

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Avaliação de polimorfismos nos genes *TP53* e *MDM2* ao longo de quatro gerações e sua influência na longevidade**

**Gabriela Elis Wachholz**

**Orientação: Profa. Dra. Lavínia Schuler Faccini**

**Coorientação: Dr. Juliano André Boquett**

Porto Alegre  
Janeiro de 2018

Gabriela Elis Wachholz

**Avaliação de polimorfismos nos genes *TP53* e *MDM2* ao longo de quatro gerações e sua influência na longevidade**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas da UFRGS.

Orientação: Profa. Dra. Lavínia Schuler Faccini

Coorientação: Dr. Juliano André Boquett

Porto Alegre  
Janeiro de 2018

## AGRADECIMENTOS

À professora Lavínia Schuler Faccini, pela oportunidade de realização desse projeto, por ser uma grande orientadora e uma inspiração, não só na pesquisa, como na vida.

Ao Juliano, meu coorientador, por ter sido um grande companheiro ao longo do desenvolvimento de todo o trabalho, desde a parte experimental até a escrita da monografia.

Aos demais pesquisadores participantes do Projeto Ger4ções, pois o trabalho e o esforço de cada um foram fundamentais para que as amostras e as informações de cada indivíduo participante fossem obtidas.

Às famílias de Veranópolis que concordaram e se disponibilizaram a fazer parte do projeto.

Ao professor Lucas e à doutora Fernanda pela ajuda nas últimas análises estatísticas.

A todos os colegas e grandes amigos do Laboratório de Genética Médica Populacional e Evolução, mais conhecido como Laboratório 113, por todos os momentos de felicidade, amizade e aprendizado.

Aos meus avós, Hilma (*in memoriam*), Aldino, Elacy e Abilio por todo carinho, amor e apoio recebidos.

Aos meus queridos pais, Fabiana e Sandro, por todo o amor, incentivo, apoio, investimento nos melhores recursos para a minha formação, e por serem os maiores exemplos de vida e amor que eu poderia ter. Vocês são a razão de tudo e a minha inspiração!

## RESUMO

A conquista da longevidade é dependente de uma complexa interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Estudos prévios sugerem que variantes no gene *TP53* (*Tumor protein p53*) possam estar relacionadas com a longevidade. Neste estudo, avaliamos o papel de polimorfismos nos genes *TP53* e *MDM2* (*Mouse double minute 2 p53 binding protein homolog*) – seu principal regulador – na longevidade em indivíduos de diferentes famílias com quatro gerações vivas da população da cidade de Veranópolis, RS. Assim, foram avaliadas as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo P72R (rs1042522) de *TP53* e do SNP309 (rs2279744) de *MDM2* em indivíduos de doze famílias distribuídos em quatro gerações. Comparações entre gerações e outros subgrupos não apresentaram diferença entre as frequências genóticas e alélicas dos dois polimorfismos avaliados. Porém, quando consideradas apenas mulheres divididas em dois grupos (gerações 1 e 2 vs. gerações 3 e 4) as frequências alélicas de G (34,1% e 43,0%, respectivamente) do SNP309 de *MDM2* apresentaram diferença ( $p = 0,04$ ). O aumento da frequência do alelo G nas gerações 3 e 4 pode sugerir que este esteja sendo selecionado através de gerações em mulheres. Este alelo está associado ao aumento da atividade de *MDM2*, que regula negativamente p53, diminuindo, assim, sua atividade apoptótica. Assim, propomos um modelo de estudo transversal e transgeracional que considera várias famílias e suas gerações na investigação de fatores genéticos e ambientais que possam ter papel na longevidade.

Palavras-chave: longevidade, P72R, *TP53*, SNP309, *MDM2*, genética.

## ABSTRACT

The achievement of longevity is dependent on a complex interaction between genetic, epigenetic and environmental factors. Previous studies suggest that variants in *TP53* gene (*Tumor protein p53*) might be related to longevity. We evaluated the role of polymorphisms in *TP53* gene and *MDM2* (*Mouse double minute 2 p53 binding protein homolog*) gene- its main regulator- in longevity in individuals of different families with four alive generations of Veranópolis, RS. Thereby, genotypic and allelic frequencies of P72R polymorphism of *TP53* (rs1042522) and the SNP309 of *MDM2* (rs2279744) were evaluated in individuals from twelve families over four generations. Comparisons between generations and other subgroups did not present difference between genotypic and allelic frequencies of both evaluated polymorphisms. However, when considering only womens divided in two groups (1 and 2 generations vs. 3 and 4 generations) a significant difference of allelic frequency of G (34,1% e 43,0%, respectively) of SNP309 polymorphism of *MDM2* was found ( $p = 0,04$ ). The increase of G allele frequency in 3 and 4 generations might suggest this allele is being selected in the transmission of generations in womens. This allele is associated with increase of *MDM2* activity, that negatively regulates p53, decreasing its apoptotic activity. Herein we propose a transversal and transgenerational study model that considers different families and their generations in the research of genetic and environmental factors that might have a role in longevity.

Key-words: longevity, P72R, *TP53*, SNP309, *MDM2*, genetics.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL                            | 8  |
| 1.1 Longevidade                                | 8  |
| 1.2 Os genes <i>TP53</i> e <i>MDM2</i>         | 9  |
| 1.3 Polimorfismos em <i>TP53</i> e <i>MDM2</i> | 11 |
| 1.4 A cidade de Veranópolis                    | 13 |
| 2. JUSTIFICATIVA                               | 15 |
| 3. OBJETIVOS                                   | 16 |
| 3.1 Objetivo geral                             | 16 |
| 3.2 Objetivos específicos                      | 16 |
| 4. MÉTODOS                                     | 17 |
| 4.1 Delineamento                               | 17 |
| 4.2 Amostragem                                 | 17 |
| 4.2.1 Critério de Inclusão                     | 17 |
| 4.2.2 Critério de não inclusão                 | 17 |
| 4.2.3 Método Amostral                          | 17 |
| 4.4 Instrumento                                | 18 |
| 4.4.1 Avaliação demográfica e socioeconômica   | 18 |
| 4.4.2 Avaliação de condições de nascimento     | 18 |
| 4.4.3 Avaliação antropométrica                 | 18 |
| 4.4.4 Avaliação de saúde                       | 19 |
| 4.4.5 Avaliação alimentar                      | 19 |
| 4.4.6 Avaliação de estresse                    | 19 |
| 4.5 Estudo genético                            | 19 |
| 4.5.1 Coleta de amostras biológicas            | 19 |
| 4.5.2 Extração de DNA                          | 20 |
|  | 6  |

|  |    |
|--|----|
| 4.5.3 Determinação de polimorfismos de <i>TP53</i> e <i>MDM2</i> | 20 |
| 4.5.4 Análise estatística  | 20 |
| 4.6 Aspectos éticos  | 21 |
| 5. RESULTADOS  | 23 |
| 6. DISCUSSÃO   | 30 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                    | 35 |
| 8. APÊNCIDES   | 38 |
| 9. Anexos  | 45 |

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Longevidade

A senescência humana pode ser interpretada evolutivamente através de um modelo de *trade off* entre o investimento do indivíduo em crescimento somático e o investimento na reprodução, ou seja, na perpetuação dos seus genes. Apesar de um grande investimento na reprodução ser necessário, o investimento limitado na manutenção somática pode levar ao acúmulo de danos que, ao se somarem, resultam no processo de envelhecimento (Kirkwood, 1997). Desta forma, o envelhecimento pode ser visto como o resultado do acúmulo de danos moleculares e celulares (Groß *et al.*, 2014).

Sabe-se que o acúmulo de danos moleculares com o passar dos anos faz parte de um processo natural, que pode ser acelerado devido a maus hábitos. Fumar, ingerir bebidas alcoólicas em excesso, não seguir uma dieta saudável, sedentarismo e stress constante são fatores que contribuem para o envelhecimento acelerado, diminuindo a longevidade do indivíduo. Assim como maus hábitos podem acelerar o envelhecimento, indivíduos que apresentam bons hábitos, provavelmente serão mais longevos. A conquista da longevidade é dependente de uma complexa interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Contudo, os fatores genéticos parecem ter uma forte influência na sobrevivência em idades mais avançadas (Capri, 2006).

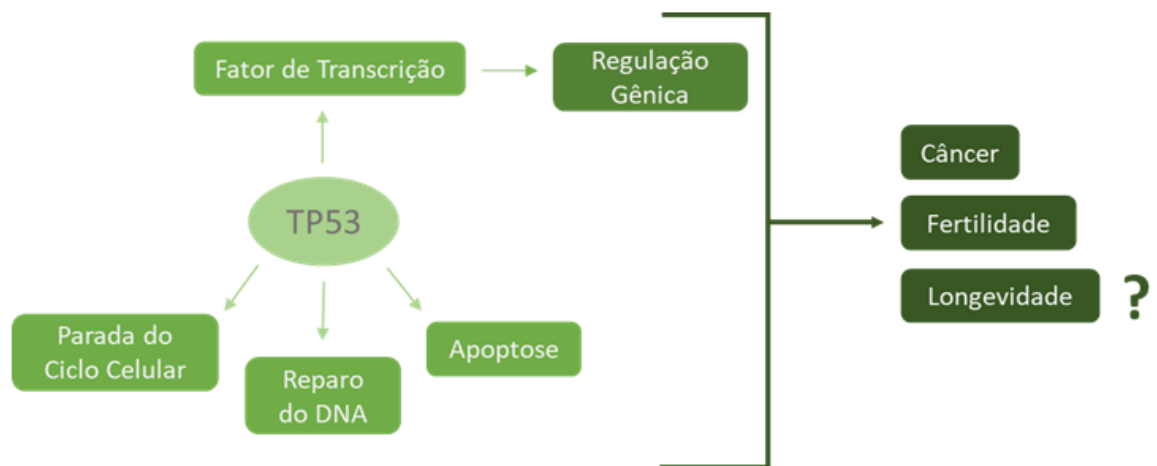
A instabilidade genômica gerada pelo acúmulo de danos moleculares ao longo da vida do indivíduo é controlada por um grupo de genes responsável pela manutenção da estabilidade genômica e pelo reparo do DNA, denominado *caretakers*. Há também um outro grupo de genes, denominado *gatekeepers*, os supressores tumorais, responsáveis pela eliminação das células em situação de extrema instabilidade genômica (Campisi, 2003). A relação desses dois grupos de genes com a longevidade é bastante complexa. A expressão aumentada dos *caretakers* mantém a estabilidade genômica, reduzindo o risco de câncer, adiando o envelhecimento, encaminhando o indivíduo à longevidade. Já a expressão aumentada dos *gatekeepers* leva a uma maior taxa de apoptose celular, o que



diminui o risco de câncer, mas acaba por acelerar as taxas de envelhecimento (van Heemst *et al.*, 2005).

## 1.2 Os genes *TP53* e *MDM2*

O gene supressor tumoral *TP53* (*Tumor protein p53*) se situa no cromossomo 17 p.13.1. e é constituído por 11 éxons, composto por 2.629 pares de bases que resultam em uma proteína de 393 aminoácidos ao final da tradução (Bojesen & Nordestgaard, 2008). Conhecido como “guardião do genoma”, é responsável pela codificação de fatores de transcrição que, por meio da regulação transcricional dos genes, podem levar à apoptose celular, parada do ciclo ou reparo do DNA, como indicado na figura 1, em resposta a condições de estresse, prevenindo o crescimento de tumores (Bojesen & Nordestgaard, 2008). Mutações no gene *TP53* estão relacionadas com variados processos biológicos como o câncer, a fertilidade e a longevidade.



**Figura 1.** Representação das principais funções do gene *TP53* e suas implicações (Adaptado de Levine, 2011).

Mutações germinativas no gene *TP53* podem resultar na síndrome de Li-Fraumeni. Descrita por Joseph Fraumeni e Frederick Li, esta síndrome é uma condição autossômica dominante rara. Essas mutações levam à uma perda de

função do gene *TP53*, pois apenas uma de suas cópias permanece funcional. Essa perda de função torna os indivíduos afetados por essa síndrome mais predispostos ao desenvolvimento de câncer. Estimativas estipulam que portadores da síndrome de Li-Fraumeni tenham 50% de chances de desenvolverem câncer até os 30 anos de idade (Thomas, 2017).

Assim, a proteína p53 tem um papel muito importante na manutenção da estabilidade genômica celular, atuando na supressão tumoral através de sua atividade apoptótica (Levine *et al.*, 2006), podendo, desta maneira, ter relação com a longevidade (Donehower, 2005). Por outro lado, variantes do gene *TP53* podem influenciar sua atividade na manutenção da estabilidade genômica. Desta forma, apesar do efeito positivo que o gene *TP53* apresenta na longevidade, também há um impacto negativo nessa condição. Achados indicam que o gene *TP53* possa exercer um papel muito importante aumentando a sobrevivência a doenças graves durante a vida adulta, porém possa suprimir a longevidade em idade avançada (Donehower, 2005). O efeito desse gene também pode ser negativo, apoiando a hipótese de que o gene *TP53* possua uma “pleiotropia antagonista”.

Além do destacado papel desempenhado por *TP53* na supressão tumoral, este gene também tem papel em outras questões biológicas como fertilidade e reprodução. Variantes no gene *TP53* já foram associadas a aborto recorrente idiopático (Pietrowski *et al.*, 2005) e aborto espontâneo (Firouzabadi *et al.*, 2009). Do mesmo modo, variantes no gene *TP53* já foram associadas como fator de risco para gestações gemelares (Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2012) e aneuploidias (Boquett *et al.*, 2013), sugerindo que uma baixa eficiência apoptótica possa tornar tolerante a gestação de gêmeos e de fetos com aneuploidia. Além disso, a eficiência da proteína p53 enquanto fator de transcrição está associada à implantação embrionária e com a fertilidade. Variantes no gene *TP53* indicam que este gene possa desempenhar um importante papel em relação à fertilidade, o que reforça a hipótese de que *TP53* regula a reprodução humana (Kang *et al.*, 2009).

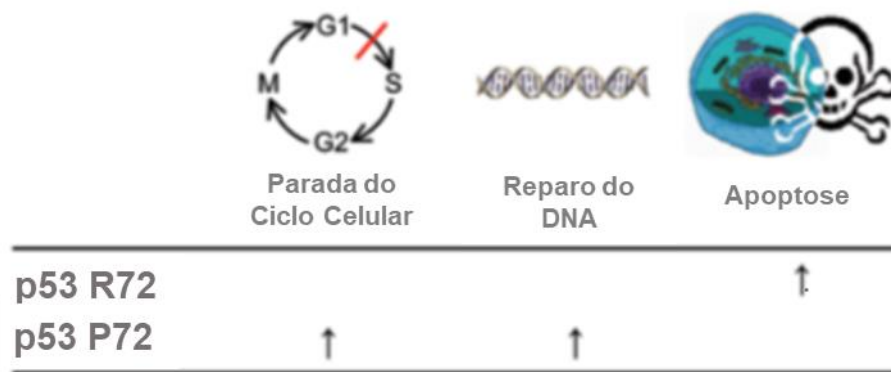
Estudos observaram que a função do gene ancestral ~~de *TP53*, uma combinação próxima aos genes *TP63* e *TP73*~~, encontrado já em animais como a anêmona do mar (Belyi *et al.*, 2010), é de desencadear a apoptose em resposta à

danos no DNA para manutenção da instabilidade genômica (Lu *et al.*, 2009) e a fidelidade de processos de desenvolvimento garantindo o sucesso da prole (Feng *et al.*, 2011). Este gene é muito conservado e é encontrado em insetos, vermes, vertebrados, tendo sua função sido importante para a evolução durante bilhões de anos (Belyi *et al.*, 2010).

O gene *MDM2* (*Mouse double minute 2 p53 binding protein homolog*) está localizado no cromossomo 12q15 e codifica uma ubiquitina ligase E3, que promove a degradação proteossomal de proteínas (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MDM2&keywords=MDM2>). É um proto-oncogene e responsável pela manutenção de níveis baixos da proteína p53 em ausência de sinais de estresse celular por meio da sua atividade de ubiquitina ligase, sendo o principal regulador negativo de *TP53*. Isso permite que haja uma proliferação celular normal (Toledo & Wahl, 2006). A superexpressão ou amplificação do *MDM2* é detectada em diferentes tipos de câncer. Variantes encontradas em *MDM2* estão associadas a um alto risco de abortamento retido (Fang *et al.*, 2011) e também a susceptibilidade à variados tipos tumorais.

### 1.3 Polimorfismos em *TP53* e *MDM2*

Os genes que fazem parte da via de sinalização do *TP53* possuem importantes polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs). Um dos principais polimorfismos no gene *TP53* é o SNP c.215G>C (P72R, rs1042522), localizado no domínio de ativação da proteína p53, no códon 72. A substituição de uma base G por uma C acarreta na alteração também do aminoácido, que antes era uma arginina (R72) por uma prolina (P72) (Buchman *et al.*, 1988). Esta alteração gera um grande impacto funcional na proteína, pois R72 é mais eficiente na indução de apoptose, enquanto P72 é mais efetivo na indução da parada do ciclo celular e no reparo do DNA, como está demonstrado na figura 2 (Bojesen & Nordestgaard, 2008).



**Figura 2.** Diferenças funcionais entre as proteínas p53 com o alelo R72 e com o alelo P72 (Adaptado de Bojesen & Nordestgaard, 2008).

Em alguns estudos, indivíduos homozigotos para o alelo P72 apresentam uma incidência aumentada de câncer, o que corrobora com achados de que essa variante da proteína p53 seria menos eficiente na atividade anti-proliferativa do que a variante R72 (van Heemst *et al.*, 2005). Estudos realizados com as populações holandesa, dinamarquesas e italiana investigaram o efeito do SNP P72R na longevidade e encontraram associações com o alelo P72R (Bojesen & Nordestgaard, 2008; Bonafè *et al.*, 1999; Orsted *et al.*, 2007; van Heemst *et al.*, 2005). Além disso, a associação do alelo P72 de *TP53* com infertilidade devido à falha de implantação recorrente já foi descrita (Kay *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011).

O gene *MDM2* possui um importante polimorfismo funcional, o SNP c.14+309T>G (SNP309, rs2279744), localizado na sua região promotora (Bond *et al.*, 2004). Esta alteração resulta no aumento de sua expressão (genótipo GG), o que acabada atenuando a função da proteína p53, já que uma das principais funções do gene *MDM2* é a manutenção dos níveis baixos de p53 na célula, como indicado na figura 3 (Di Pietro *et al.*, 2012). Há dados de que o polimorfismo SNP309 esteja associado com alto risco de desenvolvimento de tumores, o que suporta a potencial relação entre o SNP309 de *MDM2* e o polimorfismo P72R de *TP53* (Wan *et al.*, 2011). Devido à esta relação entre eles, sugere-se que o SNP309 de *MDM2* também desempenhe papel na reprodução, atenuando a atividade da proteína p53, o que acarreta em uma menor expressão do gene LIF (Fator Inibidor de Leucemia), regulado por p53 e um dos principais genes responsáveis pela implantação embrionária (Kang *et al.*, 2009). Estudos em ratos

já determinaram a relação do alelo G (SNP309) com sobrevivência maior em fêmeas, indicando uma relação entre o SNP309 do gene *MDM2* com longevidade (Groß *et al.*, 2014).



**Figura 3.** Efeito funcional do polimorfismo SNP309 de *MDM2*: aumento expressão de *MDM2*, que regulara negativamente *TP53*, baixando os níveis disponíveis da proteína p53.

#### 1.4 A cidade de Veranópolis

Veranópolis é um município do estado do Rio Grande do Sul, localizado na mesorregião Nordeste, microrregião de Caxias do Sul, a 170 quilômetros de distância ao norte da capital Porto Alegre. É conhecida como o Berço Nacional da Maça e também como a Terra da Longevidade. Historicamente, teve sua colonização iniciada em 1884 com a vinda de imigrantes italianos. Posteriormente, imigrantes poloneses também se instalaram no município.

De acordo com dados demográficos disponibilizados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), Veranópolis tem como população estimada 25.073 pessoas no ano de 2017 (<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/veranopolis/panorama>). A estimativa é de que 69,43% da economia veranense esteja concentrada em Indústrias de transformação, tipo de indústria que transforma matéria-prima em produto final ou intermediário, como as metalúrgicas (<http://www.veranopolis.rs.gov.br/cidade/4/dados-de-veranopolis>).

Veranópolis possui IDH – Índice de Desenvolvimento Humano – de 0,773, próximo ao IDH da cidade de Porto Alegre, que é de 0,805. A taxa de Esgotamento Sanitário Adequado no município é de 92,8%, ocupando a 15ª posição entre 497 cidades no estado, ou 302ª posição entre 5570 cidades de todo o país.

O indicador social *esperança de vida ao nascer*, componente do IDHM longevidade (Índice de Desenvolvimento Humano Municipal Longevidade) é utilizado para avaliar a longevidade nos municípios. No último censo realizado em 2010, a *esperança de vida ao nascer* na cidade de Veranópolis era de 75,3 anos, já para a população total brasileira esse mesmo indicador era de 73,9 anos ([http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/perfil\\_m/veranopolis\\_rs](http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/perfil_m/veranopolis_rs)).

## 2. JUSTIFICATIVA

Esse trabalho faz parte de um projeto previamente aprovado que tem como foco de estudo a população da cidade de Veranópolis (Avaliação da herdabilidade do comprimento telomérico e de polimorfismos na via de p53 ao longo de quatro gerações e sua influência na longevidade - Projeto GPPG 16-0447 – CAAE 59567916.0.0000.5327). Há anos essa população já vem sendo estudada devido à sua longevidade e pela grande quantidade de famílias com mais de quatro gerações vivas e residindo no mesmo local.

A compreensão dos fatores genéticos envolvidos na fertilidade e na longevidade são objetos de grande interesse atual. O estudo de uma população longeva, mas com características compartilhadas a outras populações é um meio de tentar compreender quais fatores genéticos estariam influenciando na longevidade. Até o presente momento, poucos estudos têm investigado polimorfismos na via do *TP53* e a influência destes marcadores na saúde e longevidade de indivíduos de uma mesma família.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar polimorfismos nos genes *TP53* e *MDM2* em indivíduos de uma mesma família ao longo de quatro gerações e sua influência na longevidade e na saúde dos indivíduos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência dos polimorfismos P72R (rs1042522) do gene *TP53* e SNP309 (rs2279744) do gene *MDM2* em indivíduos da mesma família;
- Avaliar a influência dos polimorfismos P72R (rs1042522) do gene *TP53* e SNP309 (rs2279744) do gene *MDM2* na longevidade.



## **4. MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento**

Trata-se de um estudo transversal, observacional, utilizando uma amostra de famílias residentes na cidade de Veranópolis-RS.

### **4.2 Amostragem**

#### *4.2.1 Critério de Inclusão*

Famílias residentes na cidade de Veranópolis-RS que possuam indivíduos representativos de quatro gerações (bisavô ou bisavó, avô ou avó, pai ou mãe e filho ou filha).

#### *4.2.2 Critério de não inclusão*

Não autorização de coleta de material biológico através de termo de consentimento.

#### *4.2.3 Método Amostral*

A coleta de dados foi iniciada na geração 1 (G1), a partir dos idosos das famílias com idade superior a 60 anos. A escolha das famílias foi feita por sorteio aleatório. Foram escolhidas 12 famílias com quatro gerações com membros residindo em Veranópolis, com um total estimado de 145 indivíduos.

Após o sorteio das famílias com os critérios definidos para esta pesquisa, houve uma reunião no centro comunitário da cidade. Neste momento foi explicado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com os objetivos,

procedimentos de coletas, riscos e benefícios. Após o aceite em participar, foi iniciada a coleta de dados com a família

Total de 12 famílias coletadas com tamanho amostral estimado de 148 indivíduos

#### **4.4 Instrumento**

Os seguintes dados foram coletados por meio de questionários:

##### *4.4.1 Avaliação demográfica e socioeconômica*

Foram coletados dados de consanguinidade entre os familiares, data de nascimento, escolaridade, renda familiar, profissão/ocupação, situação conjugal, paridade (número de filhos e abortos), etnia, número de irmãos e número de moradores na residência, quando aplicável.

##### *4.4.2 Avaliação de condições de nascimento*

A partir dos dados da caderneta de vacinação, foram coletados dados do nascimento como tipo de parto (cesárea/vaginal), peso ao nascer (em g), comprimento ao nascer (em cm) e perímetro cefálico ao nascer (em cm) das crianças e demais gerações, quando possível. Além disso, foi questionado se houve a prática do aleitamento no primeiro dia de vida, assim como o tempo de aleitamento materno total.

##### *4.4.3 Avaliação antropométrica*

Os dados antropométricos foram coletados e classificados conforme as referências do ciclo vital específico. As medidas realizadas foram: peso (em Kg), estatura (em cm), circunferência da cintura (em cm), circunferência braquial (em cm), dobras cutâneas tricípital (em mm) e subescapular (em mm).

#### 4.4.4 Avaliação de saúde

Foi questionada a presença de doença crônica, uso de medicamentos e suplementos atuais, hábito de fumar e consumo de drogas. Para as mulheres, foi questionada a idade da menarca e a menopausa, quando aplicável.

A avaliação da atividade física foi realizada por meio da aplicação do protocolo IPAQ (questionário internacional de atividade física) versão curta por profissionais treinados.

#### 4.4.5 Avaliação alimentar

Foram avaliadas práticas como aleitamento materno na primeira hora de vida e tempo de aleitamento materno exclusivo e total. Também foram realizados inquéritos recordatórios 24 horas por profissionais treinados em todos os familiares, em relação à alimentação do dia anterior à entrevista. O preenchimento dos inquéritos alimentares foi realizado com o auxílio de um álbum de registros fotográficos.

#### 4.4.6 Avaliação de estresse

A avaliação do nível de estresse foi realizada por meio da Escala de Estresse Percebido (*Perceived Stress Scale* - PSS) do original de Cohen e colaboradores (1983), traduzida e validada em português por Luft e colaboradores (2007).

### 4.5 Estudo genético

#### 4.5.1 Coleta de amostras biológicas

As células da mucosa oral com a saliva dos indivíduos foram coletadas com o auxílio de *swabs* estéreis que, deslizados delicadamente sobre a superfície da mucosa oral, - não ocasionando, assim, incômodo ou irritação. Após a coleta, as amostras foram devidamente transportadas em tubos e armazenadas a -20°C

no Laboratório de Pediatria Translacional/NESCA no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).



#### 4.5.2 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada por meio da adição de 200 µl de TES (10 mM Tris HCl, pH 7,6, EDTA 1 mM, 0,6% de SDS) e 5 µl de proteinase K (10 mg/mL) aos tubos contendo *swab*. Após uma incubação de 16h a 42°C, o conteúdo foi centrifugado e o *swab* foi descartado. Seguindo o protocolo, adicionou-se 42 µL de NaCl 6M com agitação vigorosa. A amostra foi, então, centrifugada durante 1 min a 15.000g e o sobrenadante transferido para um novo tubo contendo 2V de etanol absoluto. Após uma nova centrifugação por 1 min a 15.000g, descartou-se o sobrenadante e, então, o pellet de DNA foi lavado 2X com 1mL de Etanol 70°. Após o descarte do sobrenadante deixou-se o etanol residual secar e o DNA é eluído em 60 µl de TE (10 mM Tris HCl, EDTA 0,1 mM). A quantificação das amostras foi realizada por espectrofotometria a 260nm e o material foi aliqotado e armazenado a -80°C até sua análise.

#### 4.5.3 Determinação de polimorfismos de TP53 e MDM2

A determinação genotípica do polimorfismo P72R do gene *TP53* foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real utilizando *primers* e sondas específicas previamente desenhados no *Custom TaqMan Genotyping Assay* (Applied Biosystems) para o seguinte ensaio: C\_\_2403545\_10, de acordo com as instruções do fabricante. A determinação do genótipo do SNP309 do gene *MDM2* foi realizada com o uso de sondas marcadas com fluorescência FAM-TCCCGCGCCGCAG e VIC-CTCCCGCGCCGAAG que são identificadas durante a reação de PCR em tempo real. Nesta reação foram utilizados os *primers*: F: 5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3' e R: 5'-ACAGGCACCTGCGATCATC-3'. O protocolo utilizado para as análises do SNP309 de *MDM2* foi conforme o descrito por Boquett *et al.*, 2013.

#### 4.5.4 Análise estatística

Foram calculadas médias de desvio padrão para idade, número de filhos, idade da menarca, idade da menopausa, alcoolismo, escolaridade, aborto e IMC

(índice de massa corporal) para cada uma das quatro gerações e também para a amostra total. Freqüências alélicas e genóticas para os polimorfismos P72R de *TP53* e SNP309 de *MDM2* foram calculados por contagem direta. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado no *software* BioEstat 5.0.


Freqüências alélicas e genóticas dos dois polimorfismos foram comparadas entre as gerações; entre os jovens e idosos e entre os homens e mulheres da amostra total através do teste de Qui-quadrado, com  $\alpha = 0,05$ , realizado no *software* IBM SPSS Statistics V.20. As médias de filhos de todas as mulheres da amostra também foram comparadas entre os diferentes genótipos dos dois polimorfismos por meio do teste Mann-Whitney *U*, com  $\alpha = 0,05$ , realizado no *software* IBM SPSS Statistics V.20.

#### 4.6 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa está aprovado junto ao Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (GPPG 16-0447 – CAEE 59567916.0.0000.5327). As famílias alocadas foram convidadas a participar do estudo e, se aceito, os adultos participantes, assim como os responsáveis pelos menores participantes, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, apêndices I ou II), que tem duas vias, uma para o responsável e outra para o pesquisador. Nele, são informados os objetivos específicos deste estudo, bem como os procedimentos, riscos e benefícios do projeto.

Essa pesquisa ofereceu riscos mínimos aos participantes, bem como aos pesquisadores, por empregar técnicas e métodos de coleta de dados em que não se realiza intervenção ou modificação intencional nas variáveis fisiológicas, psicológicas e sociais dos indivíduos, tais como a aplicação de questionários, coleta de saliva e revisão de arquivos médicos. A coleta de dados foi realizada através de procedimentos comuns em exames físicos considerados rotineiros, como por exemplo, a aferição de peso, estatura e medição de dobras cutâneas. Assim, os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na

pesquisa foram o tempo necessário de resposta para o questionário e o desconforto na realização das medidas corporais e da coleta de saliva.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa foram contribuir para o aumento do conhecimento sobre a longevidade e o desenvolvimento de doenças. Com a realização deste estudo foi possível aprimorar o conhecimento a respeito das influências dos hábitos de vida ao longo de três gerações de forma a aperfeiçoar estratégias de intervenção para o ciclo vital 

## 5. RESULTADOS

A amostra foi constituída por 12 famílias residentes na cidade de Veranópolis-RS (heredogramas em anexo), totalizando 148 indivíduos, sendo 71 homens e 77 mulheres distribuídos em quatro gerações. Os dados sobre idade, número de filhos, idade da menarca e da menopausa, tabagismo, alcoolismo, escolaridade, ocorrência de aborto, doenças crônicas, uso de medicamentos e IMC – índice de massa corporal – estão apresentados na Tabela 1.

A idade média dos indivíduos da primeira geração foi de 85,8 anos enquanto que nos a média foi de 5,2 anos. As idades variaram entre 0 a 98 anos. Quanto à fertilidade, o número médio de filhos da geração 1 apresentou número médio de 5,5 filhos (DP = 3,1), enquanto que se observa um decréscimo nas gerações 2 e 3, com respectivamente 1,8 (DP = 0,8) e 0,8 (DP = 0,9) filhos em média. A variação entre o número de filhos foi de 0 a 11 filhos. A geração 4, composta em sua maioria por crianças não foi incluída. O número de abortos mostrou uma tendência de diminuição ao longo das gerações.

Nas mulheres, a menarca se manteve parcialmente estável ao longo das gerações 1 a 3, com médias muito próximas de 12 anos. A quarta geração não foi incluída por ser composta majoritariamente por crianças que não atingiram a idade da menarca. Já a idade média da menopausa só pode ser observada nas duas primeiras gerações. Na geração 1 a média foi de 46,3 anos (DP = 4,4), enquanto que na geração 2 foi mais tardia, com média aos 49,3 anos (DP = 7,7).

Enquanto o tabagismo é maior na geração 3 (26,4% de fumantes) os indivíduos da primeira geração consomem mais doses diárias de álcool. O nível de escolaridade aumentou ao longo das gerações, chegando a uma média de 12,2 (DP = 2,8) anos de estudo na geração 3 comparativamente a apenas 6,7 (DP = 2,5). Os indivíduos da quarta geração, em sua maioria crianças, ou ainda não estão em idade escolar ou se encontram nos primeiros anos de formação, por isso a média dessa geração é baixa quando comparada às demais. Como seria esperado pela faixa etária, a ocorrência de doenças crônicas e médias de IMC são maiores na geração 1, bem como o uso de medicamentos.

**Tabela 1.** Caracterização demográfica dos indivíduos da amostra.

| Característica                                  | Geração 1   | Geração 2    | Geração 3   | Geração 4    | Total       |
|---|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| N (%)   | 10 (6,7%)   | 63 (42,6 %)  | 51 (34,5%)  | 24 (16,2%)   | 148 (100%)  |
| Sexo (M / F)                                    | 2 / 8       | 30 / 33      | 28 / 23     | 11 / 13      | 71 / 77     |
| Idade (média ± dp)                              | 85,8 ± 7,42 | 57,9 ± 7,9   | 30,05 ± 9,8 | 5,2 ± 3,3    | 41,8 ± 23,9 |
| Número de filhos (média ± dp)                   | 5,5 ± 3,1   | 1,8 ± 0,8    | 0,8 ± 0,9   | NA           | 1,4 ± 1,7   |
| Idade Menarca (média ± dp)                      | 12,5 ± 1,5  | 12,1 ± 2,6   | 11,9 ± 2,9  | 13 ± 0       | 12,1 ± 2,6* |
| Idade Menopausa (média ± dp)                    | 46,3 ± 4,4  | 49,3 ± 7,9   | NA          | NA           | 48,7 ± 7,4  |
| Tabagismo (S)                                   | 1 (10%)     | 5 (7,69%)    | 14 (26,4%)  | NA           | 20 (13,5%)  |
| Consumo de álcool (dias/1 dose)<br>(média ± dp) | 5 ± 1,7     | 3,15 ± 2,0   | 2,65 ± 1,75 | NA           | 3,3 ± 2,0   |
| Escolaridade (anos) (média ± dp)                | 6,7 ± 2,5   | 10,3 ± 3,2   | 12,2 ± 2,6  | 3,7 ± 2,8    | 10,2 ± 3,7  |
| Aborto (média ± dp)                             | 0,75 ± 0,7  | 0,35 ± 0,7   | 0,13 ± 0,3  | NA           | 0,35 ± 0,6  |
| Doença crônica (S)                              | 7 (70%)     | 33 (52,4%)   | 12 (21,8%)  | 3 (12,5%)    | 66 (44,6%)  |
| Uso de medicamentos (S)                         | 90% (90%)   | 40 (63,5%)   | 23 (41,8%)  | 3 (12,5%)    | 76 (50,7%)  |
| IMC (média ± dp)                                | 29,63 ± 3,2 | 28,00 ± 4,44 | 25,65 ± 5,8 | 17,63 ± 2,63 | 25,7 ± 5,9  |

Legenda: N = Número; M = Masculino; F = Feminino; dp = desvio padrão; S = Sim; IMC = índice de massa corporal; NA = Não se aplica; \* = Média calculada considerando gerações 1, 2 e 3

As frequências genótípicas e alélicas para os polimorfismos estudados estão apresentadas na Tabela 2. As frequências do SNP P72R de *TP53* e SNP309 de *MDM2* estão demonstradas para as quatro gerações, incluindo homens e mulheres. Os polimorfismos estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as gerações.

O alelo G do SNP P72R foi o mais frequente, não havendo diferença significativa entre alelos ou genótipos entre as quatro gerações. Quanto ao polimorfismo SNP309 do gene *MDM2*, também não houve diferença significativa entre alelos ou genótipos comparando as diferentes gerações, sendo o alelo T e o genótipo TT os mais frequentes.



**Tabela 2.** Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos P72R de *TP53* e SNP309 de *MDM2* nas quatro gerações.

| Gene                    | Genótipos e Alelos | Geração 1<br>N 10 (%) | Geração 2<br>N 63 (%) | Geração 3<br>N 51 (%) | Geração 4<br>N 24 (%) | Total N<br>148 (%) | <i>p</i> * |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|------------|
| <i>TP53</i><br>(P72R)   | CC                 | 0 (0)                 | 6 (9,5)               | 2 (4)                 | 0 (0)                 | 8 (5,4)            | 0,216      |
|                         | CG                 | 3 (30)                | 23 (36,5)             | 25 (49)               | 7 (29,2)              | 58 (39,2)          |            |
|                         | GG                 | 7 (70)                | 34 (54,0)             | 24 (47)               | 17 (70,8)             | 82 (55,4)          |            |
|                         | C                  | 3 (15,0)              | 35 (27,8)             | 29 (28,4)             | 7 (14,6)              | 74 (25)            | 0,171      |
|                         | G                  | 17 (85,0)             | 91 (72,2)             | 73 (71,6)             | 41 (85,4)             | 222 (75)           |            |
| <i>MDM2</i><br>(SNP309) | GG                 | 1 (10)                | 8 (12,7)              | 8 (15,7)              | 2 (8,4)               | 19 (12,8)          | 0,767      |
|                         | GT                 | 5 (50)                | 33 (52,4)             | 27 (52,9)             | 17 (70,8)             | 82 (55,4)          |            |
|                         | TT                 | 4 (40)                | 22 (34,9)             | 16 (31,4)             | 5 (20,8)              | 47 (31,7)          |            |
|                         | G                  | 7 (35)                | 49 (38,9)             | 43 (42,2)             | 21 (47)               | 120 (40,5)         | 0,870      |
|                         | T                  | 13 (65)               | 77 (61,1)             | 59 (57,8)             | 27 (53)               | 176 (59,5)         |            |

\*Qui- quadrado

Na Tabela 3, porém aplicando um modelo de comparação onde as gerações 1/2 e 3/4 foram agrupadas duas categorias – gerações mais velhas vs gerações mais novas – sendo possível, deste modo, aumentar o número amostral de cada grupo, aumentando assim o poder estatístico. Em relação ao polimorfismo P72R de *TP53*, podemos observar que o genótipo TT permanece como mais frequente nas duas categorias e o alelo T também. Porém, a diferença entre as frequências genotípicas e alélicas entre as gerações 1/2 e 3/4 não são estatisticamente significativas ( $p = 0,273$  e  $p = 0,788$ , respectivamente).

Já em relação ao polimorfismo SNP 309 de *MDM2*, é possível observar que o genótipo GT se manteve como mais frequente entre as duas categorias e que o alelo T é também o mais frequente. Contudo, as diferenças entre as frequências genotípicas e alélicas entre as duas categorias não foram significativas ( $p = 0,608$  e  $p = 0,524$ , respectivamente).

**Tabela 3.** Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos P72R de *p53* e SNP309 de *MDM2* nas quatro gerações utilizado

um modelo com gerações 1/2 e 3/4 agrupadas.

| Gene                 | Genótipos e Alelos | Geração 1 e 2 - N 73 (%) | Geração 3 e 4 - N 75 (%) | Total - N 148 (%) | p*    |
|----------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------|
| <i>TP53</i> (P72R)   | CC                 | 6 (8,2)                  | 2 (2,7)                  | 8 (5,4)           | 0,273 |
|                      | CG                 | 26 (35,6)                | 32 (42,7)                | 58 (39,2)         |       |
|                      | GG                 | 41 (56,2)                | 41 (54,7)                | 82 (55,4)         |       |
|                      | C                  | 38 (26,0)                | 36 (24,0)                | 70 (24,0)         | 0,788 |
|                      | G                  | 108 (74,0)               | 114 (76,0)               | 222 (76,0)        |       |
| <i>MDM2</i> (SNP309) | GG                 | 9 (12,3)                 | 10 (13,3)                | 19 (12,8)         | 0,608 |
|                      | GT                 | 38 (52,1)                | 44 (58,7)                | 82 (55,4)         |       |
|                      | TT                 | 26 (35,6)                | 21 (28,0)                | 47 (31,8)         |       |
|                      | G                  | 56 (38,4)                | 64 (42,7)                | 120 (40,5)        | 0,524 |
|                      | T                  | 90 (61,6)                | 86 (57,3)                | 176 (59,5)        |       |

\*Qui quadrado

Na tabela 4, as gerações mais antigas e as mais novas foram agrupadas, e testadas para um modelo de dominância do alelo C de P72R de *TP53* e do alelo G do SNP309 de *MDM2*. Entretanto, não houve significância nesta nova análise.

**Tabela 4.** Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos P72R de *TP53* (CC + CG vs. GG) e SNP309 de *MDM2* (GG + GT vs. TT).

| Gene                 | Genótipos e Alelos | Geração 1 e 2 N 73 (%) | Geração 3 e 4 N 75 (%) | Total      | p*    |
|----------------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------|-------|
| <i>TP53</i> (P72R)   | CC+CG              | 32 (43,8)              | 34 (45,3)              | 66 (44,6)  | 0,986 |
|                      | GG                 | 41 (56,2)              | 41 (54,7)              | 82 (55,4)  |       |
|                      | C                  | 38 (26,0)              | 36 (24)                | 74 (25)    | 0,788 |
|                      | G                  | 108 (74,0)             | 114 (76)               | 222 (75)   |       |
| <i>MDM2</i> (SNP309) | GG+GT              | 47 (64,4)              | 54 (72)                | 101 (68,2) | 0,413 |
|                      | TT                 | 26 (35,6)              | 21 (28)                | 47 (31,8)  |       |
|                      | G                  | 56 (38,4)              | 64 (42,7)              | 120 (40,5) | 0,524 |
|                      | T                  | 90 (61,6)              | 86 (57,3)              | 176 (59,5) |       |

\*Qui- quadrado

A tabela 5 apresenta frequências alélicas e genotípicas apenas para as mulheres da amostra, totalizando 77 indivíduos. Há maior frequência do genótipo

GG e do alelo G do polimorfismo P72R de *TP53* (59,8% e 77,9%, respectivamente), mas as diferenças não foram significativas.

Para o SNP309 de *MDM2*, não se observou diferença significativa entre as frequências genóticas. Porém, a diferença entre as frequências alélicas de G e T entre as gerações 1/2 e 3/4 foi significativa ( $p = 0,0452$ ), sendo o alelo T significativamente maior nas gerações mais antigas (gerações 1 e 2).

**Tabela 5.** Frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos P72R de *TP53* e SNP309 de *MDM2* nas quatro gerações, considerando apenas as mulheres de cada geração. As gerações 1/2 e 3/4 foram agrupadas em duas categorias e os genótipos CC e CG de P72R também foram agrupados.

| Gene                    | Genótipos e Alelos | Geração 1 e 2<br>N 41 (%) | Geração 3 e 4<br>N 36(%) | Total<br>N 77 (%) | p*     |
|-------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|--------|
| <i>TP53</i><br>(P72R)   | CC+CG              | 14 (34,1)                 | 17 (47,2)                | 31 (40,2)         | 0,350  |
|                         | GG                 | 27 (65,8)                 | 19 (52,8)                | 46 (59,8)         |        |
|                         | C                  | 16 (19,5)                 | 18 (25,0)                | 34 (22,1)         | 0,532  |
|                         | G                  | 66 (80,5)                 | 54 (75,0)                | 120 (77,9)        |        |
| <i>MDM2</i><br>(SNP309) | GG                 | 5 (12,2)                  | 5 (13,9)                 | 10 (13)           | 0,332  |
|                         | GT                 | 18 (43,9)                 | 21 (58,3)                | 39 (50,6)         |        |
|                         | TT                 | 18 (43,9)                 | 10 (27,8)                | 28 (36,4)         |        |
|                         | G                  | 28 (34,1)                 | 31 (43,0)                | 59 (38,3)         | 0,0452 |
|                         | T                  | 54 (65,9)                 | 41 (57,0)                | 95 (61,7)         |        |

\*Qui- quadrado

Na tabela 6 foi realizada a análise do número de filhos entre os diferentes genótipos do polimorfismo P72R de *TP53* e do SNP309 de *MDM2*. A análise foi realizada considerando todas as mulheres da amostra. Não houve a caracterização por gerações. Foi utilizado o modelo dominante de C e T para fazer a comparação entre as médias de filhos. Aquelas mulheres que não apresentavam filhos foram excluídas da análise. O modelo dominante do alelo T para o SNP309 de *MDM2* foi utilizado, pois para análises de fertilidade este é o alelo de risco. Não foi observada diferença estatística entre a média de filhos e os diferentes genótipos dos polimorfismos P72R de *TP53* e SNP309 de *MDM2* ( $p = 0,135$  e  $p = 0,441$ , respectivamente).

**Tabela 6.** Número de filhos em relação aos diferentes genótipos dos polimorfismos dos genes *TP53* e *MDM2*, considerando todas as mulheres da amostra, sem diferenciação por geração.

| Gene                    | Genótipos | N  | Mediana | Intervalo Interquartil (25/75%) | p*    |
|-------------------------|-----------|----|---------|---------------------------------|-------|
| <i>TP53</i><br>(P72R)   | CC+CG     | 23 | 1       | (1/3)                           | 0,135 |
|                         | GG        | 31 | 2       | (2/3)                           |       |
| <i>MDM2</i><br>(SNP309) | GG        | 7  | 2       | (1/2)                           | 0,441 |
|                         | GT+ TT    | 47 | 2       | (1/3)                           |       |


\*Teste Mann-Whitney U.

Na tabela 7 foram considerados todos os 148 indivíduos amostrados, dividida de acordo com a idade do indivíduo: jovens, com idades entre 0 e 59 anos; e idosos, com idade a partir de 60 anos. Esta última foi determinada de acordo com Estatuto do Idoso, que considera idoso qualquer indivíduo com idade igual ou superior a 60 anos (LEI N° 10.741, DE 1° DE OUTUBRO DE 2003. Art. 1°). Novamente, foi testado o modelo de dominância para o alelo G do P72R e do alelo T do SNP309. Não se observou diferença significativa entre as frequências genotípicas entre idosos e jovens em nenhum dos polimorfismos testados.

**Tabela 7.** Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos P72R em *TP53* e SNP309 em *MDM2*.

| Gene                    | Genótipos e Alelos | Jovens (0-59 anos)<br>N 112 (%) | Idosos (60 anos ou mais)<br>N 36 (%) | Total<br>N 148 (%) | p*    |
|-------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------|-------|
| <i>TP53</i><br>(P72R)   | CC+CG              | 54 (48,2)                       | 12 (33,3)                            | 66 (44,6)          | 0,170 |
|                         | GG                 | 58 (51,8)                       | 24 (66,7)                            | 82 (55,4)          |       |
|                         | C                  | 60 (26,8)                       | 14 (19,4)                            | 74 (25)            | 0,273 |
|                         | G                  | 164 (73,2)                      | 58 (80,6)                            | 222 (75)           |       |
| <i>MDM2</i><br>(SNP309) | GG+GT              | 77 (68,75)                      | 24 (66,7)                            | 101 (68,2)         | 0,978 |
|                         | TT                 | 35 (31,25)                      | 12 (33,3)                            | 47 (31,8)          |       |
|                         | G                  | 93 (41,5)                       | 27 (37,5)                            | 120 (40,5)         | 0,641 |
|                         | T                  | 131 (58,5)                      | 45 (62,5)                            | 176 (59,5)         |       |

\*Qui- quadrado

As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos P72R de *TP53* e SNP309 de *MDM2* também foram testadas comparando-se homens e mulheres para todos 148 indivíduos amostrados, mas as diferenças observadas não são significativas. 

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos a possível relação entre os polimorfismos P72R do gene *TP53* e SNP309 de *MDM2* em indivíduos de uma mesma família ao longo de quatro gerações e a longevidade. Este estudo teve um modelo transversal e observacional, utilizando uma amostra de doze famílias residentes na cidade de Veranópolis-RS, totalizando 148 indivíduos. Importante ressaltar que este trabalho faz parte de um projeto que continua em andamento, portanto há perspectiva de aumento amostral.

Considerando as variáveis demográficas (tabela 1), alguns aspectos devem ser comentados. A média do número de filhos entre as gerações diminuiu da primeira geração à terceira. Esse é o esperado, acompanhando a queda no número de filhos no Brasil como um todo, principalmente com o advento dos métodos contraceptivos mais popularizados (Pedro, 2003). Além disso, as mulheres da terceira geração ainda estão em período fértil, portanto pode ser que esse valor possa sofrer alteração até que se encerre a idade reprodutiva. Já a quarta geração, formada majoritariamente por crianças, ainda não está em idade reprodutiva, não sendo assim considerada na análise.

Em relação ao uso de droga lícitas como o fumo, a terceira geração é que apresenta o maior número de indivíduos fumantes, 26,4% dos indivíduos dessa geração. Esse resultado pode estar relacionado ao estresse do trabalho, por exemplo, pois a média de idade desses indivíduos é 30 anos, compatível com atividade laboral. Trabalhadores com altos índices de estresse tem maiores riscos de uso contínuo de tabaco (Ayyagari & Sindelar, 2010). Por outro lado, o álcool foi mais prevalente nos mais idosos.

Setenta por cento dos indivíduos da primeira geração apresenta doenças crônicas, o que é compatível com indivíduos em idade avançada e, portanto, apresentam um acúmulo de danos moleculares, uma vez que o envelhecimento é em parte consequência desse acúmulo (Groß *et al.*, 2014). Esse dado acaba se refletindo em maior uso de medicamentos, justificando a alta porcentagem de indivíduos usuários na geração 1 (90%). Outra característica importante, são as

médias de IMC das gerações 1, 2 e 3 acima do que é tido como padrão para adultos, ou seja, 25 Kg/m<sup>2</sup> como definido pelo *The World Health Report* de 1998.

Sobre os resultados obtidos através das análises das frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos P72R de *TP53* e SNP309 de *MDM2* nos 148 indivíduos das quatro gerações, ~~algumas questões podem ser levantadas e discutidas.~~ As frequências dos polimorfismos aqui estudados são semelhantes às que foram determinadas nos estudos prévios. Em um estudo composto por mulheres de uma população de Porto Alegre (Boquett *et al.*, 2013), os genótipos do polimorfismo P72R apresentaram frequência de 50,5% para GG, 38,9% para CG e 9,7% para CC, sendo as frequências alélicas de 29,6% para o alelo C e 70,4% para o alelo G. Outro estudo realizado também com a população de Porto Alegre (Fraga e cols., 2014), apresentou como frequências genóticas para CC, CG e GG respectivamente: 7,7%, 42,0% e 50,3%, e as frequências alélicas foram 28,7% para o alelo C e 71,3% para o alelo G. Esses mesmos estudos avaliaram as frequências genóticas e alélicas do SNP309. No estudo de Boquett e cols (2013), as frequências genóticas para GG, GT e TT, respectivamente foram: 16,8%, 41,3% e 41,9%. Já as frequências alélicas para G e T foram: 37,5% e 62,5%. Conforme Fraga e cols (2014), as frequências genóticas para GG, GT e TT foram: 17,4%, 41,3% e 41,3%. Já as frequências alélicas de G e T foram: 38,1% e 61,9%.

Considerando que o polimorfismo P72R tem efeito funcional na proteína p53, estudos prévios já investigaram o papel desse polimorfismo em diferentes desfechos. Investigações em relação à reprodução foram em sua maior parte focadas em implantação e abortamento (Kay *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011). Além disso, estudos sobre o papel deste polimorfismo na longevidade já foram realizados em diferentes populações, comparando indivíduos mais e menos longevos (Bojesen & Nordestgaard, 2008; Bonafè *et al.*, 1999; Orsted *et al.*, 2007; van Heemst *et al.*, 2005; Donehower, 2005; Groß *et al.*, 2014).

Um estudo realizado com indivíduos de 85 anos ou mais da população holandesa, com uma amostra total de 1.226 pessoas, demonstrou que indivíduos com o genótipo CC, mesmo com mortalidade proporcionalmente maior por câncer, provavelmente devido à função menos eficiente de *TP53* na apoptose

celular, apresentavam sobrevivência 41% maior comparados com indivíduos portadores do alelo G em homozigose ou em heterozigose. De acordo com o autor, isso poderia sugerir que a proteína p53 humana protegeria o indivíduo contra o desenvolvimento de câncer, porém ao custo de sua longevidade (van Heemst *et al.*, 2005).

Outro estudo com uma população dinamarquesa que incluiu uma coorte de 9.219 indivíduos com idade entre 20 a 95 anos foi realizado por Orsted *et al* (2007). Nesta análise observou-se aumento da sobrevivência média em três anos para indivíduos portadores do genótipo CC em comparação a indivíduos GG. Aumento da sobrevida após o desenvolvimento de câncer ou de qualquer outra doença com risco de vida também foi demonstrado para indivíduos CC em comparação com os GG. O estudo sugere que o aumento da longevidade dos indivíduos seja uma consequência do aumento da sobrevida depois do diagnóstico de câncer e outras doenças com risco de vida (Orsted *et al.*, 2007). Em 2008, foi realizada uma nova análise nesta mesma coorte e novamente observou-se aumento na sobrevida média de três anos para os indivíduos com genótipo CC, sugerindo um papel do SNP P72R na longevidade nessa população (Bojesen & Nordestgaard, 2008).

Em contraposição, um estudo que comparou indivíduos centenários com controles (idade inferior a 100 anos) da Itália Continental e da região da Sardinia, não encontrou diferença significativa entre as distribuições alélicas e genotípicas entre os grupos em nenhuma das duas regiões. Neste caso, os resultados dos centenários da Sardinia foram considerados como uma evidência adicional de que os dois alelos de *TP53* seriam igualmente compatíveis com a extrema longevidade na população italiana, mas também há de considerar a limitação do número amostral de centenários (Bonafè *et al.*, 1999).

Os resultados discordantes com populações distintas, sugerem que a associação do polimorfismo P72R de *TP53* com a longevidade ainda é incerta e depende de questões étnicas de cada população em particular (Di Pietro F. *et al.*, 2012). Assim, achados em determinadas populações não devem ser considerados como determinantes para todas as diferentes populações.



Neste trabalho adotamos uma metodologia diferente dos estudos anteriores. No presente estudo, nossa amostra é constituída por doze famílias com quatro gerações vivas para a realização de um estudo de associação transversal e observacional. Nosso objetivo foi observar se havia diferenças entre as frequências genótípicas e alélicas entre as diferentes gerações das diferentes famílias, por seleção ou transmissão preferencial de determinado alelo, por exemplo, que pudesse explicar, ao menos em parte, a longevidade alcançada pela população residente em Veranópolis. As comparações realizadas entre os grupos foram limitadas pelo tamanho amostra, o que diminuiu o poder estatístico.

Em relação à distribuição das frequências genótípicas e alélicas entre as quatro gerações, considerando o polimorfismo P72R de *TP53* e o SNP309 de *MDM2*, os resultados não foram significativos. Entretanto, foi possível observar uma tendência, onde a frequência do alelo G que cuja frequência aumenta nas gerações mais antigas. Esse resultado está de acordo com dados descritos por estudos em ratos que já determinaram a relação do alelo G (SNP309) com sobrevivência maior, porém esse efeito seria gênero-específico (Groß *et al.*, 2014). Portanto, pelo fato de o alelo G estar possivelmente ligado com maior sobrevivência, poderia apresentar frequências diferentes entre gerações. Contudo, como as diferenças alélicas entre as gerações não foram significativas, não foi possível confirmar essa hipótese. Mesmo quando agrupamos as gerações em dois grupos (1/2 e 3/4), os resultados continuaram não significativos, o que pode ser pela amostra ser ainda pequena.

Considerando apenas as mulheres de cada geração, o SNP309 de *MDM2* apresentou significância para a frequência alélica ( $p = 0,0452$ ) entre as mulheres das gerações 1 e 2 (G = 34,1%) comparadas com as mulheres das gerações 3 e 4 (43%). Estudos funcionais indicam que o alelo G deste polimorfismo está associado ao aumento da expressão de *MDM2* que, por sua vez, é regulador negativo da proteína p53 (Di Pietro *et al.*, 2012). Assim, havendo maior expressão de *MDM2*, há uma maior degradação da proteína p53, resultando em uma redução dos níveis de apoptose celular, o que pode contribuir para uma maior longevidade.

Os achados em relação ao genótipo CC do polimorfismo P72R de *TP53* associado com longevidade sugerem isso, já que CC resulta em menos apoptose

(Bojesen & Nordestgaard, 2008). No caso do SNP309, a redução dos níveis de apoptose também ocorre, mas através da ação do gene *MDM2*. Em 2014, Groß e cols (2014) descreveram que ratos portadores do alelo G apresentaram uma maior sobrevivência gênero-específica em fêmeas. No nosso trabalho, o alelo G parece estar sendo positivamente selecionado nessa amostra em direção às gerações mais novas, principalmente nas mulheres. É importante ressaltar nossa amostra é composta por indivíduos vivos de quatro gerações dentro de suas respectivas famílias, e neste momento não é possível determinar qual das quatro gerações será mais longeva.

Não foi observada diferença no número de filhos de acordo com os genótipos tanto de p53 como *MDM2*. Porém, como já mencionado, a terceira geração ainda está em período fértil, e poderá ainda aumentar a média de filhos.

Finalmente, comparamos as frequências genóticas e alélicas entre indivíduos homens e mulheres da amostra. Essa análise foi importante, pois de acordo com o que já foi descrito, poderia haver especificidade de gênero em relação ao aumento da longevidade, principalmente para mulheres, de acordo com dados de modelos experimentais, para os dois polimorfismos estudados (Groß *et al.*, 2014). Esta hipótese não foi confirmada no nosso trabalho.

Como considerações finais, o nosso estudo propõe um modelo de estudo transversal que considera várias famílias e suas gerações na investigação de fatores genéticos e ambientais que possam estar associados à longevidade. Os indivíduos amostrados em suas respectivas gerações serão acompanhados ao longo dos anos. Este é o primeiro estudo a investigar fatores genéticos que possam contribuir para a longevidade realizado na população de Veranópolis. Uma limitação deste estudo é o número amostral, mas a perspectiva é superar esta limitação à medida que serão realizadas novas coletas em novas famílias, uma vez que este projeto continua em andamento. Neste momento, os resultados aqui apresentados para o SNP P72R de *TP53* são compatíveis ao que foi descrito por Bonafé *et al* (1999), onde não foi observado papel deste SNP na longevidade em duas populações italianas; uma vez que a população de Veranópolis é constituída majoritariamente por indivíduos de origem italiana. Além disso, este é o primeiro trabalho a investigar o papel do SNP309 de *MDM2* na longevidade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayyagari P1, Sindelar JL (2010) The Impact of Job Stress on Smoking and Quitting: Evidence from the HRS. *B E J Econom Anal Policy*. 1;10(1).

Belyi VA, Ak P, Markert E, Wang H, Hu W, Puzio-Kuter A e Levine AJ (2010) The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001198.

Bonafè, M., Olivieri, F., Mari, D *et al.*, (1999). p53 Codon 72 Polymorphism and Longevity: Additional Data on Centenarians from Continental Italy and Sardinia. *American Journal of Human Genetics*, 65(6), 1782–1785.

Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, et al. (2004) A single nucleotide polymorphism in the *MDM2* promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119:591–602.

Bojesen SE<sup>1</sup>, Nordestgaard BG (2008) The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle*. 15;7(2):158-63.

Boquett JA, Brandalize AP, Fraga LR, Schuler-Faccini L (2013) Maternal SNPs in the p53 pathway: risk factors for trisomy 21? *Dis Markers*. 34(1):41-9.

Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP e Georgiev GP (1988) A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene*70:245–252.

Campisi J (2003) Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 5:339–349.

Donehower LA (2005) p53: guardian AND suppressor of longevity? *Exp Gerontol* 40:7-9.

Capri M, Salvioli S, Sevini F, Valensin S, Celani L, Monti D, Pawelec G, De Benedictis G, Gonos ES, Franceschi C. (2006) The genetics of human longevity. *Ann N Y Acad Sci*.1067:252-63.

Di Pietro F, Dato S, Carpi FM, Corneveaux JJ, Serfaustini S, Maoloni S, Mignini F, Huentelman MJ, Passarino G, Napolioni V (2012) TP53\*P72 allele influences negatively female life expectancy in a population of central Italy: cross-sectional study and genetic demographic approach analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 68(5):539-45.

Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D e Qu X (2011) The p53-HDM2 gene-gene polymorphism interaction is associated with the development of missed abortion. *Hum Reprod* 26:1252-1258.

Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, Frank AK, Rosenwaks Z, Murphy ME, Levine AJ et al., (2011) Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J*25(7):2245-2255.

Firouzabadi RD, Ghasemi N, Rozbahani MA, Tabibnejad N (2009) Association of p53 polymorphism with ICSI/IVF failure and recurrent pregnancy loss. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 49(2):216-9.

Fraga LR, Dutra CG, Boquett JA, Vianna FS, Gonçalves RO, Paskulin DD, Costa OL, Ashton-Prolla P, Sanseverino MT, Schuler-Faccini L (2014) p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. *Mol Biol Rep.* 41(3):1871-7.

Goodman C, Jeyendran RS, Coulam CB (2009) P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure. *Fertil Steril*92(2):494-498.

Groß S, Immel UD, Klintschar M, Bartel F (2014) Germline genetics of the p53 pathway affect longevity in a gender specific manner. *Curr Aging Sci.* 7(2):91-100.

Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9761-9766.

Kay C, Jeyendran RS, Coulam CB (2006) p53 tumor suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online.* 4:492-496.

Kirkwood TB (1997) The origins of human ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:1765-1772.

Levine AJ, Hu W e Feng Z (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13:1027–1036.

Levine A.J., Tomasini R., McKeon F.D., Mak T.W e Melino G. (2011) The p53 family: Guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 259–265.

Lu WJ, Amatruda JF, e Abrams JM (2009) p53 ancestry: gazing through an evolutionary lens. *Nat Rev Cancer*9:758-762

Orsted DD, Bojesen SE, Tybjærg-Hansen A and Nordestgaard BG (2007) Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population.1295–1301

Pedro, Joana Maria. (2003). A experiência com contraceptivos no Brasil: uma questão de geração. *Revista Brasileira de História*, 23(45), 239-260.

Tagliani-Ribeiro A, Paskulin DD, Oliveira M, Zagonel-Oliveira M, Longo D, Ramallo V, Ashton-Prolla P, Saraiva-Pereira ML, Fagundes NJ, Schuler-Faccini L, Matte U (2012) High twinning rate in Candido Godoi: a new role for p53 in human fertility. *Hum Reprod*27:2866-2871.

Thomas DM (2017) Is Li-Fraumeni syndrome really much more common? *Hum Mutat.* 38(12):1619.

Toledo F<sup>1</sup>, Wahl GM (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.* 6(12):909-23.

Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK, Keck C, Hefler LA, Huber JC e Tempfer C (2005) Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumor suppressor gene. *Hum Reprod*4:848–851.

van Heemst D, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, de Craen AJM, Brandt BW, Slagboom PE, Westendorp RGJ, Long Life Study Group (2005) Variation in

the human *TP53* gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp Gerontol* 40:11–15.

Wan Y, Wu W, Yin Z, Guan P, Zhou B (2011) MDM2 SNP309, gene-gene interaction, and tumor susceptibility: an updated meta-analysis. *BMC Cancer* 11:208.

## 8. APÊNCIDES

### Apêndice I

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Projeto GPPG 16-0447 – CAAE 59567916.0.0000.5327**

Título do Projeto: **“Avaliação da herdabilidade do comprimento telomérico e de polimorfismos na via de p53 ao longo de quatro gerações e sua influência na longevidade”**.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o efeito do ambiente no comprimento dos telômeros e em algumas características genéticas. Os telômeros são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos e estão associadas ao envelhecimento da célula. Os cromossomos são formados de genes, que constituem o material genético (também conhecido como DNA) e proteínas, estando presentes em todas as células do nosso corpo. A ideia desta pesquisa é avaliar o comprimento dos telômeros em diferentes gerações de famílias da cidade de Veranópolis, uma vez que essa população é conhecida por ter grande longevidade. Além dos telômeros, também serão avaliadas outras informações genéticas que podem estar associadas a ter uma vida mais longa. O estudo está sendo realizado pelo Laboratório de Pediatria Translacional localizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre-RS.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação terão uma duração total aproximada de 30-40 minutos e são os seguintes:

- preenchimento de questionários a respeito de informações familiares, condições de vida e saúde, tais como: hábito alimentar e de atividade física; histórico de doenças; condições de moradia; consumo de bebidas, medicações e uso de drogas.

- medida de seu peso (com o uso de roupas leves), medidas de altura, cintura e braço e da quantidade de gordura do braço e das costas. A medida da quantidade de gordura é feita com um aparelho que se assemelha a uma pinça, que irá segurar a pele do braço e das costas por alguns segundos.

- coleta de amostra de células da sua mucosa oral/saliva (revestimento da boca). Esta coleta será realizada através de um *swab* estéril (uma haste flexível de algodão, parecido com um cotonete). O *swab* será deslizado delicadamente pela pesquisadora sobre a superfície interna de sua boca e, então, ele será armazenado dentro de um tubo. Por meio desta amostra será realizada a extração de seu DNA.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para consentir novamente o uso do material.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são o tempo necessário de resposta para o questionário e o desconforto na realização das medidas corporais e da coleta de saliva. A pesquisa não traz nenhum benefício direto, mas pode contribuir para o aumento do conhecimento sobre a longevidade e o desenvolvimento de doenças.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Marcelo Zubaran Goldani ou com a pesquisadora Mariana Bohns Michalowski, pelo telefone 51-3359-8019 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Com relação ao armazenamento das amostras biológicas:

( ) Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

( ) Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

\_\_\_\_\_

Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)



## Apêndice II

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Responsáveis

**Projeto GPPG 16-0447 – CAAE 59567916.0.0000.5327**

**Título do Projeto: “Avaliação da herdabilidade do comprimento telomérico e de polimorfismos na via de p53 ao longo de quatro gerações e sua influência na longevidade”.**

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o efeito do ambiente no comprimento dos telômeros e em algumas características genéticas. Os telômeros são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos e estão associadas ao envelhecimento da célula. Os cromossomos são formados de genes, que constituem o material genético (também conhecido como DNA) e proteínas, estando presentes em todas as células do nosso corpo. A ideia desta pesquisa é avaliar o comprimento dos telômeros em diferentes gerações de famílias da cidade de Veranópolis, uma vez que essa população é conhecida por ter grande longevidade. Além dos telômeros, também serão avaliadas outras informações genéticas que podem estar associadas a ter uma vida mais longa. O estudo está sendo realizado pelo Laboratório de Pediatria Translacional localizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre-RS.

Se você aceitar que a pessoa pela qual você é responsável participe da pesquisa, os procedimentos envolvidos terão uma duração total aproximada de 30-40 minutos e são os seguintes:

- preenchimento de questionários a respeito de informações familiares, condições de vida e saúde, tais como: hábito alimentar e de atividade física; histórico de doenças; condições de moradia; consumo de bebidas, medicações e uso de drogas.

- medida de peso (com o uso de roupas leves), medidas de altura, cintura e braço e da quantidade de gordura do braço e das costas. A medida da quantidade de gordura é feita com um aparelho que se assemelha a uma pinça, que irá segurar a pele do braço e das costas por alguns segundos.

- coleta de amostra de células da mucosa oral/saliva (revestimento da boca). Esta coleta será realizada através de um *swab* estéril (uma haste flexível de algodão, parecido com um cotonete). O *swab* será deslizado delicadamente pela pesquisadora sobre a superfície interna de sua boca e, então, ele será armazenado dentro de um tubo. Por meio desta amostra será realizada a extração de DNA.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e deverá ocorrer um novo consentimento para o uso do material.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são o tempo necessário de resposta para o questionário e o desconforto na realização das medidas corporais e da coleta de saliva. Não são conhecidos riscos diretos pela participação na pesquisa. A pesquisa não traz nenhum benefício direto, mas pode contribuir para o aumento do conhecimento sobre a longevidade e o desenvolvimento de doenças.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Marcelo Zubarán Goldani ou com a pesquisadora Mariana Bohns Michalowski, pelo telefone 51-3359-8019 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA),

pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Com relação à amostra de DNA da pessoa pela qual é responsável:

( ) Aceito armazenar a amostra para pesquisas futuras.

( ) Não aceito armazenar a amostra para pesquisas futuras.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa                      Assinatura *(se aplicável)*

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável    Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo    Assinatura

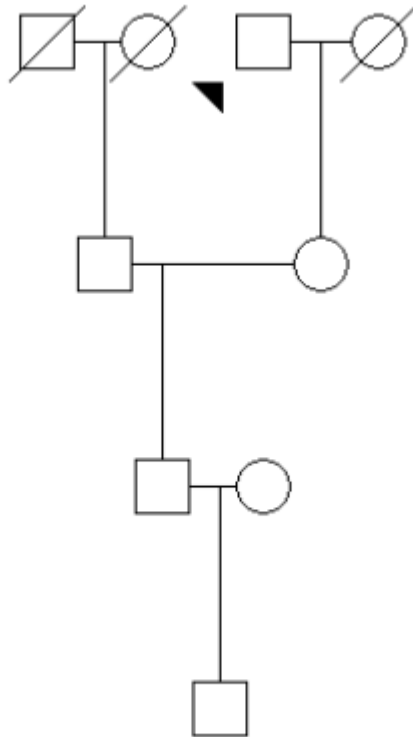
Local e Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do responsável \_\_\_\_\_      Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

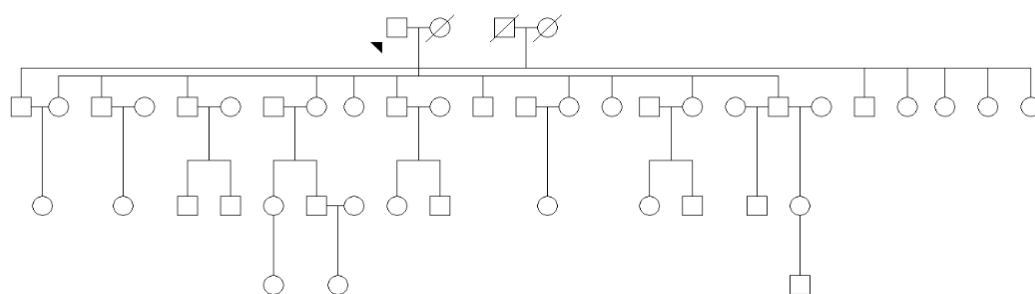
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

## 9. Anexos

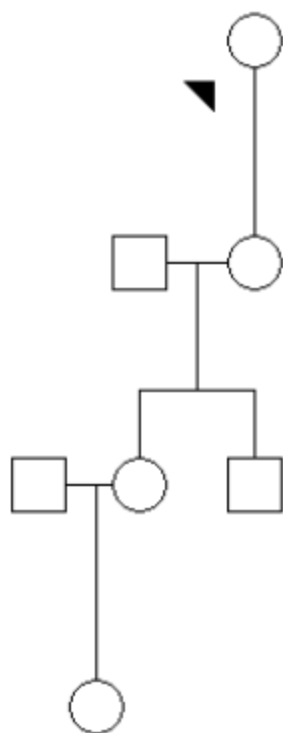
### Heredograma Família 1



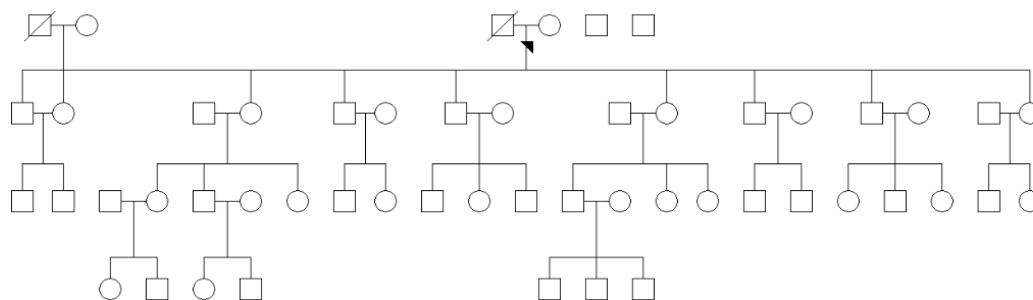
## Heredograma Família 2



### Heredograma Família 3

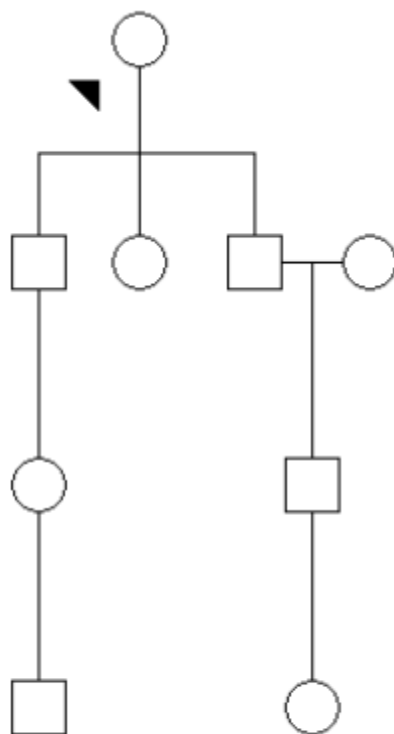


## Heredograma Família 4

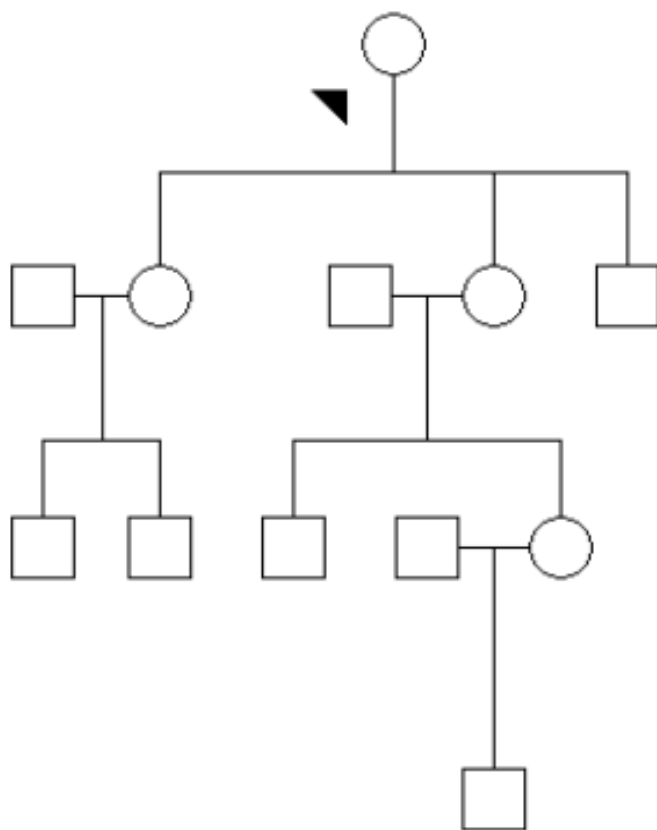




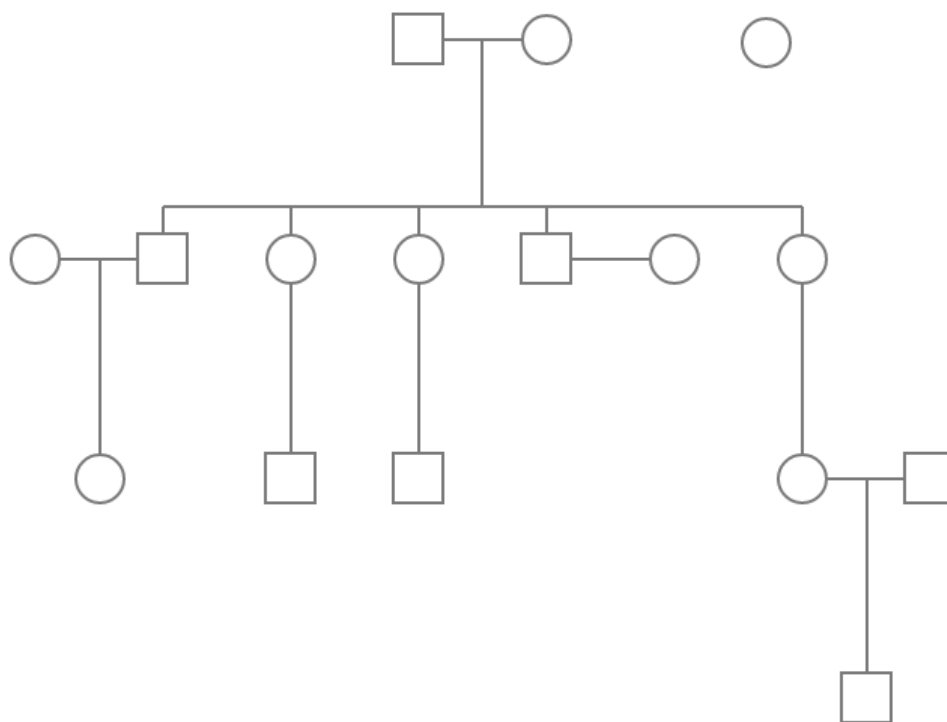
## Heredograma Família 5



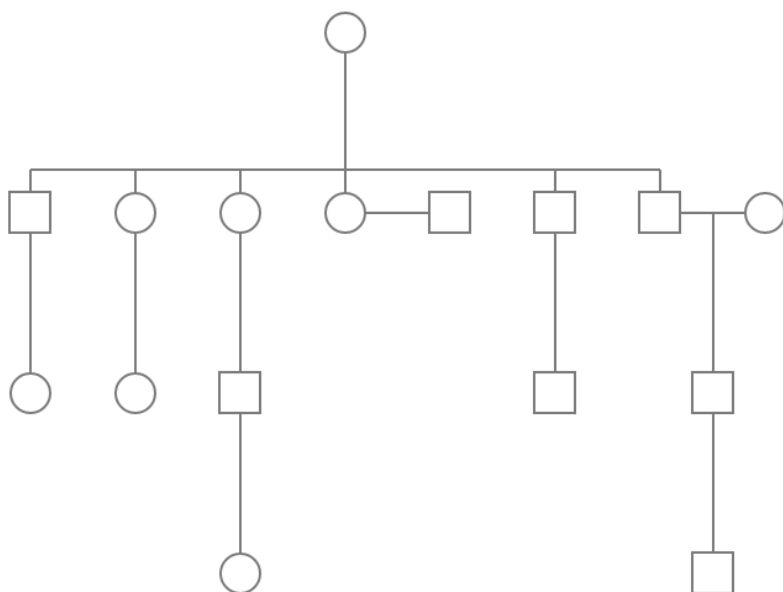
## Heredograma Família 6



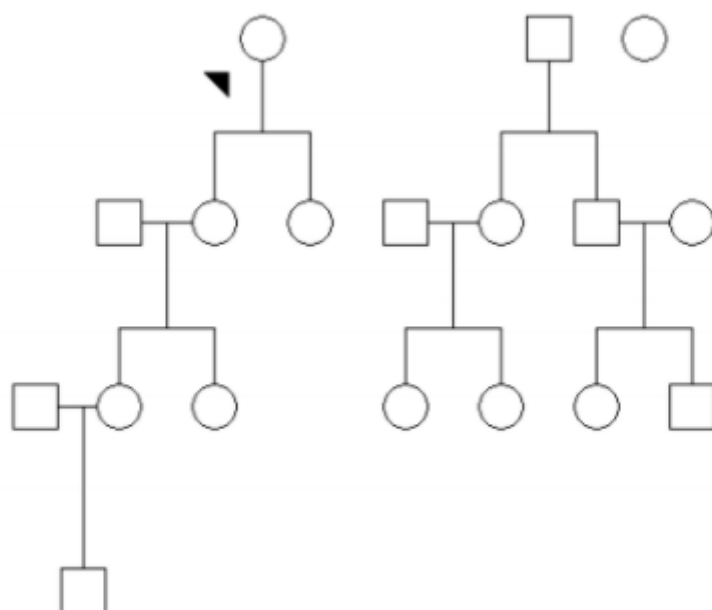
## Heredograma Família 7



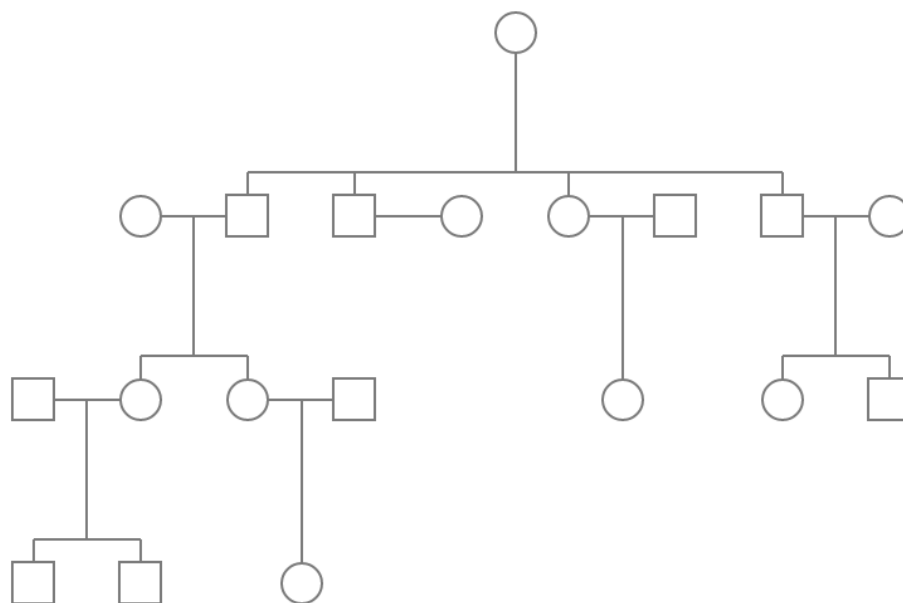
## Heredograma Família 8



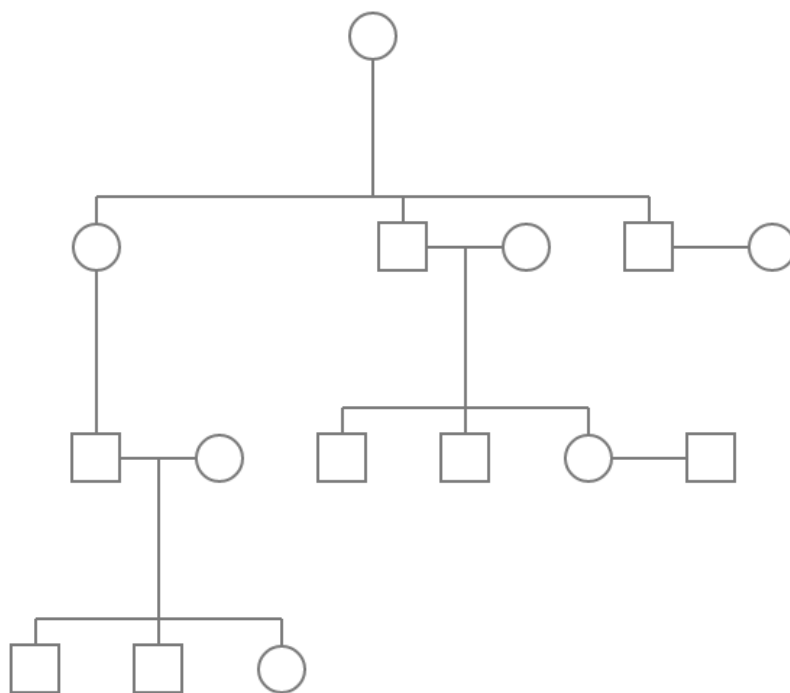
## Heredograma Família 9



## Heredograma Família 10



## Heredograma Família 11



## Heredograma Família 12

