



SAMARA BETINA ROCHA CARVALHO

**POLIMORFISMO P53 ARG72PRO EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS
COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO (AVEH) OU
ANEURISMA INTRACEREBRAL EM UMA AMOSTRA DO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA, 2018

SAMARA BETINA ROCHA CARVALHO

**POLIMORFISMO P53 ARG72PRO EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS
COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO (AVEH) OU
ANEURISMA INTRACEREBRAL EM UMA AMOSTRA DO DISTRITO FEDERAL**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Co-orientador: Leonardo Dodt de Aquino

BRASÍLIA, 2018

C C331p Carvalho, Samara Rocha
Polimorfismo P53 Arg72Pro em pacientes diagnosticados
com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH) ou
Aneurisma Intracerebral em uma amostra do Distrito Federal
/ Samara Rocha Carvalho; orientador Izabel Silva; co
orientador Leonardo Aquino. -- Brasília, 2018.
51 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. Polimorfismo. 2. p53. 3. AVE. 4. Aneurisma. I. Silva,
Izabel, orient. II. Aquino, Leonardo, co-orient. III. Título.

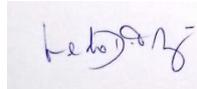
SAMARA BETINA ROCHA CARVALHO

**POLIMORFISMO P53 ARG72PRO EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS
COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO (AVEH) OU
ANEURISMA INTRACEREBRAL EM UMA AMOSTRA DO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(Universidade de Brasília - FCE)



Co-orientador: Leonardo Doth Aquino
(Universidade de Brasília)

Ligia Canongia de Abreu Cardoso
(Centro Universitário Planalto do Distrito Federal- UNIPLAN)

Rafael Martins de Moraes
(Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2018.

“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha juntos é o começo da realidade.”

Miguel de Cervantes

Dedico esse trabalho à minha mãe, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre guiar os meus passos e permitir que tudo isso acontecesse.

Meu especial agradecimento à minha orientadora profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, pela disponibilidade, confiança, dedicação, paciência, incentivo e apoio constante durante esses 2 anos e meio de projeto.

Ao Dr. Luzitano Brandão Ferreira pelo fornecimento dos prontuários e Daniel Oliveira Freire pela coleta das amostras, a contribuição de vocês foram essenciais para realização deste trabalho.

A biomédica Lígia Canongia e o farmacêutico Rafael Martins, membros da banca examinadora, por terem atendido ao convite e pela disponibilidade de seu tempo para analisar este trabalho.

A minha mãe Célia Carvalho por toda força, confiança e auxílio, não somente na graduação, mas em todos os momentos da minha vida, mesmo distante sempre foi meu amparo.

A minha avó Maria Odete, meu primo Leonardo Carvalho, minhas tias Ivanise Cristina e Deusimar Carvalho por todo carinho e amor que vocês têm por mim, além dos seus conselhos e motivação. A minha tia Umbelinda Coelho e família, pela receptividade, estadia e incentivo. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu namorado Thiago, pela ajuda, compreensão e paciência nos momentos difíceis.

Aos meus amigos da graduação: Victor Ribas, Guilherme Guimarães, Ana Lídia, Jenyffer Ribeiro, Daniel Silva, Weverson Reis, por terem me proporcionado momentos inesquecíveis, vocês foram fundamentais nesta etapa da minha vida.

Aos amigos do laboratório, Renato Augusto, Vinícius Guimarães, Adara Ciqueira, Pedro Henrique por toda ajuda e bons momentos juntos.

Sumário

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
Polimorfismos de substituição única (SNP)	13
Polimorfismo do gene p53	13
Doenças crônicas não transmissíveis associadas ao p53.....	14
Aneurisma intracraniano (IA)	14
Doença arterial coronária (DAC).....	15
Doença Aterosclerótica (AD)	15
Vitreoretinopatia proliferativa	16
Doença pulmonar obstrutiva crônica – DPOC	16
Acidente vascular encefálico	17
Acidente vascular encefálico isquêmico	17
Acidente vascular encefálico hemorrágico	17
JUSTIFICATIVA	18
OBJETIVOS	18
REFERÊNCIAS.....	19
ARTIGO.....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 <i>Coleta de dados do prontuário</i>	28
3.2 <i>Participantes do estudo</i>	28
3.3 <i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	29
3.4 <i>Procedimentos Técnicos e Laboratoriais</i>	29
3.4.1 <i>Extração de DNA</i>	29

3.4.2	<i>Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCR)</i>	29
3.4.3	<i>Digestão enzimática</i>	30
3.5	<i>Análise estatística</i>	30
3.5.1	Estatística das frequências genóticas.....	30
3.5.2	Análise dos dados dos sujeitos do estudo	31
4	RESULTADOS	32
5	DISCUSSÃO.....	35
6	CONCLUSÕES.....	37
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
	ANEXOS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos participantes da pesquisa conforme o sexo e idade nos grupos Aneurisma/AVEH e controle.....	29
Tabela 2. Estudo da associação genotípica e alélica do polimorfismo P53 Arg72Pro no estudo de caso-controle.....	30
Tabela 3. Associação entre o polimorfismo P53 Arg72Pro e o prognóstico conforme a Escala de Rankin modificada relacionada aos pacientes do grupo caso.....	30
Tabela 4. Associação entre o polimorfismo P53 Arg72Pro e as características clínicas/hábitos relacionados aos pacientes de cada grupo.....	31

RESUMO

Acidente vascular encefálico (AVE) é causado pela interrupção do fluxo sanguíneo em uma determinada região encefálica, que persiste por pelo menos 24 horas e ocasiona a perda repentina da função neurológica. O gene supressor de tumor p53 é um importante regulador de vias metabólicas, desempenhando função de manter a integridade e a estabilidade do genoma através das funções de reparo do DNA, parada do ciclo celular, senescência ou apoptose. Nesse contexto, este estudo teve por objetivo investigar a associação entre o polimorfismo P53 Arg72Pro em pacientes diagnosticados com acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) ou aneurisma intracerebral em uma amostra do Distrito Federal. Tratou-se de um estudo caso-controle, com 162 indivíduos equitativamente divididos nos grupos, com anotações das características clínicas do prontuário e análise da genotipagem por meio da estratégia de PCR. As frequências genotípicas foram estimadas por contagem direta. O nível de significância adotado foi de 5%. Foi verificado que a presença do alelo G do polimorfismo do P53 Arg72Pro atuou como fator do risco para a ocorrência do AVEH/aneurisma intracerebral. A presença do genótipo GG aumentou o risco para o prognóstico ruim (ERM >3) em pacientes portadores do AVEH/aneurisma ($P < 0,01$; OR= 16,07). Não houve associação estatística entre HAS, diabetes, tabagismo e etilismo e a presença do polimorfismo P53 Arg72Pro no grupo estudado. Concluiu-se que a presença do alelo G do polimorfismo do P53 Arg72Pro está associada ao aumento do risco de ocorrência do AVEH/aneurisma intracerebral.

Palavras – chave: Polimorfismo. P53. AVE. Aneurisma.

ABSTRACT

Stroke is caused by interruption of blood flow in a particular brain region, which persists for at least 24 hours and brings about the sudden loss of neurological function. The p53 tumor suppressor gene is an important regulator of metabolic pathways, performing the function of maintaining genome integrity and stability through the functions of DNA repair, cell cycle arrest, senescence or apoptosis. In this context, this study aimed to investigate the association between the P53 Arg72Pro polymorphism in patients diagnosed with hemorrhagic stroke (HS) or intracerebral aneurysm in a sample from the Federal District. This was a case-control study, with 162 subjects equitably divided into groups, with annotations of the clinical characteristics of the medical records and analysis of the genotyping by means of the PCR strategy. Genotypic frequencies were estimated by direct counting. The significance level adopted was 5%. It was found that the presence of the G allele of P53 Arg72Pro polymorphism acted as a risk factor for the occurrence of hemorrhagic stroke / intracerebral aneurysm. The presence of the GG genotype increased the risk for poor prognosis (ERM > 3) in patients with hemorrhagic stroke / aneurysm (P < 0.01; OR = 16.07). There was no statistical association between systemic arterial hypertension (SAH), diabetes, smoking and alcoholism, and the presence of P53 Arg72Pro polymorphism in the studied group. It was concluded that the presence of the G allele of P53 Arg72Pro polymorphism is associated with an increased risk of occurrence of hemorrhagic stroke / intracerebral aneurysm.

Keywords: Polymorphism. P53. Stroke. Aneurysm.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Polimorfismos de substituição única (SNP)

Os SNPs são os tipos de polimorfismo mais abundantes, fazem trocas de base única ou inserções pequenas e deleção em fragmentos de DNA homólogos. Podem ser utilizadas para caracterizar a variação alélica, mapeamento de locus de traços quantitativos e implementação de seleção assinalada de marcadores na criação de plantas (SHAHEEN; ZAFAR; MEHBOOB-UR-RAHMAN, 2010)

Os SNPs formam polimorfismos denominados RSPs (Restriction Site Polymorphisms), caracterizados então, pelos alelos que possuem ou não um determinado sítio de restrição, e, portanto, apresentarão um polimorfismo de sítio de restrição. A alteração de apenas um par de bases, pode levar à troca de aminoácido na proteína codificada pelo gene ou na maior ou menor taxa de expressão da proteína normal, o que pode causar uma alteração nos mecanismos de controle da pressão arterial, por exemplo, o que associado a fatores ambientais, pode conferir ao paciente uma maior ou menor predisposição a desenvolver doenças complexas como a hipertensão arterial. (Mcnevin, Wilson-Wilde *et al.*, 2005).

Polimorfismo do gene p53

O gene supressor de tumor p53 encontra-se na posição 1.3 do braço curto do cromossomo 17, sendo constituído de 11 éxons. Codifica para uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa, também chamada de p53, constituída por 393 aminoácidos, desempenhando função de manter a integridade e a estabilidade do genoma através das funções de reparo do DNA, parada do ciclo celular, senescência ou apoptose (BASU; MURPHY, 2016).

Quando agentes exógenos e endógenos provocam danos no DNA, a p53 é ativada promovendo regulação positiva e induzindo vias que conduzem parada do ciclo celular ou apoptose quando interage com o local danificado do DNA. (LAGARES, *et al.*, 2017)

O p53 ativa o gene p21/waf (Inibidor de quinase dependente de ciclina 1) que quando ativado interage com o receptor de ciclina-dependente cinase 2 (CDK2), esse complexo impede o avanço para a próxima fase de divisão celular, assim as células da fase G1 são bloqueadas enquanto acontece a reparação do DNA, quando não é possível o reparo, a p53 estimula as células a entrarem em apoptose para que não

tenha acumulação de mutações genéticas. Do contrário, se a mutação for na p53, a p21 não é ativada e a divisão celular torna-se descontrolada. (LAGARES et al., 2017)

O p53 é um importante regulador de vias metabólicas, o polimorfismo mais estudado nesse gene é o SNP que ocorre principalmente em uma área rica em prolina envolvidos na função pro-apoptótica, onde há a substituição de uma arginina por uma prolina. A p53 Arg72 tem sido relatado como um indutor mais potente de apoptose, porém a variante Pro72 também pode afetar o seu metabolismo relacionadas a atividade de transcrição (KHAN et al., 2016).

Doenças crônicas não transmissíveis associadas ao p53.

Estima-se que em 2020, 80% da carga global de doenças serão representadas pelas DCNTs, no Brasil, em 2007, 70% das mortes foram atribuíveis para doenças não transmissíveis, sendo que 80% das mortes relacionadas a essa condição, ocorrem em países de baixa e média renda. Entre elas, destacam-se as doenças cardiovasculares, câncer, doença respiratória crônica e diabetes (SAÚDE; SAÚDE; BÁSICA, 2013).

A informação genética promove estratégias eficientes para o gerenciamento dessas doenças, nas quais os avanços no mapeamento do genoma humano contribuem para uma melhor compreensão da base genética das DCNTs, proporcionando diagnóstico, intervenção efetiva, prognóstico e até mesmo tratamento, reduzindo a prevalência e a gravidade das DCNTs (JAMALUDDINE et al., 2016).

Aneurisma intracraniano (IA)

O Aneurisma intracraniano é uma doença comum de natureza multifatorial, que possui fatores ambientais e genéticos associados a sua etiologia. As lesões são normalmente por defeitos congênitos na parede dos vasos sanguíneos, alterações ateroscleróticas, traumatismos ou embolias infecciosas. Na literatura é descrito a ligação entre a inflamação e o IA, essa relação é descrito pela detecção de infiltração de células redondas associadas à ruptura na parede do IA (CARANCI et al., 2013)

Os aneurismas intracranianos representam cerca de 80% das lesões hemorrágicas subaracnóideas não traumática. Além das mulheres serem mais propensas a desenvolver um aneurisma em comparação com os homens, ocorre cerca de 1,4 vezes a hemorragia subaracnóide (SAH) no sexo feminino. (CARANCI, et al., 2013).

Em comparação com a prevalência de IA não destruídas, o SAH possui baixa incidência e o risco de ruptura depende da localização e do tamanho, além das reações inflamatórias e imunológicas que podem estar ligadas tanto na ruptura como na formação. No geral, os sintomas só aparecem depois deste fator. Sinais de alertas podem estar presentes em alguns casos, como dor acima e atrás do olho, paralisia do nervo craniano ou dor de cabeça e dor no pescoço secundária para um vazamento de sangue do aneurisma. Diferentes genes são associados a essa patologia, como o p53 pode regular a expressão de miRNAs, estudo realizado em uma população chinesa avaliou a associação do risco da doença com o miR-34b / c e TP53 Arg72-Pro. (LI et al., 2012)

Doença arterial coronária (DAC)

O acúmulo de placas ateromatosas provoca o espessamento endotelial, promovendo o estreitamento das artérias coronárias, a chamada doença arterial coronariana. Fatores de risco como diabetes, tem forte influência no aparecimento e progressão do DAC, além de fatores de risco não modificáveis como alterações genéticas.(ROSA; I; MAR, 2009)

Vários genes implicam na etiologia da doença, estudos mostram que polimorfismo do gene p53 Pro72Arg está associado ao risco de DAC, além disso, esse polimorfismo também está associada com a inibição da p73 (Membro da família p53 de fatores de transcrição nucleares, implicadas na supressão tumoral), havendo portanto uma ligação mais eficiente com a proteína, bloqueando a sua ação do p73 e facilitando a proliferação das células musculares lisas vasculares. Com isso, portadores da doença e do polimorfismo, durante a aterosclerose, são mais suscetíveis de sofrer desregulação da apoptose contribuindo para o desenvolvimento da DAC (KHAN et al., 2016).

Doença Aterosclerótica (AD)

A partir da meia idade acontece um processo de aterosclerose, que causa manifestações clínicas como enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. A aterosclerose altera a função e a parede arteriais, limitando o fluxo sanguíneo pelo estreitamento do lúmen, por meio do crescimento ateroma que conduz o endurecimento do vaso. De natureza inflamatória, as lesões ateroscleróticas são decorrentes de respostas celulares e moleculares altamente específicos e dinâmicos, advindas da acumulação de lipoproteínas derivadas de

plasma na íntima arterial. Desse modo, estudos apontam possível associação entre a aterosclerose e o gene p53 (LAGARES, 2017).

Vitreoretinopatia proliferativa

A vitreoretinopatia proliferativa acontece devido à ruptura da retina e escape do epitélio em um ambiente vítreo, causando um processo anormal de cicatrização de feridas. Sendo uma das principais causas de falha na cirurgia de desprendimento da retina, afeta 5 a 10% dos casos e 75% de todas as falhas primárias pós cirurgia. As variáveis existentes, não explicam completamente a sua aparição, embora haja muitas pesquisas que tentam identificar o seu desenvolvimento. Alguns estudos, apontam o seu desenvolvimento associado a fatores genéticos, como é o caso do polimorfismo de nucleotídeo único ligado ao gene p53. (PASTOR-IDOATE et al., 2013)

Como já citado acima, o polimorfismo do gene p53 está envolvido com o pior prognóstico do acidente vascular cerebral. A principal causa de perda neuronal após o traumatismo, isquemia e neurodegeneração no sistema nervoso central, é a apoptose, sendo assim, esses achados são importantes para correlacionar com a vitreoretinopatia, pois incluindo os processos de cicatrização, o tecido da retina tem um comportamento semelhante ao tecido cerebral. O desenvolvimento de PVR associada a cirurgia primária do desprendimento da retina, foi sugerida pelo aumento da expressão de apoptose solúvel e moléculas de adesão. Com base nisso, um estudo realizado com europeus, verificaram se houve possível associação da doença com o gene p53 códon 72, éxon 4 (PASTOR-IDOATE et al., 2013).

Doença pulmonar obstrutiva crônica – DPOC

A DPOC é uma doença que afeta vias aéreas e causa destruição do parênquima. O aumento de apoptose no septo alveolar e a regeneração deficiente das estruturas alveolares de pulmão podem influenciar no desenvolvimento de enfisema pulmonar e DPOC. A apoptose de pulmão pode ser resultado do estresse oxidativo, após a ativação da cascata de sinalização. Essa condição biológica do estresse oxidativo é responsável por ativar a p53 para inibição do ciclo celular (MIZUNO et al., 2017).

A p53 é regulada por uma proteína chamada MDM2 (*Murine double minute 2*), que inibe a sua capacidade de ativar a transcrição de genes e regula a localização celular ou ainda pode promover a degradação do p53 atuando como ligase de ubiquitina, prevenindo a apoptose e senescência das células. Sendo assim, os genes

p53 e MDM2 estão associados a apoptose das células pulmonares e a DPOC está ligada tanto a fatores ambientais devido ao estresse oxidativo quanto aos fatores genéticos, como os fatores dependente de p53 (MIZUNO et al., 2017).

Acidente vascular encefálico

O AVE é causada pela insuficiência do fluxo sanguíneo no tecido cerebral, provocando ausência de glicose e oxigênio, e há, portanto, um comprometimento ou perda da função neurológica. Clinicamente, pode ser classificado como isquêmico, quando um coágulo ou oclusão trombótica de uma artéria cerebral impede o fluxo sanguíneo (FANN et al., 2013) e hemorrágico, quando há um rompimento de um vaso, ocorrendo hemorragia subaracnóide e intraparenquimatosa (PONTES-NETO et al., 2009).

Diversos fatores podem estar associados ao AVC, entre elas, a hipertensão arterial, obesidade, sedentarismo, dislipidemia, aterosclerose, coagulopatias, tumores, arterites inflamatórias e infecciosas (JENNUM, et al., 2015). O acidente vascular cerebral é caracterizado por sinais de desenvolvimento rápido de distúrbios focais ou globais de funções cerebrais com duração > 24 horas ou que levam à morte. 85% dos AVC são decorrentes de infarto cerebral, 10% de hemorragia primária e 5% por hemorragia subaracnóide, além disso, devido ao primeiro acidente vascular cerebral 26% é recorrente dentro de 5 anos e 39% por 10 anos. (LIU et al., 2017) Quanto à idade, os resultados são divergentes. Alguns estudos mostram que a incidência é maior para os homens, em qualquer faixa etária. Outros, que em mulheres a incidência é superior em idades precoces e mais avançadas (SILVA, 2013).

- **Acidente vascular encefálico isquêmico**

A insuficiência do suprimento sanguíneo causado pelo AVEI, pode ter diversas etiologias, mas possui como principal fator de risco o HAS, cardiopatia e diabetes Mellitus, podendo ser temporário ou permanente (RADANOVIC, 2000). Em oposição ao AVC hemorrágico, outros fatores como, fibrilação atrial, miocárdio anterior infarto, acidente vascular cerebral anterior e claudicação arterial intermitente, favorecem o AVC isquêmico (ANDERSEN et al., 2009).

- **Acidente vascular encefálico hemorrágico**

AVEH é uma doença multifatorial complexa resultante de uma interação entre fatores genéticos de uma pessoa e vários fatores ambientais (YAMADA, 2008). AVC

hemorrágicos são geralmente mais graves do que AVC isquêmico e fatores como ingestão de álcool e fumar é favorável para o acometimento da doença. Dentro dos primeiros três meses após AVC, o hemorrágico está associado com um aumento considerável da mortalidade, que é especificamente e independentemente associada com a natureza da lesão (ANDERSEN et al., 2009). Além disso, fortes evidências de estudos familiares, com gêmeos e em modelos animais, têm consistentemente sugerido uma influência genética sobre o risco e prognóstico de acidente vascular cerebral (MATARIN, 2009).

O acidente vascular encefálico hemorrágico, é dividido em 2 subtipos: A hipertensão arterial sistêmica (HAS) que ocorre secundária à ruptura do aneurisma, no espaço subaracnóide e a hemorragia intracerebral (ICH) que ocorre pela ruptura de pequenas artérias que penetram o cérebro profundamente (HAN, et al., 2016).

JUSTIFICATIVA

Considerando que o acidente vascular encefálico é responsável por uma grande proporção de distúrbios neurológicos, resultante de uma interação entre vários fatores ambientais e fatores genéticos, o presente estudo busca investigar se há associação entre o polimorfismo do gene p53 e o AVEH, pois há poucos estudos na literatura que indicam provável relação. Assim, este estudo pode colaborar para um possível diagnóstico, além disso, pode contribuir futuramente para o tratamento da doença.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar a associação do polimorfismo do gene p53 no éxon 4, códon 72 (p53 Arg72Pro) com diferentes manifestações clínicas e prognóstico de pacientes com AVEH e ou Aneurisma Intracerebral em uma amostra do distrito federal.

REFERÊNCIAS

- ARROYO, H.A.; TAMER, I. Cerebrovascular disease in childhood and adolescence. Ischaemic cerebral accidents. *Rev Neurol.* 2002 Jan 16-31;34(2):133-44.
- BASU, Subhasree; MURPHY, Maureen E. Genetic Modifiers of the p53 Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 6, n. 4, p. a026302, 2016.
- COSTA-REIS, P.; SULLIVAN, K. E. Genetics and epigenetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*, v. 15, n. 9, p. 369, Sep 2013. ISSN 1534-6307 (Electronic) 1523-3774 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23943494> >.
- GOMEZ-SANCHEZ, Jose C. et al. The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *The Journal of experimental medicine*, v. 208, n. 3, p. 429-437, 2011.
- KUNZ, M. Lupus erythematosus. Part I: epidemiology, genetics and immunology. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 11, n. 8, p. 709-19; quiz 720, 709-720; quiz 721, Aug 2013. ISSN 1610-0387 (Electronic)1610-0379 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889785> >. LIU, Yu et al. Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. **Nature**, v. 531, n. 7595, p. 471-475, 2016.
- MANNU, C. et al. Comparison of different DNA extraction methods from peripheral blood cells: advice from the Fondazione Italiana Linfomi Minimal Residual Disease Network. *Leuk Lymphoma*, p. 1-11, Mar 11 2015. ISSN 1029-2403 (Electronic) 1026-8022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25115509> >.
- MATARIN, Mar; BROWN, W Mark; DENA, Hernandez; BRITTON, Angela; DE VRIEZE, Fabienne Wavrant; BROTT, Thomas G; BROWN, Robert D; WORRALL, Bradford B; CASE, L Douglas; CHANOCK, Stephen J; METTER, E Jeffrey; FERRUCE, Luigi; GAMBLE, Dale; HARDY, John A; RICH, Stephen S; SINGLETON, Andrew; MESCHIA, James F. Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. *Stroke*. 2009;40:3436- 3442.
- MCNEVIN, D. et al. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 1. Review of current status and knowledge gaps. *Forensic Sci Int*, v. 153, n. 2-3, p. 237-46, Oct 29 2005. ISSN 0379-0738 (Print) 0379-0738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15985352> >.
- ROWLAND, Lewis P. Merritt Tratado de Neurologia. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. SAXENA A; MOSHYNSKA O; SANKARAN K;

VISWANATHAN S; SHERIDAN DP (2002) gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Letters* 187(2):199-205.

SAÚDE, M. DA; SAÚDE, S. DE A. À; BÁSICA, D. DE A. Diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas redes de atenção à saúde e nas linhas de cuidado prioritárias. **Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica**, p. 28, 2013.

YAMADA, Yoshiji; METOKI, Norifumi; YOSHIDA, Hidemi; SATOH, Kei Satoh; KATO, Kimihiko; HIBINO, Takeshi; YOKOI, Kiyoshi Yokoi; WATANABE, Sachiro; ICHIHARA, Sahoko; AOYAGI, Yukitoshi; YASUNAGA, Akitomo; PARK, Hyuntae; TANAKA, Masashi; NOZAWA, Yoshinori. Genetic Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke in Japanese Individuals. *Stroke*. 2008;39:2211-2218.

ARTIGO

Título: POLIMORFISMO P53 ARG72PRO EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO (AVEH) OU ANEURISMA INTRACEREBRAL EM UMA AMOSTRA DO DISTRITO FEDERAL

Autores: CARVALHO, S. B. R¹, DA SILVA, I. C.R^{2*}.

Afiliações: ¹Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia

***Autor correspondente:**

Prof. Dr. Izabel Rodrigues

Email: belbiomedica@gmail.com

Endereço: Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília – DF. CEP: 72220-275

RESUMO

INTRODUÇÃO: Acidente vascular encefálico (AVE) é causado pela interrupção do fluxo sanguíneo em uma determinada região encefálica, que persiste por pelo menos 24 horas e ocasiona a perda repentina da função neurológica. O gene supressor de tumor p53 é um importante regulador de vias metabólicas, desempenhando função de manter a integridade e a estabilidade do genoma através das funções de reparo do DNA, parada do ciclo celular, senescência ou apoptose.

OBJETIVOS: Nesse contexto, este estudo teve por objetivo investigar a associação entre o polimorfismo P53 Arg72Pro em pacientes diagnosticados com acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) ou aneurisma intracerebral em uma amostra do Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODO: Tratou-se de um estudo caso-controle, com 162 indivíduos equitativamente divididos nos grupos, com anotações das características clínicas do prontuário e análise da genotipagem por meio da estratégia de PCR. As frequências genotípicas foram estimadas por contagem direta. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS: Foi verificado que a presença do alelo G do polimorfismo do P53 Arg72Pro atuou como fator do risco para a ocorrência do AVEH/aneurisma intracerebral. A presença do genótipo GG aumentou o risco para o prognóstico ruim (ERM >3) em pacientes portadores do AVEH/aneurisma ($P < 0,01$; OR= 16,07). Não houve associação estatística entre HAS, diabetes, tabagismo e etilismo e a presença do polimorfismo P53 Arg72Pro no grupo estudado.

CONCLUSÃO: Concluiu-se que a presença do alelo G do polimorfismo do P53 Arg72Pro está associada ao aumento do risco de ocorrência do AVEH/aneurisma intracerebral.

Palavras – chave: Polimorfismo. P53. AVE. Aneurisma.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Stroke is caused by interruption of blood flow in a particular brain region, which persists for at least 24 hours and brings about the sudden loss of neurological function. The p53 tumor suppressor gene is an important regulator of metabolic pathways, performing the function of maintaining genome integrity and stability through the functions of DNA repair, cell cycle arrest, senescence or apoptosis.

OBJECTIVE: In this context, this study aimed to investigate the association between the P53 Arg72Pro polymorphism in patients diagnosed with hemorrhagic stroke (HS) or intracerebral aneurysm in a sample from the Federal District.

MATERIALS AND METHODS: This was a case-control study, with 162 subjects equitably divided into groups, with annotations of the clinical characteristics of the medical records and analysis of the genotyping by means of the PCR strategy. Genotypic frequencies were estimated by direct counting. The significance level adopted was 5%.

RESULTS: It was found that the presence of the G allele of P53 Arg72Pro polymorphism acted as a risk factor for the occurrence of hemorrhagic stroke / intracerebral aneurysm. The presence of the GG genotype increased the risk for poor prognosis (MRS > 3) in patients with hemorrhagic stroke / aneurysm (P < 0.01; OR = 16.07). There was no statistical association between systemic arterial hypertension (SAH), diabetes, smoking and alcoholism, and the presence of P53 Arg72Pro polymorphism in the studied group.

CONCLUSION: It was concluded that the presence of the G allele of P53 Arg72Pro polymorphism is associated with an increased risk of occurrence of hemorrhagic stroke / intracerebral aneurysm.

Keywords: Polymorphism. P53. Stroke. Aneurysm.

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as principais causas de morte no mundo, responsáveis por cerca de 70% de todos os óbitos. Configuram como as principais DCNTs: o câncer, doença respiratória crônica, diabetes e doenças cerebrovasculares (DCBV) e as doenças isquêmicas do coração (DIC) ¹. Entre as DCBV, o acidente vascular encefálico (AVE) constitui grande parte das causas de internações e mortalidade, e causam algum tipo de deficiência, seja parcial ou completa, na maioria dos pacientes ².

Acidente vascular encefálico (AVE) é causado pela interrupção do fluxo sanguíneo em uma determinada região encefálica, que persiste por pelo menos 24 horas e ocasiona a perda repentina da função neurológica. Clinicamente, podem ocorrer alterações do nível de consciência e comprometimento das funções sensorial, motora, cognitiva, perceptiva e de linguagem ³.

Com base na sua etiologia, o AVE pode ser dividido em isquêmico, quando ocorre a oclusão de uma artéria decorrente de um ateroma ou êmbolos ⁴, e hemorrágico, quando há o extravasamento de sangue para o interior do cérebro (hemorragia intraparaquimentosa), para o sistema ventricular (hemorragia intraventricular) e/ou espaço subaracnóideo (hemorragia subaracnóide), devido a uma ruptura espontânea (não traumática) de um vaso ⁵.

Ocorrem cerca de 15 milhões de novos casos de AVE no mundo, aproximadamente 5 milhões vão a óbito e 5 milhões evoluem com sequela neurológica significativa. O Brasil lidera a sexta posição nas listas dos países com maior número de vítimas de AVE ⁶. No mundo ocidental, devido às anomalias e déficits neurológicos que causa no paciente, essa doença é a primeira causa de incapacitação funcional, associado à diminuição da função cognitiva, indicando influência negativa na recuperação ⁴.

Os aneurismas intracranianos são caracterizados como dilatações patológicas dos vasos que podem ter uma parede anormalmente enfraquecida e propensa à ruptura, podendo evoluir para hemorragia subaracnóidea (HSA) e, às vezes, hemorragia intraparenquimatosa⁷.

AVE hemorrágicos são geralmente mais graves do que os isquêmicos, e fatores como ingestão de álcool e tabagismo são favoráveis ao acometimento da doença. Dentro dos primeiros três meses após o AVE, o AVEH está associado com

um aumento considerável da mortalidade, que é especificamente e independentemente associada com a natureza da lesão⁸. Além disso, fortes evidências de estudos familiares, com gêmeos e em modelos animais, têm consistentemente sugerido uma influência genética sobre o risco e prognóstico de acidente vascular cerebral⁹.

O gene supressor de tumor p53 encontra-se na posição 1.3 do braço curto do cromossomo 17, sendo constituído de 12 éxons. Codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kDa, também chamada de p53, constituída por 393 aminoácidos, desempenhando função de manter a integridade e a estabilidade do genoma através das funções de reparo do DNA, parada do ciclo celular, senescência ou apoptose¹⁰.

O p53 é ativada quando agentes exógenos ou endógenos provocam danos no DNA, assim promove regulação positiva e induz vias que conduzem parada do ciclo celular ou apoptose¹¹.

Após a ativação do gene p53, este ativa o gene p21, que, quando ativado, interage com o receptor de ciclina-dependente cinase 2 (CDK2) formando um complexo que impede o avanço da fase G1 para a fase S, na divisão celular. Assim, ocorre o reparo do DNA. Quando não é possível o reparo, o p53 estimula as células a entrarem em apoptose. Do contrário, se a mutação for na p53, a p21 não é ativada e a divisão celular torna-se descontrolada¹¹.

O polimorfismo mais estudado nesse gene é o SNP (polimorfismo de nucleotídeo único). Comumente ocorre em uma área rica em prolina, envolvida na função pro-apoptótica, havendo a substituição de uma arginina por uma prolina. A p53 Arg72 é descrito como um indutor mais potente de apoptose, enquanto a variante Pro72 pode afetar o seu metabolismo relacionado à atividade de transcrição¹².

O p53 é capaz de regular a produção de energia do metabolismo, ocasionando a fosforilação oxidativa e amortecendo a glicólise nas células. Dessa forma, pode estar relacionado com algumas doenças metabólicas, como diabetes e obesidade. Além disso, está envolvido no desenvolvimento de resistência à insulina, no tecido adiposo, onde pode acarretar doenças cardiovasculares relacionadas à idade e distúrbios metabólico¹³.

Nesse contexto, este estudo tem por objetivo verificar a distribuição do Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) na região codante do gene P53 em indivíduos portadores de AVEH e/ou aneurisma cerebral em comparação com o grupo controle, dentro de uma amostra populacional do Distrito Federal, para a avaliação da

suscetibilidade. Adicionalmente, avaliou-se a contribuição do polimorfismo para o quadro clínico do paciente, por meio da associação entre o polimorfismo do gene e o prognóstico dos pacientes avaliados acometidos pela doença.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo P53 Arg72Pro em pacientes diagnosticados com acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) ou aneurisma intracerebral em uma amostra do Distrito Federal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle em pacientes com diagnóstico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral e em indivíduos sem registro do desfecho residentes no Distrito Federal (Brasil).

3.1 Coleta de dados do prontuário

Após a aprovação do estudo (ANEXO I), os dados pessoais dos participantes da pesquisa foram obtidos por meio de preenchimento de uma ficha de identificação específica (ANEXO II). A ficha de identificação possibilitou a caracterização dos participantes segundo idade, sexo, presença de hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, etilismo, glicemia, creatinina, ureia e dosagem de plaquetas, pontuação na Escala de Rankin Modificada (ERM) (BANKS and MAROTTA, 2007).

3.2 Participantes do estudo

Os participantes do estudo foram divididos em grupo caso e grupo controle. O grupo caso teve como critérios de inclusão, pacientes: de ambos os sexos; com idade maior que 18 anos; com diagnóstico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral; admitidos no período de 1 de janeiro de 2011 a 31 de dezembro de 2012; com diagnóstico de AVEH e ou aneurisma intracerebral comprovado por meio de tomografia computadorizada.

Os critérios de exclusão foram, indivíduos: menores de 18 anos; que não apresentaram diagnóstico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral; que não desejaram participar da pesquisa ou representantes legais que não consentiram em participar.

O grupo controle teve como critérios de inclusão indivíduos: de ambos os sexos; com idade maior que 18 anos; sem AVEH e aneurisma intracerebral; não aparentados dos pacientes do grupo caso. Também foi considerado como critério de inclusão aqueles indivíduos que realizaram exames bioquímicos de sangue (glicemia sérica) há menos de 15 dias e possuíam o registro formal deste resultado. Os critérios de exclusão foram indivíduos menores de 18 anos, parentes de indivíduos com AVEH e/ou aneurisma intracerebral e indivíduos que não desejaram participar da pesquisa.

Foram analisados 162 indivíduos ao todo, sendo o grupo caso constituído de pacientes portadores de AVEH e/ou aneurisma intracerebral (48 mulheres e 33 homens, com idade média de $53,5 \pm 5,9$ anos, totalizando 81 indivíduos). O grupo controle sem histórico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral foram incluídos neste

estudo (43 mulheres e 38 homens, com idade média de $52,3 \pm 5,7$ anos, totalizando 81 indivíduos).

3.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes do presente estudo que tinham condições de compreender e assinar o TCLE. Aos pacientes que não apresentaram condições clínicas de compreender e assinar o TCLE devido à sua patologia foi solicitado o TCLE dos responsáveis legais. Foi também obtido um TCLE de indivíduos sem as patologias a serem estudadas, que fizeram 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.

O presente trabalho foi aprovado no comitê de Ética da Fepecs sob o número 95/2010.

3.4 Procedimentos Técnicos e Laboratoriais

3.4.1 Extração de DNA

Os participantes foram submetidos à coleta de aproximadamente 10 mL de sangue venoso por meio de punção de veia periférica. O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit Invisorb Spin Blood Mini Kit (250) da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300, Alemanha). A concentração média do DNA obtido foi estimada pelo espectrofotômetro (NanoDrop 2000/2000c - *Thermo Fischer Scientific*). A concentração média alcançada foi de 20 ng/ μ L.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCR)

A técnica da PCR permite que uma região selecionada do genoma seja amplificada milhões de vezes.

As sequências de oligonucleotídeos utilizadas neste trabalho foram (fabricante: IDT Technologies):

Senso 5`-TCCCCCTTGCCGTCCCAA -3`

Antisenso 5`-CGTGCAAGTCACAGACTT -3`

As condições de termociclagem foram 94°C por 2 minutos (desnaturação inicial), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, acompanhada

de 60°C por 45 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O equipamento utilizado foi termociclador Techne modelo TC-512.

Em cada reação, foram utilizados 4,0 µL de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/µL; 2,5 µL de tampão 10x (10 mM de Tris e 50 mM de KCl); 0,5 µL de MgCl₂ (Fermentas), 0,5 µL de dNTPs (2,5mM; LGC); 0,5 µL de Taq-Polimerase (Fermentas, 5U/µL); 1,5µL de cada oligonucleotídeo forward e reverse (10 µM); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação.

O produto desta PCR é um fragmento de 279 pb.

3.4.3 Digestão enzimática

A digestão enzimática foi realizada com uso de enzimas de restrição (endonucleases de restrição).

O produto da PCR foi digerido com a enzima BstUI (New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA). O alelo 1 (G) cria um novo sítio de restrição, e o fragmento de 279 pb é clivado em dois de 160 pb e 119 pb; e o alelo 2 (C) não é clivado pela enzima. Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0 µL da PCR; 2,0µL de tampão 10x NEB4 (Biolabs); 1 µL de enzima BstUI (10U/µL), completando com água Milli-Q para um volume final de 20 µL por reação. O sistema foi mantido a 60°C por 2 horas.

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 20 minutos.

3.5 Análise estatística

3.5.1 Estatística 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 estatisticamente significativas aquelas cujo valor de p foram menores do que 5% ($p < 0,05$).

3.5.2 Análise dos dados dos sujeitos do estudo

Foram estimadas as frequências de determinadas características clínicas dos sujeitos do estudo, considerando sexo e as variáveis quantitativas de idade descritas em termos de suas estatísticas-resumo (média e desvio padrão).

Subsequentemente, as características clínicas do grupo controle foram descritas estatisticamente, de acordo com a Escala Rankin modificada.

Para variáveis supracitadas, a comparação das distribuições das frequências foi realizada por meio da aplicação do teste do Qui-quadrado e *OddsRatio* (OR). Foram consideradas associações estatisticamente significativas aquelas cujo valor de p foram menores do que 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

As características dos indivíduos do estudo estão descritas na tabela 1, em que foram agrupados e analisados segundo o sexo e a idade, não apresentando diferença estatística na distribuição percentual dos mesmos entre os dois grupos ($P = 0,429$ e $0,185$; respectivamente). O sexo mais prevalente foi o feminino entre os portadores de Aneurisma/AVEH, com 59,3% ($n = 48$) e no grupo controle (53,1%; $n = 43$). No tocante às idades, a média ficou em torno dos 53 anos para o grupo Aneurisma/AVEH e 52 anos para o grupo controle.

Tabela 1. Distribuição dos participantes da pesquisa conforme o sexo e idade nos grupos Aneurisma/AVEH e controle.

Variáveis	Aneurisma/AVEH		Controle		P	
	N	%	N	%		
Sexo	Feminino	48	59,3%	43	53,1%	0,429
	Masculino	33	40,7%	38	46,9%	
	Total	81	100,0	81	100,0	
idade	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	0,185	
	53,49	5,94	52,27	5,75		

Na tabela 2 estão apresentadas as frequências genotípicas e alélicas. Os dados indicaram que a frequência dos genótipos apresentou uma diferença estatística entre o grupo caso e grupo controle ($P < 0,001$). O genótipo Arg/Arg foi encontrado em 39,5% dos pacientes do grupo controle ($n = 32$) e em 13,6% do grupo caso ($n = 11$). As frequências alélicas foram estatisticamente diferentes entre os grupos AVEH/aneurisma e controle (alelo Arg: 64 contra 104 respectivamente, $P < 0,01$; OR = 0,36). Assim, a presença do alelo Arg atuou como fator protetor para a ocorrência de AVEH/aneurisma. Além disto, o grupo controle encontrava-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,504$).

Tabela 2. Estudo da associação genotípica e alélica do polimorfismo P53 Arg72Pro no estudo de caso-controle.

p53Arg72Pro	Grupos						P	OR (IC 95%)
	Aneurisma/AVEH		Controle		Total			
	N	%	N	%	N	%		
Arg/Arg	11	13,6	32	39,5	43	26,5		
Arg/Pro	42	51,9	40	49,4	82	50,6	<0,01*	NA
Pro/Pro	28	34,6	9	11,1	37	22,8		
Total	81	100	81	100	162	100		
Arg/Arg	11	13,6	32	39,5	43	26,5		
Arg/Pro + Pro/Pro	70	86,4	49	60,5	119	73,5	<0,01*	0,24 (0,11-0,52)
Total	81	100	81	100	162	100		
Arg	64	39,5	104	64,2	168	51,9		
Pro	9	60,5	58	35,8	156	48,1	<0,001*	0,36 (0,23-0,57)
Total	162	100	162	100	324	100		

*diferença estatística
NA = não se aplica

Na tabela 3 foi apresentada a associação, para o grupo caso, entre a presença dos genótipos e o prognóstico, avaliado conforme a Escala de Rankin modificada. Foi possível observar a presença do genótipo Arg/Arg aumenta o risco para o prognóstico ruim (ERM>3) nos pacientes portadores de Aneurisma/AVEH (P = 0,026; OR = 6,09).

Tabela 3. Associação entre o polimorfismo P53 Arg72Pro e o prognóstico conforme a Escala de Rankin modificada relacionada aos pacientes do grupo caso.

		p53 Arg72Pro				P	OR (IC95%)
		Arg/Arg		Arg/Pro + Pro/Pro			
		N	%	N	%		
ERM	prognóstico ruim	4	36,4%	6	8,6%	0,026	6,09 (1,38-26,95)
	bom prognóstico	7	63,6%	64	91,4%		

ERM = Escala de Rankin Modificada

Na tabela 4, tem-se a associação, dentro de cada grupo, das características clínicas/ hábitos hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes, tabagismo e etilismo. Não houve associação estatística entre a presença do polimorfismo **P53 Arg72Pro** e estas características clínicas dos pacientes.

Tabela 4. Associação entre o polimorfismo P53 Arg72Pro e as características clínicas/hábitos relacionados aos pacientes de cada grupo.

Grupos	p53 Arg72Pro						P	OR (IC95%)
			Arg/Arg		Arg/Pro + Pro/Pro			
		Contagem	N % da coluna	Contagem	N % da coluna			
Aneurisma /AVEH	HAS	sim	6	54,5	54	77,1	0,142	0,36 (0,96-1,32)
		não	5	45,5	16	22,9		
	Diabetes	sim	1	9,1	2	2,9	0,353	3,4 (0,28-41,03)
		não	10	90,9	68	97,1		
	Tabagismo	sim	3	27,3	29	41,4	0,513	0,53 (0,12-2,17)
		não	8	72,7	41	58,6		
	Etilismo	sim	2	18,2	20	28,6	0,718	0,56 (0,11-2,80)
		não	9	81,8	50	71,4		
controle	HAS	sim	4	12,5	4	8,2	0,706	1,6 (0,37-6,94)
		não	28	87,5	45	91,8		
	Diabetes	sim	0	0	0	0	NA	NA
		não	32	100	49	100		
	Tabagismo	sim	11	34,4	13	26,5	0,407	1,45 (0,55-3,81)
		não	21	65,6	36	73,5		
	Etilismo	sim	6	18,8	14	28,6	0,431	0,58 (0,20-1,71)
		não	26	81,3	35	71,4		

NA=Não se aplica

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi verificado que o alelo G (Arg) do polimorfismo do P53 éxon 4 Arg72Pro é fator protetor de ocorrência do AVEH/aneurisma intracerebral.

Alkhalaf e colaboradores investigaram em seu estudo o polimorfismo no gene p53 códon 72 em associação com doença aterosclerótica e diabetes. Realizaram uma análise de associação em relação aos genótipos homozigotos Pro/ Pro, Arg/Arg e heterozigotos Arg / Pro. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o grau de expressão em nenhum dos genótipos e as doenças estudadas e nem associação significativa entre a frequência do alelo Pro e Arg e a doença aterosclerótica¹⁴.

Sanchez e colaboradores mostraram que independente da origem (isquêmica ou hemorrágica), a presença do polimorfismo TP53 Arg72Pro determina o resultado funcional após o AVC. Sendo o genótipo TP53 Arg/Arg um marcador genético de mau prognóstico funcional, enquanto o Pro/Pro apresenta um bom prognóstico¹⁵.

Este último relato corrobora com os resultados encontrados neste estudo, no qual foi demonstrado que o genótipo Tp53 Arg / Arg é um marcador genético de mau prognóstico funcional após o AVEH. Estes resultados sugerem que o genótipo Tp53 Arg / Arg pode ser considerado como um marcador genético que prevê um desfecho funcional fraco após o AVC. Ao comparar todos os pacientes com AVEH e aneurisma descobrimos que a proporção de pacientes com desfecho funcional fraco foi sempre maior em pacientes Arg / Arg quando comparada com Arg / Pro ou Pro / Pro.

No entanto, cabe relatar que o genótipo Arg/Arg está associado a um bom prognóstico em tratamentos anticancerígenos e Tp53 Arg 72 protege as células contra o desenvolvimento neoplásico¹⁵.

Na tabela 3 foi verificado que a presença do genótipo GG aumenta o risco para o prognóstico ruim (ERM>3) em pacientes portadores de AVEH/aneurisma. Uma vez que o genótipo Arg é um indutor mais potente de apoptose, o polimorfismo p53 Arg72Pro contribui para um pior desfecho no prognóstico do AVEH/aneurisma. Estudos demonstram que a presença desse polimorfismo no AVE contribui para o agravamento do quadro clínico do paciente¹⁵.

Características clínicas como HAS, diabetes, tabagismo e etilismo são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de AVE (RODRIGUES, *et.al.*, 2013). Entretanto, no presente estudo não houve associação entre as características

supracitadas e o polimorfismo p53 Arg72Pro (tabela 4). Esse resultado constata a hipótese de que a presença do polimorfismo p53 Arg72Pro atua como fator de risco para a ocorrência do AVEH/aneurisma e descarta a possibilidade de viés de estudo por não haver associação entre os fatores de risco e o polimorfismo no desfecho estudado.

Por fim, efeitos sobre a apoptose são importantes para serem avaliados na patogenia de AVEH, dado que neurônios presentes na penumbra isquêmica por várias horas ou dias podem sofrer o fenômeno de morte celular, levando a propagação do dano cerebral, assim, prevenir a apoptose na penumbra pode ser um dos objetivos para limitar o volume de infarto cerebral após o AVE clínico¹⁶.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos indicaram que há associação entre a presença do polimorfismo do gene P53 Arg72Pro e a ocorrência do AVEH/aneurisma.

Em relação às características clínicas estudadas, não foi constatada associação estatística entre o polimorfismo P53 Arg72Pro e tais características, o que descarta a possibilidade de viés de estudo e ratifica a atuação do polimorfismo como fator de risco para a ocorrência de AVEH/aneurisma.

Todavia, a avaliação do prognóstico por meio da Escala da Ranking modificada demonstrou que a presença do genótipo GG constituía um fator de risco para o prognóstico ruim do AVEI/aneurisma, contribuindo para evidenciar o papel indutor da arginina e conseqüentemente, o agravamento no desfecho do AVEH/aneurisma.

Tendo em vista que o p53 é um importante regulador de vias metabólicas, é primordial a compreensão da relação entre o polimorfismo do gene p53 e sua contribuição para o desfecho do AVEH/aneurisma. Além disso, estudos futuros devem ser realizados a fim de elucidar a associação do AVEH/aneurisma com tal polimorfismo, além de verificar a possibilidade de utilização do gene p53 como alvo terapêutico nas patologias estudadas e, conseqüentemente melhorar o prognóstico dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malta DC, Bernal RTI, Lima MG, Araújo SSC de, Silva MMA da, Freitas MI de F, et al. Doenças crônicas não transmissíveis e a utilização de serviços de saúde: análise da Pesquisa Nacional de Saúde no Brasil. *Rev Saude Publica*. 2017;51(1):1–10.
2. Almeida SRM. Análise epidemiológica do acidente vascular cerebral no Brasil. *Rev Neurociencias*. 2012;20(4):481–2.
3. Baggi Prieto Alvarez R, Rodrigues Pires E, Caramêz R. Acidente Vascular Encefálico. *Rev Unilus Ensino e Pesqui*. 2014;11(25):88–9.
4. Schuster R. Evaluation of the stroke patient ' s functionality Avaliação da funcionalidade de indivíduos acometidos por Acidente Vascular Encefálico. 2017;(January).
5. Pontes-Neto OM, Oliveira-Filho J, Valiente R, Friedrich M, Pedreira B, Rodrigues BCB, et al. Diretrizes para o manejo de pacientes com hemorragia intraparenquimatosa cerebral espontânea. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2009;67(August):940–50. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2009000500034&nrm=iso
6. Madureira PR De, Roberto C, Correa S. A hipertensão arterial e o acidente vascular cerebral. 2007; Available from: http://associacaoavc.pt/images/downloads/pdfs/bA4_Alcool_P.pdf%5Cnhttp://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000480769
7. Rafael S, Roberto J, Melo T, Médica R, Rafael S. ANEURISMA DO SEGMENTO P3 DA ARTÉRIA CEREBRAL POSTERIOR NA Luiz Eduardo Ribeiro Wanderley Filho Residente do Serviço de Neurocirurgia do Hospital sendo considerados raros , mais comuns na bifurcação da artéria carótida interna e cerebral aneurismas na circ. 2013;7(2).
8. Andersen KK, Olsen TS, Dehlendorff C, Kammersgaard LP. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: Stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke*. 2009;40(6):2068–72.
9. Matarin M, Singleton A, Hardy J, Meschia J. 102642^The genetics of ischaemic stroke. *J Intern Med* [Internet]. 2010;267(2):139. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02202.x>
10. Basu S, Murphy ME. Genetic Modifiers of the p53 Pathway. 2016;1–14.

11. Lagares MH, Silva KSF, Barbosa AM, Rodrigues DA. in symptomatic patients with atherosclerosis. 2017;16(codon 72).
12. Khan S, Phulukdaree A, Ramkaran P, Moodley D, Chuturgoon AA. The Arg72 variant of the p53 functional polymorphism (rs1042522) is associated with coronary artery disease in young South Africans of Indian ancestry. *Gene* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;593(2):261–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.040>
13. Bonfigli AR, Sirolla C, Testa R, Cucchi M, Spazzafumo L, Salvioli S, et al. The p53 codon 72 (Arg72Pro) polymorphism is associated with the degree of insulin resistance in type 2 diabetic subjects: A cross-sectional study. *Acta Diabetol.* 2013;50(3):429–36.
14. Alkhalaf M, Al-Bustan S, Hamoda H, Abdella N. Polymorphism of p53 gene codon 72 in Kuwaiti with coronary artery disease and diabetes. *Int J Cardiol.* 2007;115(1):1–6.
15. GOMEZ-SANCHEZ, Jose C. et al. The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *The Journal of experimental medicine*, v. 208, n. 3, p. 429-437, 2011.
16. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40(5).

ANEXO

ANEXO A - Aprovação do projeto pelo comitê de ética



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: cepesedf@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.

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: _____

Índice de Barthel: _____

Tomografia: _____

Angiografia: _____

Observações: _____

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

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 assina-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 sequências 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 sequências 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. 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 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”).

O sangue do paciente sob sua responsabilidade, 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.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob minha responsabilidade.

Paciente sob minha responsabilidade:

Assinatura do participante

Brasília, ____ de _____ de _____

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

Artigos de revisão

Serão aceitos apenas mediante convite.

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

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original que possam ser replicados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir:

Referências

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

Exemplos:

- Artigos de periódicos (um só autor) Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da 'política racial' do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.
- Artigos de periódicos (até seis autores) Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.
- Artigos de periódicos (mais de seis autores) Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-*H. pylori* antibodies in Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.
- Artigo de periódico on-line Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.
- Livros no todo (dois autores) Eyre HJ, Lange DP. *Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery*. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.
- Capítulos ou parte de livro editado por outro autor Mendenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.

- Parte de livro em meio eletrônico São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). Entendendo o meio ambiente. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.
- Evento em meio eletrônico Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.
- Tese ou dissertação Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- Citações no texto Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

Tabelas e figuras

- As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).
- As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.
- O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png, e com resolução de no mínimo 300 dpi.

- O direito à privacidade do paciente não deve ser infringido. Imagens que eventualmente permitam a identificação pessoal somente poderão ser utilizadas com consentimento por escrito do paciente ou responsável, quando da submissão do manuscrito.

Abreviações e nomes de medicamentos

- As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.

- As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

Contato com a secretaria do JBPML

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