paciente medido nas diferentes escalas. Portanto, o polimorfismo *Glu264Asp CHGA* parece não contribuir para a gênese da expressão de uma proteína cromogranina A neste grupo de pacientes, e que então, não seria o embasamento para compreender porque esta proteína é um biomarcador desta doença cardiovascular.

**Palavras chave:** Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH), Aneurisma intracerebral, Cromogranina A (CHGA), Polimorfismos genéticos.

## ABSTRACT

The study of the association between CHGA gene polymorphisms and its influence on the onset of hemorrhagic stroke and intracerebral aneurysm has its importance in understanding the pathology, which is multifactorial, in order to obtain data that aid in the development of clinical studies and possible reversal and prevention of the pathological situation. In addition to the already accepted risks of vascular diseases, there is increasing evidence of chromogranin on the genetic role in the pathophysiology of AVHR and aneurysm. The CHGA gene also called Secretogranine, is a group of proteins present in several types of neuroendocrine tissues. It is a tumor marker with great utility in endocrine neoplasms. It has also been shown to be an important biological marker of nerve sympathetic activities and as a prognosis of cardiovascular diseases. Thus, the present study aimed to verify the frequency of the Glu264Asp CHGA polymorphism in a Brazilian population population sample of the Federal District. It was a population-based case-control study in which blood samples were collected from these groups and submitted to laboratory technique PCR-RFLP for sample genotyping. There was observed absence of CC genotype of the Glu264Asp CHGA polymorphism in the study participants and a significant presence of the genotype heterozygous GC However, the distribution of genotypes did not differ statistically in the groups. As to the distribution, within the case group, of epidemiological factors such as age, sex, hypertension, diabetes, smoking and alcoholism, no statistical association was found with the CHGA gene polymorphism. Therefore, the Glu264Asp CHGA polymorphism does not seem to contribute to the genesis of the expression of a chromogranin A protein in this group of patients, and that, therefore, it would not be the basis for Understand why this protein is a biomarker of this cardiovascular disease.

**Keywords:** Hemorrhagic Stroke (AVEH), intracerebral aneurysm, chromogranin A (CHGA), genetic polymorphisms.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1	ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	8
1.2	CROMOGRANINA A.....	10
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	13
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>14</b>
4.1	APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA E FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	14
4.2	COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE DE PATOLOGIA MOLECULAR CLÍNICA.....	16
4.3	PARTICIPANTES DA PESQUISA.....	16
4.4	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	17
4.5	TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
4.6	PROCEDIMENTOS LABORATORIAS.....	17
4.6.1	<i>Extração de DNA</i> .....	17
4.6.2	<i>PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo</i> .....	18
4.6.3	<i>Digestão Enzimática</i> .....	18
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4.7.1	<i>Estimativa das frequências genotípicas</i> .....	19
4.7.2	<i>Análise dos dados dos sujeitos de pesquisa</i> .....	19
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES.....	20
5.2	ANÁLISE DO POLIMORFISMO <i>GLU264ASP CHGA</i> .....	21
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>27</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>29</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O AVE ou doença neurovascular representa uma disfunção neurológica aguda, de origem vascular, seguida da ocorrência súbita de sinais e sintomas relacionados ao comprometimento de áreas focais no encéfalo onde os sintomas persistem acima de 24 horas de duração. Segundo a Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares (2012), a cada seis segundos, independente da idade ou sexo, uma pessoa vai a óbito vítima de AVE, sendo isto, mais do que uma estatística em saúde pública, demonstrando também pelo grande impacto econômico e social para o Brasil. (DE CARVALHO, 2015).

O AVE é caracterizado pela falta de aporte sanguíneo em uma dada região cerebral que pode ser ocasionada pela ruptura ou obstrução arterial. Existem dois tipos de AVE, e são eles: isquêmico e hemorrágico. O AVE isquêmico é caracterizado pela interrupção do fluxo sanguíneo em determinada região cerebral, em geral a interrupção ocorre pela presença de um trombo, que é um processo de coagulação sanguínea inadequado, na artéria ou na veia, pela presença de um êmbolo, coágulo de sangue com agregados bacterianos e células inflamatórias. (BATH, 2014).

O AVE Hemorrágico é resultado de uma fragilidade vascular que pode levar a uma ruptura do vaso e conseqüente extravasamento sanguíneo em regiões do cérebro. Os dois tipos de AVEH são o intracerebral, que ocorre dentro da massa encefálica, e o subaracnóide, quando o sangue extravasado fica confinado entre as meninges aracnóide e pia-mater. (VAGAL, 2014).

De acordo com a Academia Americana de Acidente Vascular (AAS), o acidente vascular encefálico hemorrágico contabiliza aproximadamente 13% dos casos de acidente vascular encefálico. No geral, os casos de aneurisma são rotineiramente observados no ambiente emergencial de hospitais, e representam a principal causa de morte no Brasil (FERNANDES, 2014).

Existem dois tipos de fraqueza vascular que usualmente levam a ruptura do vaso, o aneurisma e malformações arteriovasculares. As malformações são

congenitas e ocorrem raramente. O aneurisma é, grosseiramente, um distúrbio da morfologia vascular de uma região enfraquecida do endotélio. Se não tratado, o aneurisma continua a se desenvolver e pode chegar à ruptura e subsequente extravasamento de sangue. Os locais mais suscetíveis ao desenvolvimento dos aneurismas são as bifurcações de artérias e veias. Estima-se que até 80% dos AVEHs tem como evento primário os aneurismas (WIWANITKIT, 2014).

Os aneurismas podem ser classificados quanto a sua causa, lesão que os originaram ou quanto a sua conformação geométrica. Quanto à lesão os aneurismas são subdivididos em: arterioscleróticos, que são os aneurismas decorrentes de casos de arteriosclerose avançada; e congênitos e infecciosos esses são os aneurismas cuja fragilidade na parede arterial ou vascular é fruto de infecções diversas (HAJI, VAN ADEL, 2014).

Atualmente, o diagnóstico de AVE é dado com base no histórico clínico do paciente e com o auxílio da tomografia computadorizada. Os sintomas do AVE podem ser vários e estão relacionados com diferentes áreas do cérebro, é comum que haja alteração neurológica podendo interferir na fala, visão, cognição, sensibilidade, no equilíbrio e nos movimentos (NETO, NEVILLE, 2014).

Os casos de AVE não são distribuídos uniformemente pelo mundo, os números variam de região pra região, de sociedade pra sociedade, de costume pra costume, de hábitos de vida para hábitos de vida. O AVE está relacionado com uma série de fatores que influenciam no evento, dentro desses fatores existem aqueles que os indivíduos não exercem influência, como por exemplo, sexo e idade, e fatores que podem ser controlados pelo indivíduo, como a hipertensão arterial (BACZKO, LEPRAN, 2014).

Os fatores de risco para o AVC são geralmente divididos em não-modificáveis (idade, sexo, etnia, baixo peso ao nascer, doenças hereditárias) e modificáveis (hipertensão, diabetes mellitus, doenças cardíacas, tabagismo, dislipidemia, abuso de álcool, obesidade, síndrome metabólica, contraceptivos orais, reposição hormonal pós-menopausa em mulheres, estenose carotídea clinicamente silenciosa, doença arterial periférica, abuso de drogas, enxaqueca e outros). (ROLINDO, 2016).

O fumo é o segundo fator de risco mais importante relacionado ao aneurisma, aumentando a chance do acontecimento de infarto intracerebral. Já os anticoncepcionais orais estão relacionados com população de mulheres acima dos

35 anos fumantes, que tem histórico de enxaqueca ou hipertensão arterial anos e o evento mais comum nesses casos é o AVE isquêmico. (CAI, 2014).

Níveis alterados colesterol se apresentam como fator de risco e pode interferir e influenciar no evento do AVE. Concentrações muito baixas de colesterol atuam como fator de risco para a hemorragia cerebral, enquanto que concentrações altas são fatores de risco para o infarto cerebral (SULTAN, SCHUPF *et al.*, 2014).

## 1.2 CROMOGRANINA A

CgA, que é a granina que foi descoberta pela primeira vez, tem sido mais extensivamente estudado, tem um peso de 48 kDa e compreende 439 aminoácidos. Este nome é derivado da descoberta original na medula adrenal, onde é co-armazenado e co-liberado com catecolaminas a partir de grânulos de armazenamento. CgA em plasma é um biomarcador estabelecido de tumores neuroendócrinos, onde é utilizado como marcador de diagnóstico para acompanhar a progressão ou regressão tumoral durante o tratamento. Sugeriu-se também ter um papel de biomarcador em doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, hipertensão, doenças cardiovasculares, insuficiência renal e hepática. (BROEDBAEK, HILSTED, 2016).

O gene humano CHGA (CgA) está localizado no cromossomo 14q32.12, que se estende por 12.192 pb e dá origem a um transcrito de 2,041 pb que codifica uma proteína de 439 aminoácidos. Existem 10 locais dibásicos em humanos CgA, que são locais potenciais para clivagem proteolítica. (BARTOLOMUCCI, *et al.*, 2011.)

A cromogranina A (CgA) pertence a uma superfamília de proteínas comumente referidas como "graninas". As graninas consistem em cromogranina A, cromogranina B e secretogranina II, todos os quais são bioquimicamente caracterizados por seu perfil ácido. As proteínas são difusamente expressas em tecido neuroendócrino e presente em grânulos ou vesículas secretoras. Além disso, essas graninas também são expressas em várias outras células, incluindo células imunológicas, células epiteliais e neurônios. A família das graninas também inclui Secretogranina III, o antígeno HSL-19 (secretogranina IV), a secreção neuroendócrina Proteína 7B2 (secretogranina V), NESP55 (secretogranina VI) e fator de crescimento nervoso indutível Proteína VGF (secretogranina VII). Contudo,

estas proteínas são mais seletivamente expressas em apenas alguns tecidos. Todas as graninas contêm numerosos pares de aminoácidos básicos. As graninas são libertadas de células neuroendócrinas em paralelo com as substâncias reguladoras específicas para as diferentes células endócrinas. (GOETZE, 2014).

A CgA é co-secretada, juntamente com as catecolaminas da medula suprarrenal, pelas terminações nervosas simpáticas e tem se mostrado útil como marcador biológico da atividade nervosa simpática. A CgA, quando intracelular, tem um papel importante na regulação da formação e liberação de vesículas secretoras, estando associada ao complexo de Golgi e, quando extracelular, é um polipeptídeo pró-hormonal, que sofre clivagem, dando origem a peptídeos biologicamente ativos como: pancreastatina (PST) , vasostatina I e II, e catestatina. A PST diabetogênica (CgA humana<sub>250-301</sub>) tem como ações inibir a liberação de insulina estimulada pela glicose das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas e também inibir a recaptura de glicose pelos adipócitos e hepatócitos. (KOGAWA, GRISI et al., 2015).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista a complexidade do AVE, a necessidade crescente da descoberta de possíveis fatores de risco mostra-se relevante, embora existam estudos estabelecendo associações significativas entre a presença de determinados polimorfismos e o desenvolvimento do AVE, o conhecimento em populações diferentes é importante para confirmar as associações propostas até então e verificar o real impacto deste polimorfismo no desenvolvimento da doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Sendo assim, o objetivo geral deste estudo é verificar a frequência do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* em uma amostra populacional de indivíduos brasileiros com AVEH.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar levantamento bibliográfico sobre polimorfismo *Glu264Asp CHGA*.
- b) Padronizar e executar as estratégias de biologia molecular (PCR e digestão enzimática) para estudo da frequência do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* em indivíduos com AVEH.
- c) Investigar a possível associação entre o polimorfismo *Glu264Asp CHGA* com diferentes manifestações clínicas e prognósticos de pacientes com Acidente Vascular Encefálico Sistêmico.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA E FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Após a aprovação do projeto (ANEXO A), os dados pessoais dos participantes da pesquisa foram obtidos por meio de preenchimento de uma ficha de identificação específica (ANEXO B). Esta ficha abrangia as seguintes variáveis: idade, sexo, presença de hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, etilismo. Parâmetros bioquímicos e celulares também foram anotados, exemplos: glicose, creatinina e plaquetas. Foram computadas as informações sobre a escala de Glasgow, Escala de Rankin, índice de Bartel.

O uso de escalas é importante. No ambiente da emergência, a avaliação neurológica deve abranger principalmente a gravidade do AVE, o seu tipo e sua localização, dado que exames neurológicos extensos são inexecutáveis.

A Escala de Rankin (ERm) é um instrumento de mensuração da incapacidade que tem sido amplamente utilizado na avaliação da recuperação neurológica e como *end-point* primário (prognóstico) em estudos clínicos para o tratamento do AVE (acidente vascular encefálico). A versão mais atual dessa escala é uma adaptação da escala de Rankin e consiste de 6 categorias que vão do 0 a 5, sendo que, eventualmente, agrega-se o escore 6 (óbito) em estudos clínicos. Resumidamente, a escala avalia a capacidade do indivíduo de realizar as atividades de vida diária. A escala é essencialmente baseada na incapacidade global (em particular a incapacidade física) e na necessidade de assistência para realizar atividades instrumentais e básicas da vida diária com ênfase no comprometimento motor. Ela pode ser aplicada por qualquer profissional da área da saúde, possuindo moderada confiabilidade entre observadores. Na figura 1, tem-se a graduação da respectiva escala.

Escala de Rankin modificada	
Pontuação	Descrição
0	Sem qualquer sintoma.
1	Sem incapacidade significativa apesar dos sintomas; capaz de realizar todos os deveres e atividades usuais.
2	Incapacidade leve; incapaz de realizar todas as atividades prévias, mas é capaz de cuidar de si próprio sem auxílio.
3	Incapacidade moderada; necessita de alguma ajuda, mas é capaz de caminhar sem assistência.
4	Incapacidade moderadamente grave, incapaz de caminhar sem assistência e incapaz de atender a suas necessidades físicas sem assistência.
5	Incapacidade grave, acamado, incontinente, requer constante atenção e cuidados de enfermagem.
6	Óbito.

Figura 1. Graduação da escala de Rankin. (Adaptada de FALCÃO *et al.*, 2010)

O Índice de Barthel (IB) é uma escala de incapacidade que mensura 10 aspectos básicos da atividade diária relacionados à mobilidade e aos cuidados pessoais, tais como: alimentação, higiene pessoal, controle dos esfíncteres vesical e intestinal, independência no banheiro, transferência da cadeira, marcha e capacidade para subir escadas. Tem sido bastante utilizada como medida de prognóstico pós-AVE, porém também é utilizada para avaliação de outras desordens neurológicas. O escore normal é de 100 (máximo), com pontuações indicando o grau de dependência sendo que abaixo de 50 significa dependência.

O IB pode ser avaliado de duas maneiras: (a) Quanto à classificação prognóstica - Grupo I: 0 a 45 pontos=incapacidade severa; Grupo II: 50 a 70 pontos=moderada; Grupo III: 75 a 95 pontos=leve e Grupo IV: 100pontos=independência funcional; (b) Quanto à agrupamentos funcionais - Grupo A: auto-cuidados (itens 1 a 7: alimentação, banho, apresentação pessoal, vestir, cuidados com intestinos e bexiga, e uso do banheiro) e Grupo B: mobilidade (itens 8 a 10: deambulação, transferência do leito para cadeira e subir escadas) (MARTIN-SCHILD, ALBRIGHT *et al.*, 2011).

A Escala de Coma de Glasgow (ECG) é uma escala neurológica que representa um método confiável para registrar o nível de consciência de um indivíduo, com intuito da avaliação inicial e contínua após um traumatismo craniano. Seu valor também é utilizado no prognóstico do paciente e é de grande utilidade na previsão de sequelas casuais. Inicialmente usado para avaliar o nível de consciência depois de trauma encefálico, a escala é atualmente aplicada a diversas circunstâncias (BARLOW, 2012). A interpretação desta escala está aqui descrita: 3 = Coma profundo; (85% de probabilidade de morte); 4 = Coma profundo; 7 = Coma intermediário; 11 = Coma superficial; 15 = Normalidade.

#### 4.2 COLETA DE MATERIAL PARA ANÁLISE DE PATOLOGIA MOLECULAR CLÍNICA

O único procedimento a que os participantes foram submetidos foi a coleta de aproximadamente 10 mL de sangue por meio de punção de veia periférica, com material novo e descartável. A coleta de sangue foi realizada pela enfermeira chefe do setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília, Hélia Sousa, responsável pelo projeto de pesquisa aprovado no comitê de ética.

O material biológico, no caso o sangue, dos participantes foi levado ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Bioprospecção e Neurociências (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília), onde foi estocado sob a guarda da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari para realização da extração do DNA das amostras e os exames para verificação dos polimorfismos genéticos, também foi fracionado com o Laboratório de Análises Clínicas da FCE/UnB sob supervisão da professora Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva.

#### 4.3 PARTICIPANTES DA PESQUISA

Os participantes da pesquisa foram divididos em dois grupos, grupo caso e grupo controle. O grupo caso teve como critérios de inclusão pacientes de ambos os sexos, idade maior que 18 anos, com diagnóstico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral (n = 45). Os critérios de exclusão deste grupo foram idade, neste caso indivíduos menores de 18 anos, indivíduos que não apresentaram diagnóstico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral, indivíduos que não desejaram participar da pesquisa ou representantes legais que não consentiram em participar.

O grupo controle teve como critérios de inclusão indivíduos (n = 52) de ambos os sexos, idade maior que 18 anos, sem histórico de AVEH e aneurisma intracerebral, não aparentados dos pacientes do grupo caso. Os critérios de exclusão foram idade, aqui indivíduos menores de 18 anos, parentes de indivíduos com AVEH e/ou aneurisma intracerebral, indivíduos que não desejaram participar da pesquisa.

#### 4.4 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes do presente estudo caso tenham condições de compreender e assinar o TCLE. Se os pacientes não apresentaram condições clínicas devido à sua patologia, foi solicitado o TCLE do responsável legal dos pacientes. Foi também obtido um TCLE de indivíduos sem as patologias a serem estudadas, que farão parte do grupo controle (Anexo C).

Antes da coleta do material, ocorreram esclarecimentos sobre o significado e o possível uso dos resultados previstos. Aos sujeitos de pesquisa foi oferecida a opção de escolher entre serem informados ou não sobre resultados de seus exames.

#### 4.5 TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

O Termo de Guarda de Material Biológico foi obtido de todos os participantes do presente estudo (Anexo D).

Aos sujeitos de pesquisa foi dada a possibilidade de autorizar ou não o armazenamento de dados e materiais biológicos coletados no âmbito da pesquisa. Todo indivíduo terá acesso a seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirá-los do banco onde se encontram armazenados, a qualquer momento.

#### 4.6 PROCEDIMENTOS LABORATORIAS

##### 4.6.1 Extração de DNA

O kit usado para a extração do DNA foi o *Invisorb Spin Blood Mini Kit (250)* da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A concentração de DNA foi determinada em corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/ $\mu$ L.

#### 4.6.2 PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo

A técnica de PCR Qualitativa permite que uma região do DNA genômico seja amplificada milhões de vezes, o que permite um estudo minucioso do ácido nucleico citado. Baseando-se nesse fato, usou-se essa metodologia para avaliação do polimorfismo *Glu264Asp CHGA*.

As sequências de oligonucleotídeos que foram utilizadas para avaliar o polimorfismo *Glu264Asp CHGA* foram (fabricante: IDT Technologies):

Senso 5'- AGGGTGGCAGGCAAAGAG-3'

Antisenso5'- AAGGTGGAATGAGGTTATGG -3'.

(KOGAWA, GRISI, et al., 2015).

As condições de termociclagem foram: 94°C por 5 minutos (denaturação inicial), seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, acompanhada de 56 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto para o anelamento dos oligonucleotídeos. Por último, foi realizada o processo de extensão a 72°C por 7 minutos, obtém-se, então um fragmento de 235pb. O equipamento utilizado foi *termocicladorTechne modelo TC-512*.

Em cada reação, foi utilizado: 4,0 µL de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/µL, descongelado; 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl); 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 2 µL de dNTPs (2,5mM; LGC); 0,4 µL de Taq-Polimerase (Fermentas, 5U/µL); 1 µL de cada oligonucleotídeo forward e reverse (10µM); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação.

#### 4.6.3 Digestão Enzimática

Realizada a PCR e tendo como produto o fragmento de 235pb, partiu-se para o processo de digestão enzimática. A enzima de restrição usada na digestão foi a DPN1, sendo que esse processo foi realizado a 37°C por 2 horas. O alelo 1 (G) não sofreu clivagem pela enzima, portanto obteve-se um fragmento de 235pb. O alelo 2 (C) apresentou um novo sítio de restrição, ou seja, o fragmento de DNA foi clivado em dois fragmentos um de 106 pb e outro outro de 129 pb.

A montagem do sistema de digestão utilizado foi a seguinte: 10,0 µL da PCR; 2,0µL de tampão 10x NEB4 (Biolabs); 0,3 µL de enzima DPN1 (10U/µL), completando com água Milli-Q para um volume final de 20 µL por reação.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio em uma potência de 100W por um tempo de 90 minutos.

## 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4.7.1 Estimativa das frequências genotípicas

As frequências genotípicas foram contabilizadas por meio de contagem direta, utilizando o programa SPSS versão 20.0. A comparação das distribuições dessas frequências foi feita através das aplicações dos testes qui-quadrado, de forma a detectar possíveis associações dos genótipos entre os grupos avaliados, grupo caso e grupo controle. Foram consideradas associações com probabilidades menores que 5% ( $P < 0,05$ ).

### 4.7.2 Análise dos dados dos sujeitos de pesquisa.

Também foram estimadas as frequências de características dos sujeitos de pesquisa, considerando: sexo, tabagismo, etilismo, presença de hipertensão arterial (HAS), e diabetes; por outro lado, as variáveis quantitativas idade e glicemia foram descritas em termos de suas estatísticas-resumo (média e erro padrão).

Subsequente a isso, as características clínicas do grupo controle foram descritas estatisticamente, seguindo como exemplo as escalas de Glasgow, Rankin; o Índice de Bartel; e exames laboratoriais tais como os exames bioquímicos, hematológicos

Para todas estas variáveis, a comparação das distribuições das frequências foi aplicado o teste do qui-quadrado e ANOVA com pós teste de Tukey (observadas as pressuposições de normalidade pelo teste de Shapiro - Wilk). Foram consideradas associações com probabilidades menores que 5% ( $P < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES

Na tabela 2 estão descritas características dos participantes de pesquisa analisados conforme o grupo. Foi observado que, em relação ao sexo, o grupo feminino era mais prevalente, e estava pareado entre o desenho caso- controle, com 32 mulheres no grupo caso (71,1%) contra 31 no controle (59,6%) ( $P = 0,237$ ). No tocante a idade, ambos os grupos estavam pareados, com grupo caso  $52 \pm 1$  ano e grupo controle  $51 \pm 1$  ano (tabela 3).

*Tabela 2 - Distribuição da frequência e da porcentagem dos grupos estudados segundo o sexo*

		Grupos				P
		aneurisma/aveh		Controle		
		N	%	n	%	
Sexo	Fem	32	71,1%	31	59,6%	0,237
	Masc	13	28,9%	21	40,4%	

*Tabela 3 - Estatísticas-resumo (média e erro padrão) da idade dos grupos controle e AVEH/ aneurisma.*

	Grupos				P
	aneurisma/aveh		Controle		
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média	
Idade	52	1	51	1	0,917

## 5.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO *GLU264ASP CHGA*

As frequências genótípicas estão apresentadas na tabela 4. Foi observada a ausência de registros do genótipo CC em ambos os grupos, mas alta prevalência de indivíduos heterozigotos (77,8% no grupo caso e 82,7% no grupo controle). Com isto, não houve associação entre o genótipo/alelo *Glu264Asp CHGA* e o desfecho ( $P>0,05$ ).

Nas tabelas 5 e 6 foram descritas as associações entre as características clínicas, laboratoriais e o prognóstico dos pacientes e o polimorfismo estudado. Também não se verificou associação do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* com hipertensão arterial, diabetes, etilismo, tabagismo, prognóstico avaliado nas escalas de Glasgow, Rankin e Barthel, glicemia, creatinina e número médio de plaquetas.

*Tabela 4 - Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* nos diferentes grupos.*

Glu264Asp CHGA	Grupo				P	OR	IC
	AVEH/aneurisma		Controle				
	N	%	N	%			
GG	10	22,2	9	17,3			
GC	35	77,8	43	82,7	NA	NA	NA
CC	0	0,0	0	0,0			
Total	45	100,0	52	100,0			
GG	10	22,2	9	17,3			
GC+CC	35	77,8	46	88,5	0,543	1,36	0,50-3,73
Total	45	100,0	52	100,0			
G	55	61,1	61	58,7			
C	35	38,9	43	41,3	0,729	1,10	0,62-197
Total	90	100,0	104	100,0			

Tabela 5 - Associação entre o polimorfismo *Glu264Asp CHGA* e as características clínicas/hábitos e o prognóstico do paciente medido nas escalas.

Características clínicas		Glu264Asp CHGA				P
		GG		GC		
		N	%	N	%	
HAS	Sim	8	22,9%	27	77,1%	0,848
	Não	2	20,0%	8	80,0%	
Diabetes	Sim	0	0,0%	3	100,0%	0,338
	Não	10	23,8%	32	76,2%	
Tabagismo	Sim	3	20,0%	12	80,0%	0,800
	Não	7	23,3%	23	76,7%	
Etilismo	Sim	1	14,3%	6	85,7%	0,583
	Não	9	23,7%	29	76,3%	
Glasgow	coma intermediário	2	33,3%	4	66,7%	0,482
	coma superficial	0	0,0%	0	0,0%	
	Normalidade	8	20,5%	31	79,5%	
Rankin	Assintomático	0	0,0%	2	100,0%	0,864
	sintoma sem incapacidade	8	23,5%	26	76,5%	
	incapacidade leve	0	0,0%	1	100,0%	
	incapacidade moderada	0	0,0%	2	100,0%	
	incapacidade moderada a grave	1	33,3%	2	66,7%	
	incapacidade grave	1	33,3%	2	66,7%	
Índice de Barthel	incapacidade severa	2	33,3%	4	66,7%	0,371
	incapacidade moderada	0	0,0%	0	0,0%	
	incapacidade leve	7	25,9%	20	74,1%	
	independência funcional	1	8,3%	11	91,7%	

Tabela 6 - Estatísticas-resumo da glicemia, creatinina e plaquetas conforme a presença do polimorfismo *Glu264Asp CHGA*.

Variáveis laboratoriais	Glu264Asp CHGA						P
	GG		GC		Total		
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média	
Glicose (mg/dl)	112	9	109	4	110	4	0,790
Creatinina (mg/dl)	0,9	0,1	1,4	0,4	1,3	0,3	0,439
Plaquetas (k/ul)	321	17	339	12	335	10	0,455

## 6 DISCUSSÃO

Estudos de variação genética indicam que do total de casos de AVE aproximadamente 38% são hereditários, também afirmam que a maior parte da contribuição genética para o AVE é poligênica e refletem efeitos de múltiplos genes cada um exercendo pequenos efeitos (HOPEWELL AND CLARKE 2016). No tocante ao AVEH poucos estudos de literatura têm sido executados, quanto comparados ao desfecho isquêmico do referido agravo.

A cromogranina A, também denominada secretogranina I, constitui-se num grupo de proteínas presentes em vários tecidos neuroendócrinos. Tem sido relatada como um marcador tumoral com utilidade em neoplasias endócrinas, tipo feocromocitoma, síndrome carcinóide, carcinoma medular da tireóide, adenoma hipofisário, carcinoma de células ilhotas do pâncreas e na neoplasia endócrina múltipla. O intervalo de referência, no soro, é de 10ng/mL a 50ng/mL (DE ALMEIDA, 2007).

No entanto, a cromogranina também passou a pertencer ao grupo de novos marcadores na insuficiência cardíaca (IC), pois foi incluída como parte do mecanismo de disfunção neuroendócrina. A Classificação Braunwald de Biomarcadores para IC, dividido em sete categorias, aponta as cromograninas como biomarcadores para avaliação do prognóstico e do risco cardiovascular (PITTHAN; MARTINS; BARBISAN, 2014).

Sendo assim, estudos sobre o polimorfismo genético da cromogranina A podem contribuir para a compreensão de patogênese e o prognóstico de doenças cardiovasculares, como o AVEH.

Porém, o presente estudo não apontou associação do polimorfismo da CHGA com a ocorrência do AVEH/Aneurisma. Poucos estudos na literatura identificaram este polimorfismo em um grupo de indivíduos. O estudo proposto por Salem e colaboradores (2008) identificou que polimorfismos no gene CHGA estavam associados com a presença doença renais hipertensiva, porém não identificaram a relevância do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* para a patogênese da doença.

Outro estudo, desenvolvido por Kogawa e colaboradores (2016), identificou que o polimorfismo não estava associado com a presença de diabetes, o mesmo observado no atual estudo quando se desejou investigar esta associação dentre os pacientes do grupo caso portadores de diabetes.

No tocante ao prognóstico, também não se verificou neste estudo que o polimorfismo da CHGA estava associado com o perfil do paciente medido pelas escalas de avaliação de neurológica.

Assim, outros estudos de genotipagem de CGHA em portadores de AVEH deverão ser executados para entender a expressão deste gene como biomarcador para susceptibilidade ou prognóstico desta doença cardiovascular.

## 7 CONCLUSÃO

Foi observada ausência de genótipo CC do polimorfismo *Glu264Asp CHGA* nos participantes do estudo e uma presença significativa do genótipo heterozigoto GC, sendo que mais do que três quartos dos indivíduos eram portadores deste perfil, independente do grupo no qual o indivíduo foi alocado. No entanto, a distribuição dos genótipos não diferiu estatisticamente nos grupos

Quanto à distribuição, dentro do grupo caso, de fatores epidemiológicos como idade, sexo, HAS, diabetes, tabagismo e etilismo, não se observou associação estatística com o polimorfismo do gene CHGA. Também não houve esta associação com as avaliações do prognóstico do paciente medido nas diferentes escalas.

Portanto, o polimorfismo *Glu264Asp CHGA* parece não contribuir para a gênese da expressão de uma proteína cromogranina A neste grupo de pacientes, e que então, não seria o embasamento para compreender porque esta proteína é um biomarcador desta doença cardiovascular.

## REFERÊNCIAS

BACZKO, I. et al. Future Perspectives in the Pharmacological Treatment of Atrial Fibrillation and Ventricular Arrhythmias in Heart Failure. **Curr Pharm Des**, Oct 28 2014. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25354185>> .

BARLOW, P. A practical review of the Glasgow Coma Scale and Score. **Surgeon**. 30 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300893>>.

BARTOLOMUCCI, Alessandro et al. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 6, p. 755-797, 2011.

BATH, P. M.; KRISHNAN, K. Interventions for deliberately altering blood pressure in acute stroke. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 10, p. CD000039, 2014. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25353321>>.

BROEDBAEK, Kasper; HILSTED, Linda. Chromogranin A as biomarker in diabetes. **Biomarkers in Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1181-1189, 2016.

CAI, Y.; ZENG, T.; CHEN, L. Association of adiponectin polymorphisms with the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: A meta-analysis. **J Diabetes**, May 13 2014. ISSN 1753-0407 (Electronic) 1753-0407 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825737>>

DE ALMEIDA, José Ricardo Chamhum et al. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

DE CARVALHO, Maria Ismin Félix et al. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL: DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE UMA CLÍNICA DE FISIOTERAPIA DO SERTÃO NORDESTINO BRASILEIRO. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 2, n. 6, 2015.

FALCÃO, C. H., FALCÃO, A. L. E, ULHOA, A., REZENDE, M.T, SALGADO, C.G., MALHEIROS, W.G., SILVA, J. A. C, PEIXOTO, E.C.S. Trombólise intra-arterial associada a angioplastia adjunta na fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**. 27 Maio 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2179-83972010000300007&lng=en&tlng=pt.10.1590/S2179-83972010000300007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-83972010000300007&lng=en&tlng=pt.10.1590/S2179-83972010000300007)>.

FERNANDES, T. G. et al. Stroke in the rain forest: prevalence in a ribeirinha community and an urban population in the Brazilian Amazon. **Neuroepidemiology**, v. 42, n. 4, p. 235-42, 2014. ISSN 1423-0208 (Electronic) 0251-5350 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903570>>.

GOETZE, Jens P. et al. Chromogranin A as a biomarker in cardiovascular disease. **Biomarkers**, v. 8, n. 1, p. 133-140, 2014.

HAJI, F. et al. Intracranial aneurysm rupture following intravenous thrombolysis for stroke. **Can J Neurol Sci**, v. 41, n. 1, p. 95-8, Jan 2014. ISSN 0317-1671 (Print) 0317-1671 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384346>> .

HOPEWELL, Jemma C.; CLARKE, Robert. Emerging Risk Factors for Stroke What Have We Learned From Mendelian Randomization Studies?. **Stroke**, v. 47, n. 6, p. 1673-1678, 2016.

KOGAWA, E. et al. Salivary function impairment in type 2 Diabetes patients associated with concentration and genetic polymorphisms of chromogranin A. **Clinic Oral Invest**, Jan 11 2016.

MARTIN-SCHILD, S. et al. Zero on the NIHSS does not equal the absence of stroke. **Ann Emerg Med**. 25 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828876>> .

NETO, H. S. et al. Hemodynamic stroke caused by strangulation. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 9, p. 2932-5, 2014. ISSN 1940-5901 (Electronic) 1940-5901 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356163>> .

PITTHAN, Eduardo; MARTINS, Oscar Morency Otto; BARBISAN, Juarez N. Novos biomarcadores inflamatórios e de disfunção endotelial: predição de risco cardiovascular. **Revista da AMRIGS**, v. 58, n. 1, p. 69-77, 2014.

ROLINDO, Saullo José Silva; OLIVEIRA, Leticia Tomaz. ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO: REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ASPECTOS ATUAIS DO TRATAMENTO NA FASE AGUDA. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 3, n. 3, p. 18-26, 2016.

SULTAN, S. et al. Predictors of Cholesterol and Lipoprotein(a) Testing in Children with Arterial Ischemic Stroke. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 23, n. 9, p. 2405-13, Oct 2014. ISSN 1532-8511 (Electronic) 1052-3057 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25174567>> .

VAGAL, A. S. et al. Time to Angiographic Reperfusion in Acute Ischemic Stroke: Decision Analysis. **Stroke**, Oct 28 2014. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352484>> .

WIWANITKIT, V. Aneurysm, ischemic stroke and cysticercosis. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 119, p. 135-6, Apr 2014. ISSN 1872-6968 (Electronic) 0303-8467 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555987>> .

## ANEXOS

## ANEXO A - Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa/SES-DF.



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/SES-DF

PARECER Nº 0095/2010

**PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 380/2010 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E AO ANEURISMA INTRACEREBRAL.**

**Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.**

**Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.**

**Validade do Parecer: 15/12/2012**

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 16 de dezembro de 2010.

Atenciosamente,

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes  
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF  
Coordenadora

AL/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesdf@saude.df.gov.br  
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-907

BRASILIA - PATRIMONIO CULTURAL DA HUMANIDADE

## ANEXO B – Ficha de identificação dos participantes da pesquisa.

Ficha de identificação dos participantes da pesquisa: Polimorfismo genético ctla4 -318 (c/t) associado ao acidente vascular encefálico hemorrágico e ao aneurisma intracerebral.

Nome do participante:

\_\_\_\_\_

Nome do representante legal (se houver):

\_\_\_\_\_

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

Sexo:  Masc.  Fem.

Cor: \_\_\_\_\_

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

Data do acidente vascular encefálico hemorrágico e/ou do aneurisma intracerebral: \_\_\_\_\_

Hipertensão arterial:  Sim  Não

Pressão Arterial: \_\_\_\_\_

Diabetes:  Sim  Não

Glicemia: \_\_\_\_\_

Tabagismo:  Sim  Não Se sim, quantos maços por dia:

\_\_\_\_\_

Etilismo:  Sim  Não Se sim, quanto por dia: \_\_\_\_\_

Uréia: \_\_\_\_\_

Creatinina: \_\_\_\_\_

Plaquetas: \_\_\_\_\_

Escala de Glasgow: \_\_\_\_\_

Escala de Rankin: \_\_\_\_\_

Escala NIHSS: \_\_\_\_\_

Índice de Barthel: \_\_\_\_\_

ICH: \_\_\_\_\_

Tomografia: \_\_\_\_\_

Angiografia: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de todos participantes da pesquisa.**

### *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - Indivíduos “saudáveis”*

Você está sendo convidado a participar do estudo “Polimorfismos genéticos associados ao acidente vascular encefálico e ao aneurisma intracerebral”. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

#### Natureza e objetivos do estudo:

O objetivo do presente estudo é o de verificar a frequência de determinadas variantes do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) em uma população de indivíduos que não apresentam aneurisma cerebral diagnosticado ou acidente vascular encefálico.

#### Procedimentos do estudo:

Sua participação consiste em responder uma ficha de identificação e autorizar uma única vez, a coleta de aproximadamente 10 ml (uma seringa) de sangue, através de uma punção de veia periférica no antebraço.

O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

#### Riscos e benefícios:

Este estudo possui desconfortos inerentes à coleta de sangue, como dor no local e formação de um hematoma (mancha roxa).

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local. Caso haja algum problema você receberá a atenção necessária e o ressarcimento de alguma eventual despesa.

Sua participação poderá ajudar no maior conhecimento sobre qual a frequência na população saudável de determinadas características genéticas que

podem causar doenças e deste modo na melhor compreensão do fator genético de determinadas doenças.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:

Sua participação é voluntária. Você não terá nenhum prejuízo se não quiser participar. Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Conforme previsto pelas leis brasileiras você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade:

Seus dados serão identificados com um número e somente os pesquisadores saberão que número pertence a cada indivíduo.

Os resultados de seus exames serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos. Os resultados dos seus exames poderão ser entregues pela pesquisadora responsável mediante a sua solicitação, a qualquer momento, desde que as amostras já tenham sido processadas e analisadas. Esta solicitação poderá ser feita agora durante a assinatura deste TCLE, por email ou telefone, presentes neste TCLE, e a pesquisadora agendará uma reunião para a entrega do resultado.

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

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Eu, \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_, após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

*Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente*

Polimorfismos genéticos associados ao Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e ao Aneurisma Intracerebral

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que você está sendo convidado a participar. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

#### Natureza e objetivos do estudo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo pelo fato de ter apresentado um aneurisma ou um acidente vascular encefálico (“derrame”). Você poderá decidir participar ou não. A decisão é sua.

Existe uma possibilidade de associação de fatores genéticos com o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), assim, este estudo tem o objetivo geral de conhecer um pouco melhor como “funciona” estas doenças, do ponto de vista genético.

O objetivo específico deste estudo é o de conhecer se determinadas seqüências do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

#### Procedimentos do estudo:

Sua participação consiste em responder um questionário e autorizar que seu os pesquisadores possam ver seu prontuário, para que tenham maior conhecimento de seus exames, tratamento e da história da sua doença.

Após isso será coletado de você, uma única vez, aproximadamente 10 ml (uma seringa pequena) de sangue, através de uma punção da veia do seu antebraço. O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

#### Riscos:

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de coleta de sangue. Medidas preventivas durante a coleta serão tomadas para minimizar qualquer risco ou incômodo.

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local.

**Benefícios:**

A sua participação neste estudo poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido.

Os resultados estarão sempre disponíveis a você. Caso seja de seu desejo, os resultados serão discutidos com você pela equipe deste trabalho.

Sua participação poderá ainda ajudar no maior conhecimento sobre o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), principalmente em relação às causas genéticas da doença.

**Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:**

Sua participação é voluntária e não alterará o seguimento e tratamento da doença que você já está fazendo.

Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Caso você decida não participar, isto não afetará o seguimento e tratamento normal nem o seu relacionamento com seu médico.

Conforme previsto pelas leis brasileiras você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

**Confidencialidade:**

Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

Seus dados serão identificados com um número e somente os pesquisadores saberão que número pertence a cada indivíduo.

Os resultados de seus exames, bem como as informações de seu prontuário, serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma- AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari.

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

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Se o Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com a enfermeira Hélia Carla de Souza, no setor de Neurocirurgia, do Hospital de Base de Brasília, no horário matutino. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. Qualquer dúvida com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3325-4955. Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_, após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Participante

### *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Representante Legal*

Polimorfismos genéticos associados ao Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e ao Aneurisma Intracerebral

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que o paciente sob sua responsabilidade está sendo convidado a participar. Antes de decidir se deseja aceitar que o paciente sob sua responsabilidade (de livre e espontânea vontade) participe, você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida aprovar a participação, você será solicitado a assiná-lo e receberá

uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

#### Natureza e objetivos do estudo:

O paciente sob a sua responsabilidade está sendo convidado a participar de um estudo pelo fato de ter apresentado um aneurisma ou um acidente vascular encefálico (“derrame”). Você poderá decidir que ele participe ou não. A decisão é sua.

Existe uma possibilidade de associação de fatores genéticos com o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), assim, este estudo tem o objetivo geral de conhecer um pouco melhor como “funciona” estas doenças, do ponto de vista genético.

O objetivo específico deste estudo é o de conhecer se determinadas seqüências do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

#### Procedimentos do estudo :

A participação do paciente sob sua responsabilidade consiste em autorizar que seu os pesquisadores possam ver o prontuário do paciente, para que tenham maior conhecimento dos exames, tratamento e da história da sua doença do paciente que está sob sua responsabilidade.

Após isso será coletado do paciente sob sua responsabilidade, uma única vez, aproximadamente 10 ml (uma seringa pequena) de sangue, através de uma punção da veia do seu antebraço. O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

#### Riscos:

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de coleta de sangue. Medidas preventivas durante a coleta serão tomadas para minimizar qualquer risco ou incômodo.

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local.

Benefícios:

A participação do paciente sob sua responsabilidade poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido.

Os resultados estarão sempre disponíveis a você. Caso seja de seu desejo, os resultados serão discutidos com você pela equipe deste trabalho.

A participação do paciente sob sua responsabilidade poderá ainda ajudar no maior conhecimento sobre o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), principalmente em relação às causas genéticas da doença.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo :

A participação do paciente sob sua responsabilidade é voluntária e não alterará o seguimento e tratamento da doença que você já está fazendo.

Você poderá retirar a autorização de participação do paciente sob sua responsabilidade desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Caso você decida não concordar com a participação, isto não afetará o seguimento e tratamento normal nem o relacionamento do paciente sob sua responsabilidade com a equipe médica.

Conforme previsto pelas leis brasileiras você não haverá nenhum tipo de compensação financeira pela participação neste estudo.

Confidencialidade:

Os registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

Os dados do paciente sob sua responsabilidade serão identificados com um número e somente os pesquisadores saberão que número pertence a cada indivíduo.

Os resultados dos exames, bem como as informações do prontuário, serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos.

O sangue do paciente sob sua responsabilidade, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari. · Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação de um Comitê de

Ética em Pesquisa e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Se o Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com a enfermeira Hélia Carla de Souza, no setor de Neurocirurgia, do Hospital de Base de Brasília, no horário matutino. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. Qualquer dúvida com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: [\(61\) 3325-4955](tel:61-3325-4955). Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_ RG  
 \_\_\_\_\_, após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em permitir a participação do paciente sob minha responsabilidade, o Sr(a) \_\_\_\_\_ Brasília,  
 \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Responsável pelo Participante da pesquisa

## **ANEXO D – Termo de guarda de material biológico de todos os participantes da pesquisa.**

### *Termo de Guarda de Material Biológico – Indivíduos “saudáveis”*

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

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Bioprospecção e Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari e será utilizado somente para verificar os polimorfismos genéticos do presente estudo.

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

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

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

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

### *Termo de Guarda de Material Biológico – Paciente*

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

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Bioprospecção e Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari. O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar se determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com seu nome. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número. Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca seu nome ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

*Termo de Guarda de Material Biológico – Representante Legal*

Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob sua responsabilidade. Você poderá autorizar ou não a guarda do material biológico do paciente sob sua responsabilidade.

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

A qualquer momento você terá acesso aos dados do paciente sob sua responsabilidade e de seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar o material biológico do banco onde se encontra armazenado.

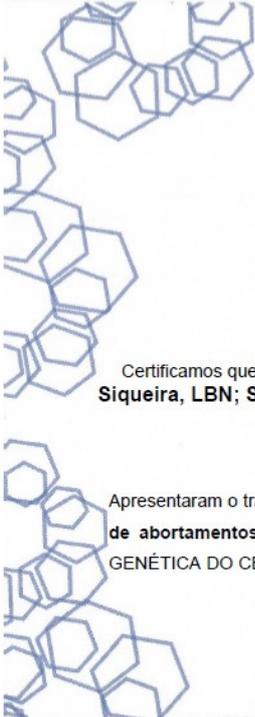
Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

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

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com o nome do paciente sob sua responsabilidade. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número.

O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar se determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).



**Anexo E – Certificado de apresentação de pôster em congresso**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**Pró-Reitoria de Extensão e Cultura**

**CERTIFICADO**

Certificamos que **Oliveira, ACA; Santos Júnior, JCM; Cardoso, LCA; Borges, FSA; Siqueira, LBN; Souza, TM; Freire, DO; Cipriano, VTF; Kogawa, EM; Lins, CEC; Ferreira, LB; Silva, ICR.**

Apresentaram o trabalho intitulado: **“A associação do polimorfismo no gene CTLA4 (rs231775) e presença de abortamentos em Lúpus Eritematoso sistêmico”** na modalidade PÔSTER no IV CONGRESSO DE GENÉTICA DO CENTRO-OESTE, realizado em Goiânia-Goiás, no período de 24 a 27 de agosto de 2016.

Goiânia, 29 de Agosto de 2016.

  
Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

  
Dr. Reginaldo Nassar Ferreira