



RENATO AUGUSTO SILVA CUNHA

**POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *BAX* EM GRUPO DE
INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL
HEMORRÁGICO (AVCH) OU ANEURISMA INTRACRANIANO EM UMA
AMOSTRA POPULACIONAL DO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA, 2018

RENATO AUGUSTO SILVA CUNHA

POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *BAX* EM GRUPO DE INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL HEMORRÁGICO (AVCH) OU ANEURISMA INTRACRANIANO EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL 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.

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

BRASÍLIA, 2018

CC972 Cunha, Renato Augusto Silva
Polimorfismo da região promotora do gene BAX em grupo de indivíduos diagnosticados com Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCH) ou ANEURISMA INTRACRANIANO em uma amostra populacional do Distrito Federal / Renato Augusto Silva Cunha; orientador Izabel Cristina Rodrigues da Silva. -- Brasília, 2018.
50 p.

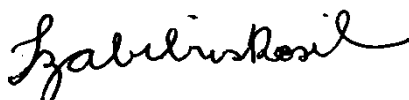
Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Polimorfismo. 2. BAX. 3. AVCH. 4. Aneurisma. I. Silva, Izabel Cristina Rodrigues da, orient. II. Título.

RENATO AUGUSTO SILVA CUNHA

**POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *BAX* EM GRUPO DE
INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL
HEMORRÁGICO (AVCH) OU ANEURISMA INTRACRANIANO EM UMA
AMOSTRA POPULACIONAL DO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA



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

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

Rafael Martins de Moraes
(Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2018.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota ”.

Madre Teresa de Caucutá

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais por sempre me incentivarem e se esforçarem ao máximo para que eu pudesse ter uma educação que os mesmos não puderam ter quando mais novos.

Ao meu irmão Renan Cunha, minha cunhada Armanda, meus sobrinhos Maria Fernanda e Luiz Gustavo e meu afilhado Rennan Augusto por me ensinarem todo dia sobre sentimentos puros e verdadeiros.

Ao Ayslan Melo por toda companhia, incentivo e todo crédito positivo que sempre depositou em mim.

Especialmente a minha orientadora profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues por todos os anos de graduação que sempre foi tão prestativa, dedicada ao ensino e paciente para transmitir todo conhecimento que possui. Serei para sempre grato.

A biomédica Lígia Canongia e o farmacêutico Rafael Martins por aceitarem prontamente o meu convite para participarem da banca examinadora deste trabalho, dedicando o tempo para um momento muito importante para mim.

Ao Dr. Luzitano Brandão Ferreira e Daniel Oliveira Freire pela colaboração crucial para realização deste estudo.

Aos meus fiéis amigos que conquistei durante minha vida Flávio Barreto, Daniel Madureira, Vinícius Gabriel, Renan Torres, Daniel Lucas, Vinícius Reolon, Raphael Vinícius, Gabriel Melo, Débora Melo, Pedro Ricardo, Samara Lorrane, Victor Hugo, Anderson Moraes e outros que me proporcionaram momentos únicos.

Também aos amigos que adquiri durante os anos de graduação Maxwell Souza, Andressa Dias, Jennifer Freire, Vick Oliveira, Laura Mendonça, Dawanne Aparecida, Fernando Ricardo, Bianca Sarmento, Bruna Lepesqueur, Emily Drielle e outros que dividiram a vivência acadêmica comigo.

Aos amigos e companheiros de laboratório Samara Betina, Adara Cerqueira, Victor Lopes, Gabriel Seixas, Pedro Peixoto e todos que compartilharam momentos de pesquisa e trabalho.

Sumário

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO COM REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA	13
Polimorfismos de substituição única (SNP)	13
Gene <i>BAX</i>	13
Apoptose.....	14
Acidente Vascular Cerebral (AVC)	15
Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCI)	16
Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCH)	16
Aneurisma Intracraniano.....	17
Justificativa	17
OBJETIVOS	18
REFERÊNCIAS.....	18
ARTIGO.....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1. <i>Coleta de dados do prontuário</i>	25
2.2. <i>Participantes do estudo</i>	26
2.3. <i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>	26
2.4. <i>Procedimentos Técnicos e Laboratoriais</i>	27
2.4.1. <i>Extração de DNA</i>	27
2.4.2. <i>Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCR)</i>	27
2.4.3. <i>Digestão enzimática</i>	28
2.5. <i>Análise estatística</i>	28
2.5.1. <i>Estatística das frequências genotípicas</i>	28
2.5.2. <i>Análise dos dados dos sujeitos do estudo</i>	28

3.	RESULTADOS	29
4.	DISCUSSÃO.....	31
5.	CONCLUSÕES.....	33
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via intrínseca de ativação de apoptose.....	15
Figura 2. Escala de Rankin modificada.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos participantes da pesquisa conforme o sexo e idade nos grupos AVCH/Aneurisma e controle.....	29
Tabela 2. Estudo da associação genotípica e alélica do polimorfismo do <i>BAX G/A</i> (-248) (rs4645878) no estudo de caso-controle.....	30
Tabela 3. Associação entre o polimorfismo do <i>BAX G/A</i> (-248) (rs4645878) e o prognóstico conforme a Escala de Rankin modificada relacionada aos pacientes do grupo caso.....	30
Tabela 4. Associação entre o polimorfismo <i>BAX G/A</i> (-248) (rs4645878) e doenças crônicas.....	31

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é um importante problema de saúde pública, que se situa entre as quatro maiores causas de morte em muitos países, pode ser classificado em isquêmico ou hemorrágico, possuindo diversos fatores ambientais e de herança genética que podem estar associados. O gene *BAX*, é um membro pró-apoptótico da família *BCL2* e está localizado no cromossomo 19q13.3. Além disto, estudos experimentais com ratos mostraram que os níveis da proteína bax estavam elevados em animais que sofreram acidente vascular isquêmico, e foram tratados com álcool, diferente dos ratos tratados com terapia normobárica, mostrando que o gene *BAX* pode ter relação com um prognóstico ruim do AVC. Sendo assim, o objetivo geral deste estudo foi verificar a frequência do polimorfismo G/A (-248) do *BAX* (rs4645878) em uma amostra populacional de indivíduos brasileiros com Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCH) ou Aneurisma Intracerebral e comparar com um grupo controle. O trabalho foi delineado e realizado como estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle. Foram padronizadas e executadas as análises moleculares do polimorfismo do gene *BAX* em 162 indivíduos, sendo que 81 eram portadores de AVCH e/ou Aneurisma Intracerebral. O nível de significância adotado foi de 5%. Não foi apontada diferença estatística entre os grupos caso e controle na associação genotípica/alélica do polimorfismo. Em relação a um prognóstico bom ou ruim, através da Escala de Rankin modificada, os participantes com a presença polimórfica apontaram vínculo com uma presunção clínica ruim para um AVCH e/ou aneurisma e também nenhum dos indivíduos com genótipo ancestral foi diagnosticado com a doença crônica Diabetes. A presença do polimorfismo G/A (-248) do *BAX* não está associado com AVCH e/ou Aneurisma e nenhum dos indivíduos com genótipo G/G havia prognóstico ruim na ERm. O alelo G, no modelo dominante está fortemente associado a ausência de diabetes, e também a ausência do prognóstico ruim avaliado conforme a ERm.

Palavras – chave: Polimorfismo. *BAX*. AVCH. Aneurisma

ABSTRACT

Stroke is an important public health problem, which is among the four major causes of death in many countries and It can be classified as ischemic or hemorrhagic, and several environmental and genetic inheritance factors may be associated. The *BAX* gene is a pro-apoptotic member of the *BCL2* family and is located on chromosome 19q13.3. In addition, experimental studies with rats showed that levels of the bax protein were elevated in animals suffering from ischemic stroke, and were treated with alcohol, unlike mice treated with normobaric therapy, showing that the *BAX* gene may be related to a poor prognosis of the Stroke. Thus, the general objective of this study was to verify the frequency of the *BAX* (-248) G/A polymorphism (rs4645878) in a population sample of Brazilian individuals with Hemorrhagic Stroke or Intracerebral Aneurysm and to compare it with a control group. The study was designed and performed as an observational, descriptive case-control study. Molecular analyzes of the *BAX* gene polymorphism were standardized and performed in 162 individuals, 81 of whom were carriers of Hemorrhagic Stroke and/or Intracerebral Aneurysm. The level of significance was 5%. The difference between the case and control groups in the genotypic/allelic association of the polymorphism was not observed. With regard to a good or poor prognosis, through the modified Rank Scale, participants with a polymorphic presence indicated a link with a poor clinical presumption for an Hemorrhagic Stroke and/or aneurysm and also in none of the individuals with ancestral genome was diagnosed with a chronic disease Diabetes. The presence of the *BAX* G/A (-248) polymorphism is not being associated with Hemorrhagic Stroke and/or Aneurysm, and none of the individuals with the G/G genotype had poor mRS prognosis. The G allele, no problem statically associated with an absence of diabetes, and also an absence of poor prognosis as a modified Rankin Scale.

Keywords: Polymorphism. *BAX*. Hemorrhagic Stroke. Aneurysm.

INTRODUÇÃO COM REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA

Polimorfismos de substituição única (SNP)

Os SNPs são mutações pontuais de bases selecionadas que ocorrem e podem desencadear substituições de aminoácidos em proteínas codificadas pelo gene ou pequenas inserções e deleções em fragmentos de DNA homólogos ou na alteração da expressão da proteína normal por este gene. Como possível consequência disto pode levar a alterações (aumentando ou diminuindo) em mecanismos de controle da pressão arterial e, subsequentemente, desenvolvimento de doenças crônicas como hipertensão arterial, ocasionadas juntamente a fatores ambientais (STRACHAN, READ, 2002; SHAHEEN *et al.*, 2010).

Gene *BAX*

O gene *BAX* encontra-se no cromossomo 19q13.3, sua expressão é induzida pelo gene *P53*, possui um sítio de ligação para a proteína p53 que atua como fator de transcrição, assim, o aumento na expressão da proteína p53 parece estar relacionada com aumento na ativação transcricional da proteína *bax* (GENG *et al.*, 2013; MIYASHITA, REED, 1995; THORNBORROW *et al.*, 2002).

Segundo o SNPedia atualmente existem 6 SNPs que se relacionam com alterações no gene *BAX*, dentre eles: em regiões de ligação da p53 associado com o risco de carcinoma espinocelular esofágico onde há uma troca de Citosina por Timina (rs1009316), leucemia linfóide aguda (LLA) de células T onde ocorre a troca de Glicina por Arginina na região codificante 39 do gene (rs398122842) e a troca de Glicina por Arginina na região codificante 67 (rs398122513), carcinoma de cólon onde ocorre a troca de Glutamato por Glicina na região codificante 41 deste gene (rs398122840) e a troca de Glutamato por Arginina também na região codificante 41 deste gene (rs398122841) e o polimorfismo *BAX* -248 G/A (rs4645878) que caracteriza-se pela presença dos nucleotídeos guanina no alelo selvagem e adenina no alelo variante, encontra-se na região 5' não traduzida, no promotor desse gene. O alelo variante A foi associado com a redução da expressão da proteína pró-apoptótica *bax*, quando comparado ao alelo selvagem G (SAXENA *et al.*, 2002; STARCZYNSKI *et al.*, 2005).

Estudos que avaliam indivíduos saudáveis de populações étnicas distintas apontam que o genótipo homocigoto selvagem GG foi identificado em 77-85%, o heterocigoto GA em 14-21% e o homocigoto variante AA em 0-1% dos indivíduos saudáveis de populações étnicas distintas (FEGAN *et al.*, 2006; KÖHLER *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007).

Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programado, ativo, com controle intrínseco, possui influência de fatores externos e está presente em diversas situações patológicas e fisiológicas, como em processos inflamatórios e a morfogênese no desenvolvimento embrionário, respectivamente (BONINI, 2000).

Tal processo ocorre em células isoladas e o controle do processo de apoptose pode ser executado por fatores internos e externos. A proteína bax pode se apresentar sob a forma de homodímeros (bax-bax), determinando apoptose, ou juntamente com a proteína bcl-2 (célula-B de linfoma 2), em heterodímeros (bax-bcl-2) que resultará na sobrevivência celular inibindo a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela bax na membrana externa mitocondrial pois a bax atua na pró-apoptose devido a interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas induzindo a liberação da APAF-1 (fator de ativação de protease associada à apoptose 1) se associando à bcl-2, ativando a caspase 9, levando a apoptose, como mostrado na figura 1 (BONINI, 2000; GRIVICICH *et al.*, 2007).

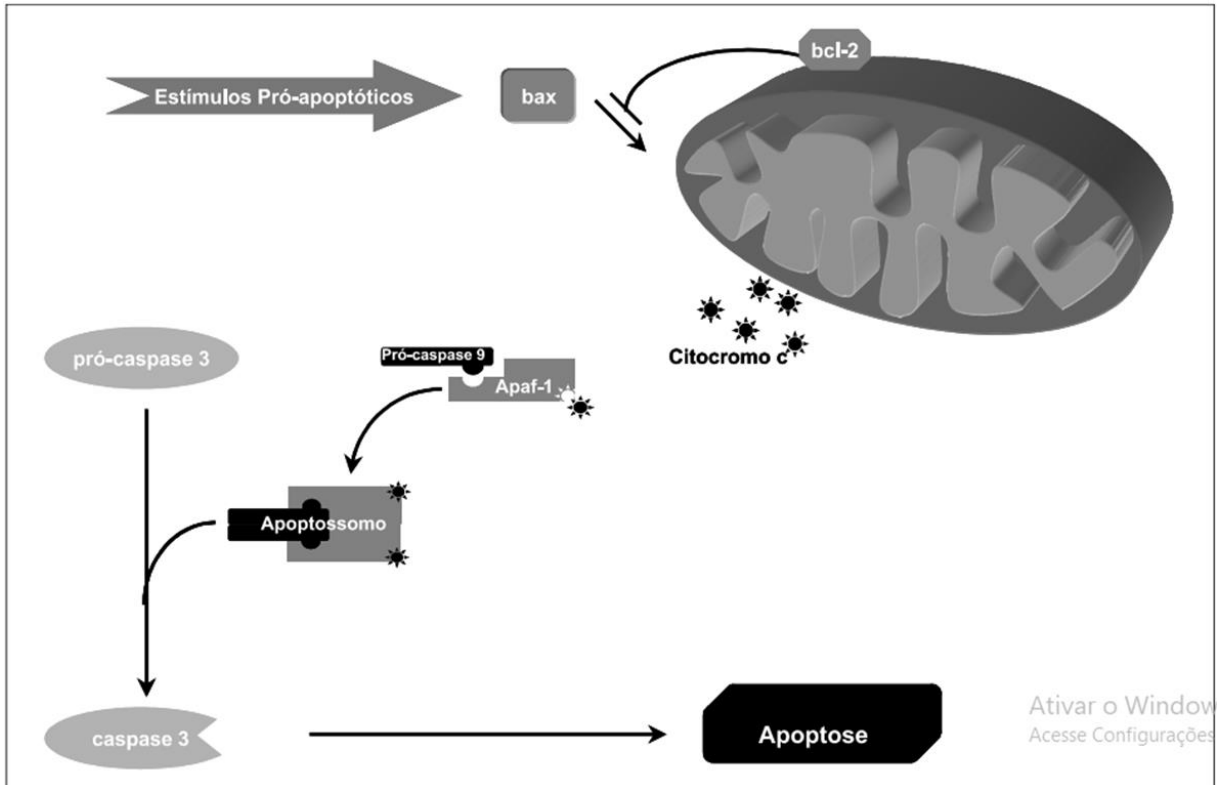


Figura 1. Via intrínseca de ativação de apoptose. (GRIVICICH *et al.*, 2007)

O proto-oncogene BCL-2 é um dos mais conhecidos genes relacionados a apoptose, tendo relação com a derrogação do processo. E a proteína p53 é um fator de transcrição responsável pela iniciação do processo apoptótico. Danos ao DNA e outros estímulos podem aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas trazendo um desequilíbrio e ocorrendo a apoptose. (BONINI, 2000).

Acidente Vascular Cerebral (AVC)

O AVC é causado pela insuficiência do fluxo sanguíneo no tecido cerebral, provocando ausência ou diminuição de oxigênio e glicose, gerando hipóxia e/ou anóxia e um comprometimento ou perda da função neurológica. Divide-se clinicamente como isquêmico ou hemorrágico, quando há o impedimento do fluxo sanguíneo por um embrião ou uma oclusão trombótica de uma artéria cerebral e quando há um rompimento de um vaso, ocorrendo hemorragia subaracnóide e intraparenquimatosa, respectivamente. (FANN *et al.*, 2013; PONTES-NETO *et al.*, 2009).

Ponderando com frequência um distúrbio metabólico ou hematológico implícito, anormalidades laboratoriais diversas foram associadas ao AVC e identificadas como possíveis precursoras (SILVA, 2015).

O AVC é caracterizado por sinais de desenvolvimento rápido de distúrbios focais ou globais de funções cerebrais ou que ocasionam morte do indivíduo. 85% dos AVC são decursivos 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).

Acidente Vascular Cerebral Isquêmico (AVCI)

Uma cascata de eventos ao nível neuronal leva a disfunção e morte de células devido a diminuição ou suspensão de irrigação sanguínea, começando pela insuficiência da bomba de Na/K, a despolarização da membrana neuronal, a liberação de neurotransmissores excitatórios e a abertura dos canais de cálcio. Os quatro subtipos mais frequentes de infarto cerebral são o aterosclerótico, cardioembólico, de pequenos vasos (lacunar) e criptogênico (ROWLAND, 2002).

O aterosclerótico se dá pela diminuição da luz do vaso causado pelo acúmulo de gordura ou outros elementos na parede da artéria. O cardioembólico acomete territórios vasculares diferentes, causa infartos em áreas do córtex cerebral e tem como precursora alguma patologia cardíaca importante como trombo intracavitário.

O subtipo lacunar está muito relacionado com hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes mellitus, mas sem alterações significativas em exames de investigação que suscitaria outra causa. Assim como etiologias por causas determinadas e indeterminadas, o criptogênio pertence as causas indeterminadas onde não há uma associação atual clara com alterações em exame de investigação.

Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCH)

As hemorragias intracranianas podem ser classificadas de três formas, pela localização: intracerebral, quando o extravasamento ocorre dentro da massa cefálica e subaracnóide, quando o sangue fica confinado entre as meninges pia-mater e

aracnoide; conforme a natureza do vaso ou vasos rompidos: arterial, capilar e venosa ou de acordo com a causa: primária, quando ocorre a ruptura espontânea do vaso ou secundária, devido a um aneurisma, malformação no vaso ou por alguns medicamentos (BROUWERS *et al.*, 2014; SILVA, 2015).

O AVC hemorrágico está associado com um aumento significativo da mortalidade dentro dos primeiros três meses após o surgimento da doença, que é especificamente e independentemente associada com a natureza da lesão, por isso, o AVC hemorrágico é geralmente mais grave do que AVC isquêmico (ANDERSEN *et al.*, 2009).

Aneurisma Intracraniano

Aneurisma intracraniano é uma lesão normalmente ocasionadas por defeitos congênitos na parede dos vasos sanguíneos, alterações ateroscleróticas, traumatismos ou embolias infecciosas. É uma doença comum de origem multifatorial, que possui fatores ambientais e genéticos associados à sua etiologia e representa cerca de 80% das lesões hemorrágicas subaracnóideas não traumática (CARANCI *et al.*, 2013).

De modo geral, os sintomas só aparecem depois das lesões hemorrágicas, ou seja, após as rupturas sucedidas. As lesões hemorrágicas subaracnóideas acarretam uma incidência reduzida se comparadas com aneurisma intracraniano não rompido e o risco de ruptura depende intrinsecamente da localização e do tamanho assim como as reações inflamatórias e imunológicas que podem estar ligadas tanto na ruptura como na formação. Em alguns casos podem manifestar sinais de alerta: paralisia do nervo craniano ou dor de cabeça, dor acima e atrás do olho e dor no pescoço secundária para uma hemorragia do aneurisma (LI *et al.*, 2012).

Justificativa

Visto que na literatura não há estudos da associação do polimorfismo do gene *BAX* com *AVCH* em seres humanos e levando em consideração que o AVC é responsável por uma grande proporção de problemas neurológicos, resultante de uma interação entre fatores ambientais e genéticos, o presente estudo buscou investigar

se há associação entre o polimorfismo do gene *BAX* e o AVCH ou Aneurisma, para fundamentar a provável relação entre o polimorfismo genético específico e a predisposição ou presença da doença. Assim, este estudo pode colaborar para um possível diagnóstico e contribuir futuramente para o tratamento destas doenças.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi verificar a frequência do polimorfismo -248 G/A do *BAX* em uma amostra populacional de indivíduos brasileiros com AVCH ou Aneurisma Intracerebral e investigar associação com diferentes manifestações clínicas e prognóstico dos pacientes. Os objetivos específicos deste trabalho foram realizar o levantamento bibliográfico sobre polimorfismo *BAX* G/A (-248), padronizar e executar as estratégias de biologia molecular (PCR e digestão enzimática) para estudo da frequência deste polimorfismo em indivíduos com AVCH ou Aneurisma Intracerebral e investigar a possível associação entre o polimorfismo *BAX* G/A (-248) com diferentes manifestações clínicas e prognóstico de pacientes com AVCH ou Aneurisma Intracerebral.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, K. K. *et al.* Hemorrhagic and ischemic strokes compared: Stroke severity, mortality, and risk factors. **Stroke**, v. 40, n. 6, p. 2068–2072, 2009.
- BONINI, A. L.; MOURA, L. A. R.; FRANCO, M. Revisão: Apoptose em glomerulopatias. **J Bras Nefrol**, 2000;22(2):70-7
- BROUWERS, H. B., *et al.* "Predicting hematoma expansion after primary intracerebral hemorrhage." **JAMA neurology** 71(2): 158-164, 2014.
- CARANCI, F. *et al.* Epidemiology and genetics of intracranial aneurysms. **European Journal of Radiology**, v. 82, n. 10, p. 1598–1605, 2013.
- CHEN, K.; HU, Z.; WANG, L.E.; STURGIS, E.M.; NAGGAR, K.E.; ZHANG, W.; WEI, Q. (2007). Single nucleotide polymorphism at the *TP53*-binding or responsive promoter regions of *BAX* and *BCL2* genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis** 28(9): 2008-2012
- FANN, David Yang-Wei *et al.* Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 4, p. 941-966, 2013.

- FEGAN, C.; STARCZYNSKI, J.; PRATT, G.; PEPPER, C. (2006). The role of the *BAX* gene polymorphism G(-248)A in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia** 20(8):1460-1461
- GENG, Xiaokun *et al.* Reduced apoptosis by combining normobaric oxygenation with ethanol in transient ischemic stroke. **Brain research**, v. 1531, p. 17-24, 2013.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. da. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2007; 53(3): 335-343
- KÖHLER, K.F.; PETZL-ERLER, M.L. (2006). No evidence for association of the *TP53* 12139 and the *BAX*-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **International Journal Immunogenetics** 33(2):141-144
- LI, L. *et al.* Interactions of miR-34b / c and *TP53* Polymorphisms on the Risk of Intracranial Aneurysm. v. 2012, 2012.
- LIU, J. *et al.* Association of carotid atherosclerosis and recurrent cerebral infarction in the chinese population: A meta-analysis. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 13, p. 527–533, 2017.
- MIYASHITA, T.; REED, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *BAX* gene. *Cell* 80(2):293-299
- PONTES-NETO, Octávio M. *et al.* Brazilian guidelines for the management of intracerebral hemorrhage. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, v. 67, n. 3B, p. 940-950, 2009.
- ROWLAND, Lewis P. Merritt *Tratado de Neurologia*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.
- .
- SAXENA A; MOSHYNKA O; SANKARAN K; VISWANATHAN S; SHERIDAN DP (2002). Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of *BAX* gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. **Cancer Letters** 187(2):199-205
- SILVA, I. C. R. Polimorfismos genéticos associados ao Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico e ao Aneurisma Intracerebral. **Universidade de Brasília-FCE**. Brasília – DF, 2015.
- STARCZYNSKI, J.; PEPPER, C.; PRATT, G.; HOOPER, L; THOMAS, A; MILLIGAN, D; BENTLEY, P; FEGAN, C (2005). Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the *BAX* gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated. **J Clin Oncol** 23(7):1514-1521

THORNBORROW, Edward C. et al. A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes. **Oncogene**, v. 21, n. 7, p. 990, 2002.

ARTIGO

Título: POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE BAX EM GRUPO DE INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL HEMORRÁGICO (AVCH) OU ANEURISMA INTRACRANIANO EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL DO DISTRITO FEDERAL

Autores: CUNHA, R. A. S¹, 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

A ser publicado na revista *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*
(Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine)

RESUMO

INTRODUÇÃO: O acidente vascular cerebral (AVC) é um importante problema de saúde pública, que se situa entre as quatro maiores causas de morte em muitos países, pode ser classificado em isquêmico ou hemorrágico e diversos fatores ambientais e de herança genética podem estar associados. O gene *BAX*, é um membro pró-apoptótico da família *BCL2* e está localizado no cromossomo 19q13.3. Além disto, estudos experimentais com ratos mostraram que os níveis da proteína *bax* estavam elevados em animais que sofreram acidente vascular isquêmico, e foram tratados com álcool, diferente dos ratos tratados com terapia normobárica, mostrando que o gene *BAX* pode ter relação com um prognóstico ruim do AVE.

OBJETIVOS: Sendo assim, o objetivo geral deste estudo foi verificar a frequência do polimorfismo G/A (-248) do *BAX* (rs4645878) em uma amostra populacional de indivíduos brasileiros com AVCH ou Aneurisma Intracerebral e comparar com um grupo controle.

MATERIAL E MÉTODO: O trabalho foi delineado e realizado como estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle. Foram padronizadas e executadas as análises moleculares do polimorfismo do gene *BAX* em 162 indivíduos, sendo que 81 eram portadores de AVCH e/ou Aneurisma Intracerebral. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS: Não foi apontada diferença estatística entre os grupos caso e controle na associação genotípica/alélica do polimorfismo. Em relação a um prognóstico bom ou ruim, através da Escala de Rankin modificada, os participantes com a presença polimórfica apontaram vínculo com uma presunção clínica ruim para um AVCH e/ou aneurisma e também nenhum dos indivíduos com genótipo ancestral foi diagnosticado com a doença crônica Diabetes.

CONCLUSÃO: A presença do polimorfismo G/A (-248) do *BAX* não está associado com AVCH e/ou Aneurisma e nenhum dos indivíduos com genótipo G/G havia prognóstico ruim na ERM. O alelo G, no modelo dominante está fortemente associado a ausência de diabetes, e também a ausência do prognóstico ruim avaliado conforme a ERM.

Palavras – chave: Polimorfismo. *BAX*. AVCH. Aneurisma

ABSTRACT

INTRODUCTION: Stroke is an important public health problem, which is among the four major causes of death in many countries and It can be classified as ischemic or hemorrhagic, and several environmental and genetic inheritance factors may be associated. The *BAX* gene is a pro-apoptotic member of the *BCL2* family and is located on chromosome 19q13.3. In addition, experimental studies with rats showed that levels of the bax protein were elevated in animals suffering from ischemic stroke, and were treated with alcohol, unlike mice treated with normobaric therapy, showing that the *BAX* gene may be related to a poor prognosis of the Stroke.

OBJECTIVES: Thus, the general objective of this study was to verify the frequency of the *BAX* (-248) G/A polymorphism (rs4645878) in a population sample of Brazilian individuals with Hemorrhagic Stroke or Intracerebral Aneurysm and to compare it with a control group.

MATERIAL AND METHOD: The study was designed and performed as an observational, descriptive case-control study. Molecular analyzes of the *BAX* gene polymorphism were standardized and performed in 162 individuals, 81 of whom were carriers of Hemorrhagic Stroke and/or Intracerebral Aneurysm. The level of significance was 5%.

RESULTS: The difference between the case and control groups in the genotypic/allelic association of the polymorphism was not observed. With regard to a good or poor prognosis, through the modified Rank Scale, participants with a polymorphic presence indicated a link with a poor clinical presumption for an Hemorrhagic Stroke and/or aneurysm and also in none of the individuals with ancestral genome was diagnosed with a chronic disease Diabetes.

CONCLUSION: The presence of the *BAX* G/A (-248) polymorphism is not being associated with Hemorrhagic Stroke and/or Aneurysm, and none of the individuals with the G/G genotype had poor Mrs prognosis. The G allele, no problem statically associated with an absence of diabetes, and also an absence of poor prognosis as a mRS.

Keywords: Polymorphism. *BAX*. Hemorrhagic Stroke. Aneurysm.

1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é um importante problema de saúde pública, que se situa entre as quatro maiores causas de morte em muitos países e é responsável por uma grande proporção de distúrbios neurológicos. Mais incapacitante que fatal, o acidente vascular cerebral é a principal causa de incapacidade neurológica grave e acarreta tanto em gastos com cuidados de saúde, como em perda de produtividade¹. Pode ser classificado em isquêmico ou hemorrágico e diversos fatores ambientais e de herança genética podem estar associados, entre elas, a hipertensão arterial, obesidade, sedentarismo, dislipidemia, aterosclerose, coagulopatias, tumores, artrites inflamatórias e infecciosas e ingestão de álcool e fumo. O AVC hemorrágico é devido principalmente às malformações vasculares intracranianas e secundárias a trauma².

Acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCH) é uma doença multifatorial complexa resultante de uma interação entre fatores genéticos de uma pessoa e vários fatores ambientais³. Fortes evidências de estudos familiares, com gêmeos e em modelos animais, têm consistentemente sugerido uma influência genética sobre o risco e prognóstico de AVC⁴.

Medições funcionais do comprometimento neurológico são utilizadas para melhor abrangência da situação, tomadas de decisão, acompanhamento clínico e melhor tratamento de um paciente pós-AVC. A Escala de Rankin, que foi atualizada com o passar dos anos compreende 7 níveis de incapacidades neurológicas (0-6), desde a ausência de sintomas ao desfecho com óbito⁵, detalhado na figura 2 a seguir.

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 2. Escala de Rankin modificada⁶.

Polimorfismos genéticos são variações genéticas em que o alelo menos comum corresponde a mais de 1% população. Dentre os principais polimorfismos de DNA

destaca-se os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) que são alterações pontuais de bases selecionadas, chamado de mutação pontual. Esta alteração 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. Os SNPs formam polimorfismos denominados RSPs (*Restriction Site Polymorphisms*), caracterizados pelos alelos que possuem ou não um determinado sítio de restrição, portanto, podem apresentar um polimorfismo de sítio de restrição^{7,8}.

O gene *B-cell lymphoma 2-associated X protein*, o *BAX*, é um membro pró-apoptótico da família *BCL2* e está localizado no cromossomo 19q13.3. Além disto, estudos experimentais com ratos mostraram que os níveis da proteína bax estavam elevados em animais que sofreram acidente vascular isquêmico, e foram tratados com etanol, diferente dos ratos tratados com terapia de oxigenação normobárica, mostrando que o gene *BAX* pode ter relação com um prognóstico ruim do AVC⁹.

Com isto, o objetivo deste estudo foi verificar a frequência do polimorfismo -248 G/A do *BAX* em uma amostra populacional de indivíduos brasileiros com AVCH ou Aneurisma Intracerebral e investigar associação com prognóstico e diferentes manifestações clínicas dos portadores do agravo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi delineado e realizado como estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle em pacientes com diagnóstico de AVCH e/ou aneurisma intracerebral e em indivíduos sem registro do desfecho residentes no Distrito Federal (Brasil).

2.1. Coleta de dados do prontuário

Após a aprovação do estudo pelo comitê de Ética da Fepecs (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, e pontuação na Escala de Rankin Modificada (ERm)¹⁰.

2.2. 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 AVCH e/ou aneurisma intracerebral; admitidos no período de 1 de janeiro de 2011 a 31 de dezembro de 2012; com diagnóstico de AVCH 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 AVCH 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 AVCH 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 AVCH 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 AVCH 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 AVCH 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).

2.3. 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 III).

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.

2.4. Procedimentos Técnicos e Laboratoriais

2.4.1. 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 Invitek (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/μL.

2.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a genotipagem *BAX* (-248 G>A) - rs4645878- foi executada conforme dados da literatura¹¹. Os oligos utilizados foram Senso 5'- CATTAGAGCTGCGATTGGACCG -3' e Antisenso 5'- GCTCCCTCGGGAGGTTTGGT -3'.

As condições de termociclagem foram 96°C por 2 minutos (desnaturação inicial), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, acompanhada de 56°C por 40 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/ μ L); 1,5 μ L de cada oligonucleotídeo forward e reverse (10 μ M); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 μ L por reação.

Estes oligonucleotídeos flanqueiam o gene *BAX* e amplifica um fragmento de DNA de 109 pb.

2.4.3. Digestão enzimática

O produto da PCR foi digerido com a enzima *MspI* (*New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA*). O alelo ancestral (G) cria um novo sítio de restrição, e o fragmento de 109 pb é clivado em dois de 89 pb e 20 pb; e o alelo polimórfico (A) não é clivado pela enzima. Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0 μ L da PCR; 2,0 μ L de tampão 10x *CutSmart® Buffer* (Biolabs); 1 μ L de enzima *BstUI* (10U/ μ L), completando com água Milli-Q para um volume final de 20 μ L 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.

2.5. Análise estatística

2.5.1. 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% ($P < 0,05$).

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aplicado no grupo controle por ser a base da genética de populações e poder demonstrar que as frequências dos alelos não sofreram alteração ao longo das gerações.

2.5.2. 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 caso 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% ($P < 0,05$).

3. 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/AVCH, com 59,3% ($n = 48$) e no grupo controle (53,1%; $n = 43$). No tocante às idades, a média ficou em torno dos 53 ± 5 anos, para o grupo Aneurisma/AVCH e 52 ± 5 anos para o grupo controle.

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

Variáveis	AVCH/Aneurisma		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 genóticas e alélicas do polimorfismo *BAX* (-248 G>A) nos participantes, separados pelos grupos. Os dados indicaram que a frequência dos genótipos não apresentou diferença estatística entre

as proporções no grupo caso e grupo controle ($P=0,2144$). O genótipo G/G foi encontrado em 82,7% dos pacientes do grupo controle ($n=67$) e em 72,8% do grupo caso ($n=59$). As frequências alélicas também não foram estatisticamente diferentes entre os grupos AVCH/aneurisma e controle (alelo G: 134 contra 146 respectivamente, $P=0,052$; $OR=0,52$). Além disso, o grupo controle encontrava-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P=0,504$).

Tabela 2. Estudo da associação genotípica e alélica do polimorfismo do *BAX* G/A (-248) (rs4645878) no estudo de caso-controle.

<i>BAX</i> G/A (-248) (rs4645878)	Grupos				P	OR (IC 95%)
	Aneurisma/AVCH		Controle			
	N	%	N	%		
G/G	59	72,8	67	82,7	0,2144	NA
G/A	16	19,8	12	14,8		
A/A	06	7,4	2	2,5		
Total	81	100,0	81	100,0		
G/G	59	72,8	67	82,7	0,131	0,56 (0,26-1,19)
G/A+A/A	22	27,2	14	17,3		
Total	81	100,0	81	100,0		
G	134	82,7	146	90,1	0,052	0,52 (0,27-1,01)
A	28	17,3	16	9,9		
Total	162	100,0	162	100,0		

NA: Não se aplica

Na Tabela 3 é possível visualizar a relação entre um prognóstico ruim de acordo com a Escala de Rankin modificada dado que todos os participantes com prognóstico ruim ($n=10$) eram portadores do alelo polimórfico A, tanto no modelo recessivo quanto no modelo heterozigoto ($P<0,01$).

Tabela 3. Associação entre o polimorfismo do *BAX* G/A (-248) (rs4645878) e o prognóstico conforme a Escala de Rankin modificada relacionada aos pacientes do grupo caso.

		<i>BAX</i> G/A (-248) (rs4645878)				P	OR (IC 95%)
		G/G		G/A+A/A			
		N	%	N	%		
ERm	Prognóstico ruim	0	0,0%	10	45,5%	<0,01*	NA
	Bom prognóstico	59	100,0%	12	54,5%		

*Diferença estatística

NA: Não se aplica

Na Tabela 4, observou-se a associação do polimorfismo *BAX* G/A (-248) (rs4645878) e a presença das doenças crônicas: Hipertensão Arterial Sistêmica, Diabetes, tabagismo e etilismo dos grupos caso e controle. Há diferença estatística ($P < 0,05$) apenas na doença Diabetes (grupo caso) com valor de $P = 0,018$ em que entre os pacientes portadores do genótipo G/G, todos não foram diagnosticados com diabetes ($n = 59$).

Tabela 4. Associação entre o polimorfismo *BAX* G/A (-248) (rs4645878) e doenças crônicas.

Grupos		<i>BAX</i> G/A (-248) (rs4645878)				P	OR (IC 95%)		
		G/G		G/A+A/A					
		N	%	N	%				
AVCH/Aneurisma	HAS	Sim	42	71,2%	18	81,8%	0,332	0,55 (0,16-1,86)	
		Não	17	28,8%	4	18,2%			
	Diabetes	Sim	0	0,0%	3	13,6%	0,018*	NA	
		Não	59	100,0%	19	86,4%			
	Tabagismo	Sim	24	40,7%	8	36,4%	0,729	1,2 (0,44-3,30)	
		Não	35	59,3%	14	63,6%			
	Etilismo	Sim	17	28,8%	5	22,7%	0,583	1,38 (0,44-4,33)	
		Não	42	71,2%	17	77,3%			
	Controle	HAS	Sim	8	11,9%	0	0,0%	0,339	NA
			Não	59	88,1%	14	100,0%		
Diabetes		Sim	0	0,0%	0	0,0%	1	NA	
		Não	67	100,0%	14	100,0%			
Tabagismo		Sim	19	28,4%	5	35,7%	0,748	0,71 (0,21-2,40)	
		Não	48	71,6%	9	64,3%			
Etilismo		Sim	16	23,9%	4	28,6%	0,739	0,78 (0,22-2,84)	
		Não	51	76,1%	10	71,4%			

*Diferença estatística

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

NA: Não se aplica

4. DISCUSSÃO

Este estudo foi o primeiro a investigar a associação do polimorfismo do gene *BAX* com AVCH e/ou Aneurisma em seres humanos numa amostra da população brasileira.

Pode-se notar que não houve associação estatística ($P > 0,05$) entre o grupo caso e controle contrapondo os genótipos GG, GA e AA. Este estudo realizado em seres humanos diverge dos resultados relatados por Geng e colaboradores⁹ produzido em ratos no ano de 2013 onde se pode correlacionar o aumento da proteína

bax nos ratos com a ocorrência de AVC. Por outro lado, um estudo de Saxena e colaboradores¹⁰ sobre este polimorfismo do gene *BAX* em associação com a doença Leucemia Linfocítica Crônica em uma amostra populacional da cidade de Saskatoon, Canadá apontou que o alelo G está mais correlacionado com o aumento da proteína bax quando colacionado com o alelo A. O autor também mostrou uma frequência dos mesmos genótipos quanto ao grupo controle com frequência de 94,3% do genótipo GG, 5,7% do GA e 0% do AA, enquanto na amostra controle do Distrito Federal, Brasil do presente estudo foi de 82,7%, 14,8% e 2,5%, respectivamente mostrada na Tabela 2.

Quanto ao prognóstico, dentro dos pacientes com polimorfismo *BAX* G/A (-248) foi possível identificar uma associação importante entre a presença do alelo polimórfico A e o prognóstico ruim conforme classificado pela Escala de Rankin modificada.

Quão mais ruim o prognóstico (≥ 3) está associado a um paciente na ERm após um AVC, mais incapacitado ele se encontra e maior a necessidade de cuidados e auxílio profissional⁶. A redução da expressão da proteína bax descrita para essa mutação pode estar associada com o prognóstico ruim pois o desequilíbrio causado em relação a apoptose pode gerar um acúmulo de células do tecido danificado aumentando a oclusão do vaso sanguíneo ou artéria e por outro lado, diminuindo a apoptose diminui-se também o processo inflamatório natural que seria importante para a renovação celular local do dano, como descrito num estudo por Parmar¹², acarretando em um prolongamento do processo do AVC e maior comprometimento do paciente quanto ao risco.

A estratificação do grupo caso revelou que todos os portadores do genótipo ancestral G/G não eram diagnosticado com diabetes ($P=0,018$). No entanto, Podesta e colaboradores¹³ realizaram um trabalho em 2000 que confronta este achado, pois mostraram que a proteína bax está aumentada na retina de indivíduos diabéticos e está associada à apoptose de pericitos vasculares da região ocular *in vivo* e *in vitro*, porém vale ressaltar que o estudo especificava uma característica da diabetes - a retinopatia.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo caso-controle demonstrou que a presença do polimorfismo não está associada a ocorrência de AVCH ou aneurisma, porém foi possível observar que o alelo G, no modelo dominante está associado a ausência de diabetes, e também a ausência do prognóstico ruim avaliado conforme a Escala de Rankin modificada.

Como futuras perspectivas, estudos deverão ser executados que compreendam melhor a participação do gene *BAX* e da proteína *bax* na fisiopatologia de AVC e Aneurisma.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arroyo HA, Tamer I. Cerebrovascular disease in childhood and adolescence. Ischaemic cerebral accidents. *Revista de neurologia* 34.2. 2002; 133-144.2.
2. Rowland LP. Merritt Tratado de Neurologia. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.
3. Yamada Y, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Kato K, Hibino T, *et al.* Genetic factors for ischemic and hemorrhagic stroke in Japanese individuals. *Stroke*. 2008; 39(8), 2211-2218.
4. Matarin M, Brown WM, Dena H, Britton A, De Vrieze FW, Brott TG, *et al.* Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. *Stroke*. 2009; 40:3436-3442.
5. dos Santos SLF, Araújo AM, da Silva Alves HH, Barros KBNT, & de Macedo Arraes MLB. SERVIÇO DE ATENÇÃO FARMACÊUTICA EM PROGNÓSTICO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: RELATO DE CASO. *Revista de APS*. 2017; 20(4).
6. Falcão CH, Falcão ALE, Ulhoa A, Rezende M, Salgado, CG, Malheiros WG, *et al.* Trombólise intra-arterial associada a angioplastia adjunta na fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*. 2010.
7. Góes ACS. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. *Revista do Biomédico*. 2005; São Paulo, p. 22 – 23.

8. McNevin D, Wilson-Wilde L, Robertson J, Kyd J, & Lennard C. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair: Part 1. Review of current status and knowledge gaps. *Forensic science international*. 2005; 153(2-3), 237-246.
9. Banks JL, Marotta CA. Outcomes validity and reliability of the modified Rankin scale: implications for stroke clinical trials: a literature review and synthesis. *Stroke*. 2007; 38(3), 1091-1096.
10. Geng X, Parmar S, Li X, Peng C, Ji X, Chakraborty T, *et al*. Reduced apoptosis by combining normobaric oxygenation with ethanol in transient ischemic stroke. *Brain research*. 2013; 1531, 17-24.
11. Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of *BAX* gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Letters*. 2002; 187(2):199-205
12. Parmar KN. A imunidade pós-AVC: da inflamação à infecção. 2016; Diss.
13. Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, *et al*. *BAX* is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *The American journal of pathology*. 2000; v. 156, n. 3, p. 1025-1032.

ANEXOS

ANEXO I - 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 II – 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 III – 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(a) 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 IV – 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