

Avaliação do polimorfismo do gene TP53 Arg72Pro e sua Relação com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico em Pacientes Brasileiros

Evaluation of the TP53 Arg72Pro gene polymorphism and its relationship with hemorrhagic stroke in Brazilian patients

Evaluación del polimorfismo del gen TP53 Arg72Pro y su relación con el accidente cerebrovascular hemorrágico en pacientes brasileños.

Samara Betina Rocha Carvalho¹, Aline Ribeiro Barros¹, Leonardo Aquino¹, Luzitano Brandão Ferreira², Helia Carla Souza Silva²,
Izabel Cristina Rodrigues da Silva¹

Como citar: Carvalho SBR, Barros AR, Aquino L, Ferreira LB, Silva HCS, Silva ICR. Avaliação do polimorfismo do gene TP53 Arg72Pro e sua relação com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico em Pacientes Brasileiros. REVISA. 2020; 9(1): 89-96. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v9.n1.p89a96>

REVISA

1. Universidade de Brasília.
Faculdade de Ceilândia. Ceilândia,
Distrito Federal, Brasil.

2. Centro Universitário de Brasília.
Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Recebido: 22/11/2019
Aprovado: 14/01/2020

RESUMO

Objetivo: investigar a associação entre o polimorfismo TP53 Arg72Pro em pacientes diagnosticados com acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) ou aneurisma intracerebral em uma amostra do Distrito Federal. **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 Arg do polimorfismo do TP53 Arg72Pro atuou como fator do risco para a ocorrência do AVEH/aneurisma intracerebral. A presença do genótipo Arg/Arg aumentou o risco para o prognóstico ruim (ERM >3) em pacientes portadores do AVEH/aneurisma ($P < 0,01$; OR = 6,07). Não houve associação estatística entre HAS, diabetes, tabagismo e etilismo e a presença do polimorfismo TP53 Arg72Pro no grupo estudado. **Conclusão:** Concluiu-se que a presença do alelo Arg do polimorfismo do TP53 Arg72Pro está associada ao aumento do risco de ocorrência do AVEH/aneurisma intracerebral.

Descritores: Genes p53; Acidente Vascular Cerebral; Polimorfismo Genético.

ABSTRACT

Objective: to investigate the association between the TP53 Arg72Pro polymorphism in patients diagnosed with hemorrhagic stroke (HS) or intracerebral aneurysm in a sample from Distrito Federal. **Method:** This was a case-control study, with 162 individuals equally divided into groups, with notes on the clinical characteristics of the medical record and analysis of genotyping using the PCR strategy. Genotype frequencies were estimated by direct counting. The level of significance adopted was 5%. **Results:** we found that the presence of the Arg allele of the TP53 Arg72Pro polymorphism acted as a risk factor for the occurrence of HS/intracerebral aneurysm. The presence of the Arg/Arg genotype increased the risk for poor prognosis (ERM > 3) in patients with HS/aneurysm ($P < 0.01$; OR = 6.07). There was no statistical association between SAH, diabetes, smoking and alcohol consumption and the presence of the TP53 Arg72Pro polymorphism in the studied group. **Conclusion:** It was concluded that the presence of the Arg allele of the TP53 Arg72Pro polymorphism is associated with an increased risk of occurring HS/intracerebral aneurysm.

Descriptors: Genes p53; Stroke; Polymorphism, Genetic.

RESUMEN

Objetivo: investigar la asociación entre el polimorfismo TP53 Arg72Pro en pacientes diagnosticados de accidente cerebrovascular hemorrágico (AVEH) o aneurisma intracerebral en una muestra del Distrito Federal. **Método:** Este fue un estudio de casos y controles, con 162 individuos igualmente divididos en grupos, con notas sobre las características clínicas de la historia clínica y el análisis de genotipado utilizando la estrategia de PCR. Las frecuencias de genotipo se estimaron por conteo directo. El nivel de significación adoptado fue del 5%. **Resultados:** Se encontró que la presencia del alelo Arg del polimorfismo TP53 Arg72Pro actuó como un factor de riesgo para la aparición de AVEH/aneurisma intracerebral. La presencia del genotipo Arg / Arg aumentó el riesgo de mal pronóstico (ERM > 3) en pacientes con AVEH/aneurisma ($P < 0.01$; OR = 6.07). No hubo asociación estadística entre SAH, diabetes, tabaquismo y consumo de alcohol y la presencia del polimorfismo TP53 Arg72Pro en el grupo estudiado. **Conclusión:** se concluyó que la presencia del alelo Arg del polimorfismo TP53 Arg72Pro se asocia con un mayor riesgo de aparición de AVEH/aneurisma intracerebral.

Descriptores: Genes p53; Accidente Cerebrovascular; Polimorfismo Genético.

Introdução

Uma das principais causas de mortalidade na atualidade são as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que são responsáveis por aproximadamente 70% de todos os óbitos. Dentre as DCNT mais prevalentes destacam-se as neoplasias, diabetes e doenças cardiovasculares.¹ Entre essas doenças o Acidente Vascular Encefálico (AVE), que segundo a OMS é responsável por um expressivo número de internação e mortalidade, além do grande potencial de provocar lesões permanentes e invalidez.²

O AVE pode ser definido como a interrupção do fluxo sanguíneo em uma determinada região encefálica, que persiste por pelo menos 24 horas e ocasiona a perda repentina da função neurológica. Alguns sinais visíveis são a alterações do nível de consciência e comprometimento das funções sensorial, motora, cognitiva, perceptiva e de linguagem.³ O AVE pode ser dividido em isquêmico, quando ocorre a oclusão de uma artéria decorrente de um ateroma ou êmbolos⁴, e hemorrágico, quando há hemorragia intraparaquimentosa ou hemorragia subaracnóide⁵. Algumas evidências sugerem que variações genéticas podem estar associadas com a suscetibilidade e prognóstico do AVE.⁶

O gene supressor de tumor TP53 encontra-se na posição 1.3 do braço curto do cromossomo 17, sendo constituído de 12 éxons. Esse gene é responsável pela codificação do fator de transcrição p53, que possui propriedade antitumoral, pois participa de processos que medeiam a apoptose.⁷ Os resultados funcionais pós AVC podem ser explicados pela presença de neurônios apoptóticos tanto na penumbra isquêmica como na área de perihematoma, indicando uma morte neuronal apoptótica tardia.⁸⁻⁹

Os polimorfismos mais estudados nesse gene são do tipo SNP (polimorfismo de nucleotídeo único). Alguns estudos demonstraram que o polimorfismo Arg72Pro estaria relacionado com diferentes prognósticos de AVE.¹⁰ Há dados que indicam a associação do gene TP53 com a neuroproteção após isquemia¹¹, provavelmente por que o fator de transcrição p53 seria deslocado do cortisol para mitocôndrias em resposta ao estímulo isquêmico.¹⁰ No entanto a participação das variações genéticas do TP53 no Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH) ainda é desconhecida, há pouco estudos que avaliam a associação dos polimorfismos deste gene com o AVEH.

Nesse contexto, este estudo tem por objetivo a avaliar a associação do polimorfismo Arg72Pro do gene TP53 em indivíduos portadores de AVEH. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal, número do parecer: 0095/2010.

Método

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo do tipo caso-controle em pacientes com diagnóstico de AVEH ou aneurisma intracerebral e em indivíduos sem registro da doença, todos residentes no Distrito Federal (Brasil). Os dados pessoais dos participantes da pesquisa foram obtidos por meio de preenchimento de uma ficha de identificação específica. 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).

O grupo caso teve como critérios de inclusão, pacientes: de ambos os sexos; com idade maior que 18 anos; com diagnóstico de AVEH ou aneurisma intracerebral com diagnóstico comprovado por meio de tomografia computadorizada.

Para o grupo controle os critérios de inclusão indivíduos foram: 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.

Ao todo foram analisados 162 indivíduos sendo o grupo caso constituído de pacientes 81 portadores de AVEH e/ou aneurisma intracerebral com média de idade $53,5 \pm 5,9$ anos (48 mulheres e 33 homens). O grupo controle sem histórico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral foi composto por 81 pessoas incluídas com idade média de $52,3 \pm 5,7$ (43 mulheres e 38 homens).

Foram coletados aproximadamente 5 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.

A genotipagem foi realizada por meio da técnica de PCR qualitativa. Foram utilizadas as seguintes sequências de oligonucleotídeos:

Foward 5'-TCCCCCTTGCCGTCCCAA -3'
Reverse 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 μ L de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/ μ L; 2,5 μ L de tampão 10x (10 mM de Tris e 50 mM de KCl); 0,5 μ L de MgCl₂ (Fermentas), 0,5 μ L de dNTPs (2,5mM; LGC); 0,5 μ L 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. O produto desta PCR é um fragmento de 279 pb.

Os produtos da PCR foram submetidos a digestão enzimática com 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 μ L da PCR; 2,0 μ L de tampão 10x NEB4 (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.

As frequências genóticas 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% ($p < 0,05$).

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% ($p < 0,05$).

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). Observamos maior prevalência do sexo feminino entre os portadores de Aneurisma/AVEH (59,3%) e no grupo controle (53,1%).

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%
	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	

Teste T de student

Na tabela 2 foi observado que a frequência dos genótipos apresentou uma diferença estatística significativa 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. O grupo controle encontrava-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,504$).

Tabela 2-Estudo da associação genotípica e alélica do polimorfismo TP53 Arg72Pro no estudo de caso-controle.

TP53Arg72Pro	Grupos						P	OR (IC 95%)	
	Aneurisma/AVEH		Controle		Total				
	N	%	N	%	N	%			
Arg/Arg	11	13,6	32	39,5	43	26,5	<0,01*	NA	
Arg/Pro	42	51,9	40	49,4	82	50,6	<0,01*		
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	+	70	86,4	49	60,5	119	73,5	<0,01*	0,24 (0,11-0,52)
Pro/Pro									
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		

NA: Não se aplica

Foi possível observar que 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), como demonstrado da Tabela 3.

Não foi observado associação estatística significativa entre a presença do polimorfismo TP53 Arg72Pro e as características clínicas dos pacientes.

Tabela 3- Associação entre o polimorfismo TP53 Arg72Pro e o prognóstico conforme a Escala de Rankin modificada relacionada aos pacientes do grupo caso.

		TP53 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	7	63,6%	64	91,4%		
	prognóstico						

Testes Qui-Quadrado; ERM: Escala Rankin Modificada

Tabela 4- Associação entre o polimorfismo TP53 Arg72Pro e as características clínicas/hábitos relacionados aos pacientes de cada grupo.

Grupos		TP53 Arg72Pro				P	OR (IC95%)	
		Arg/Arg		Arg/Pro + Pro/Pro				
		Contagem	% da coluna	Contagem	% 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		
	HAS	sim	4	12,5	4	8,2	0,706	1,6 (0,37-6,94)
		não	28	87,5	45	91,8		
Controle	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		

Teste Qui-Quadrado; NA: não se aplica.

Discussão

Alkhalaf e colaboradores investigaram em seu estudo o polimorfismo no gene TP53 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 aterosclerótica.¹²

Gomes-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 prognóstico.¹³

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 neoplásico.¹³

Foi observado 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 TP53 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 paciente.¹³

Por fim, efeitos sobre a apoptose são importantes para serem avaliados na patogênica 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 clínico.⁸

Conclusão

Os dados obtidos indicaram que há associação entre a presença do polimorfismo do gene TP53 Arg72Pro e a ocorrência do AVEH/aneurisma.

Em relação às características clínicas estudadas, não foi constatada associação estatística entre o polimorfismo TP53 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 Arg/Arg constituía um fator de risco para o prognóstico ruim do AVEH/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 TP53 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 TP53 como alvo terapêutico nas patologias estudadas e, conseqüentemente melhorar o prognóstico dos pacientes.

Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Financiamento

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal.

Referências

1. Malta, D. C. *et al.* Noncommunicable diseases and the use of health services: analysis of the National Health Survey in Brazil. *Rev. Saude Publica* **51**, (2017).
2. World Health Organization. *Global status report on noncommunicable diseases 2014 - Global Target 7: Halting the rise in diabetes and obesity.* (2014).
3. Baggi Prieto Alvarez, R., Rodrigues Pires, E. & Caramêz, R. Acidente Vascular Encefálico. *Rev. Unilus Ensino e Pesqui.* **11**, 88–89 (2014).
4. Schuster, R. Evaluation of the stroke patient ' s functionality Avaliação da funcionalidade de indivíduos acometidos por Acidente Vascular Encefálico. (2017).
5. Pontes-Neto, O. M. *et al.* Diretrizes para o manejo de pacientes com hemorragia intraparenquimatosa cerebral espontânea. *Arq. Neuropsiquiatr.* **67**, 940–950 (2009).
6. Matarin, M., Singleton, A., Hardy, J. & Meschia, J. The genetics of ischaemic stroke. *J. Intern. Med.* **267**, 139 (2010).
7. Basu, S. & Murphy, M. E. Genetic Modifiers of the p53 Pathway. 1–14 (2016).
8. Broughton, B. R. S., Reutens, D. C. & Sobey, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, (2009).
9. Qureshi, A. I. *et al.* Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery* **52**, 1041–7; discussion 1047–8 (2003).
10. Gomez-Sanchez, J. C. *et al.* The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *J. Exp. Med.* **208**, 429–437 (2011).
11. Ramos-Araque, M. E. *et al.* The Neuronal Ischemic Tolerance Is Conditioned by the Tp53 Arg72Pro Polymorphism. *Transl. Stroke Res.* **10**, 204–215 (2019).
12. 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.* **115**, 1–6 (2007).
13. Gomez-sanchez, J. C. *et al.* O polimorfismo humano TP53 Arg72Pro explica diferentes prognósticos funcionais no AVC. **72**, (2011).

Autor de Correspondência

Izabel Cristina Rodrigues da Silva.
Campus Universitário, s/n, Centro
Metropolitano. CEP: 72220-275. Brasília, Distrito
Federal, Brasil.
belbiomedica@gmail.com