



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES *CTLA4*, *NOS3* E *CYP* EM
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO
HEMORRÁGICO (AVEH) E/OU ANEURISMA INTRACEREBRAL EM UMA
AMOSTRA DO DISTRITO FEDERAL.

LIGIA CANONGIA DE ABREU CARDOSO

Brasília – DF
Fevereiro/2017

LIGIA CANONGIA DE ABREU CARDOSO

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES *CTLA4*, *NOS3* E *CYP* EM
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO
HEMORRÁGICO (AVEH) E/OU ANEURISMA INTRACEREBRAL EM UMA
AMOSTRA DO DISTRITO FEDERAL.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ildinete Silva Pereira

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Brasília – DF

Fevereiro/2017

À minha família por acreditar em mim e sempre me apoiar com muito carinho, aos meus pais que não mediram esforços para que eu concluísse mais uma etapa na minha vida, ao meu noivo que esteve ao meu lado em todos os momentos.

Agradecimentos

A Deus por me dar força e coragem para superar desafios.

À Universidade de Brasília - UnB e seu corpo docente por me proporcionar imenso aprendizado na Pós-Graduação.

À minha orientadora Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira, pelo carinho, orientação e suporte em todos os momentos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, por todo empenho, dedicação, orientação, paciência e, principalmente, pela amizade durante os anos de mestrado.

Ao Prof. Dr. Luzitano Brandão Ferreira, pelas oportunidades que me foram oferecidas para que fosse possível a realização do mestrado.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Haddad, pelo apoio durante as práticas laboratoriais e em congressos.

Às técnicas de laboratório Lorena e Nara, pela amizade, suporte e atenção durante os dias de pesquisa.

Aos membros do Laboratório de Patologia Molecular, pelo apoio acadêmico.

Aos colegas de Laboratório que me incentivaram e ajudaram durante as pesquisas.

À minha amiga Renata Souza, que desde o primeiro dia esteve ao meu lado tanto na bancada quanto no dia-a-dia.

À minha amiga Renata Andrade, pela ajuda e direção nas práticas laboratoriais, na montagem de cronograma, na programação das aulas e que sempre esteve presente em todos os momentos.

Ao meu amigo Felipe Borges, que me auxiliou durante as práticas de extração de DNA apoiando e motivando a conclusão do projeto.

À minha amiga Thaís Souza, pelo aprendizado das técnicas laboratoriais.

Ao CNPq, FAPDF e Faculdade LS pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional

À minha família, noivo e amigos pela contribuição valiosa durante minha pós-graduação.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo. Devemos promover coragem onde há medo, promover o acordo onde existe conflito e inspirar a esperança onde há desespero. ”

Nelson Mandela.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Acidente Vascular Encefálico	2
1.2 Fisiopatologia	4
1.3 Classificação Etiológica	6
1.3.1 Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH)	6
1.3.2 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI)	7
1.3.3 Aneurisma Intracerebral	8
1.4 Escalas de consciência	9
1.5 Epidemiologia	11
1.6 Fatores de Risco	14
2. Polimorfismos genéticos	16
2.1 <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA4)</i>	18
2.2 Óxido Nítrico Sintase Endotelial (<i>NOS3</i>)	19
2.3 Citocromo p450 2D6 (<i>CYP2D6</i>)	20
3. Objetivos	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. METODOLOGIA	23
4.1 Delineamento	23
4.2 Campo de estudo	23
4.3 Amostra	24
4.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	25
4.5 Termo de Guarda de Material Biológico	25
4.6 Procedimentos Técnicos e Laboratoriais	26
4.6.1 Extração de DNA	26
4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	26
4.6.3 RFLP – <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> / Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5.1 Estimativa das frequências genotípicas e de dados dos participantes da pesquisa.	34

6. RESULTADOS	35
6.1 Caracterização dos grupos de estudo	35
6.2 Resultados da avaliação do polimorfismo genético <i>CTLA4</i> -318 C/T	40
6.3 Resultados da avaliação do polimorfismo genético <i>NOS3</i> íntron 4.....	50
6.4 Resultados da avaliação do polimorfismo genético <i>NOS3</i> -786 T/C.....	58
6.5 Resultados da avaliação do polimorfismo genético <i>CYP2D6</i> 1846 G/A.....	66
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO	85
9. REFERÊNCIAS	88
ANEXOS	99

Lista de Abreviaturas

- A1C - Hemoglobina Glicada
AHA/ASA - *American Heart Association/American Stroke Association*
AIT - Ataque Isquêmico Transitório
APCs – Células Apresentadoras de Antígenos
ATP - Adenosina Trifosfato
AVE - Acidente Vascular Encefálico
AVEH - Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico
AVEI - Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
CEO - Carcinoma Epidermóide Oral
CTLA4 - Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CYP - Citocromo p450
CYP2D6 - Citocromo p450 2D6
DAC - Doença Arterial Coronariana
DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DCBV - Doenças Cerebrovasculares
DM - Diabetes Mellitus DIC - Doenças Isquêmicas do Coração
ERM - Escala de Rankin Modificada
HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica
HAVEI - Hospitalização por AVEI
IAM - Infarto Agudo do Miocárdio
IC - Insuficiência Cardíaca
ICH - Hemorragia intracerebral espontânea IMC - Índice de Massa Corporal
IR - Insuficiência Renal
NIHSS - *Nation Institutes of Health Stroke Scale*
NO - Óxido Nítrico
NOS - NO sintases
NOS3 - Óxido Nítrico Sintase Endotelial
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PIC - Pressão Intracraniana
RFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição
RNAm - RNA mensageiro

SNC - Sistema Nervoso Central

SNPs - Polimorfismos de Nucleotídeo Único

STR - Short Tandem Repeats

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VNTRs - *Variable Number Tandem Repeat*

Resumo

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) corresponde a uma disfunção neurológica aguda causada pela interrupção do fluxo sanguíneo em áreas do encéfalo, ocasionando diversas incapacidades e o acometimento global interfere em atividades diárias da vida do paciente. O Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH), compreende a hemorragia subaracnóide e a hemorragia intraparenquimatosa, que tem como principal doença associada a hipertensão arterial sistêmica (HAS). No Brasil, são registradas mais de 68 mil mortes por AVE anualmente, tal doença representa a primeira causa de morte e incapacidade no país, gerando impacto social e econômico. Neste trabalho foram avaliados Polimorfismos Genéticos em pacientes diagnosticados com AVEH e/ou Aneurisma Intracerebral. Polimorfismo genético pode ser compreendido quando há mutação de nucleotídeos em pelo menos 1% dos indivíduos da espécie, onde um específico gene apresenta variações em suas sequências codificadora, não-codificadora ou promotoras, o que pode acarretar fenótipos diferentes. O objetivo do presente estudo foi investigar possível associação entre os polimorfismos dos genes *CTLA4*, *NOS3* e *CYP* e a ocorrência do AVEH e/ou Aneurisma Intracerebral, descrevendo frequências alélicas e genótípicas, avaliando diferentes manifestações clínicas e prognósticos de pacientes residentes no Distrito Federal. Os participantes preencheram uma ficha de identificação e foram sujeitos à coleta de sangue venoso. Após a coleta, foi realizada extração do DNA, PCR-RFLP e análise do genótipo. As frequências genótípicas foram estimadas por contagem direta, por meio do programa SPSS versão 23.0. Para comparação das distribuições das frequências foi aplicado o teste do qui-quadrado, de forma a detectar possíveis associações dos genótipos entre os grupos caso e controle. Foram consideradas associações com probabilidades menores que 5% ($P < 0,05$). Concluiu-se que independente do polimorfismo a presença da HAS é um fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma e quando analisado o polimorfismo *CTLA4* -318 C/T, a presença do genótipo CT, foi considerada um fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma. Os demais polimorfismos não obtiveram diferença estatística quanto à associação entre os diferentes genótipos.

Palavras-chave: Acidente Vascular Encefálico, Polimorfismo, *CTLA4*, *NOS3*, *CYP*.

Abstract

Stroke refers to an acute neurological dysfunction caused by disruption of blood flow in areas of the brain, causing various disabilities, and global impairment interferes with daily activities of the patient's life. Hemorrhagic Stroke (HS), includes subarachnoid hemorrhage and intraparenchymal hemorrhage, which has as its main disease associated with systemic arterial hypertension (SAH). In Brazil, more than 68 thousand deaths per year are registered, this disease represents the first cause of death and disability in the country, generating social and economic impact. Genetic polymorphism can be understood when there is a mutation of nucleotides in at least 1% of the individuals of the species, where a specific gene presents variations in its coding, non-coding or promoter sequences, which can lead to different phenotypes. The aim of the present study was to investigate possible association between the *CTLA4*, *NOS3* and *CYP* gene polymorphisms and the occurrence of hemorrhagic stroke/intracerebral aneurysm, describing allelic and genotype frequencies, evaluating different clinical manifestations and prognoses of patients residing in the Federal District. Participants filled out an identification form and were subjected to venous blood collection. After the collection, DNA extraction, PCR-RFLP and genotype analysis were performed. The genotypic frequencies were estimated by direct counting, using SPSS software version 23.0. To compare the frequency distributions, the chi-square test was applied in order to detect possible associations of genotypes between the case and control groups. Associations with probabilities less than 5% ($P < 0.05$) were considered. It was concluded that regardless of the polymorphism the presence of SAH is a risk factor for the occurrence of hemorrhagic stroke/Aneurysm. Analyzing the *CTLA4* -318 C/T polymorphism, the presence of the CT genotype was considered a risk factor for the occurrence of hemorrhagic stroke/Aneurysm. The other polymorphisms did not present statistical difference regarding the association between the different genotypes.

Key words: Stroke, Polymorphism, *CTLA4*, *NOS3*, *CYP*.

1. INTRODUÇÃO

Doenças Crônicas não transmissíveis são as principais causas de morte no mundo, representam 63% dos óbitos no mundo ocorridos em 2008, dentre elas, destacam-se as doenças isquêmicas do coração (DIC) e doenças cerebrovasculares (DCBV), dentro do grupo de DCBV, o Acidente Vascular Encefálico (AVE) tornou-se uma das principais causas de incapacidade, sendo considerada a segunda doença com maior taxa de mortalidade (Ferreira and Ferreira 2012, Malta, Oliveira et al. 2016)

De acordo com o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), no Brasil 28,2% dos óbitos em 2012 foram resultados de doenças do aparelho circulatório, sendo que desses óbitos 30,1% foram por DCBV e 13,6% por doenças hipertensivas, tais óbitos são prevalentes na região Nordeste e possuem uma redução nas regiões Sudeste e Sul quando comparadas às regiões Norte e Centro-Oeste. (de Padua Mansur and Favarato 2016, Villela, Klein et al. 2016).

O AVE corresponde a uma disfunção neurológica aguda causada pela interrupção do fluxo sanguíneo em áreas do encéfalo, ocasionando diversas incapacidades e o acometimento global interfere em atividades diárias da vida do paciente (Medeiros, Fernandes et al. 2014).

Após a ocorrência do AVE, um dos maiores riscos é o AVE secundário, também conhecido como AVE recorrente, que ocorre nas primeiras 24 horas ou mais após o primeiro AVE e pode envolver qualquer área vascular do encéfalo. O AVE secundário está associado a um aumento de mortalidade e a um pior prognóstico quando comparado ao primeiro AVE. A morbidade causada pelo AVE é considerada a maior causa de incapacidade no mundo (Peter and Justus 2016).

Pacientes acometidos pelo AVE apresentam variados graus de dependência para a realização de suas atividades diárias, portanto, cabe ao profissional, em seu trabalho interdisciplinar atentar para todas necessidades do paciente e atuar com vistas à integralidade de suas ações. É importante destacar propostas de promoção de saúde e ações preventivas, além do trabalho centrado no conhecimento biomédico (Araujo, Ximenes et al. 2013).

1.1 Acidente Vascular Encefálico

O AVE é considerado um déficit neurológico (transitório ou definitivo) em uma área do encéfalo que ocorre secundário a uma lesão vascular. Pode ser dividido em duas categorias principais: isquêmicos (87%) e hemorrágicos (13%). Tais categorias apresentam semelhanças, porém diferem quanto à etiologia, fisiopatologia, tratamento médico e cirúrgico (Montaner, Mendioroz et al. 2012).

O Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH), compreende a hemorragia subaracnóide e a hemorragia intraparenquimatosa, que tem como principal doença associada a hipertensão arterial sistêmica (HAS); e o Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI) define um déficit neurológico devido a insuficiência de suprimento sanguíneo no encéfalo, podendo ser temporário ou permanente, tem como principais fatores de risco a HAS, diabetes mellitus e cardiopatias (Radanovic 2000).

A *American Heart Association* desenvolveu um conceito de saúde cardiovascular ideal para ser aplicado em todo o mundo, que é definido com a presença simultânea de quatro comportamentos de saúde ideais: ser não-fumante, obter Índice de Massa Corporal (IMC) $<25 \text{ kg/m}^2$, realizar atividades físicas regularmente e seguir uma dieta consistente; e com três fatores de saúde ideais: obter índice de colesterol total $< 200 \text{ mg/dL}$, pressão arterial sistólica $< 120 \text{ mmHg}$ e diastólica $< 80 \text{ mmHg}$, e glicose em jejum $< 100 \text{ mg/dL}$. Tais medidas buscam a prevenção de fatores de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares e AVE (Zhang, Zhou et al. 2013).

Taylor, Trialists e colaboradores afirmam que o AVE não é mais considerado uma doença sem tratamento e com morbidade a longo prazo. Hospitais públicos e privados da África do Sul ganharam bastante atenção devido à sua desenvoltura multidisciplinar em tratamento de pacientes com AVE. Nas unidades de AVE, os cuidados dos pacientes ficam sob a supervisão de uma equipe multidisciplinar especializada na gestão da doença (Trialists' Collaboration 2013, Taylor, le Feuvre et al. 2016).

Cerca de 60 a 70% dos casos de AVE ocorrem em pessoas com mais de 65 anos e esses pacientes acometidos pelo AVE tornam-se cada vez mais dependentes, com a necessidade de apoio permanente, o que produz impacto na qualidade de vida do acometido. Devido à dependência física surgem alterações sociais como o

isolamento, alterações econômicas e emocionais, podem ocorrer transtornos neuropsiquiátricos como a depressão (Marques and Martins 2012, Silva, Neves et al. 2016).

Diversas terapias têm sido estudadas na tentativa de minimizar as sequelas do AVE, entre as quais estão a redução do equilíbrio e da mobilidade funcional. Estudos vêm propondo medidas que proporcionem melhora no quadro do paciente e em sua qualidade de vida. Bacha e colaboradores (2016) afirmam que o treinamento funcional tem se sobressaído com opção de tratamento para idosos, pois possui características para manutenção da mobilidade funcional e independência dos acometidos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu como qualidade de vida “a percepção do indivíduo da sua posição na vida, no contexto da cultura e sistema de valores nos quais ele vive, e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações”. As experiências clínicas e mudanças comportamentais dos pacientes devem ser avaliadas para que seja mantida a qualidade de vida, devido a isso são realizadas avaliações de qualidade de vida a partir de escalas (Fleck, Louzada et al. 2000, Suzano, de Almeida et al. 2016).

1.2 Fisiopatologia

O encéfalo exige um suprimento constante de oxigênio e glicose que são fornecidos pela circulação sanguínea. O fluxo sanguíneo cerebral é cerca de 50mL por minuto para cada 100g de tecido e se mantém constante devido às pressões sanguíneas e intracranianas que se mantêm contínuas pela auto regulação da resistência vascular (Pereira 2013).

Tal auto regulação ainda não é completamente compreendida, porém, sabe-se que mecanismos neurogênicos e o óxido nítrico (NO) são participantes deste processo. Mediadores químicos liberados pelo NO podem controlar a reatividade vascular e inibir o acúmulo de plaquetas e leucócitos. Experimentos demonstraram que camundongos deficientes da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS3) possuíam um maior volume do enfarte cerebral. Essas e outras observações sugerem que o NO no endotélio pode proteger o tecido encefálico isquêmico por mecanismos hemodinâmicos (del Zoppo and Hallenbeck 2000).

A fisiopatologia do AVEH depende da etiologia e do tipo de distúrbio vascular. Os sintomas como deterioração ou perda da função neurológica são produzidos quando há um rápido acúmulo de sangue dentro do parênquima cerebral, devido à hemorragia, que leva à ruptura da artéria e aumento da pressão no local (Fann, Lee et al. 2013).

O metabolismo normal do encéfalo é rompido pelo fato de ter sido exposto ao sangue, que geram efeitos patológicos como alterações devido à citotoxicidade do sangue, hipermetabolismo, stress oxidativo e inflamação. Ocorre uma isquemia secundária no encéfalo devido à pressão de perfusão reduzida (Aronowski and Zhao 2011).

Estudos correlacionam os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica com o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares e AVE. Quanto ao AVE, diferentes etiologias têm sido associadas com os níveis de pressão arterial e que ambos os valores altos ou baixos estão associados a um mau prognóstico para deterioração neurológica precoce (Zis, Vemmos et al. 2013).

O Aumento da pressão intracraniana (PIC) devido ao derramamento de sangue no encéfalo pode levar à disfunção vascular cerebral e congestão vascular com posterior edema cerebral. Como o aumento da PIC sobe para níveis que se aproximam da pressão arterial média, a pressão de perfusão cerebral se aproxima de

zero, o que resulta na perda de fluxo sanguíneo. Este processo pode conduzir à isquemia encefálica quando o fluxo sanguíneo não cumprir as exigências metabólicas dos tecidos (Donnelly 2014).

A isquemia encefálica desencadeia alterações no metabolismo de neurônios e células da glia, podendo levar à morte celular pela falência de seu metabolismo e por falta de suprimento energético. Durante a isquemia, há uma diminuição do nível de adenosina trifosfato (ATP) disponível, levando à disfunção da bomba de sódio e potássio, acúmulo do sódio intracelular e como consequência alteração do potencial de membrana e edema celular (Homi, Júnior et al. 2000)

Aneurismas intracranianos ocorrem em decorrência da dilatação das paredes da artéria cerebral que se desenvolve em devido a fraqueza da parede arterial, são mais comuns na bifurcação da artéria carótida interna e cerebral média, sendo 72,5% dos casos nestas localizações. Podem apresentar-se de diversas formas sendo a mais frequente a ruptura do aneurisma gerando uma hemorragia subaracnóide (Wanderley Filho, Junior et al. 2013).

O processo inflamatório desempenha um papel importante na patogênese do aneurisma intracerebral. O dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio pode danificar as paredes dos vasos por conta da geração de radicais livres, através do recrutamento de células pró-inflamatórias. Aneurismas intracerebrais desenvolvem pontos de ramificação de vasos ao longo das artérias que são áreas de alto estresse hemodinâmico (Starke, Chalouhi et al. 2014).

1.3 Classificação Etiológica

1.3.1 Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH)

O AVEH é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo sendo responsável por 10-15% de todos os casos de AVE (Mota, Meireles et al. 2016).

Envolve a ruptura de uma artéria intracerebral e por consequente um derramamento de sangue, formando um hematoma. Alguns danos cerebrais envolvem a morte de células que foram privadas de oxigênio e nutrientes, inicia-se então um processo degenerativo que elimina progressivamente neurônios e astrócitos da região do AVEH dentro de 24 horas. Células vizinhas também podem ser perdidas dentro de semanas subsequentes. A fase secundária envolve uma resposta inflamatória do tecido encefálico que causa edema, constrição de vasos, citotoxicidade e acidose (Robinson, Dang et al. 2013).

O AVEH é uma doença multifatorial resultante da combinação de fatores e genéticos e ambientais. Fatores de risco contribuem para o aumento do risco na ocorrência do AVEH (Silva 2013, Hopewell and Clarke 2016).

É considerado mais debilitante e grave quando comparado ao AVEI sendo que 34% dos casos resultam em óbito dentro de 30 dias. Casos de hemorragias intracerebrais e hemorragias subaracnóides podem decorrer da ruptura de um aneurisma intracraniano. (Robinson, Dang et al. 2013).

A hemorragia intracerebral primária ocorre devido à ruptura espontânea causada pela hipertensão descontrolada, é uma das formas mais letais do AVEH. Contudo, a localização e o volume do hematoma são fortes preditores para se definir um bom prognóstico. A expansão do hematoma acontece em 30% dos pacientes, o que significa apenas piora do quadro, porém pode ser evitada. A hemorragia intracerebral secundária está associada a malformações arteriovenosas, aneurismas intracranianos e medicamentos (Brouwers, Chang et al. 2014).

A hemorragia subaracnóide é considerada um caos de urgência médica com altas taxas de morbidade e mortalidade. Avanços no tratamento têm gerado uma queda quanto a taxa de mortalidade, e a porcentagem de sobreviventes após a ruptura do aneurisma pode ser de até 65%. Déficits na construção visual, memória, flexibilidade mental, deficiência cognitiva e velocidade psicomotora são demonstrados

mesmo em pacientes com bom prognóstico e podem persistir por mais de um ano (da Costa, Dunkley et al. 2016).

González-Pérez e colaboradores (2013) em um estudo coorte realizado no Reino Unido, examinaram a letalidade de curto e longo prazo de pacientes que sofreram hemorragia intracerebral primária e hemorragia subaracnóide entre os anos 2000 e 2008. Tal estudo demonstrou que pacientes com menos de 50 anos são mais propensos a morrer depois da hemorragia intracerebral primária em comparação com a hemorragia subaracnóide. Além disso, os sobreviventes de ambos casos continuam a ter risco de morte em comparação com uma população de referência.

1.3.2 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI)

O encéfalo pode ser privado de oxigênio de duas formas, entrando em hipóxia funcional quando há baixa pressão parcial de oxigênio, devido a incapacidade de carreamento de oxigênio pelo sangue ou quando ocorre a isquemia, podendo esta ser transitória ou permanente, devido a interrupção do fluxo sanguíneo por perfusão reduzida ou obstrução de um vaso (Loterio 2015).

Ao se avaliar medidas específicas para o controle do AVEI, é necessário que o conceito de zona de penumbra isquêmica seja esclarecido. Esta é uma área ao redor do núcleo isquêmico, caracterizada por isquemia moderada, disfunção celular, porém não há morte celular, tal área é reversível após a reperfusão (Rolindo and Oliveira 2016).

A isquemia produz uma série de alterações moleculares e celulares, como disfunção inflamatória molecular e desequilíbrio de íons que levam a um estado patológico grave. Durante a reperfusão, após a isquemia, a restauração de oxigênio e fornecimento de glicose restabelecem a fosforilação oxidativa que ajuda a normalizar os níveis de energia exigidos nos processos fisiológicos (Burcu, Osman et al. 2016).

Menos que 5% dos pacientes acometidos por AVEI recebem terapia trombolítica intravenosa, este fato se dá pelo receio dos médicos de piorar a evolução dos pacientes com AVEI ou pela admissão tardia do paciente no hospital. Contudo, essa terapia trombolítica venosa dentro de uma janela de tempo de 4 horas e 30 minutos após a ocorrência do AVEI pode oferecer efeito benéfico em pacientes selecionados (Strbian, Engelter et al. 2012, Sundseth, Faiz et al. 2014).

Indivíduos pós-AVEI podem enfrentar incapacidades como paralisia dos músculos, rigidez em partes do corpo, perda de mobilidade das articulações, dores difusas, problemas de memória, dificuldade na comunicação oral e incapacidades sensoriais. A funcionalidade do indivíduo é um fator importante associado a independência e qualidade de vida. Porém a restrição no funcionamento físico e cognitivo tende a piorar a saúde mental do acometido pelo AVEI (Estrela-Dias and Pais-Ribeiro 2014).

1.3.3 Aneurisma Intracerebral

Aneurismas Intracerebrais são lesões comumente adquiridas e encontradas em 1 a 6% das autópsias *post mortem*. O aneurisma sacular ou congênito é o tipo mais comum de aneurisma intracerebral, cerca de 90% dos aneurismas saculares ocorrem na circulação anterior próximo aos pontos de ramificação arterial. Os Aneurismas Intracerebrais caracterizam-se por uma dilatação localizada e anormal na parede das artérias, situadas geralmente no polígono arterial de Willis (Pinto and Zago 2000).

Na maioria dos casos os aneurismas não se rompem e passam por toda a vida do indivíduo sem diagnóstico. Contudo 27 mil novos casos de hemorragia subaracnóide nos Estados Unidos são decorrentes de aneurismas, sendo que destes 5 a 15% evoluem para um AVEH (Magistris, Bazak et al. 2013).

Os fatores mais importantes para o surgimento do aneurisma intracerebral são a vulnerabilidade da parede arterial e o aumento do estresse hemodinâmico. Estudos histopatológicos em aneurismas demonstram a falta da lâmina elástica interna com as camadas íntima, média e adventícia normais associada à presença de polimorfonucleares, linfócitos e células plasmáticas (LOURENÇO, JÚNIOR et al. 2013).

O diagnóstico do aneurisma intracerebral pode ser realizado através de tomografia computadorizada do crânio; angiotomografia, útil em aneurismas clipados e pacientes submetidos a técnicas endovasculares; angiorressonância magnética, possibilita a reconstrução de vasos, porém com uso restrito em aneurismas clipados e angiografia cerebral por cateterização intra-arterial, sendo padrão ouro para o diagnóstico de aneurisma intracerebral (Fukujima and Gabbai 2001).

1.4 Escalas de consciência

O atendimento ao paciente que sofrera o AVE requer muita atenção e depende de uma equipe multidisciplinar bem capacitada para o desenvolvimento de protocolos. É de fundamental importância que a equipe de socorro imediato faça a avaliação neurológica do paciente, observando o nível de consciência aplicando algumas escalas (ALBAN and CARVALHO 2016).

Tais escalas examinam a presença de incapacidades relacionadas ao AVE e fornecem informações para um prognóstico funcional, sendo fundamentais como guias em programas de reabilitação funcional, assim como, adaptação a atividades diárias (Pawlowski, de Carvalho Rodrigues et al. 2013).

A escala de coma de Glasgow tornou-se uma importante ferramenta para a investigação de lesões cerebrais traumáticas desde a sua introdução em meio acadêmico por Teasdale e Jennett, quando se notou ser vital a capacidade de avaliar e registrar mudanças em estados de consciência alterada de forma confiável, assim como a inconsistência de sistemas para descrever pacientes com alterações de consciência que muitas vezes descreviam em termos de má compreensão (Barker, Whyte et al. 2014).

Em 1974, Teasdale e Jennett afirmam que se deve avaliar três aspectos diferentes da resposta comportamental: resposta motora, resposta verbal e abertura dos olhos, sendo cada uma avaliada independentemente da outra, o que depende de respostas que podem ser claramente definidas e graduadas de acordo com a ordem de classificação que indica o grau de disfunção (Teasdale and Jennett 1974).

O desenvolvimento da escala de coma de Glasgow começou em 1971, como um instrumento para melhorar o atendimento clínico de pacientes com lesão cerebral aguda e como consequência seus prognósticos. A pesquisa que produziu a escala ocorreu na unidade de neurocirurgia do Instituto de Ciências Neurológicas, em Glasgow, Reino Unido, uma clínica multidisciplinar que prestava serviços no oeste da Escócia (Teasdale, Maas et al. 2014).

Completando 40 anos, a escala de coma de Glasgow é utilizada clinicamente em todo o mundo, e seu artigo pioneiro de 1974 em 2010 foi considerado um dos artigos de neurocirurgia mais citados em todo o mundo, contudo, há a preocupação de que com o passar do tempo, sua divulgação foi acompanhada com alterações na técnica de aplicação, há relatos de diferentes técnicas e avaliação de fatores como

confusão e intubação, além disso há alterações na forma como os resultados são tratados (Ponce and Lozano 2010, Reith, Brennan et al. 2016).

A escala de Rankin é uma escala bem estabelecida para avaliar pacientes acometidos por AVE, contudo, possui uma confiabilidade abaixo do ideal e para limitar subjetividades foi proposto um questionário simplificado para a Escala de Rankin Modificada, o qual apresenta boa confiabilidade e um tempo médico de conclusão de 1,5 minutos (Bruno, Close et al. 2013).

Tal escala é considerada uma escala ordinal com pontuação definida por 7 graus classificados da seguinte forma: 0, assintomático; 1, nenhuma deficiência significativa e apesar dos sintomas é capaz de desempenhar todas as tarefas e atividades habituais; 2, ligeira deficiência, não é possível executar todas as atividades anteriores, mas capaz de cuidar de seus assuntos sem ajuda; 3, deficiência moderada, exige alguma ajuda, mas capaz de andar sem ajuda; 4, deficiência moderada a grave, é incapaz de andar sem ajuda e incapaz de atender às próprias necessidades corporais sem assistência; 5, incapacidade grave, acamado, incontinente e exigindo cuidados de enfermagem e atenção constantes; e 6, a morte (Cheng, Forkert et al. 2014).

Pesquisadores de AVE estudam medidas globais para avaliar pacientes acometidos e então desenvolver um bom prognóstico quanto à deficiência de cada paciente. As escalas para o AVE são mundialmente conhecidas, confiáveis e validadas, sendo importantes na prática clínica, uma vez que a mensuração acurada do estado funcional do paciente é de grande relevância (de Brito, Lins et al. 2013).

O Índice de Barthel compreende a avaliação de dez itens que consideram a independência funcional em pacientes acometidos por AVE. O escore varia de 0 a 100, onde é considerado: dependência severa, escores inferiores a 45; dependência grave, entre 45 e 59; dependência moderada entre 60 e 80 e dependência leve, entre 81 e 100 (Rangel, Belasco et al. 2013).

1.5 Epidemiologia

A OMS relata que o AVEH possui 15 milhões de casos em todo o mundo a cada ano, destes, mais de cinco milhões morrem e outros cinco milhões permanecem incapacitados. A maioria destas mortes ocorre geralmente em países desenvolvidos (Somarajan, Kalita et al. 2011, Kumar, Sagar et al. 2013, Tada, Shiffman et al. 2014).

A cada ano mais de 690.000 norte-americanos sofrem um AVEI, esta enorme morbidade é resultante de um comprometimento neurológico, emocional e social. Apesar do aumento do número de casos de AVEH em todo o mundo, avanços vem sendo relatados quanto ao controle de novos casos (Kernan, Ovbiagele et al. 2014).

Em 2008, após anos sendo a terceira principal causa de morte nos Estados Unidos, o AVE caiu para a quarta principal causa de morte. O que reflete o compromisso e o trabalho realizado pela *American Heart Association/American Stroke Association* (AHA/ASA), a razão do sucesso quanto à redução de óbitos foi considerada multifatorial e incluiu uma melhor prevenção e melhores cuidados nas primeiras horas da ocorrência do AVE (Jauch, Saver et al. 2013).

A incidência do AVE na China tem aumentado rapidamente ao longo dos anos. Cerca de 15 milhões de morte estão associadas ao AVE por ano, e já se torna a primeira causa de mortalidade na China, tal taxa está intimamente associada com a idade, significativamente mais presente em pacientes idosos. Devido ao envelhecimento demográfico na China, torna-se urgente compreender a tendência do prognóstico do AVE (He, Wu et al. 2014).

O AVEH e as doenças cardíacas são as principais doenças acometidas no mundo, embora o AVE seja mais evidente em países em desenvolvimento, por exemplo, as taxas de mortalidade por doenças cardíacas são ligeiramente mais elevadas na América do Norte, Europa e Austrália. Em contraste as taxas de mortalidade por AVE são mais elevadas em grande parte da África e Ásia (Figura 1) (Kim and Johnston 2013).

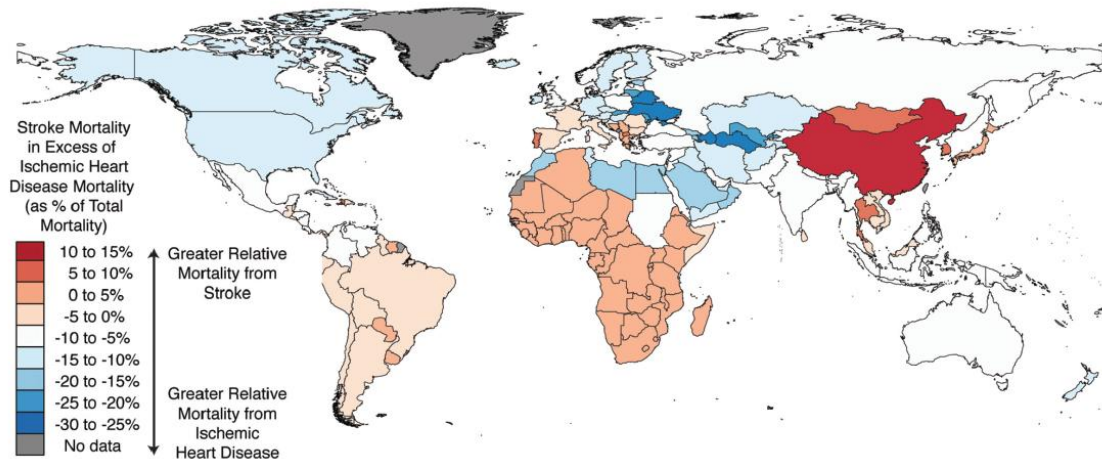


Figura 1: taxa de mortalidade relativa de AVE em comparação com doença isquêmica do coração. 2004. (OMS – Organização Mundial da Saúde) Fonte: (Kim and Johnston 2013)

No Brasil, são registradas mais de 68 mil mortes por AVE anualmente, tal doença representa a primeira causa de morte e incapacidade no país, gerando impacto social e econômico. A OMS recomenda adoção de medidas de emergência para a prevenção e tratamento da doença, uma vez que 90% dos casos podem ser prevenidos. O Ministério da Saúde afirma que o fumo é responsável por 25% das doenças vasculares, entre elas o AVE (Portal Saúde. 2016).

O AVE em 2005 ocasionou cerca de 5,7 milhões de mortes. Estudos revelam uma elevada taxa de mortalidade por AVE no Brasil ao final da década de 1980. A redução de óbitos por AVE iniciou em meados da década de 1960 e foi estabilizada ao final do século XX em países como Estados Unidos, Canadá e Austrália. O Brasil apresenta redução da taxa de mortalidade por AVE semelhante à dos países em desenvolvimento, porém ainda é a quarta maior taxa de toda América Latina (Garritano, Luz et al. 2012).

Há evidências do declínio da taxa de mortalidade por AVE no estado de São Paulo desde 1870 e em todo o país desde 1980. De 1979 a 1996, a taxa de mortalidade ajustada por idade em adultos brasileiros com 30 anos ou mais diminuiu de 200 para 164 mortes por 100.000 habitantes homens e de 168 para 130 mortes por 100.000 mulheres (Passos, Ishitani et al. 2016).

Estudos brasileiros nos estados de São Paulo e Santa Catarina demonstraram uma taxa de mortalidade reduzida em 20%, semelhante ao observado em países desenvolvidos. Na população da cidade de Joinville, SC, observou-se uma diminuição de 30% na mortalidade em casos de AVE (Minelli, Fen et al. 2007, Cabral, Gonçalves et al. 2009).

No sul do Brasil, Copstein e colaboradores (2013) afirmam que há uma alta prevalência de sobreviventes de AVE em uma população vulnerável na cidade de Porto Alegre. Foram identificados como fatores de risco para a ocorrência de AVE idade, tabagismo, hipertensão e doença coronariana. Maior escolaridade foi associada como um fator de proteção contra o AVE. Contudo os autores informam que há necessidade de implementação de políticas públicas de baixo custo para melhoramento do número de sobreviventes.

Em sobreviventes de AVE com mais de 65 anos são comumente relatadas dificuldades após 6 meses da lesão, tais como, hemiparesia, incapacidade de andar sem assistência, alterações cognitivas, sintomas de depressão, afasia e dependência para serem realizadas as atividades diárias (Caro, Mendes et al. 2016).

Com a implementação do Programa Nacional de Assistência aos Portadores de Hipertensão Arterial Sistêmica, denominado HIPERDIA em 2002, foi permitido evidenciar uma redução acentuada nas taxas de hospitalização por AVEI (HAVEI). Lopes e colaboradores (2016) afirmam que houve um declínio acentuado na incidência de HAVEI no Brasil em todas faixas etárias e sexo, contudo não evidencia a diminuição da mortalidade por AVEI, por esta ser dependente de melhorias no sistema de saúde, incluindo suporte de urgência e emergência.

1.6 Fatores de Risco

A ocorrência do AVE na maioria dos casos é secundária à presença de fatores de risco em cada paciente. Tais fatores de risco podem ser divididos em modificáveis e não modificáveis. Existem fatores de risco cardiovasculares que podem ser tratáveis, porém aumentam o risco de desenvolver o AVE (Rodrigues, Castro et al. 2013).

Fatores de risco para AVE modificáveis incluem: Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), Diabetes Mellitus (DM), tabagismo, etilismo e glicemia. Os fatores de risco não modificáveis são os que não podem ser tratados como alterações congênitas, idade, sexo e etnia (Rodrigues, da Silva et al. 2016).

A HAS é o fator de risco para AVE mais importante e melhor documentado. Estudos afirmam que avaliando a pressão arterial em 115/75 mmHg, alterações de 20 mmHg na sistólica e 10 mmHg na diastólica para cima estão associadas a um aumento de risco de 2 vezes para mortalidade por AVE. Globalmente a HAS está presente em um a cada três adultos, condição que faz com que 51% das mortes dos portadores de HAS seja por AVE. (Hong, Bang et al. 2013, Owolabi and Agunloye 2013).

A DM é uma doença metabólica, cuja principal clínica é a hiperglicemia. As principais formas clínicas de DM são o tipo 1 e o 2. A DM tipo 1 decorre da destruição imunológica das células- β pancreáticas (células de Langerhans) e é responsável por aproximadamente 10% dos casos, tais pacientes passam a depender da insulina para sobrevivência e tendem a descompensar com cetoacidose (Oselka and Troster 2000).

A DM tipo 2 é a forma mais prevalente, correspondendo a mais de 90% dos casos, e está basicamente associada a dois mecanismos: disfunção de células- β e resistência à ação da insulina, que varia da resistência à insulina predominante com deficiência relativa de insulina aos casos em que predomina o defeito secretório com resistência à insulina. Esta última, por sua vez, está intimamente relacionada a obesidade e ao sedentarismo (Oselka and Troster 2000, Bosi, Carvalho et al. 2009).

Pacientes com DM possuem um aumento de risco para ocorrência do AVE e nota-se que este risco ocorre de 10 a 15 anos mais cedo do que em indivíduos não diabéticos. Além disso a síndrome metabólica e seus componentes também demonstram um aumento de risco para a ocorrência do AVE, especialmente em

pacientes com DM tipo 2. Vários estudos avaliam a DM tipo 2 como fator de risco, porém são poucos os que estudam a DM tipo 1 (Hägg, Thorn et al. 2014).

Khoury e colaboradores (2013) afirmam que a população com DM é substancialmente um fator de risco para a ocorrência de AVE. Seus dados destacam a crescente prevalência de DM em paciente com AVE ao longo do tempo, além disso demonstram uma taxa de incidência 3 a 4 vezes de AVEI em paciente com DM.

Foi demonstrado que o tabagismo é um fator de risco para ambos os tipos de AVE, isquêmico e hemorrágico, tanto em homem quanto em mulheres. Fumantes possuem uma duplicação quanto ao risco de ocorrência do AVE durante suas vidas em comparação aos que nunca fumaram. Estimativas indicam que 19% das causas de AVE são em decorrência do fumo (Peters, Huxley et al. 2013).

Segundo a OMS o etilismo mata cerca de 2,5 milhões de pessoas por ano, causando 4% de todas as mortes. O uso prejudicial do álcool é fator de risco, principalmente entre os homens com idades entre 15 e 59 anos, para a ocorrência não somente de AVE mas como cirrose, convulsões, acidentes, violência e câncer (O'Keefe, Bhatti et al. 2014).

Eventos pós-prandiais são reconhecidos como fatores de risco para doenças vasculares. Valores elevados de glicemia pós-prandial são marcadores do aumento de resistência da insulina que quando associados a outros fatores como síndrome metabólica e pressão arterial elevada formam um fator de risco para a ocorrência do AVE (Mirrahimi, Chiavaroli et al. 2014)

O AVE é conhecido por ter um efeito maior em mulheres do que em homens, embora quando se trata de idade a incidência aumenta em homens e os piores prognósticos aumentam em mulheres, pois a incidência do AVE é maior em grupos etários mais velhos e as mulheres possuem maior longevidade. Em todo o mundo, a incidência do AVE é 33% mais elevado em homens do que em mulheres fato também observado na prevalência, sendo 41% maior em homens (Wang, Ning et al. 2014).

Há cada vez mais evidências sobre as diferenças na incidência do AVE, principalmente quando relacionadas à grupos étnicos. Na Inglaterra e País de Gales as variações na ocorrência do AVE são grandes, onde negros são mais acometidos pelo AVE, quase que duas vezes mais do que outros grupos étnicos da população. Nas populações de Bangladesh e Paquistão a prevalência de AVE é mais que o dobro em homens (Bhopal, Bansal et al. 2012).

Além dos fatores de risco originalmente estudados, a identificação de fatores de risco não tradicionais para o AVE vêm aumentando. Alguns fatores como obesidade, síndrome metabólica, apnéia do sono, inflamação crônica, doença renal crônica, nutrição, anticoncepcionais orais, estresse, depressão e poluição do ar têm sido avaliados com novos fatores de disparo para a ocorrência do AVE (Silva, Nascimento et al. 2013, Bang, Ovbiagele et al. 2015).

2. Polimorfismos genéticos

O projeto genoma humano consistiu em um esforço internacional para o mapeamento do genoma humano, tal projeto surgiu a partir de duas ideias chave no início de 1980, a de que a capacidade de analisar pontos de vista globais aceleraria a pesquisa biomédica analisando problemas de forma abrangente e imparcial e a construção de um ponto de vista global que exigiria esforço de toda comunidade científica (Lander, Linton et al. 2001).

O estabelecimento da tecnologia de sequenciamento do DNA por Walter Gilbert e Allan Maxam gerou um número de sequências de DNA disponíveis em bancos de dados de genômica que têm crescido exponencialmente nos últimos anos, o que conta com o auxílio de novas gerações de sequenciadores de alta eficiência (Carrer, Barbosa et al. 2010).

Polimorfismo genético pode ser compreendido quando há mutação de nucleotídeos em pelo menos 1% dos indivíduos da espécie, onde um específico gene apresenta variações em suas sequências codificadoras, não-codificadoras ou promotoras, o que pode acarretar fenótipos diferentes. (Salazar Pelaéz, Fernández Grisales et al. 2012).

SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) constituem 90% das variações encontradas no genoma humano e podem ocorrer em um a cada 1.000 pares de bases, sendo comuns no genoma humano e podendo ser responsáveis por diversas patologias. SNPs nas regiões promotoras e codantes possuem maior probabilidade de modificar o desempenho do gene e por consequência a tradução em proteína (de Marqui 2015).

O número de identificação de referência de um SNP, ou ID "rs", é uma etiqueta de identificação atribuída pelo NCBI a um grupo de SNPs que mapeiam para uma localização idêntica. O número "rs" é um identificador exclusivo para SNP e não deduz a posição, podendo ter uma ou mais posições numa sequência. Sendo que tais identificações para os polimorfismos deste estudo são: *CTLA4* -318 C/T (rs5742909), *NOS3* -786 T/C (rs2070744) e *CYP2D6* (rs3892097) (Bhagwat 2010).

Os polimorfismos de comprimento de sequência única englobam VNTRs (variable number tandem repeat) ou minissatélites e STR (short tandem repeats) ou microsatélites. Os VNTRs possuem repetições in tandem de 10 a 64 pares de base, enquanto os STRs possuem repetições de 2 a 9 pares de base. STRs e SNPS são comumente utilizados na identificação humana, tendo amplas análises em casos forenses (da Silva Leite, Batista et al. 2013).

VNTRs são marcadores informativos para caracterização genética e são denominados como codominantes na natureza. A utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em VNTRs tem sido útil em diagnósticos pré-natais, quantificação de quimerismo pós transplante, análise de doenças e diversos estudos de população (Pellerin, McKercher et al. 2016, Sajib, Yeasmin et al. 2016).

Polimorfismos genéticos podem configurar uma genética de risco ou proteção quando uma proteína codificada por um gene polimórfico participa de processos biológicos, porém nem todo polimorfismo tem significado funcional. A presença de alelos polimórficos em uma população não afetada reflete que tais polimorfismos não são determinantes e outros fatores devem ser investigados (Teles 2013).

Estudos de variação genética sugerem que do total de casos de AVE aproximadamente 38% são hereditários, também afirmam que a maior parte da contribuição genética para o AVE é poligênica e reflete efeitos de múltiplos genes cada um exercendo pequenos efeitos (Hopewell and Clarke 2016).

2.1 Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA4)

O *CTLA4* é uma potente molécula imunorreguladora que desempenha um papel na regulação negativa de ativação e proliferação de células T. O *CTLA4* pode induzir a apoptose independente de células T ativadas, o que inibe a função imune de linfócitos T (Zhao, Duan et al. 2014).

Moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, expressas na superfície de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), possuem como papel principal a indução de resposta imune e manutenção da tolerância. Tais moléculas quando se ligam ao receptor CD28, presente em linfócitos T, promovem o segundo sinal necessário para ativação e proliferação de linfócitos T, contudo, quando se ligam ao receptor *CTLA4* inibem a resposta celular (Migliori 2010).

O CD80 e CD86 presentes na célula apresentadora de antígeno se ligam ao *CTLA4* com mais força do que o CD28. Tal descoberta levou à proposta de que o *CTLA4* atua em competição com o CD28, bloqueando sua sinalização e atenuando a resposta de células T ao antígeno, retardando o aparecimento de doenças. (Rudd 2008).

Wang e colaboradores (2015) afirmam que o polimorfismo do gene *CTLA4* está associado com a diminuição do risco de ocorrência de câncer, especialmente câncer de mama e de pulmão. Reconhecendo que o *CTLA4* atua como um regulador negativo na ativação de células T reduzindo a produção de receptores das interleucinas 1 e 2, responsáveis pela diferenciação e proliferação de linfócitos, e retardando as células T na fase G1 do ciclo celular, induzindo assim a apoptose da célula.

O polimorfismo do gene *CTLA4* -318 C/T (rs5742909) já foi descrito por desempenhar um papel na regulação da autotolerância do sistema imune. A presença do alelo T pode regular positivamente a expressão do *CTLA4* e já foi relatado em doenças autoimunes como a artrite reumatoide (Lee, Bae et al. 2015).

Lozano e colaboradores (2011) inferem que indivíduos portadores do alelo T no SNP -318 possuem maior expressão de *CTLA4* na superfície celular. Tal SNP foi associado com uma maior atividade promotora, o que aumenta a expressão do gene e condiz com forte efeito regulador do *CTLA4* em linfócitos T.

Wang e colaboradores Wang, Jiang et al. (2009) afirmaram que a apresentação do antígeno pode estar envolvida no desencadeamento do AVE idiopático em crianças e que moléculas envolvidas na co-estimulação da ativação das células T, como o

CTLA4, podem ser importantes na regulação da apresentação do antígeno no AVE idiopático. É por isso que utilizamos o gene *CTLA4* como candidato para determinar se o polimorfismo de tal molécula co-estimuladora de células T está associada ao AVEH.

O gene *CTLA4* está localizado no cromossomo 2q33 e é composto por 4 éxons que possuem funções distintas como: domínio extracelular, transmembrânico e citoplasmático, e 3 íntrons (Liu and Zhang 2013).

2.2 Óxido Nítrico Sintase Endotelial (*NOS3*)

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina que é transformada em um intermediário, a N-hidroxi-L-arginina, com a presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e Ca^{2+} e após é necessário mais NADPH e O_2 para a formação de L-citrulina e NO. Muitas células são capazes de sintetizar NO através de enzimas NO sintases (NOS), tais sintases possuem três isoenzimas. A isoforma I está presente no cérebro, isoforma II é induzida por macrófagos e outras células e a isoforma III (*NOS3*) é expressa por células endoteliais (Flora Filho and Zilberstein 2000).

O NO possui várias atividades fisiológicas que incluem a regulação do fluxo sanguíneo cerebral e a modulação das atividades neuronais. Qualquer defeito na *NOS3* induz à disfunção endotelial vascular e diminuição das atividades cerebrais. Doenças como aterosclerose e o AVE estão relacionadas à disfunção da *NOS3* (Elneam, Boghdady et al. 2015).

O gene *NOS3* está localizado no cromossomo 7q35-36, contém 26 éxons e 21 kb de DNA. Os polimorfismos 4b/a localizado no íntron 4 e o -786 T/C na região promotora têm sido amplamente investigados. Estudos têm demonstrado que tais polimorfismos estão associados à ocorrência de AVEI. Os polimorfismos íntron 4 e -786 T/C estão associados com o AVEI em populações asiáticas, além disso o íntron 4 pode estar também relacionado com a ocorrência de AVE em populações brancas (Niu, Yang et al. 2013).

O SNP do gene *NOS3* -786 T/C (rs2070744), foi estudado por alterar a expressão do *NOS3* e reduzir a atividade promotora do gene, a desregulação de *NOS3* influencia no nível de NO plasmático, que possui propriedades antitrombóticas e anti-inflamatórias (Liu, Geng et al. 2014).

O VNTR localizado no íntron 4 do *NOS3* está intimamente associado com a concentração de NO no plasma. Tal polimorfismo possui uma sequência de 27 pares de base, onde há um alelo maior e outro menor. O alelo maior “b” possui 5 repetições *in tandem* de 27 pares de base, enquanto o alelo menor “a” possui 4 repetições (Türkanoglu Özçelik, Can Demirdöğen et al. 2014).

Zhao e colaboradores (2012) sugeriram em uma meta-análise que o VNTR no íntron 4 possui efeito protetores significativos contra retinopatia diabética, principalmente em pacientes diagnosticados com diabetes tipo 2. Contudo a presença do alelo C do SNP -786 T/C pode ser considerado um fator de proteção para tal patologia.

2.3 Citocromo p450 2D6 (*CYP2D6*)

O gene citocromo p450 (*CYP*) 2D6 é membro da subfamília de genes *CYP2D*. Embora a enzima *CYP2D6* seja mais extensivamente estudada devido a sua importância clínica, a evolução da subfamília *CYP2D* ainda não foi completamente compreendida. As enzimas *CYP* catalisam a oxidação de substratos exógenos e endógenos como medicamentos, químicos ambientais, ácidos graxos e esteróides. Tais enzimas são proteínas ligadas a membrana celular expressas em eucariotos e procariotos. (Yasukochi and Satta 2015).

As enzimas *CYP* desempenham um papel importante na biotransformação de fármacos, mediando até 90% do metabolismo de oxidação do fármaco. O gene *CYP2D6* está entre os principais que desempenham tal papel, metabolizando aproximadamente 19% do fármaco. A variabilidade de *CYP* é atribuída a fatores genéticos que podem ser indicadores para terapias individualizadas. A relação entre uma específica enzima *CYP* e seu polimorfismo tem sido amplamente estudada (Wu, Zhang et al. 2013).

A *CYP2D6* tem recebido bastante atenção desde o início de 1970, devido a sua grande variação individual que levou à descoberta de deleção e duplicação no gene *CYP2D6*. O gene possui 9 éxons e 8 íntrons que codificam um polipeptídeo de 497 aminoácidos. *CYP2D6* constitui apenas 2 a 4% das enzimas hepáticas, porém possui um papel no metabolismo de fármacos maior que outras enzimas. (Ota, Hayashida et al. 2014).

A nomenclatura de CYP450 é determinada por convenção. CYP2D6*4, se refere à citocromo p450, família 2, subfamília D, isoenzima 6, variante alélica número 4. O alelo*4 possui frequência de 22% dos suecos, representando 75% dos alelos mutados (Gamarra 2011).

CYPs são encontradas no retículo endoplasmático ou em frações mitocondriais. O locus do gene *CYP2D6* é altamente polimórfico com mais de 80 variantes alélicas. *CYP2D6* localiza-se no cromossomo 22q13.1 (Zalata, El-Samanoudy et al. 2015).

Nepomnyashchikh e colaboradores (2012), investigando a cirrose hepática, estudou a associação de substituição de um nucleotídeo único na região 1846 G/A do gene *CYP2D6* (rs3892097), formando o agrupamento de alelos *CYP2D6*4*, em Caucasianos com cirrose viral ou tóxica desenvolvida.

Por serem polimórficos, os genes que codificam as CYP levam à variação na atividade enzimática e por sua vez a suscetibilidade ao câncer. As enzimas codificadas pelos genes das *CYP2E1*, *CYP1A1* e *CYP1A2* estão envolvidas na ativação de diversas substâncias cancerígenas. O polimorfismo *CYP2D6*4* G/A resulta em uma capacidade limitada para metabolizar substâncias, tal diminuição prolonga o tempo de exposição a neurotoxinas, podendo levar a ocorrência de AVE. (de Leon, Armstrong et al. 2006)

Dentre os polimorfismos já descritos, o gene *CYP1A1* exibe uma substituição de C para T denominada 3801 C/T (*CYP1A1*2*) no éxon 7, que cria um sítio de restrição para *MspI* e resulta em um aumento de três vezes na atividade enzimática, diferente do polimorfismo *CYP2D6*4* (Zordoky and El-Kadi 2010).

O efeito modificador dos polimorfismos sobre a atividade das enzimas CYP é o fator mais importante das diferenças individuais no metabolismo oxidativo das drogas. Conhecer o tipo do polimorfismo dado permite escolher o fármaco mais adequado e definir a dose eficaz exata (Nyíró, Inczédy-Farkas et al. 2012).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar possível associação entre os polimorfismos dos genes *CTLA4*, *NOS3* e *CYP* e a ocorrência do AVEH e/ou aneurisma intracerebral.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *CTLA4* -318 C/T, *NOS3* -786 T/C, *NOS3* íntron4 e *CYP2D6* 1846 G/A nos participantes do estudo

- Avaliar as diferentes manifestações clínicas e o prognósticos dos participantes da pesquisa com AVEH e/ou aneurisma intracerebral;

- Analisar a associação dos polimorfismos *CTLA4* -318 C/T, *NOS3* -786 T/C, *NOS3* intron4 e *CYP2D6* 1846 G/A e a ocorrência do AVEH e/ou aneurisma intracerebral residentes no Distrito Federal (Brasil);

- Analisar a associação entre os polimorfismos *CTLA4* -318 C/T, *NOS3* -786 T/C, *NOS3* intron4 e *CYP2D6* 1846 G/A com manifestações clínicas e o prognósticos de e/ou aneurisma intracerebral.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento

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

4.2 Campo de estudo

Após a aprovação do projeto (ANEXO A), dados pessoais dos participantes da pesquisa foram obtidos por meio do preenchimento de uma ficha de identificação específica (ANEXO B). A ficha de identificação possibilitou a identificação dos pacientes segundo a idade, sexo, cor, estado civil, data do AVEH/aneurisma, HAS, Pressão arterial, diabetes, glicemia, tabagismo, etilismo, uréia, creatinina, pontuação na escala de coma de Glasgow, Rankin e Índice de Barthel na admissão e exames de imagem.

O único procedimento a que os participantes foram submetidos foi a coleta de aproximadamente 10 mL de sangue venoso através de punção de veia periférica, com material novo e descartável. A coleta de sangue foi realizada pela enfermeira chefe do setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília, Hélia Sousa, responsável pelo projeto de pesquisa.

O material biológico (sangue) dos participantes foi levado ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Bioprospecção e Neurociências (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília), onde foi estocado sob a guarda da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari para realização da extração do DNA das amostras e os exames para verificação dos polimorfismos genéticos. Esse material biológico foi fracionado, e armazenado no Laboratório de Pesquisa em Genética Molecular, sob responsabilidade do professor Dr. Luzitano Brandão Ferreira e no Laboratório de Análises Clínicas, sessão de Patologia Molecular, sob a tutela da professora Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva.

4.3 Amostra

Os participantes da pesquisa foram divididos em grupo caso e grupo controle.

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

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

A autorização ética para pesquisa foi para no máximo 200 participantes do grupo caso.

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

A autorização ética para pesquisa foi para no máximo 200 participantes do grupo controle, sendo que este grupo foi pareado por sexo e idade em relação ao grupo caso.

4.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

4.5 Termo de Guarda de Material Biológico

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

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

4.6 Procedimentos Técnicos e Laboratoriais

4.6.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit *Invisorb Spin Blood Mini Kit (250)* da empresa Invitek (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300, Alemanha) (Figura 2). A concentração do DNA obtido foi estimada pelo espectrofotômetro (NANODROP Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). A concentração média alcançada foi de 20 ng/μL.

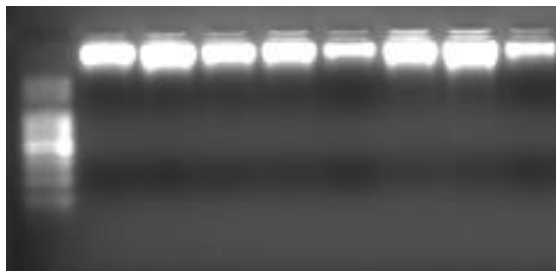


Figura 2. Extração do DNA visualizada em gel de agarose (elaborada pela autora).

4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica da PCR permite que uma região selecionada do genoma seja amplificada milhões de vezes. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar os polimorfismos foram:

Gene	Oligonucleotídeos	Referências
<i>CTLA4</i> -318 C/T	<i>Foward</i> 5' AAA TGA ATT GGA CTG GAT GGT 3' <i>Reverse</i> 5' TTA CGA GAA AGG AAG CCG TG 3'	(Zaletel, Krhin et al. 2006)
<i>NOS3</i> -786 T/C	<i>Forward</i> 5' TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A 3' <i>Reverse</i> 5' GCC TCC ACC CCC ACC CTG TC 3'	(Glueck, Prince et al. 2015)
<i>NOS3</i> íntron 4	<i>Foward</i> 5' AGG CCC TAT GGT AGT GCC TT 3' <i>Reverse</i> 5' TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC 3'	(Sinici, Kalyoncu et al. 2010)
<i>CYP2D6</i> 1846 G/A	<i>Foward</i> 5' GCC TTC GCC AAC CAC TCC G 3' <i>Reverse</i> 5' AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC 3'	(Nepomnyashchikh, Vavilin et al. 2012)

Em cada reação, foram utilizados 4,0 µL de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/µL; 2,5µL de tampão 10X Taq Pol, (**Ludwig Biotecnologia** LTDA, Brasil); 0,5 µL de MgCl₂ (50 mM, **Ludwig Biotecnologia** LTDA, Brasil), 0,5 µL de dNTPs (2,5mM; **Ludwig Biotecnologia** LTDA, Brasil)); 0,5 µL de Taq-Polimerase (**Ludwig Biotecnologia** LTDA, Brasil), 5U/µL); 1,5µL de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (*Invitrogen Life Technologies*, EUA, 10 pmol/µL); completando com água ultrapura para um volume final de 25 µL por reação.

O equipamento utilizado foi termociclador TC-512 (Techne, EUA).

4.6.2.1 PCR do gene *CTLA4*

As condições de termociclagem para a amplificação da região do polimorfismo *CTLA4* -318 C/T foram: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. O produto desta PCR foi um fragmento de 247pb.

4.6.2.2 PCR do gene *NOS3*

Na termociclagem do gene *NOS3* na região promotora -786 T/C foram feitas as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 63°C por 30 segundos e extensão da fita de DNA a 72°C por 30 segundos. Extensão final a 72°C por 10 minutos. Tal PCR gerou um fragmento de 180pb (Figura 3).

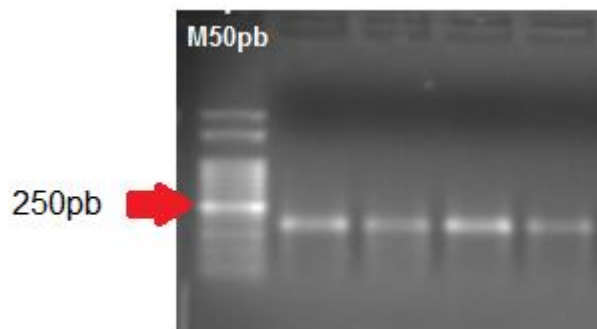


Figura 3. PCR do gene *NOS3* -786 T/C gerando um fragmento final de 180pb (elaborada pela autora).

Para a amplificação do gene *NOS3* na região do íntron 4 foram realizadas a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos 60°C por 30 segundos e extensão 72°C por 1 minuto. Extensão final 72°C por 10 minutos, gerando fragmentos de DNA de 420 pb (alelo b) e/ou 323pb (alelo a) (Figura 4).

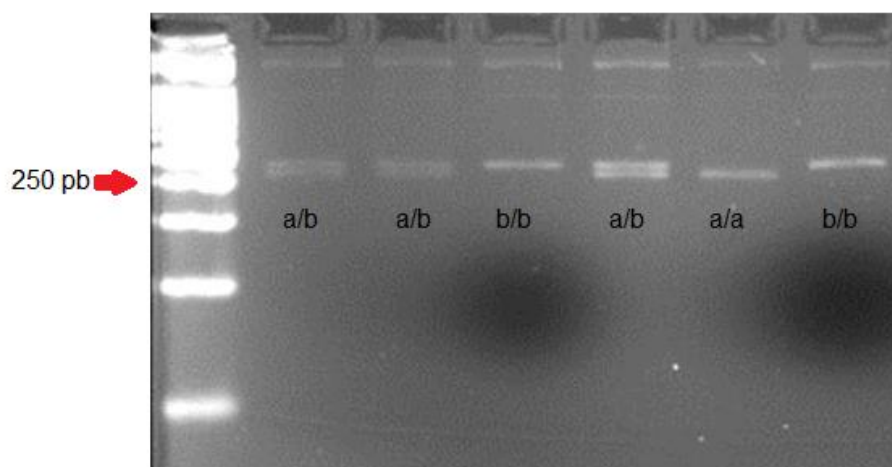


Figura 4. PCR do gene *NOS3* íntron 4 gerando um fragmento final de 420pb (alelo b) e/ou 323pb (alelo a) (elaborada pela autora).

4.6.2.3 PCR do gene CYP2D6

A PCR do gene *CYP2D6* compreendeu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos 60°C por 15 segundo e extensão 72°C por 20 segundos. Extensão final 72°C por 7 minutos. Foi produzido um fragmento de 355 pb (Figura 5).

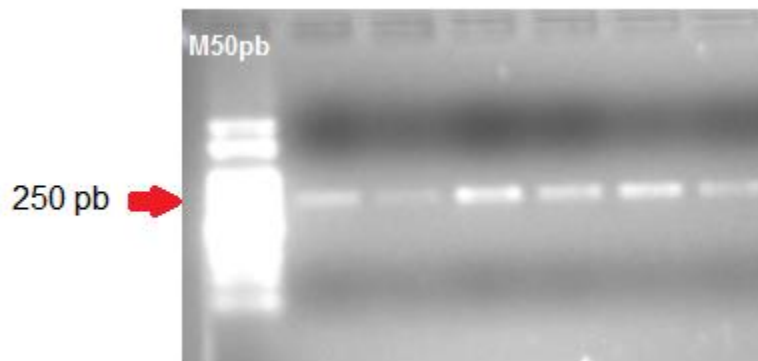


Figura 5. PCR do gene NOS3 CYP2D6 gerando um fragmento final de 355 pb (elaborada pela autora).

4.6.3 RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* / Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição

Para a obtenção de marcadores polimórficos, os produtos da PCR podem ser digeridos por enzimas de restrição gerando fragmentos de tamanhos variados denominados RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição). As enzimas de restrição clivam o DNA em locais específicos, denominados sítios de restrição (SCHINCARIOL 2011).

4.6.3.1 RFLP do gene *CTLA4*

O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição *MseI* (*New England Biolabs*, Inc., EUA). Para montagem do sistema de digestão foram utilizados: 10,0 μL da PCR; 2,0 μL de tampão 10x NEB4 (*Biolabs*); 1 μL de enzima *Mse I* (10U/ μL), completando com água ultrapura para um volume final de 20 μL por reação. O sistema foi mantido a 37°C por 3 horas.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3% (*Invitrogen Life Technologies*, EUA), com brometo de etídio em uma potência de 100W por 20 minutos. O alelo 1 (T) criou um novo sítio de restrição, e o fragmento de 247pb foi clivado em dois de 132pb e 115pb; o alelo 2 (C) não foi clivado pela enzima, e assim, o polimorfismo foi dividido em genótipo de clivagem (TT), heterozigoto (TC) e genótipo de não clivagem (CC) (Figura 6).

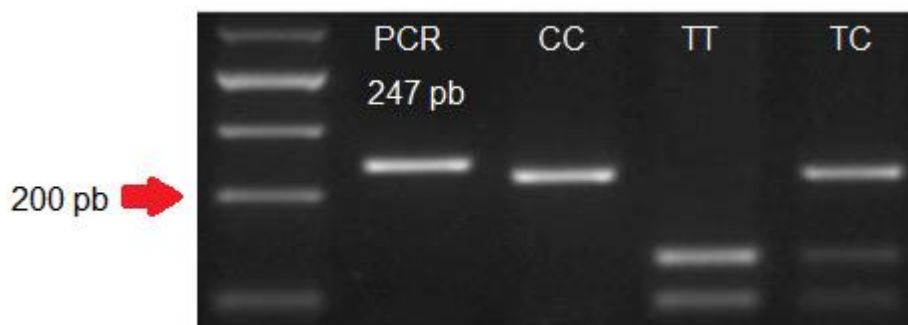


Figura 6. PCR e digestão enzimática do gene *CTLA4*, gerando os genótipos C/C, T/T e T/C (Wang, Jiang et al. 2009).

4.6.3.2 RFLP do gene *NOS3*

Apenas a região promotora -786 T/C foi submetida à digestão enzimática. O produto da PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *MspI* (*New England Biolabs, Inc.*, EUA). Para a digestão foi utilizado 10,0 µL da PCR; 2,0µL de tampão (*New England Biolabs, Inc.*, EUA); 1 µL de enzima *MspI* (10U/µL), 17 µL completando com água ultrapura para um volume final de 20 µL por reação. O sistema foi mantido a 37°C por 1 hora e 30 minutos.

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 50W por 1 hora e 30 minutos.

O alelo 1 (T) criou um sítio de restrição, gerando os fragmentos de 140pb e 40pb e o alelo 2 (C) possuiu dois sítios de restrição criando fragmentos de 90pb, 50pb e 40pb. Esse polimorfismo -786 T/C foi dividido em genótipo T/C onde ambos os tipos de clivagem ocorreram nos dois alelos, T/T em que ocorreu uma clivagem nos dois alelos e genótipos C/C no qual a enzima clivou duas vezes os dois alelos (Figura 7).

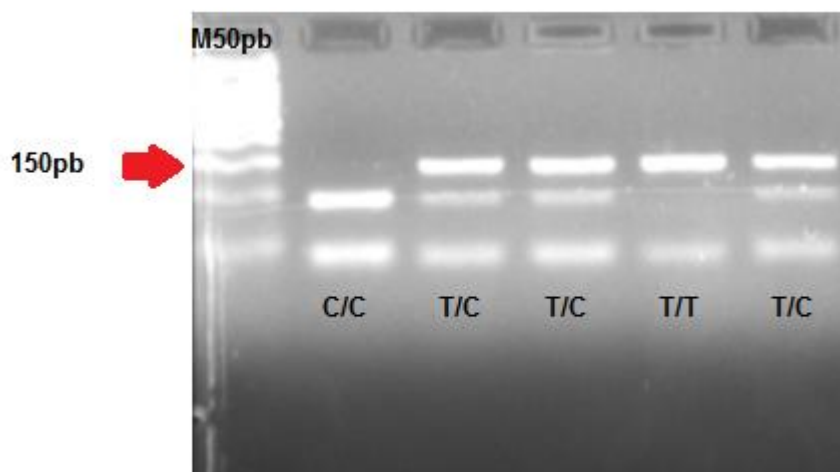


Figura 7. Digestão enzimática do gene *NOS3* -786 T/C, gerando os genótipos C/C, T/C e T/T (elaborada pela autora).

A região do íntron 4 não foi submetida à digestão enzimática por ser um VNTR e possuir uma mutação de deleção, na qual o alelo selvagem 4b é maior com 5 repetições *in tandem* de 27 pares de base, e o alelo mutado 4a é menor com 4 repetições devido à deleção.

Apenas com a amplificação do material genético foi possível realizar a genotipagem, pois o oligonucleotídeo reconhecia os alelos 4a e 4b. O alelo 4a, mutante, produziu um fragmento de 323pb e o alelo 4b, selvagem um fragmento de 420pb.

4.6.3.3 RFLP do gene *CYP*

A digestão enzimática do produto da PCR foi realizada utilizando a enzima de restrição BseBI. A reação de restrição utilizou: enzima de restrição BseBI (*Jena, Alemanha*). Para isto foi utilizado, 10,0 µL do produto da PCR; 2,0µL de tampão da enzima; 1 µL de enzima BseBI (10U/µL), 17 µL de água ultrapura. O sistema foi mantido a 60°C por 1 hora e 30 minutos.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 4%, com brometo de etídio em uma potência de 50W por 1 hora e 30 minutos.

Quando digerido, o polimorfismo *CYP2D6*4* aparece em duas bandas de 105 e 250pb, definidas como alelo selvagem G, o aparecimento de um fragmento não digerido de 355pb indica a presença da mutação A de *CYP2D6*4*, denominado mutação homozigótica. No *CYP2D6*4* selvagem, existe um local de restrição que se perde em indivíduos que tiveram a troca de base G para A. Como consequência, esta enzima não corta o DNA genômico devido a mutação homozigótica (Figura 8).

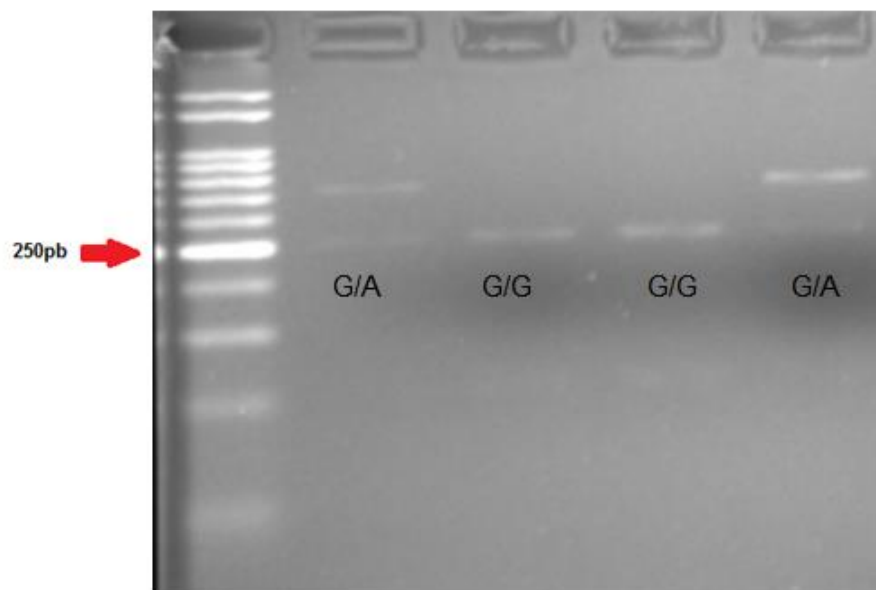


Figura 8. Digestão enzimática do gene *CYP2D6*, gerando os genótipos G/A e A/A (elaborada pela autora).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1 Estimativa das frequências genótípicas e de dados dos participantes da pesquisa.

As frequências genótípicas foram estimadas por contagem direta, por meio do programa SPSS versão 23.0. Para comparação das distribuições das frequências foi aplicado o teste do qui-quadrado, de forma a detectar possíveis associações dos genótipos entre os dois grupos avaliados (caso e controle). Foram consideradas associações com probabilidades menores que 5% ($P < 0,05$).

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

Além disto, características clínicas do grupo caso foram descritas estatisticamente, tais como: as escalas de Glasgow, Rankin, Índice de Barthel; e exames laboratoriais como exames bioquímicos.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização dos grupos de estudo

No período do estudo foram identificados 112 indivíduos portadores de AVEH e/ou aneurisma, porém devido à ausência de informações clínicas relevantes no seu prontuário e a necessidade de homogeneidade de características basais com o grupo controle selecionado, o tamanho amostral do grupo caso foi reduzido para 81 indivíduos. Destes, 48 (59,3%) pacientes eram portadores de AVEH e 33 (40,7%) pacientes de aneurisma (Tabela 1).

Tabela 1. Tamanho amostral do grupo caso, dividido em AVEH e Aneurisma.

Desfecho	N	%
AVEH	48	59,3%
Aneurisma	33	40,7%
Total	81	100,0%

Assim, a avaliação da homogeneidade quanto ao sexo e a idade dos grupos de estudo estão descritas nas tabelas 2 e 3, respectivamente. A tabela 2 avalia a associação do sexo em relação ao AVEH/Aneurisma. Foi observado que no grupo AVEH/Aneurisma 59,3% dos participantes eram do sexo feminino contra 53,1% do grupo controle. Não houve diferença estatística, entre os grupos de estudo, na proporção do sexo ($P=0,429$)

Tabela 2. Associação entre sexo e grupos caso e controle.

	Grupos				P	OR	IC
	AVEH/Aneurisma		Controle				
	N	%	N	%			
feminino	48	59,3%	43	53,1%	0,429	1,29	(0,69 - 2,39)
Sexo masculino	33	40,7%	38	46,9%			
Total	81	100,0%	81	100,0%			

A tabela 3 descreve a diferença de médias de idade entre os grupos caso e controle. A média de idade dos participantes do grupo AVEH/Aneurisma foi de 53,49, e 52,6 do para controle. Apesar dos valores diferentes, não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 3. Associação entre idade e grupos caso e controle.

	Grupos				P
	AVEH/Aneurisma		Controle		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Idade	53,49	5,94	52,27	5,75	0,185

A tabela 4 avalia a associação entre as características clínicas e a ocorrência de AVE. Nota-se que 74,1% dos participantes do grupo caso apresentaram HAS contra apenas 9,9% no grupo controle, tal evidência apresentou diferença estatística ($P < 0,001$) sendo considerada a presença da HAS um fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma, este fator de risco aumenta a chance para a ocorrência do desfecho em até 26 vezes ($OR = 26$). As demais características não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Em relação a Diabetes, no grupo caso 3,7% dos participantes eram portadores de Diabetes contra nenhum do grupo controle. Avaliando-se a característica tabagismo, 39,5% do grupo caso era tabagista, contra 29,6% do grupo controle. Com relação ao etilismo, 27,2% dos participantes do grupo caso apresentavam etilismo, contra 24,7% do grupo controle.

Tabela 4. Características clínicas associadas aos grupos caso e controle.

		Grupos				P	OR	IC
		AVEH/Aneurisma		Controle				
		N	%	N	%			
HAS	sim	60	74,1%	8	9,9%	<0,001*	26,0	(10,78 - 63,05)
	não	21	25,9%	73	90,1%			
	Total	81	100,0%	81	100,0%			
Diabetes	sim	3	3,7%	0	0,0%	0,245	NA	NA
	não	78	96,3%	81	100,0%			
	Total	81	100,0%	81	100,0%			
Tabagismo	sim	32	39,5%	24	29,6%	0,186	1,55	(0,81 - 2,98)
	não	49	60,5%	57	70,4%			
	Total	81	100,0%	81	100,0%			
Etilismo	sim	22	27,2%	20	24,7%	0,720	1,14	(0,56 - 2,30)
	não	59	72,8%	61	75,3%			
	Total	81	100,0%	81	100,0%			

* diferença estatística

NA = não se aplica

Exames como creatinina e a contagem de plaquetas, foram anotados dos pacientes do grupo caso (Tabela 5). Sendo a média de creatinina nos pacientes diagnosticados com AVE/Aneurisma 1,1 mg/dL e a média de plaquetas 316.000/mm³.

Tabela 5. Exames bioquímicos e hematológicos associados ao grupo caso.

	AVEH/Aneurisma					
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Creatinina (mg/dL)	1,1	1,3	81,0	0,8	0,7	1,1
Plaquetas/mm ³	315,7	76,0	81,0	313,0	255,0	373,0

A média de glicose foi avaliada tanto no grupo caso quanto no grupo controle, sendo que, a média de glicose no grupo AVEH foi 107 mg/dL contra 96 mg/dL do grupo controle. Tal diferença foi estatisticamente significativa ($P=0,001$), demonstrando um aumento de glicemia relacionado aos pacientes diagnosticados com AVEH/Aneurisma (Tabela 6).

Tabela 6. Média de glicose associada aos grupos caso e controle.

	Grupos						P
	AVEH/Aneurisma						
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	106,7	22,5	81,0	101,0	95,0	118,0	
	Controle						0,001*
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	96,2	7,0	81,0	96,0	89,0	100,0	

* diferença estatística

Todos os pacientes diagnosticados com AVEH/Aneurisma tiveram registros anotados quanto ao seu nível de consciência. A tabela 7 demonstra em número absolutos e relativos quais eram os estados de consciência dos pacientes segundo a Escala de Coma de Glasgow, Escala de Rankin, Escala de Rankin Modificada (ERM) e Índice de Barthel. Analisando Escala de coma de Glasgow, 9,9% dos pacientes apresentaram coma intermediário. Na Escala de Rankin, 4,9% sofriam de incapacidade grave, contudo, em relação à ERM 87,7% possuíam prognóstico bom. Quanto ao Índice de Barthel, 12,3% dos pacientes tinham incapacidade severa.

Tabela 7. Escalas de Consciência.

Escalas de Consciência			
		N	%
Glasgow	coma intermediário	8	9,9%
	coma superficial	2	2,5%
	normalidade	71	87,7%
Rankin	assintomático	20	24,7%
	sintoma sem incapacidade	46	56,8%
	incapacidade leve	2	2,5%
	incapacidade moderada	3	3,7%
	incapacidade moderada a grave	6	7,4%
ERM	incapacidade grave	4	4,9%
	prognóstico ruim	10	12,3%
	prognóstico bom	71	87,7%
Índice de Barthel	incapacidade severa	10	12,3%
	incapacidade moderada	6	7,4%
	incapacidade leve	39	48,1%
	independência funcional	26	32,1%

ERM = Escala de Rankin Modificada

6.2 Resultados da avaliação do polimorfismo genético *CTLA4* -318 C/T

Na tabela 8 estão descritas as distribuições genóticas do gene *CTLA4* associadas aos grupos caso e controle, no qual se verifica uma diferença estatística na proporção dos genótipos CT e CC ($P=0,018$). O genótipo homozigoto (CC) foi mais prevalente do que os demais genótipos, tanto no grupo caso (72,8%, $n=59$), quanto no grupo controle (87,7%, $n = 71$), e nenhum participante da pesquisa era portador do genótipo homozigoto (TT). Foi possível identificar que o genótipo CT pode ser considerado como fator de risco para a ocorrência de AVE e/ aneurisma, aumentando em 3 vezes o risco para a ocorrência do desfecho em participantes com genótipo CT ($OR = 3$). 13,6% dos participantes do grupo caso possuíam o alelo T, contra 6,2% do grupo controle, essa diferença foi estatisticamente significativa, aumentando em 2 vezes a chance do portador do alelo T ter AVEH/Aneurisma.

Tabela 8. Distribuição genotípica do polimorfismo *CTLA4* -318 C/T nos grupos caso e controle.

	Grupos				P	OR	IC
	AVEH/Aneurisma		Controle				
	N	%	N	%			
<i>CTLA4</i> -318 C/T	TT	0	0	0	0		
	CT	22	27,2	10	12,3	0,018*	2,67 (1,162 - 6,031)
	CC	59	72,8	71	87,7		
	Total	81	100	81	100		
	T	22	13,6	10	6,2		
	C	140	86,4	152	93,8	0,025*	2,38 (1,09 - 5,22)
	Total	162	100	162	100		

* diferença estatística

A tabela 9 descreve o estudo de associação entre polimorfismo *CTLA4* -318 C/T e as características clínicas (HAS, Diabetes, tabagismo ou etilismo) em todos os participantes da pesquisa. 33,8% dos participantes com genótipo CC possuíam HAS, contra 75% com genótipo CT. Essa diferença foi estatisticamente significativa, e a presença do genótipo CC foi considerada um fator de proteção para a ocorrência de HAS. O fato do indivíduo ser portador do genótipo CC, o protege 6 vezes contra a ocorrência de HAS. Avaliando Diabetes, nenhum participante com genótipo CC tinha Diabetes, contra 9,4% com genótipo CT. Essa diferença foi significativa, contudo, não foi possível calcular OR. Quanto ao tabagismo, 23,1% dos participantes com genótipo CC eram tabagistas, contra 81,3% do genótipo CT, tais dados tiveram diferença estatística.

Tabela 9. Distribuição das características clínicas: HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo conforme o polimorfismo ***CTLA4* -318 C/T** nos participantes do estudo.

		<i>CTLA4</i> -318 C/T				P	OR	IC
		CC		CT				
		N	%	N	%			
HAS	sim	44	33,8%	24	75,0%	<0,001*	0,17	(0,071 - 0,411)
	não	86	66,2%	8	25,0%			
Diabetes	sim	0	0,0%	3	9,4%	0,007*	NA	NA
	não	130	100,0%	29	90,6%			
Tabagismo	sim	30	23,1%	26	81,3%	<0,001*	0,07	(0,026 - 0,184)
	não	100	76,9%	6	18,8%			
Etilismo	sim	35	26,9%	7	21,9%	0,559	1,31	(0,523 - 3,313)
	não	95	73,1%	25	78,1%			

* diferença estatística

NA = não se aplica

As características clínicas também foram associadas em cada variante do polimorfismo, por grupo de estudo separado (Tabela 10), sendo possível afirmar que 71,2% dos participantes do grupo caso portadores do genótipo CC eram hipertensos, contra apenas 2,8% do grupo controle, e assim, entre os participantes CC, o risco para AVE aumentava 85 vezes em hipertensos comparado ao grupo controle ($P < 0,001$; $OR = 85$; 18,74–387,60). Para as demais características clínicas, não houve associação entre a presença da patologia e a presença das características, independente do genótipo.

Tabela 10. Características clínicas associadas a ocorrência de AVEH/aneurisma por genótipo CC e CT do polimorfismo **CTLA4 -318 C/T**.

		CTLA4 -318 C/T											
		CC				CT							
		Grupos				Grupos							
		AVEH/Aneurisma		Controle				AVEH/Aneurisma		Controle			
		N	%	N	%	P	OR (IC)	N	%	N	%	P	OR (IC)
HAS	sim	42	71,2%	2	2,8%	<0,001*	85,24 (18,74-387,60)	18	81,8%	6	60,0%	0,218	3,00 (0,57-15,87)
	não	17	28,8%	69	97,2%			4	18,2%	4	40,0%		
	Total	59	100,0%	71	100,0%			22	100,0%	10	100,0%		
Diabetes	sim	0	0,0%	0	0,0%	NA	NA	3	13,6%	0	0,0%	0,543	NA
	não	59	100,0%	71	100,0%			19	86,4%	10	100,0%		
	Total	59	100,0%	71	100,0%			22	100,0%	10	100,0%		
Tabagismo	sim	12	20,3%	18	25,4%	0,499	0,75 (0,33-1,72)	20	90,9%	6	60,0%	0,06	6,66 (0,97-45,79)
	não	47	79,7%	53	74,6%			2	9,1%	4	40,0%		
	Total	59	100,0%	71	100,0%			22	100,0%	10	100,0%		
Etilismo	sim	16	27,1%	19	26,8%	0,963	1,01 (0,468-2,22)	6	27,3%	1	10,0%	0,387	3,38 (0,35-32,64)
	não	43	72,9%	52	73,2%			16	72,7%	9	90,0%		
	Total	59	100,0%	71	100,0%			22	100,0%	10	100,0%		

* diferença estatística

NA = não se aplica

Em seguida, efetuou-se o estudo de associação entre o perfil da escala de consciência e o polimorfismo *CTLA4* -318 C/T, no grupo caso (Tabela 11). Com relação a Escala de Glasgow, 13,6% dos portadores do genótipo CC estavam em coma intermediário, contra 0% do genótipo CT, essa associação teve diferença estatística ($P=0,015$). Avaliando a Escala de Rankin, 5,1% dos participantes com genótipo CC possuíam incapacidade grave contra 4,5% do genótipo CT, apresentando diferença estatisticamente significativa ($P=0,007$). Quanto ao Índice de Barthel, 13,6% dos portadores do genótipo CC tinham incapacidade severa, contra 9,1 com genótipo CT.

Tabela 11. Escalas de consciência associadas ao polimorfismo **CTLA4 -318 C/T**.

		CTLA4 -318 C/T				P	OR	IC
		CC		CT				
		N	%	N	%			
Glasgow	coma intermediário	8	13,6%	0	0,0%	0,015*	NA	NA
	coma superficial	0	0,0%	2	9,1%			
	normalidade	51	86,4%	20	90,9%			
	Total	59	100,0%	22	100,0%			
Rankin	assintomático	20	33,9%	0	0,0%	0,007*	NA	NA
	sintoma sem incapacidade	26	44,1%	20	90,9%			
	incapacidade leve	2	3,4%	0	0,0%			
	incapacidade moderada	3	5,1%	0	0,0%			
	incapacidade moderada a grave	5	8,5%	1	4,5%			
	incapacidade grave	3	5,1%	1	4,5%			
	Total	59	100,0%	22	100,0%			
Índice de Barthel	incapacidade severa	8	13,6%	2	9,1%	0,239	NA	NA
	incapacidade moderada	6	10,2%	0	0,0%			
	incapacidade leve	29	49,2%	10	45,5%			
	independência funcional	16	27,1%	10	45,5%			
	Total	59	100,0%	22	100,0%			

* diferença estatística

NA = não se aplica

Os participantes da pesquisa do grupo caso foram dicotomizados entre bom e mau prognóstico neurológico, de acordo com a definição prognóstica adotada em estudos sobre tratamento de AVE, sendo considerado como bom prognóstico a pontuação de 0 a 2 e mau prognóstico a pontuação na Escala de Rankin Modificada (ERM) entre 3 e 6; sendo 3, deficiência moderada; 6, morte; 0, assintomático e 2 ligeira deficiência (Braga 2016).

A tabela 12 associa bom e mau prognóstico segundo a ERM e o polimorfismo *CTLA4* -318 C/T. 13,6% dos participantes com genótipo CC apresentavam prognóstico ruim, contra 9,1% do genótipo CT, não foi encontrada diferença estatística entre os prognósticos e diferentes tipos de genótipos (P=0,720).

Tabela 12. Estudo de associação entre prognóstico (escala de Rankin) e o polimorfismo ***CTLA4* -318 C/T**.

		<i>CTLA4</i> -318 C/T				P	OR	IC
		CC		CT				
		N	%	N	%			
ERM	prognóstico ruim	8	13,6%	2	9,1%	0,720	1,56	(0,306 - 8,034)
	prognóstico bom	51	86,4%	20	90,9%			
	Total	59	100,0%	22	100,0%			

ERM = Escala de Rankin Modificada

Análises bioquímicas e hematológicas como dosagem de glicose, creatinina e contagem de plaquetas foram obtidas dos participantes da pesquisa. A tabela 13 avalia a diferença de médias de glicemia entre os grupos de estudo nos diferentes genótipos. Avaliando o genótipo CC, a média de glicose no grupo caso foi 105 mg/dL, contra 96 mg/dL do grupo controle. Essa diferença foi estatisticamente significativa e a glicemia no grupo caso era superior à do grupo controle.

Quanto ao genótipo CT, a média de glicose no grupo caso foi 111 mg/dL, contra 98 mg/dL do grupo controle. O que também teve diferença estatisticamente significativa, sendo a glicemia média do grupo caso maior que a do grupo controle.

Tabela 13. Análise da glicemia nos grupos de estudo conforme o perfil genético no polimorfismo **CTLA4 -318 C/T**.

	CTLA4 -318 C/T									
	CC					CT				
	Grupos					Grupos				
	AVEH/Aneurisma		Controle		P	AVEH/Aneurisma		Controle		P
Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média		Desvio padrão	Média	Desvio padrão		
Glicose (mg/dL)	105	25	96	7	0,023*	111	16	98	6	0,015*

* diferença estatística

A dosagem de creatinina e contagem de plaquetas foi obtida apenas do grupo caso. A média de creatinina em participantes com genótipo CC foi de 1,2 mg/dL, contra 0,9 mg/dL do genótipo CT. A média da contagem de plaquetas no genótipo CC foi 311.000/mm³, contra 326.000/mm³ do genótipo CT. Não houve diferença entre as médias da quantidade estimada de creatinina e do número de plaquetas quando associadas aos diferentes genótipos nos grupos caso e controle (tabela 14).

Tabela 14. Análises bioquímicas e hematológicas no grupo caso conforme o perfil genético no polimorfismo **CTLA4 -318 C/T**.

	CTLA4 -318 C/T						P
	CC						
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Creatinina (mg/dL) #	1,2	1,5	130,0	0,8	0,7	1,0	
Plaquetas/mm ³ #	311,4	73,3	130,0	292,0	252,0	373,0	
	CT						P
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
	Creatinina (mg/dL) #	0,9	0,2	32,0	0,9	0,7	
Plaquetas/mm ³ #	326,7	83,3	32,0	327,0	268,0	398,0	0,429

grupo caso

A tabela 15 avalia a média da glicemia sem considerar a separação por grupos de estudo. Avaliando o genótipo CC, a média de glicose foi 101 mg/dL, contra 107 mg/dL do genótipo CT. Não houve diferença estatística entre as médias.

Tabela 15. Análise glicêmica no grupo caso conforme o perfil genético no polimorfismo **CTLA4 -318 C/T**.

	CTLA4 -318 C/T						P
	CC						
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	100,6	19,0	130,0	96,0	91,0	104,0	0,097
CT							
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	106,9	15,0	32,0	104,0	96,0	116,0	

6.3 Resultados da avaliação do polimorfismo genético *NOS3* íntron 4

A tabela 16 avalia a associação entre o polimorfismo *NOS3* íntron 4 e a ocorrência de AVEH/Aneurisma. 7,4% dos participantes do grupo caso apresentaram genótipo aa, contra 3,7% do grupo controle. Não se obteve diferença estatística quanto à associação do polimorfismo e os diferentes genótipos. 23,5% dos pacientes com AVEH/Aneurisma possuíam o alelo b, contra 17,9% do grupo controle, também não houve diferença estatística quando aos diferentes alelos e a ocorrência de AVEH/Aneurisma.

Tabela 16. Distribuição genotípica do polimorfismo *NOS3* íntron 4 nos grupos caso e controle.

		Grupos				P	OR	IC
		AVEH/Aneurisma		Controle				
		N	%	N	%			
<i>NOS3</i> íntron 4	aa	6	7,4	3	3,7	0,465	NA	NA
	ab	26	32,1	23	28,4			
	bb	49	60,5	55	67,9			
	Total	81	100,0	81	100,0			
	aa	49	60,5	55	67,9	0,325	0,724	(0,380 - 1,380)
	ab+aa	32	39,5	26	32,1			
	Total	81	100,0	81	100,0			
	b	38	23,5	29	17,9	0,217	1,405	(0,817 - 2,415)
	a	124	76,5	133	82,1			
	Total	162	100,0	162	100,0			

NA = não se aplica

A tabela 17 demonstra o estudo de associação entre o polimorfismo *NOS3* íntron 4 e as características clínicas (HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo). Quanto às características clínicas do grupo caso, a presença do genótipo b/b não foi associada estatisticamente com a HAS (P=0,828) nem com a diabetes (P=0,292), tabagismo (P=0,718) ou etilismo (P=0,268).

Tabela 17. Distribuição das características clínicas: HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo conforme o polimorfismo **NOS3 íntron 4** nos participantes do estudo.

		NOS3 íntron 4				P	OR	IC
		b/b		a/b + a/a				
		N	%	N	%			
HAS	sim	43	41,3%	25	43,1%	0,828	0,930	(0,486 - 1,782)
	não	61	58,7%	33	56,9%			
Diabetes	sim	1	1,0%	2	3,4%	0,292	0,272	(0,024 - 3,065)
	não	103	99,0%	56	96,6%			
Tabagismo	sim	37	35,6%	19	32,8%	0,718	1,134	(0,575 - 2,237)
	não	67	64,4%	39	67,2%			
Etilismo	sim	24	23,1%	18	31,0%	0,268	0,667	(0,325 - 1,369)
	não	80	76,9%	40	69,0%			

As características clínicas também foram analisadas separadamente quanto aos genótipos do polimorfismo *NOS3* íntron 4 por grupo de estudo separado, como descrito na tabela 18. 73,5% dos participantes do grupo caso portadores do genótipo b/b apresentaram HAS contra 12,7% do grupo controle, tendo uma associação estatística significativa e o portador do genótipo a/a possui um risco aumentado em 19 vezes de se ter AVEH quando se é hipertenso ($P < 0,001$; OR=18,99; IC (6,88-52,42). 75% do grupo caso portadores do genótipo a/b + a/a eram hipertensos contra 3,8% do grupo controle, aumentando em 75 vezes o risco de se ter AVEH, quando é hipertenso, sob a presença do alelo a.

Tabela 18. Características clínicas associadas a ocorrência de AVEH/aneurisma por genótipo a/a e a/b + b/b do polimorfismo **NOS3 íntron 4**.

		NOS3 íntron 4													
		b/b						a/b + a/a							
		Grupos				Grupos									
		AVEH/Aneurisma		Controle		AVEH/Aneurisma		Controle		P	OR (IC)	AVEH/Aneurisma		Controle	
N	%	N	%	N	%	N	%	N	%						
HAS	sim	36	73,5%	7	12,7%	<0,001*	18,99 (6,88 - 52,42)	24	75,0%	1	3,8%	<0,001*	75 (8,71 - 645,79)		
	não	13	26,5%	48	87,3%			8	25,0%	25	96,2%				
	Total	49	100,0%	55	100,0%			32	100,0%	26	100,0%				
Diabetes	sim	1	2,0%	0	0,0%	0,471	NA	2	6,3%	0	0,0%	0,497	NA		
	não	48	98,0%	55	100,0%			30	93,8%	26	100,0%				
	Total	49	100,0%	55	100,0%			32	100,0%	26	100,0%				
Tabagismo	sim	19	38,8%	18	32,7%	0,52	1,31 (0,58 - 2,91)	13	40,6%	6	23,1%	0,157	2,28 (0,72 - 7,23)		
	não	30	61,2%	37	67,3%			19	59,4%	20	76,9%				
	Total	49	100,0%	55	100,0%			32	100,0%	26	100,0%				
Etilismo	sim	9	18,4%	15	27,3%	0,282	0,60 (0,24 - 1,53)	13	40,6%	5	19,2%	0,08	2,87 (0,86 - 9,58)		
	não	40	81,6%	40	72,7%			19	59,4%	21	80,8%				
	Total	49	100,0%	55	100,0%			32	100,0%	26	100,0%				

* diferença estatística

Efetou-se o estudo de associação entre os perfis de escalas de consciência e o polimorfismo *NOS3* íntron 4 (Tabela 19). Foram avaliadas as proporções de indivíduos segundo as escalas de consciência: Glasgow, Rankin e Barthel. Na Escala de Glasgow, 10,2% dos indivíduos com genótipo b/b apresentaram coma intermediário, contra 9,4% dos indivíduos com genótipo a/b+a/a. Avaliando a Escala de Rankin, 8,2% dos pacientes com genótipo b/b apresentaram incapacidade grave, contra nenhum com genótipo a/b+a/a. Quanto ao Índice de Barthel, 14,3% dos indivíduos com genótipo b/b apresentaram incapacidade severa, contra 9,4% do genótipo a/b+a/a. Não houve associação em relação as escalas de consciência que estão relacionadas aos genótipos do grupo caso do polimorfismo *NOS3* íntron 4.

Tabela 19. Escalas de consciência associadas ao polimorfismo **NOS3 íntron 4**.

		NOS3 íntron 4				P	OR	IC
		b/b		a/b + a/a				
		N	%	N	%			
Glasgow	coma intermediário	5	10,2%	3	9,4%	0,503	NA	NA
	coma superficial	2	4,1%	0	0,0%			
	normalidade	42	85,7%	29	90,6%			
Rankin	assintomático	16	32,7%	4	12,5%	0,139	NA	NA
	sintoma sem incapacidade	23	46,9%	23	71,9%			
	incapacidade leve	1	2,0%	1	3,1%			
	incapacidade moderada	2	4,1%	1	3,1%			
	incapacidade moderada a grave	3	6,1%	3	9,4%			
	incapacidade grave	4	8,2%	0	0,0%			
	incapacidade severa	7	14,3%	3	9,4%			
Índice de Barthel	incapacidade moderada	4	8,2%	2	6,3%	0,860	NA	NA
	incapacidade leve	22	44,9%	17	53,1%			
	independência funcional	16	32,7%	10	31,3%			

NA = não se aplica

Na tabela 20 avalia-se a proporção de indivíduos com prognóstico bom ou ruim segundo a ERM, de acordo com a definição prognóstica adotada em estudos sobre o tratamento de AVE. 14,3% dos indivíduos com genótipo homocigoto b/b apresentaram prognóstico ruim, contra 9,4% do genótipo a/b+a/a, não havendo diferença estatística entre os grupos (P=0,732).

Tabela 20. Estudo de associação entre prognóstico (escala de Rankin Modificada) e o polimorfismo **NOS3 íntron 4**.

		NOS3 íntron 4				P	OR	IC
		b/b		a/b + a/a				
		N	%	N	%			
ERM	prognóstico ruim	7	14,3%	3	9,4%	0,732	1,61	(3,84 - 6,752)
	bom prognóstico	42	85,7%	29	90,6%			
	Total	49	100,0%	32	100,0%			

ERM = Escala de Rankin Modificada

A tabela 21 avalia a diferença de médias de glicemia entre os grupos de estudo nos diferentes genótipos. Avaliando o genótipo b/b, a média de glicose no grupo caso foi 107 mg/dL, contra 96 mg/dL do grupo controle, quanto a essas diferenças de médias foi obtida diferença estatística (P=0,003).

Tabela 21. Análise da glicemia (mg/dL) nos grupos de estudo conforme o perfil genético no polimorfismo **NOS3 íntron 4**.

		NOS3 íntron 4								P
		b/b				a/b + a/a				
		Grupos				Grupos				
		AVEH/Aneurisma		Controle		AVEH/Aneurisma		Controle		
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Glicose (mg/dL)	107	22	96	7	0,003*	106	24	96	7	0,147

* diferença estatística

Análises bioquímicas e hematológicas como as dosagens de glicose, creatinina e contagem de plaquetas foram associadas aos genótipos do polimorfismo *NOS3* íntron 4 no grupo caso. A média de creatinina foi 1,1 mg/dL para o genótipo b/b contra 1,1 mg/dL para o genótipo a/b+a/a. A média de plaquetas dos pacientes com genótipo b/b foi 320.000/mm³, contra 310.000/mm³ no genótipo a/b+a/a. Contudo, não houve diferença estatística entre as análises e os genótipos (tabela 22).

Tabela 22. Análises bioquímicas e hematológicas no grupo caso conforme o perfil genético no polimorfismo ***NOS3* íntron 4**.

	<i>NOS3</i> íntron 4						P
	b/b						
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Creatinina (mg/dL) #	1,1	1,2	104,0	0,8	0,8	1,1	
Plaquetas/mm ³ #	319,7	70,5	104,0	292,0	267,0	373,0	
	a/b+a/a						P
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
	Creatinina (mg/dL) #	1,1	1,5	58,0	0,9	0,7	
Plaquetas/mm ³ #	309,8	84,6	58,0	327,0	242,0	395,0	0,579

grupo caso

A glicemia média associada aos genótipos b/b e a/b+a/a do polimorfismo NOS3 íntron 4 sem considerar a separação por grupos está evidenciada na tabela 23. Avaliando o genótipo b/b a média de glicose foi 102 mg/dL, contra 102 mg/dL no genótipo a/b+a/a. Não houve diferença estatística significativa quando comparadas as médias dos participantes com genótipo b/b e a/b+a/a ($P=0,903$).

Tabela 23. Análise glicêmica no grupo caso conforme o perfil genético no polimorfismo **NOS3 íntron 4**.

NOS3 íntron 4							P
b/b							
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	0,903
Glicose (mg/dL)	102,0	17,4	104,0	96,5	94,5	104,0	
a/b+a/a							
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	102,4	20,1	58,0	100,0	95,0	116,0	

6.4 Resultados da avaliação do polimorfismo genético *NOS3* -786 T/C

Na tabela 24 estão descritas as distribuições genóticas e alélicas do polimorfismo *NOS3* -786 T/C associadas aos grupos caso e controle. Foi observado que 19,8% dos participantes com AVEH/Aneurisma possuíam genótipo TT, contra 28,4% do grupo controle com mesmo genótipo. Não houve diferença estatística com relação as demais frequências genóticas ($P=0,209$). 58% dos pacientes com AVEH/Aneurisma possuíam o alelo T, contra 60,5% dos participantes do grupo controle com o mesmo alelo. Tal diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,654$).

Tabela 24. Distribuição genotípica do polimorfismo *NOS3* -786 T/C nos grupos caso e controle.

		Grupos				P	OR	IC
		AVEH/Aneurisma		Controle				
		N	%	N	%			
	TT	16	19,8	23	28,4	0,209	NA	NA
	TC	62	76,5	52	64,2			
	CC	3	3,7	6	7,4			
	Total	81	100,0	81	100,0			
<i>NOS3</i> -786 T/C	TT	16	19,8	23	28,4	0,198	0,621	(0,299 - 1,288)
	TC+CC	65	80,2	58	71,6			
	Total	81	100,0	81	100,0			
	T	94	58,0	98	60,5	0,654	0,902	(0,579 - 1,406)
	C	68	42,0	64	39,5			
	Total	162	100,0	162	100,0			

Na tabela 25 avalia-se a diferença na proporção de indivíduos segundo características clínicas (HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo) associadas ao polimorfismo NOS3 -786 T/C. Em relação às características clínicas, não houve diferença estatística quando associadas aos genótipos, dado que para HAS (P=0,890), para Diabetes (P=0,565), tabagismo (P=0,083) e etilismo (P=0,376).

Tabela 25. Distribuição das características clínicas: HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo conforme o polimorfismo **NOS3 -786 T/C** nos participantes do estudo.

		NOS3 -786 T/C				P	OR	IC
		TT		TC+CC				
		N	%	N	%			
HAS	sim	16	41,0%	52	42,3%	0,890	0,950	(0,457 - 1,974)
	não	23	59,0%	71	57,7%			
Diabetes	sim	1	2,6%	2	1,6%	0,565	1,592	(0,140 - 18,048)
	não	38	97,4%	121	98,4%			
Tabagismo	sim	9	23,1%	47	38,2%	0,083	0,485	(0,212 - 1,111)
	não	30	76,9%	76	61,8%			
Etilismo	sim	8	20,5%	34	27,6%	0,376	0,676	(0,282 - 1,616)
	não	31	79,5%	89	72,4%			

A tabela 26 mede a associação entre as características clínicas e a ocorrência de AVE, nos diferentes genótipos. Sendo que, 87,5% dos participantes do grupo caso portadores do genótipo TT apresentavam HAS, contra 8,7% do grupo controle com o mesmo genótipo. Entre os participantes com genótipo TT, o risco para AVE aumentava 73 vezes no grupo caso com HAS (P<0,001; OR=73; 9,24 – 584,43). 70,8% dos participantes do grupo caso com genótipo TC+CC eram hipertensos, contra 10,3% do grupo controle com o mesmo genótipo. O risco para AVEH/Aneurisma em pacientes com HAS e com genótipo TC+CC aumentou em 21 vezes, quando comparado ao grupo controle (P<0,001; OR=21; 7,72 - 57,03).

Tabela 26. Características clínicas associadas a ocorrência de AVEH/aneurisma por genótipo TT e TC + CC do polimorfismo **NOS3 -786 T/C**

NOS3 -786 T/C													
	TT						TC+CC						
	Grupos						Grupos						
	AVEH/Aneurisma		Controle		P	OR (IC)	AVEH/Aneurisma		Controle		P	OR (IC)	
	N	%	N	%			N	%	N	%			
HAS	sim	14	87,5%	2	8,7%	<0,001*	73,50 (9,24 - 584,43)	46	70,8%	6	10,3%	<0,001*	20,98 (7,72 - 57,03)
	não	2	12,5%	21	91,3%			19	29,2%	52	89,7%		
	Total	16	100,0%	23	100,0%			65	100,0%	58	100,0%		
Diabetes	sim	1	6,3%	0	0,0%	0,41	NA	2	3,1%	0	0,0%	0,498	NA
	não	15	93,8%	23	100,0%			63	96,9%	58	100,0%		
	Total	16	100,0%	23	100,0%			65	100,0%	58	100,0%		
Tabagismo	sim	4	25,0%	5	21,7%	1	1,20 (0,27 - 5,40)	28	43,1%	19	32,8%	0,24	1,55 (0,74 - 3,24)
	não	12	75,0%	18	78,3%			37	56,9%	39	67,2%		
	Total	16	100,0%	23	100,0%			65	100,0%	58	100,0%		
Etilismo	sim	4	25,0%	4	17,4%	0,694	1,58 (0,33 - 7,56)	18	27,7%	16	27,6%	0,99	1,00 (0,46 - 2,22)
	não	12	75,0%	19	82,6%			47	72,3%	42	72,4%		
	Total	16	100,0%	23	100,0%			65	100,0%	58	100,0%		

Na tabela 27 são associados diferentes prognósticos dos pacientes medidos pelas escalas de consciência com o polimorfismo. Em relação a Escala de Glasgow, 31,3% dos participantes com genótipo TT apresentavam coma intermediário, contra 4,6% com genótipo TC+CC, demonstrando uma diferença estatística ($P=0,003$). Avaliando a Escala de Rankin, 18,8% dos participantes com genótipo TT apresentavam incapacidade grave, contra 1,5% com genótipo TC+CC ($P=0,021$) e quanto ao Índice de Barthel, 37,5% dos participantes apresentaram incapacidade severa e eram do genótipo TT, contra 6,2% com genótipo TC+CC, apresentando diferença estatística ($P=0,003$).

Tabela 27. Escalas de consciência associadas ao polimorfismo **NOS3 -786 T/C**.

		NOS3 -786 T/C				P	OR	IC
		TT		TC+CC				
		N	%	N	%			
Glasgow	coma intermediário	5	31,3%	3	4,6%	0,003*	NA	NA
	coma superficial	1	6,3%	1	1,5%			
	normalidade	10	62,5%	61	93,8%			
Rankin	assintomático	3	18,8%	17	26,2%	0,021*	NA	NA
	sintoma sem incapacidade	7	43,8%	39	60,0%			
	incapacidade leve	0	0,0%	2	3,1%			
	incapacidade moderada	0	0,0%	3	4,6%			
	incapacidade moderada a grave	3	18,8%	3	4,6%			
	incapacidade grave	3	18,8%	1	1,5%			
Índice de Barthel	incapacidade severa	6	37,5%	4	6,2%	0,003*	NA	NA
	incapacidade moderada	0	0,0%	6	9,2%			
	incapacidade leve	8	50,0%	31	47,7%			
	independência funcional	2	12,5%	24	36,9%			

* diferença estatística

NA = não se aplica

A tabela 28 avalia o prognóstico medido pela ERM associada ao polimorfismo NOS3 -786 T/C. 37,5% dos portadores do genótipo TT apresentaram prognóstico ruim, contra 6,2% com genótipo TC+CC, tal diferença foi estatisticamente significativa, sendo que a presença do genótipo TT aumenta em 9 vezes o risco de um prognóstico ruim (P=0,003; OR=9; 2,19 – 38,27)

Tabela 28. Estudo de associação entre prognóstico (escala de Rankin) e o polimorfismo **NOS3 -786 T/C**.

		NOS3 -786 T/C				P	OR	IC
		TT		TC+CC				
		N	%	N	%			
ERM	prognóstico o ruim	6	37,5%	4	6,2%	0,003*	9,00	(2,19 - 38,27)
	bom prognóstico o	10	62,5%	61	93,8%			
	Total	16	100,0%	65	100,0%			

* diferença estatística

ERM = Escala de Rankin Modificada

A tabela 29 avalia a diferença de médias de glicemia entre os grupos de estudo nos diferentes genótipos, não havendo diferença estatística entre a glicemia média dos grupos em ambos genótipos.

Tabela 29. Análise da glicemia nos grupos de estudo conforme o perfil genético no polimorfismo **NOS3 -786 T/C**.

		NOS3 -786 T/C								P
		TT				TC+CC				
		Grupos				Grupos				
		AVEH/Aneurisma		Controle		AVEH/Aneurisma		Controle		
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão		Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Glicose (mg/dL)	100	14	96	7	0,707	108	24	96	7	0,970

A dosagem de creatinina e contagem de plaquetas foram associadas aos genótipos do polimorfismo *NOS3* -786 T/C no grupo caso (tabela 30). A média de creatinina foi 1,9 mg/dL para o genótipo TT contra 0,8 mg/dL para o genótipo TC+CC. A média de plaquetas dos pacientes com genótipo TT foi 348.000/mm³, contra 307.000/mm³ no genótipo TC+CC. Contudo, não houve diferença estatística entre as análises e os genótipos.

Tabela 30. Análises bioquímicas e hematológicas no grupo caso conforme o perfil genético no polimorfismo ***NOS3* -786 T/C**.

	<i>NOS3</i> -786 T/C						P
	TT						
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Creatinina (mg/dL) #	1,9	2,9	39,0	0,8	0,7	1,2	
Plaquetas/mm ³ #	348,4	72,2	39,0	358,0	292,0	373,0	
	TC+CC						P
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Creatinina (mg/dL) #	0,9	0,2	123,0	0,8	0,7	1,0	0,830
Plaquetas/mm ³ #	308,0	75,4	123,0	292,0	252,0	373,0	0,580

grupo caso

A glicemia média associada aos genótipos TT e TC+CC do polimorfismo NOS3 -786 T/C sem considerar a separação por grupos está evidenciada na tabela 31. Avaliando o genótipo TT a média de glicose foi 97,7 mg/dL, contra 103,4 mg/dL no genótipo TC+CC. Não houve diferença estatística significativa quando comparadas as médias dos participantes com genótipo TT e TC+CC (P=0,903).

Tabela 31. Associação entre a glicemia dos participantes com genótipo TT contra os genótipos TC+CC.

NOS3 -786 T/C							P
TT							
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	98	11	39	96	95	104	0,903
TC+CC							
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	103	20	123	99	94	107	

6.5 Resultados da avaliação do polimorfismo genético **CYP2D6 1846 G/A**

Na tabela 32 estão descritas as distribuições genóticas e alélicas do polimorfismo *CYP2D6* 1846 G/A associadas aos grupos caso e controle. Foi observado que 74,1% dos pacientes do grupo caso possuíam genótipo GG, contra 71,6% do grupo controle com mesmo genótipo. Não houve diferença estatística com relação as demais frequências genóticas ($P=0,930$). 86,4% dos pacientes com AVEH/Aneurisma possuíam o alelo G, contra 83,3% dos participantes do grupo controle com o mesmo alelo. Tal diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,764$).

Tabela 32. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo **CYP2D6** nos grupos caso e controle.

		Grupos				P	OR	IC
		AVEH/Aneurisma		Controle				
		N	%	N	%			
	GG	60	74,1	58	71,6	0,930	NA	NA
	GA	17	21,0	19	23,5			
	AA	4	4,9	4	4,9			
	Total	81	100,0	81	100,0			
<i>CYP2D6</i> 1846 G/A	GG	60	74,1	58	71,6	0,729	1,13	0,56-2,27
	GA+AA	21	25,9	23	28,4			
	Total	81	100,0	81	100,0			
	G	137	86,4	135	83,3	0,764	1,09	0,60-1,98
	A	25	15,4	27	16,7			
	Total	162	100,0	162	100,0			

NA = não se aplica

Na tabela 33 avalia-se a diferença na proporção de indivíduos segundo características clínicas (HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo) associadas ao polimorfismo *CYP2D6* 1846 G/A. Contudo, não houve associação entre os genótipos e a presença de HAS (P= 0,867), diabetes (P= 1,00), tabagismo (P= 0,938) e etilismo (P= 0,332).

Tabela 33. Distribuição das características clínicas: HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo conforme o polimorfismo ***CYP2D6*** nos participantes do estudo.

		<i>CYP2D6</i> 1846 G/A				P	OR	IC
		GG		GA+AA				
		N	%	N	%			
HAS	sim	50	42,4%	18	40,9%	0,867	1,062	(0,526 - 2,146)
	não	68	57,6%	26	59,1%			
Diabetes	sim	2	1,7%	1	2,3%	1	0,741	(0,066 - 8,386)
	não	116	98,3%	43	97,7%			
Tabagismo	sim	41	34,7%	15	34,1%	0,938	1,029	(0,496 - 2,135)
	não	77	65,3%	29	65,9%			
Etilismo	sim	33	28,0%	9	20,5%	0,332	1,510	(0,655 - 3,482)
	não	85	72,0%	35	79,5%			

A tabela 34 mede a associação entre as características clínicas e a ocorrência de AVE, nos diferentes genótipos. Sendo que, 76,7% dos participantes do grupo caso portadores do genótipo GG apresentavam HAS, contra 6,9% do grupo controle com o mesmo genótipo. Entre os participantes com genótipo GG, o risco para AVE aumentava 44 vezes no grupo caso com HAS (P<0,001; OR=44; 13,65 – 144,17). 66,7% dos participantes do grupo caso com genótipo GA+AA eram hipertensos, contra 17,4% do grupo controle com o mesmo genótipo. O risco para AVEH/Aneurisma em pacientes com HAS e com genótipo GA+AA aumentou em 10 vezes, quando comparado ao grupo controle (P=0,002; OR=10; 2,32 – 38,87).

Tabela 34. Características clínicas associadas a ocorrência de AVEH/aneurisma por genótipo GG e GA + A do polimorfismo *CYP2D6*.

		<i>CYP2D6</i> 1846 G/A											
		GG						GA+AA					
		Grupos						Grupos					
		AVEH/Aneurisma		Controle				AVEH/Aneurisma		Controle			
		N	%	N	%	P	OR (IC)	N	%	N	%	P	OR (IC)
HAS	sim	46	76,7%	4	6,9%	<0,001*	44,36 (13,65 - 144,17)	14	66,7%	4	17,4%	0,002*	9,50 (2,32 - 38,87)
	não	14	23,3%	54	93,1%			7	33,3%	19	82,6%		
	Total	60	100,0%	58	100,0%			21	100,0%	23	100,0%		
Diabetes	sim	2	3,3%	0	0,0%	0,496	2,0 (1,67 - 2,40)	1	4,8%	0	0,0%	0,477	2,15 (1,56 - 2,96)
	não	58	96,7%	58	100,0%			20	95,2%	23	100,0%		
	Total	60	100,0%	58	100,0%			21	100,0%	23	100,0%		
Tabagismo	sim	24	40,0%	17	29,3%	0,223	1,61 (0,75 - 3,46)	8	38,1%	7	30,4%	0,592	1,41 (0,40 - 4,92)
	não	36	60,0%	41	70,7%			13	61,9%	16	69,6%		
	Total	60	100,0%	58	100,0%			21	100,0%	23	100,0%		
Etilismo	sim	17	28,3%	16	27,6%	0,928	1,04 (0,46 - 2,32)	5	23,8%	4	17,4%	0,716	0,71 (0,34 - 6,48)
	não	43	71,7%	42	72,4%			16	76,2%	19	82,6%		
	Total	60	100,0%	58	100,0%			21	100,0%	23	100,0%		

* diferença estatística

Na tabela 35 são associados diferentes prognósticos dos pacientes medidos pelas escalas de consciência com o polimorfismo *CYP2D6* 1846 G/A. Em relação a Escala de Glasgow, 10,0% dos participantes com genótipo GG apresentavam coma intermediário, contra 9,5% com genótipo GA+AA, não demonstrando diferença estatística ($P=0,734$). Avaliando a Escala de Rankin, 5,0% dos participantes com genótipo GG apresentavam incapacidade grave, contra 4,8% com genótipo GA+AA ($P=0,574$) e quanto ao Índice de Barthel, 11,7% dos participantes apresentaram incapacidade severa e eram do genótipo TT, contra 14,3% com genótipo GA+AA ($P=0,003$).

Tabela 35. Escalas de consciência associadas ao polimorfismo **CYP2D6**.

		CYP2D6 1846 G/A				P	OR	IC
		GG		GA+AA				
		N	%	N	%			
Glasgow	coma intermediário	6	10,0%	2	9,5%	0,734	NA	NA
	coma superficial	1	1,7%	1	4,8%			
	normalidade	53	88,3%	18	85,7%			
Rankin	assintomático	16	26,7%	4	19,0%	0,574	NA	NA
	sintoma sem incapacidade	34	56,7%	12	57,1%			
	incapacidade leve	2	3,3%	0	0,0%			
	incapacidade moderada	1	1,7%	2	9,5%			
	incapacidade moderada a grave	4	6,7%	2	9,5%			
	incapacidade grave	3	5,0%	1	4,8%			
	incapacidade severa	7	11,7%	3	14,3%			
Índice de Barthel	incapacidade moderada	6	10,0%	0	0,0%	0,338	NA	NA
	incapacidade leve	30	50,0%	9	42,9%			
	independência funcional	17	28,3%	9	42,9%			

NA = não se aplica

A tabela 36 avalia o prognóstico medido pela ERM associada ao polimorfismo *CYP2D6* 1846 G/A, na qual 11,7% dos indivíduos que apresentam um prognóstico ruim possuíam genótipo GG. No entanto, as diferenças nas proporções não foram relevantes estatisticamente. (P=0,714).

Tabela 36. Estudo de associação entre prognóstico (escala de Rankin) e o polimorfismo *CYP2D6*.

		<i>CYP2D6</i> 1846 G/A				P	OR	IC
		GG		GA+AA				
		N	%	N	%			
ERM	prognóstico ruim	7	11,7%	3	14,3%	0,714	0,792	(0,185 - 3,393)
	bom prognóstico	53	88,3%	18	85,7%			
	Total	60	100,0%	21	100,0%			

ERM = Escala de Rankin Modificada

A tabela 37 avalia a diferença de médias de glicemia entre os grupos de estudo nos diferentes genótipos. Avaliando o genótipo GG, a média de glicose no grupo caso foi 106 mg/dL, contra 96 mg/dL do grupo controle, quanto a essas diferenças de médias foi obtida diferença estatística (P=0,004) e a glicemia média foi maior no grupo caso do que no grupo controle.

Tabela 37. Análise da glicemia nos grupos de estudo conforme o perfil genético no polimorfismo *CYP2D6*.

	<i>CYP2D6</i> 1846 G/A									
	GG					GA+AA				
	Grupos					Grupos				
	AVEH/Aneurisma		Controle			AVEH/Aneurisma		Controle		
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	P	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	P
Glicose (mg/dL)	106	21	96	7	0,004*	107	27	96	7	0,126

A dosagem de creatinina e contagem de plaquetas foram associadas aos genótipos do polimorfismo *CYP2D6* 1846 G/A no grupo caso (tabela 38). A média de creatinina foi 1,2 mg/dL para o genótipo GG contra 0,9 mg/dL para o genótipo GA+AA. A média de plaquetas dos pacientes com genótipo GG foi 322.000/mm³, contra 296.000/mm³ no genótipo GA+AA. Contudo, não houve diferença estatística entre as análises e os genótipos.

Tabela 38. Análise bioquímica e hematológica no grupo caso conforme o perfil genético no polimorfismo ***CYP2D6***.

	<i>CYP2D6</i> 1846 G/A						P
	GG						
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Creatinina (mg/dL) #	1,2	1,5	118,0	0,8	0,8	1,0	
Plaquetas/mm ³ #	322,8	77,6	118,0	327,0	267,0	395,0	
	GA+AA						P
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
	Creatinina (mg/dL) #	0,9	0,2	44,0	0,8	0,7	
Plaquetas/mm ³ #	296,7	69,9	44,0	278,0	252,0	358,0	0,180

grupo caso

A glicemia média associada aos genótipos GG e GA+AA do polimorfismo *CYP2D6* 1846 G/A sem considerar a separação por grupos está evidenciada na tabela 39. Avaliando o genótipo GG a média de glicose foi 102,1 mg/dL, contra 102,4 mg/dL no genótipo GA+AA. Não houve diferença estatística significativa quando comparadas as médias dos participantes com genótipo GG e GA+AA ($P=0,921$).

Tabela 39. Associação entre a glicemia dos participantes com genótipo GG contra os genótipos GA+AA.

<i>CYP2D6</i> 1846 G/A							P
GG							
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	102,1	17,0	118,0	97,0	95,0	107,0	0,921
GA+AA							
	Média	Desvio padrão	N	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Glicose (mg/dL)	102,4	21,8	44,0	99,0	91,0	104,0	

7. DISCUSSÃO

O AVE é a segunda maior causa de incapacidade funcional em países desenvolvidos, possuindo altas taxas de mortalidade. De acordo com o Relatório de Saúde da OMS, 5,5 milhões de pessoas morrem por ano em decorrência do AVE. Em todo o mundo, enormes quantias de dinheiro e materiais estão envolvidas no tratamento desta doença. No entanto, métodos para identificar pessoas com alto risco de ocorrência do AVE são limitados e os mecanismos moleculares envolvidos neste trabalho são fundamentais para resolver tal problema (Gu, Wu et al. 2013).

Características clínicas como a presença de HAS, Diabetes, Tabagismo e Etilismo foram coletadas de todos os participantes da pesquisa, sendo que quando avaliadas com os grupos caso e controle houve um aumento de 26 vezes na chance de se ter HAS no grupo caso quando comparado ao controle ($P < 0,001$).

Monteiro e colaboradores (2005) afirmam que a elevação progressiva da pressão arterial ocasionalmente causa lesão de vasos sanguíneos dos olhos, coração, rins e encéfalo. As consequências dos níveis elevados persistentes e descontrolados são, portanto, insuficiência visual; hemorragia ocular; angina; fenômenos ateroscleróticos, como infarto agudo do miocárdio (IAM), insuficiência cardíaca (IC); além da insuficiência renal (IR), com possibilidade de perda da função renal; insuficiência circulatória e AVE.

No Brasil, a incidência de AVE dobra a cada década após os 55 anos, ocupando posição de destaque entre a população idosa, sendo considerado um país que está envelhecendo em considerável progressão, fato que se deve, fundamentalmente, ao aumento da expectativa de vida que abrange desde investimentos nos serviços de saúde de alta complexidade até as ações primárias de saúde (Pereira, Alvarenga et al. 2009).

Nesta pesquisa a incidência de AVEH e/ou aneurisma foi ligeiramente maior em mulheres (59,3%, $n = 48$) do que em homens (40,7%, $n = 33$), sendo que a média de idade do grupo caso foi de 53 anos.

Silva e colaboradores (2013), analisaram aspectos topográficos e epidemiológicos dos pacientes, bem como, o nível de gravidade na admissão e alta hospitalar e situação clínica do paciente após um ano da alta. Dos 148 pacientes com diagnóstico de AVEH, 77 (52%) eram do sexo masculino e 71 (48%) do sexo feminino. A faixa etária variou de 20 a 92 anos de idade, tendo maior número de casos no sexo

masculino. Do total de casos houve 57 óbitos (38,5%), com maior número de mortes nas faixas de 40 a 59 com pequena diferença entre os gêneros, sendo a taxa de letalidade foi maior para o sexo feminino (43,7%) nas faixas de 40 a 59.

O encéfalo depende de um aporte constante de oxigênio e glicose, poucos minutos sem irrigação sanguínea o adequada são suficientes para gerar danos no tecido encefálico (Monteiro, Santos et al. 2005).

Segundo a *American Diabetes Association* (2014) os critérios para o diagnóstico de Diabetes são: teste para hemoglobina glicada (A1C) $\geq 6,5\%$, que deve ser realizado utilizando um método certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program*; ou; glicose plasmático em jejum > 126 mg/dL (7,0 mmol/L), sendo o jejum definido como a ausência de ingestão por pelo menos 8 horas; ou; glicose plasmática de duas horas >200 mg/dL (11,1 mmol/L) durante um teste oral de tolerância à glicose, tal teste deve ser realizado conforme descrito pela OMS, utilizando uma carga de glicose contendo o equivalente a 75g de glicose anidra dissolvida em água; ou; em paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, uma glicemia aleatória > 200 mg/dL (11,1 mmol/L).

A dosagem da glicemia foi realizada em ambos os grupos desta pesquisa, sendo que, houve um aumento na média de glicose (107 mg/dL) nos portadores de AVEH/aneurisma.

O excesso de glicose circulante na corrente sanguínea leva a um aumento de cortisol e alguns outros hormônios que são contra insulínicos, diminuindo a sua captação pelos tecidos alvos levando a uma resistência, e diminuição da secreção de insulina pelo pâncreas. Com isso, há um aumento nos níveis de ácidos graxos e dos danos por radicais livres de oxigênio, além da agregação plaquetária com aumento da atividade do inibidor de ativação do plasminogênio. Tais fatores contribuem para os danos nas artérias e do tecido encefálico. As artérias acometidas irrigam o encéfalo, sendo o aumento da glicose um importante fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma (Ferreira, Machado et al. 2016).

Pesquisas têm sido elaboradas quanto ao gene *CTLA4* relacionado à diversas patologias autoimunes (Li, Gong et al. 2016, Ting, Chien et al. 2016, Narooie-Nejad, Taji et al. 2017) e as variações de seus alelos têm sido frequentemente examinadas em pacientes. Há na literatura, variadas observações quanto às diferenças proporcionais entre grupos relacionados ao gene *CTLA4*, tais dados necessitam de

uma maior investigação quanto aos candidatos que possuam o gene polimórfico em diferentes populações (Liu and Zhang 2013).

Mais de 100 polimorfismos têm sido identificados no gene *CTLA4*, como o polimorfismo -318 C/T. No entanto, com relação ao AVE, apenas um trabalho avaliou a associação do agravo de um polimorfismo neste gene, sendo que os participantes do estudo eram crianças, e o AVE Isquêmico Idiopático (Wang, Jiang et al. 2009)

Neste trabalho, houve ausência do genótipo TT em participantes do grupo caso e controle. A presença do genótipo heterozigoto CT foi mais prevalente nos indivíduos do grupo caso (27,2%) do que nos indivíduos do grupo controle (12,3%). Tais dados levam a uma diferença estatisticamente significante ($P=0,018$). O alelo T esteve mais presente no grupo caso (13,6%) quando comparado ao grupo controle (6,2%), sendo a presença do alelo T associada a ocorrência do AVEH/Aneurisma (0,025).

Lee, Kim e colaboradores (2014) afirmam que o alelo T -318 está associado com a uma atividade promotora maior que o alelo C -318. Assim, a presença do alelo T -318 pode contribuir para o aumento dos níveis de expressão de *CTLA4*, e, conseqüentemente, representar um mecanismo para inibir a atividade imunológica exagerada.

Embora o SNP -318 C/T esteja na região promotora do gene *CTLA4*; Anjos, Tessier e colaboradores (2004) afirmam que a presença do alelo T nesta posição tem mostrando aumentar a expressão de *CTLA4* em 30%.

A presença de HAS foi avaliada quanto aos genótipos CC e CT em todos os participantes da pesquisa quanto ao polimorfismo *CTLA4* -318 C/T. Neste trabalho, o fator do indivíduo ser portador do genótipo CC, o protege 6 vezes contra a ocorrência de HAS ($P=<0,001$; OR=0; 0,071-0,411).

Kokubo, Tomoike e colaboradores (2006) estudaram o polimorfismo *CTLA4* +49 A/G associando à pressão arterial em homens e mulheres com base em um modelo genético dominante ou recessivo. Tal análise revelou que o polimorfismo de *CTLA4* +49 A/G demonstrava uma associação significativa com hipertensão arterial sistêmica.

Silva e colaboradores (2013), analisaram que a HAS esteve presente de forma isolada em oitenta e sete (59,7%) dos pacientes; HAS somada à Diabetes Mellitus em 18 (12,0%) e quarenta e um (27,7%) pacientes não apresentavam doenças associadas.

Nota-se neste estudo que nenhum participante da pesquisa com genótipo CC apresentou Diabetes, sendo que, 9,4% dos participantes com genótipo CT possuía tal patologia. Fato que foi verificado por Saleh, Koeleman e colaboradores (2013), que confirmaram a ausência de associação do polimorfismo *CTLA4* -318 C/T e a forte presença de associação entre o polimorfismo *CTLA4* +49 A/G e a ocorrência de Diabetes tipo 1 em uma população Egípcia.

Porém, um estudo brasileiro desenvolvido por Gamberini e colaboradores (2006), com 279 pacientes e 151 controles não verificou associação de ambos polimorfismos, *CTLA4* +49 A/G e -318 C/T e a ocorrência de Diabetes tipo 1.

CTLA4 regula negativamente as respostas de células T, o aumento por nicotina na produção de citocinas de células T durante as fases de resposta tardia pode estar relacionado com a sua capacidade de reduzir a expressão *CTLA4* (Petro, Schwartzbach et al. 1999).

Poucos estudos avaliam a significância clínica desta associação. Um estudo na Índia avaliou SNPs na região promotora de *CTLA4*, afirmando que o SNP 1722 com genótipo homocigoto CC tende a ser mais elevado em pacientes com Carcinoma Epidermóide Oral (CEO), enquanto que em menor frequência o genótipo CT parece reduzir o risco de tabagismo relacionado ao CEO. Contudo, não achou associação significativa entre o SNP -318 e o risco de tabagismo (Bharti, Mohanti et al. 2013).

Neste estudo, os participantes de pesquisa portadores do genótipo CC possuíam um risco de ter HAS aumentado de 85 vezes no grupo caso quando comparado ao grupo controle ($P < 0,001$; $OR = 85$; 18,74 – 387,60).

Estudos sobre as bases genéticas das origens da hipertensão arterial vêm permitindo um melhor entendimento dos mecanismos moleculares, bem como novas medidas preventivas e tratamentos precoces, mais específicos e eficazes. Os genes controladores da pressão sanguínea ainda não são completamente conhecidos, mas estudos familiares e com gêmeos tem documentado estes componentes hereditários. Evidências sugerem que cerca de 30% da variação da pressão arterial podem ser de origem genética (Ferreira and Rola 2008).

Sob uma outra perspectiva, os desfechos clínicos após o AVE são altamente variáveis, e as razões para essas variações ainda não são bem elucidadas. A recuperação após AVE isquêmico ou hemorrágico começa imediatamente após o início agudo, e muitos diferentes níveis de respostas biológicas estão envolvidos. Estas respostas diferem no tempo e entre as diferentes áreas do cérebro afetado. Tal recuperação pode ser rápida, sem déficits neurológicos ou lenta, se existir, durante meses ou anos (Lindgren and Maguire 2016).

Evidências recentes de estudos de associação genética apoiam o fato de que fatores genéticos desempenham um papel fundamental no resultado de vários distúrbios do Sistema Nervoso Central (SNC). Vários pesquisadores revelam variantes genéticas que conferem susceptibilidade a um prognóstico bom ou ruim após a ocorrência do AVE (Dardiotis, Fountas et al. 2010).

Para avaliação do prognóstico são utilizadas escalas de nível de consciência como Escala de Coma de Glasgow, que é o parâmetro atualmente mais utilizado no mundo, principalmente em paciente após AVE por conter exames físicos simples se serem realizado; Escala de Rankin, escolhida por ser um bom instrumento para mensurar a incapacidade em pesquisas contemporâneas sobre AVE e Índice de Barthel, que avalia o nível de independência do indivíduo para a realização de atividades básicas. (Furmann and Costa 2015, do Carmo, Oliveira et al. 2016)

Além disto, Weih, Kallenber e colaboradores (1999) definiram como prognóstico não favorável, score de 1 a 4 na Escala de Coma de Glasgow e como prognóstico favorável score 5, sendo o prognóstico favorável significativamente associado com o ataque isquêmico transitório (AIT) antes da ocorrência do AVE. Também avaliaram a Escala de Rankin, dicotomizando critério de independência como score de 0 a 1 ou dependência com score de 2 a 5, não achando associação com prognóstico favorável ou não com a ocorrência de AIT antes do AVE.

Quanto ao estudo do polimorfismo *CTLA4* -318 C/T deste trabalho, 13,6% dos indivíduos com genótipo CC apresentaram coma intermediário quanto a escala de Glasgow, contra nenhum do genótipo CT, tal evidência foi estatisticamente significativa. Avaliando-se a escala de Rankin, 5,1% dos pacientes com genótipo CC apresentaram incapacidade grave, contra 4,5% com genótipo CT, havendo diferença estatística entre os genótipos.

Estudando a ERM, não houve associação entre o pior prognóstico medido pelo nível de consciência e a presença do genótipo homocigoto dominante ($P=0,720$), pois 13,6% dos participantes com genótipo CC apresentaram prognóstico ruim, contra 9,1% com genótipo CT.

Com relação ao polimorfismo *CTLA4* -318 C/T, a média da glicose estava elevada no grupo caso, tanto nos portadores do genótipo CC quanto ao genótipo TT. Contudo, há uma diferença estatística no grupo caso quando comparado ao grupo controle nos genótipos CC ($P=0,023$) e CT ($P=0,015$).

Outro gene associado para os estudos de polimorfismo neste trabalho, foi o *NOS3*, para o qual dois polimorfismos foram testados: o polimorfismo *NOS3* íntron 4 e o *NOS3* -786 T/C.

No presente trabalho não se descobriu diferença estatisticamente significativa entre o polimorfismo *NOS3* íntron 4, e a ocorrência do AVEH/Aneurisma ($P=0,465$). Tao e Cheng (2009), em uma metanálise sugeriram que a homocigose do alelo "a" não estava associada ao aumento do risco de AVE isquêmico. Seus resultados foram apenas significativos para o genótipo a/b em um modelo recessivo para o alelo "a" em asiáticos do leste.

Em um estudo dinamarquês com indivíduos Caucásicos, Staalsø, Edsen e colaboradores (2014) verificaram que o genótipo b/b do polimorfismo *NOS3* íntron 4 estava associado à hemorragia subaracnóide e que tal associação foi impulsionada pelo sexo. Os portadores do genótipo b/b foram mais prevalentes entre os pacientes do sexo masculino do que entre os do sexo feminino, aumentando o risco de hemorragia subaracnóide em homens, mas não em mulheres. Fato que não foi visto no presente estudo devido aos grupos estarem pareados por idade e sexo.

Estudando o polimorfismo *NOS3* íntron 4, notou-se que o portador do genótipo b/b possui um risco aumentado em 19 vezes de se ter AVE quando é hipertenso ($P<0,001$; OR=19; 6,88-52,42), o que também foi avaliado no indivíduo portador do genótipo a/b+a/a, que possui um risco aumentado em 75 vezes de se ter AVE, quando é hipertenso, sob a presença do alelo a.

Sponto, Degli Esposti e colaboradores (2014), realizaram um estudo em que a pressão arterial era monitorada durante 24 horas após um treinamento aeróbico, a fim de assegurar os efeitos benéficos do exercício para a saúde. Em relação ao polimorfismo *NOS3* íntron 4, a monitorização da pressão arterial somente reduziu

significativamente em voluntários com genótipo b/b em comparação aos genótipos a/b e a/a.

Quanto a associação: polimorfismo *NOS3* íntron 4 X HAS X outro desfecho clínico, um estudo desenvolvido em uma população iraniana analisou o polimorfismo *NOS3* íntron 4 quanto o desenvolvimento de Doença Arterial Coronariana (DAC), e tal estudo demonstrou que as frequências genóticas a/a, a/b e b/b foram significativamente diferentes entre os grupos caso e controle, sendo o alelo “a” um fator dependente para a ocorrência de DAC. A presença do alelo “a” também foi considerada um fator de risco para pressão arterial sistólica e diastólica, tabagismo e histórico familiar de DAC na população iraniana (Salimi, Firoozrai et al. 2008). Possivelmente o estudo na população iraniana divergiu do presente estudo, pois os desfechos bases eram distintos (DAC e AVEH, respectivamente).

A dosagem média de glicose foi obtida dos participantes do grupo caso e controle desta pesquisa quanto ao polimorfismo *NOS3* íntron 4, após as análises estatísticas foi possível analisar que há um aumento da média de glicose nos indivíduos do grupo caso, quando comparados ao grupo controle ($P=0,147$).

Similrmente, em um estudo onde avaliou-se a presença do polimorfismos *NOS3* intron 4 a ocorrência de Diabetes tipo 1 ou 2 foi considerado que o genótipo a/a ou a/b foi significativamente mais frequente em indivíduos com diabetes tipo 1 ($P<0,016$), quando a glicose média é mais alta (Galanakis, Kofteridis et al. 2008)

O polimorfismo *NOS3* -786 T/C tem sido amplamente associado a doença cardiovascular. Nakayama, Yasue e colaboradores (1999), afirmaram que a presença da mutação -786 T/C suprime a transcrição do gene *NOS3* e que tal diminuição da transcrição gênica é consistente com a noção de que a produção de NO endotelial é reduzida em pacientes portadores da mutação. Na análise deste estudo não se encontrou associação entre o polimorfismo *NOS3* -786 T/C e predisposição ao AVEH/Aneurisma.

Weiss, Fränkl e colaboradores (2012) demonstraram uma distribuição similar quanto ao polimorfismo em uma população Caucasiana diagnosticada com glaucoma e um grupo controle, não encontrando diferenças nas frequências genóticas do polimorfismo *NOS3* -786 T/C. Por outro lado, Salimi, Naghavi e colaboradores (2012), em um estudo iraniano, afirmam que as frequências genóticas do polimorfismo *NOS3* T-786C diferiram significativamente entre os pacientes com DAC e o grupo

controle, também verificaram que a frequência do alelo C foi significativamente maior nos pacientes com DAC que no controles.

Neste estudo com o polimorfismo *NOS3* T-786C foi possível avaliar um aumento de 73 vezes na chance de se ter AVEH/Aneurisma entre portadores de HAS, quando comparado ao grupo controle sob o genótipo TT e tal chance aumentou em 21 vezes sob o genótipo TC+CC.

Nakayama, Yasye e colaboradores (1999), compararam características clínicas e a frequência do polimorfismo *NOS3* T-786C e encontraram diferenças estatísticas significantes quanto a HAS, Diabetes e tabagismo ($P < 0,001$).

Kallel, Sbï e colaboradores (2013), afirmam que houve prevalência de HAS, Diabetes, dislipidemia e tabagismo em pacientes do grupo caso quando comparados ao grupo controle ($P < 0,001$). Avaliou também a distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo em pacientes com IM em uma população da Tunísia, não encontrado diferença estatística entre os grupos caso e controle.

Em um estudo Italiano, foram documentadas alterações no perfil hemorreológico que demonstraram a influência dos genes *NOS3* T-786C e 894G>T no comportamento do fluxo sanguíneo em pacientes diagnosticados com Esclerose Sistêmica. Fatini, Mannini e colaboradores (2006) afirmam que seus resultados evidenciam um possível mecanismo pelo qual uma disponibilidade potencialmente reduzida de NO, relacionada aos polimorfismos, pode influenciar na predisposição de Esclerose Sistêmica.

Outros polimorfismos de *NOS3* e HAS têm sido associados na literatura.

Lacolley, Gautier e colaboradores (1998) em uma pesquisa francesa afirmaram que as distribuições dos polimorfismos *NOS3* G23T (ínton 23) e Glu298Asp (éxon 7) não sugerem que tais mutações estejam envolvidas na regulação da rigidez aórtica em indivíduos hipertensos e normotensos. Contudo, a maior prevalência do alelo 298G em hipertensos sugere que o polimorfismo *NOS3* Glu298Asp está envolvido com a hipertensão ($P = 0,004$).

Um estudo Polonês demonstrou que o polimorfismo G11T (ínton23) não estava associado a hipertensão, o que suporta outros estudos que afirmam que tal mutação não é considerada um fator de risco para HAS. Derebcka, Holysz e colaboradores (2002) afirmam que este polimorfismo é comum na população polonesa.

O papel do gene *NOS3* na etiologia da pré-eclâmpsia tem sido discutido controversamente. Em um estudo realizado em Houston, Texas, foram avaliadas mulheres grávidas em que a pressão alta era definida como sendo pressão sanguínea sistólica 30 mm Hg ou maior, ou diastólica 15 mm Hg, ou maior, tendo como base 115/75 mmHg. Os dados apresentados neste estudo forneceram evidências para uma associação entre *NOS3* e pré-eclâmpsia nesta população específica de pacientes. O polimorfismo íntron 4 conferiu um risco significativamente elevado de desenvolver pré-eclâmpsia e estava associado a uma maior pressão sanguínea (Tempfer, Dorman et al. 2001).

Miyamoto, Saito e colaboradores (1998), demonstraram uma associação significativa entre o polimorfismo *NOS3* Glu298Asp e a presença de HAS em Japoneses. Observou um desequilíbrio significativo da variante Glu298Asp em duas populações distintas de Quioto e Kumamoto, Japão, enquanto era esperado que os japoneses fossem racialmente homogêneos.

Em um estudo americano não foi encontrada associação entre o polimorfismo *NOS3* Glu298Asp e a ocorrência da HAS, segundo o autor, achado consistente com a população branca. Tais divergências podem ser explicadas pela diferença populacional, devido aos polimorfismos poderem ser mais presentes em um população do que outra (Benjafield and Morris 2000).

Analisando a Escala de Coma de Glasgow no estudo do polimorfismo *NOS3* -786 T/C, 31,3% do participantes apresentaram genótipo homozigoto TT e coma intermediário, contra 4,6% com genótipo TC+CC (P=0,003). Avaliando a Escala de Rankin, 18,8% dos participantes com genótipo TT apresentavam incapacidade grave, contra 1,5% do genótipo TC+CC (P=0,021) e quanto ao Índice de Barthel, 37,5% dos participantes apresentaram incapacidade severa e eram do genótipo TT, contra 6,2% do genótipo TT+TC (P=0,003). A presença do genótipo homozigoto dominante pode estar associada a um pior prognóstico.

O prognóstico medido pela ERM associado ao polimorfismo *NOS3* -786 T/C também foi avaliado, 37,5% dos pacientes com genótipo TT apresentaram prognóstico ruim, contra 6,2% com genótipo TC+CC, tal diferença foi estatisticamente significativa, sendo que a presença do genótipo TT aumenta em 9 vezes o risco de um prognóstico ruim (P=0,003; OR=9, 2,19-38,27).

Benjafield e Morris (2000), avaliaram uma associação significativa entre o polimorfismo *TNFA* -308 e o prognóstico de pacientes após a ocorrência de

traumatismo crâniano. Os portadores de 2 alelos do *TNFA* -308 apresentaram maior probabilidade de um prognóstico desfavorável em comparação aos não portadores, tal associação pode ser refletida devido ao $TNF\alpha$ desempenhar um papel inicial no controle inflamatório após a ocorrência do traumatismo crâniano.

Na literatura, os estudos com associação entre polimorfismos genéticos e escalas de consciências são escassos.

Quanto ao gene *CYP2D6*, que codifica a enzima *CYP2D6* pertencente ao sistema citocromo p450, expressa não somente no fígado mas também no SNC, tendo um papel central na catalização de metabólitos de fármacos e toxinas biológicas. A mutação *CYP2D6*4* é causada pela transição de G para A, o que resulta em uma capacidade limitada para metabolizar substâncias. A diminuição da atividade de *CYP2D6* pode prolongar o tempo de exposição a neurotoxinas, induzindo a danos nas células do SNC. Tal hipótese pode ser suspeita por desempenhar papel na patogênese do AVE, doenças de Parkinson e doença de Alzheimer (Lu, Qin et al. 2014).

No presente estudo o polimorfismo *CYP2D6*4* não evidenciou diferença estatística quanto aos diferentes genótipos, o que também foi observado nas escalas de consciências e diferentes prognósticos.

Contudo, foi possível observar que entre os participantes com genótipo GG, o risco para AVE aumentava 44 vezes no grupo caso com HAS ($P < 0,001$, $OR = 44,13,65-144,17$), e entre os participantes com genótipo GA+AA o risco para AVEH/Aneurisma em pacientes com HAS aumentou em 10 vezes. O genótipo parece ter influência quando dividiu-se os grupos de estudo (tabela 29), mas não quando se considerou todos os participantes de pesquisa (tabela 28), sendo que o genótipo dominante parece favorecer mais fortemente o risco de hipertensão.

A hipertensão arterial sistêmica é um dos principais fatores de risco para AVE. Entretanto, apesar da disponibilidade de medicamentos anti-hipertensivos com diferentes mecanismos de ação, em grande parte dos hipertensos tratados não são alcançados níveis ideais de pressões sanguíneas. O polimorfismo *CYP2D6* faz com que pacientes possam ser caracterizados como metabolizadores ultrarrápidos, metabolizadores intermediários ou metabolizadores lentos de drogas. Estes últimos correspondem a 7% a 10% da população de indivíduos caucasianos (Sandrim and Tanus-Santos 2008).

Em um estudo Egípcio, foram comparados casos de hipertensão e controles em relação às variantes alélicas genóticas do gene *CYP2D6*, os casos de hipertensão mostraram presença do genótipo homozigoto dominante significativamente maior em comparação aos controles ($P=0,01$). Esse fenômeno também se manifestou entre os casos de subgrupos com obesidade que apresentaram formas homozigóticas mutantes significativamente menores do que os controles obesos ($P=0,040$), casos com lesões cardíacas ($P=0,008$) e complicações ($P=0,010$). Fato que foi confirmando quando comparado casos de hipertensão e controles, em que as variantes genéticas do gene *CYP2D6* apresentaram um genótipo homozigoto dominante significativamente maior entre os casos de hipertensão quando comparados ao controle. (Ali, Wassim et al. 2013).

Neste trabalho a dosagem de glicose média foi mais alta no grupo caso quando comparada ao grupo controle em ambos genótipos, GG ($P=0,004$) e GA+AA ($P=0,126$) do polimorfismo *CYP2D6*. No entanto, Agúndez, Menaya e colaboradores (1996), em um estudo espanhol, não encontraram associação entre os genótipos de *CYP2D6*, que foram similares entre caso e controle, não havendo associação com a ocorrência de DM tipo 2 (não insulino dependente) ou com a variação de glicemia.

8. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, conclui-se que independente do polimorfismo a presença da HAS é um fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma, este fator de risco aumenta a chance para a ocorrência do desfecho em até 26 vezes. A medida de glicose realizada em todos os participantes da pesquisa possibilitou concluir que há um aumento na glicemia em pacientes diagnosticados com AVEH/Aneurisma quando comparados ao grupo controle.

Quanto à associação entre o polimorfismo *CTLA4* -318 C/T e a ocorrência do AVEH e/ou aneurisma intracerebral, a presença do genótipo CT, no polimorfismo *CTLA4* -318 C/T, foi considerada um fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma, aumentando em 3 vezes o risco para a ocorrência do desfecho. E a presença do alelo T foi associada a um aumento de 2 vezes a chance de o portador ter AVEH/Aneurisma.

O fato do indivíduo ser portador do genótipo CC foi considerado um fator de proteção de 6 vezes para a ocorrência de HAS. Quanto ao tabagismo, houve associação entre o tabagismo e a presença do genótipo CC.

Avaliando as características clínicas por grupo de estudo separado, os indivíduos portadores do genótipo CC corriam um risco aumentado em 85 vezes de se ter HAS no grupo caso quando comparado ao grupo controle.

No estudo de associação entre o perfil da escala de consciência e o polimorfismo *CTLA4* -318 C/T, a maioria dos participantes com genótipo CC apresentava coma intermediário e incapacidade severa. Quando dicotomizados em prognóstico bom e mau, a maior parte dos participantes com genótipo CC apresentavam prognóstico ruim.

Quanto à média de glicose dos participantes da pesquisa, a glicemia do grupo caso era superior à do grupo controle. Quando comparado os genótipos CC e CT, a glicemia foi superior no genótipo CT. Observando os valores médios da dosagem de creatinina e plaquetas, não houve diferença quanto aos genótipos.

Analisando o polimorfismo *NOS3* íntron 4, não se obteve diferença quanto à associação do polimorfismo e os diferentes genótipos. Avaliando as características clínicas, a presença do genótipo b/b não foi associada com HAS, diabetes, tabagismo ou etilismo. Quando dicotomizados os grupos de estudo, o portador do genótipo b/b possuiu um risco aumentado em 19 vezes de se ter AVEH/Aneurisma quando se é

hipertenso, e os portadores dos genótipos *a/b+a/a* tendo um risco aumentado em 75 vezes o risco de se ter AVEH quando hipertensos.

Em relação às escalas de consciência, não houve associação entre as escalas quando relacionado aos genótipos do polimorfismo *NOS3* íntron 4. Quanto à glicemia, creatinina e plaquetas a presença do alelo *a* não influenciou na diferença entre os grupos.

Não houve diferença estatística com relação às frequências genótípicas do polimorfismo *NOS3* -786 T/C e a ocorrência de AVEH/Aneurisma, ou com características clínicas como HAS, Diabetes, tabagismos e etilismo. Contudo, quando avaliada as características clínicas e a ocorrência de AVEH/Aneurisma nos diferentes genótipos, os participantes com genótipo TT possuíam um risco para AVE aumentado em 73 vezes no grupo com HAS, e o risco para AVEH/Aneurisma em pacientes com HAS e genótipo TC+CC aumentou em 21 vezes quando comparado ao grupo controle.

Quanto às escalas de coma associadas ao polimorfismo *NOS3* -786 T/C, a presença do genótipo TT estava associada ao coma intermediário, incapacidade grave/severa. Sendo que, a presença do genótipo TT aumenta em 9 vezes o risco de um prognóstico ruim.

Não houve diferença estatística quando associada à glicemia média, creatinina e plaquetas aos diferentes genótipos nos participantes da pesquisa.

Aferindo as distribuições genótípicas e alélicas do polimorfismo *CYP2D6* 1846 G/A, não houve diferença estatística entre tais distribuições e a ocorrência de AVEH/Aneurisma. Inclusive, não havendo associação com características clínicas, tais como, HAS, Diabetes, tabagismo e etilismo e o desfecho.

Em relação às características clínicas e a ocorrência de AVEH/Aneurisma em diferentes genótipos, entre os participantes com genótipo GG, o risco de AVEH aumentava em 44 vezes no grupo com HAS, sendo que o risco para o desfecho em pacientes com HAS e genótipo GA+AA aumentou em 10 vezes quando comparado ao grupo controle.

Observando as escalas de consciência, não houve diferença estatística entre os níveis de consciência e os diferentes genótipos do polimorfismo *CYP2D6* 1846 G/A. Quanto à glicemia média, foi maior no grupo caso do que no grupo controle, sendo que, no genótipo GG a média de glicose maior no grupo caso foi estatisticamente significativa. Contudo, analisando as médias de creatinina e plaquetas quando aos diferentes genótipos, não houve associação significativamente estatística.

A presença dos polimorfismos *CTLA4* -318 C/T, *NOS3* -786 T/C, *NOS3* íntron4 e *CYP2D6* 1846 G/A devem ser amplamente estudadas em pesquisas futuras, e os resultados desta pesquisa podem ser úteis a outros estudos de associação a doenças ligadas a genes. A influência possível sobre a expressão dos genes desta pesquisa continua a ser elucidada, portanto mais estudos de associação devem ser realizados para esclarecer se tais polimorfismos representam associações ao AVEH e Aneurisma Intracerebral.

9. REFERÊNCIAS

- Agúndez, J. A., et al. (1996). "Genetic analysis of the NAT2 and CYP2D6 polymorphisms in white patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." Pharmacogenetics and Genomics **6**(5): 465-472.
- ALBAN, F. S. and Y. L. d. CARVALHO (2016). "Aplicação das escalas de escore de trauma por equipes do atendimento pré-hospitalar."
- Ali, A. A., et al. (2013). "Genetic polymorphism of CYP2D6 gene among Egyptian hypertensive cases." The Journal of Basic & Applied Zoology **66**(4): 228-233.
- Anjos, S. M., et al. (2004). "Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(12): 6257-6265.
- Araujo, T. L. d., et al. (2013). "Competências essenciais de programas de assistência domiciliar para pacientes com acidente vascular cerebral."
- Aronowski, J. and X. Zhao (2011). "Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage secondary brain injury." Stroke **42**(6): 1781-1786.
- Association, A. D. (2014). "Standards of medical care in diabetes--2014." Diabetes care **37**: S14.
- Bacha, J. M. R., et al. (2016). "Impacto do treinamento sensório-motor com plataforma vibratória no equilíbrio e na mobilidade funcional de um indivíduo idoso com sequela de acidente vascular encefálico: relato de caso." Fisioterapia e Pesquisa **23**(1): 111-116.
- Bang, O. Y., et al. (2015). "Nontraditional Risk Factors for Ischemic Stroke An Update." Stroke **46**(12): 3571-3578.
- Barker, M. D., et al. (2014). "Application and clinical utility of the Glasgow coma scale over time: a study employing the NIDRR traumatic brain injury model systems database." The Journal of head trauma rehabilitation **29**(5): 400-406.
- Benjafield, A. V. and B. J. Morris (2000). "Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension." American journal of hypertension **13**(9): 994-998.
- Bhagwat, M. (2010). "Searching NCBI's dbSNP database." Current Protocols in Bioinformatics: 1.19. 11-11.19. 18.
- Bharti, V., et al. (2013). "Functional genetic variants of CTLA-4 and risk of tobacco-related oral carcinoma in high-risk North Indian population." Human immunology **74**(3): 348-352.
- Bhopal, R., et al. (2012). "Ethnic variations in the incidence and mortality of stroke in the Scottish Health and Ethnicity Linkage Study of 4.65 million people." European journal of preventive cardiology **19**(6): 1503-1508.
- Bosi, P. L., et al. (2009). "Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo." Arq Bras Endocrinol Metab **53**(6): 726-732.

- Braga, G. P. (2016). "Alterações eletrocardiográficas como preditores de gravidade no acidente vascular cerebral."
- Brouwers, H. B., et al. (2014). "Predicting hematoma expansion after primary intracerebral hemorrhage." *JAMA neurology* **71**(2): 158-164.
- Bruno, A., et al. (2013). "Simplified modified Rankin Scale questionnaire correlates with stroke severity." *Clinical rehabilitation*: 0269215512470674.
- Burcu, G. B., et al. (2016). "The protective cardiac effects of B-myrcene after global cerebral ischemia/reperfusion in C57BL/J6 mouse." *Acta Cirurgica Brasileira* **31**(7): 456-462.
- Cabral, N. L., et al. (2009). "Trends in stroke incidence, mortality and case fatality rates in Joinville, Brazil: 1995–2006." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **80**(7): 749-754.
- Caro, C. C., et al. (2016). "Independence and cognition post-stroke and its relationship to burden and quality of life of family caregivers." *Topics in Stroke Rehabilitation*: 1-6.
- Carrer, H., et al. (2010). "Biotecnologia na agricultura." *estudos avançados* **24**(70): 149-164.
- Cheng, B., et al. (2014). "Influence of stroke infarct location on functional outcome measured by the modified rankin scale." *Stroke* **45**(6): 1695-1702.
- Copstein, L., et al. (2013). "Prevalence and risk factors for stroke in a population of Southern Brazil." *Arquivos de neuro-psiquiatria* **71**(5): 294-300.
- da Costa, L., et al. (2016). "Increased Frontal Lobe Activation After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." *Stroke: STROKEAHA*. 116.013786.
- da Silva Leite, V., et al. (2013). "Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense." *Derecho y Cambio Social* **10**(34): 21.
- Dardiotis, E., et al. (2010). "Genetic association studies in patients with traumatic brain injury." *Neurosurgical focus* **28**(1): E9.
- de Brito, R. G., et al. (2013). "Instrumentos de avaliação funcional específicos para o acidente vascular cerebral."
- de Leon, J., et al. (2006). "Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19." *Psychosomatics* **47**(1): 75-85.
- de Marqui, A. B. T. (2015). "Síndrome de Turner e polimorfismo genético: uma revisão sistemática." *Revista Paulista de Pediatria* **33**(3): 364-371.
- de Padua Mansur, A. and D. Favarato (2016). "Mortalidade por Doenças Cardiovasculares em Mulheres e Homens nas cinco Regiões do Brasil, 1980-2012." *Arq Bras Cardiol* **107**(2): 137-146.
- del Zoppo, G. J. and J. M. Hallenbeck (2000). "Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke." *Thrombosis research* **98**(3): 73-81.

Derebecka, N., et al. (2002). "Polymorphism in intron 23 of the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) is not associated with hypertension." ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION- **49**(1): 263-268.

do Carmo, J. F., et al. (2016). "Incapacidade funcional e fatores associados em idosos após o Acidente Vascular Cerebral em Vitória–ES, Brasil." Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia **19**(5): 809-818.

Donnelly, M. K. (2014). Role of cytochrome p450 fatty acid metabolism in the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage, University of Pittsburgh.

Elneam, A. I. A., et al. (2015). "Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism (T-786C) and Cerebrovascular Stroke with or without Smoking." International Journal **3**(6): 619-624.

Estrela-Dias, M. and J. L. Pais-Ribeiro (2014). "Intervenção psicológica positiva em grupo: forças e virtudes na reabilitação pós-AVC= Positive psychological group intervention: strengths and virtues in rehabilitation after stroke."

Fann, D. Y.-W., et al. (2013). "Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes." Ageing research reviews **12**(4): 941-966.

Fatini, C., et al. (2006). "Hemorheologic profile in systemic sclerosis: role of NOS3– 786T> C and 894G> T polymorphisms in modulating both the hemorheologic parameters and the susceptibility to the disease." Arthritis & Rheumatism **54**(7): 2263-2270.

Ferreira, A. I. d. S. and G. Ferreira (2012). "Prevalência de mortalidade por doenças cardiovasculares em uma cidade do sul de Minas Gerais nos anos de 1999 a 2008/Prevalence of cardiovascular mortality in a southern city of Minas Gerais in the years 1999 to 2008." REVISTA CIÊNCIAS EM SAÚDE **2**(2): 57-66.

Ferreira, D. V., et al. (2016). "A ATUAÃ# Æfo DO NUTRICIONISTA CLÃ NICO NA PREVENÃ# Æfo DOS FATORES DE RISCO AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÃ LICO (AVE)." Revista Rede de Cuidados em Saúde **9**(3).

Ferreira, L. B. and M. G. Rola (2008). "Polimorfismos genéticos associados à hipertensão arterial sistêmica-doi: 10.5102/ucs.v6i1.464." Universitas: Ciências da Saúde **6**(1): 57-68.

Fleck, M. P., et al. (2000). "Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida" WHOQOL-bref". Revista de saúde pública **34**(2): 178-183.

Flora Filho, R. and B. Zilberstein (2000). "Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções." Revista da Associação Médica Brasileira **46**(3): 265-271.

Fukujima, M. M. and A. A. Gabbai (2001). "Recomendações nos Casos de Aneurisma Cerebral Não Roto." Rev. Neurociências **9**(1): 32-35.

Furmann, N. and F. M. Costa (2015). "Critérios clínicos utilizados por profissionais para liberação de dieta via oral em pacientes adultos hospitalizados." Rev. CEFAC **17**(4): 1278-1287.

Galanakis, E., et al. (2008). "Intron 4 a/b polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with both type 1 and type 2 diabetes in a genetically homogeneous population." Human immunology **69**(4): 279-283.

- Gamarra, J. G. A. (2011). Genotípica, Estudo para a caracterização genotípica e fenotípica da atividade enzimática da subfamília citocromo p450 CYP2D6 de voluntários sadios Universidade de São Paulo.
- Gamberini, M., et al. (2006). "Associação do polimorfismo+ 49 A/G no exon 1 do gene CTLA-4 com diabetes melito tipo 1 e suas apresentações clínicas." Arq Bras Endocrinol Metab **50**: S180.
- Garritano, C. R., et al. (2012). "Análise da tendência da mortalidade por acidente vascular cerebral no Brasil no século XXI." Arq Bras Cardiol **98**(6): 519-527.
- Glueck, C. J., et al. (2015). "The eNOS T786C mutation, Prinzmetal's Variant Angina, and amelioration of angina by l-arginine in 59 patients with intractable angina despite calcium channel blocker–nitrate therapy." IJC Metabolic & Endocrine **8**: 13-19.
- González-Pérez, A., et al. (2013). "Mortality after hemorrhagic stroke Data from general practice (The Health Improvement Network)." Neurology **81**(6): 559-565.
- Gu, L., et al. (2013). "The role of TNF- α 308G> A polymorphism in the risk for ischemic stroke." The American journal of the medical sciences **345**(3): 227-233.
- Hägg, S., et al. (2014). "Different risk factor profiles for ischemic and hemorrhagic stroke in type 1 diabetes mellitus." Stroke **45**(9): 2558-2562.
- He, Q., et al. (2014). "Trends in in-hospital mortality among patients with stroke in China." PloS one **9**(3): e92763.
- Homi, H. M., et al. (2000). "Fisiopatologia da isquemia cerebral." Rev. bras. anesthesiol **50**(5): 405-414.
- Hong, K.-S., et al. (2013). "Stroke statistics in Korea: part I. Epidemiology and risk factors: a report from the korean stroke society and clinical research center for stroke." Journal of stroke **15**(1): 2-20.
- Hopewell, J. C. and R. Clarke (2016). "Emerging Risk Factors for Stroke What Have We Learned From Mendelian Randomization Studies?" Stroke **47**(6): 1673-1678.
- Jauch, E. C., et al. (2013). "Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **44**(3): 870-947.
- Kallel, A., et al. (2013). "Polymorphisms of the NOS3 gene and risk of myocardial infarction in the Tunisian population." Cytokine **64**(3): 646-651.
- Kernan, W. N., et al. (2014). "Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **45**(7): 2160-2236.
- Khoury, J. C., et al. (2013). "Diabetes Mellitus A risk factor for ischemic stroke in a large biracial population." Stroke **44**(6): 1500-1504.
- Kim, A. S. and S. C. Johnston (2013). "Temporal and geographic trends in the global stroke epidemic." Stroke **44**(6 suppl 1): S123-S125.

- Kokubo, Y., et al. (2006). "Association of sixty-one non-synonymous polymorphisms in forty-one hypertension candidate genes with blood pressure variation and hypertension." Hypertension research **29**(8): 611.
- Kumar, A., et al. (2013). "Identification of genetic contribution to ischemic stroke by screening of single nucleotide polymorphisms in stroke patients by using a case control study design." BMC neurology **13**(1): 1.
- Lacolley, P., et al. (1998). "Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects." Journal of hypertension **16**(1): 31-35.
- Lander, E. S., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Lee, Y. H., et al. (2015). "Association between the CTLA-4, CD226, FAS polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis." Human immunology **76**(2): 83-89.
- Lee, Y. H., et al. (2014). "CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis." Human immunology **75**(5): 414-421.
- Li, Y.-y., et al. (2016). "CTLA-4+ 49A/G gene polymorphism and type 1 diabetes mellitus in the Chinese population: a meta-analysis of 2238 subjects." International Journal of Diabetes in Developing Countries **36**(1): 45-51.
- Lindgren, A. and J. Maguire (2016). "Stroke Recovery Genetics." Stroke **47**(9): 2427-2434.
- Liu, J. and H.-X. Zhang (2013). "CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a comprehensive meta-analysis." Genetic testing and molecular biomarkers **17**(3): 226-231.
- Liu, J. and H. Zhang (2013). "- 1722T/C polymorphism (rs733618) of CTLA-4 significantly associated with systemic lupus erythematosus (SLE): A comprehensive meta-analysis." Human immunology **74**(3): 341-347.
- Liu, R., et al. (2014). "Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786C) and ischemic stroke susceptibility: a meta-analysis." International Journal of Neuroscience **124**(9): 642-651.
- Lopes, J. M., et al. (2016). "Hospitalization for ischemic stroke in Brazil: an ecological study on the possible impact of Hiperdia." Revista Brasileira de Epidemiologia **19**(1): 122-134.
- Loterio, F. A. (2015). "Análise do padrão de ativação muscular de indivíduos hemiparéticos pós-AVC em marcha assistida por andador robótico."
- LOURENÇO, S., et al. (2013). "Modelo experimental estável de aneurisma sacular em artéria carótida de suínos utilizando veia jugular interna." Cirurgiões **40**(2): 130-136.
- Lozano, V. F., et al. (2011). "Polymorphism analysis of the CTLA-4 gene in paracoccidioidomycosis patients." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **106**(2): 220-226.
- Lu, Y., et al. (2014). "Quantitative assessment of CYP2D6 polymorphisms and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis." Journal of the neurological sciences **343**(1): 15-22.

- Magistris, F., et al. (2013). "Intracerebral hemorrhage: pathophysiology, diagnosis and management." MUMJ **10**(1): 15-22.
- Malta, D. C., et al. (2016). "Avanços do Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis no Brasil, 2011-2015." Epidemiologia e Serviços de Saúde **25**(2): 373-390.
- Marques, F. M. L. A. and R. M. L. Martins (2012). Independência funcional do doente pós AVC, Instituto Politécnico de Viseu, Escola Superior de Saúde de Viseu.
- Medeiros, C. S. P. d., et al. (2014). "Effects of mirror therapy through functional activities and motor standards in motor function of the upper limb after stroke." Fisioterapia e Pesquisa **21**(3): 264-270.
- Migliori, I. K. (2010). Uso de RNA de interferência (siRNA) para modulação da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em células dendríticas, Universidade de São Paulo.
- Minelli, C., et al. (2007). "Stroke Incidence, Prognosis, 30-Day, and 1-Year Case Fatality Rates in Matão, Brazil A Population-Based Prospective Study." Stroke **38**(11): 2906-2911.
- Mirrahimi, A., et al. (2014). "The role of glycemic index and glycemic load in cardiovascular disease and its risk factors: a review of the recent literature." Current atherosclerosis reports **16**(1): 1-10.
- Miyamoto, Y., et al. (1998). "Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension." hypertension **32**(1): 3-8.
- Montaner, J., et al. (2012). "Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway." Journal of proteomics **75**(15): 4758-4765.
- Monteiro, P. C., et al. (2005). "Características biossociais, hábitos de vida e controle da pressão arterial dos pacientes em um programa de hipertensão." Arq Ciênc Saúde **12**(2): 73-79.
- Mota, D. V. N., et al. (2016). "Mirror therapy for upper limb rehabilitation in chronic patients after stroke." Fisioterapia em Movimento **29**(2): 287-293.
- Nakayama, M., et al. (1999). "T- 786→ C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm." Circulation **99**(22): 2864-2870.
- Narooie-Nejad, M., et al. (2017). "Association of CTLA-4 gene polymorphisms-318C/T and+ 49A/G and Hashimoto's thyroiditis in Zahedan, Iran." Biomedical Reports **6**(1): 108-112.
- Nepomnyashchikh, D., et al. (2012). "Cytochrome P450 2D6 Polymorphism Is a Molecular Genetic Marker of Liver Cirrhosis Progression." Bulletin of experimental biology and medicine **152**(5): 633.
- Niu, P. P., et al. (2013). "Relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and ischemic stroke: a meta-analysis." Acta Neurologica Scandinavica **128**(3): 202-212.
- Nyíró, G., et al. (2012). "The effect of the CYP 2C19* 2 polymorphism on stroke care." Acta Physiologica Hungarica **99**(1): 33-39.
- O'Keefe, J. H., et al. (2014). Alcohol and cardiovascular health: the dose makes the poison... or the remedy. Mayo Clinic Proceedings, Elsevier.

- Oselka, G. and E. J. Troster (2000). "Aspectos éticos do atendimento médico do adolescente." Revista da Associação Médica Brasileira **46**(4): 306-307.
- Ota, T., et al. (2014). "Long PCR-based Genotyping for a Deleted CYP2D6 Gene without DNA Extraction." Drug metabolism and pharmacokinetics **29**(3): 283-285.
- Owolabi, M. and A. Agunloye (2013). "Risk factors for stroke among patients with hypertension: A case-control study." Journal of the neurological sciences **325**(1): 51-56.
- Passos, V., et al. (2016). "Consistent declining trends in stroke mortality in Brazil: mission accomplished?" Arquivos de neuro-psiquiatria **74**(5): 376-381.
- Pawlowski, J., et al. (2013). "Avaliação neuropsicológica breve de adultos pós-acidente vascular cerebral em hemisfério esquerdo." Avances en Psicología Latinoamericana **31**(1): 33-45.
- Pellerin, C., et al. (2016). "A Simple Variable Number of Tandem Repeat-Based Genotyping Strategy for the Detection of Handling Errors and Validation of Sample Identity in Biobanks." Biopreservation and Biobanking.
- Pereira, A. B. C. N. d., et al. (2009). "Prevalência de acidente vascular cerebral em idosos no Município de Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil, através do rastreamento de dados do Programa Saúde da Família." Cad. saúde pública **25**(9): 1929-1936.
- Pereira, B. J. A. (2013). "Impacto da introdução do microdoppler vascular para a avaliação do fluxo sanguíneo cerebral durante a microcirurgia de aneurismas intracranianos."
- Peter, J. and A. H. Justus (2016). "Knowledge and Practices of Stroke Survivors Regarding Secondary Stroke Prevention, Khomas Region, Namibia." Journal of Medical Biomedical and Applied Sciences **3**(1).
- Peters, S. A., et al. (2013). "Smoking as a risk factor for stroke in women compared with men A systematic review and meta-analysis of 81 cohorts, including 3 980 359 individuals and 42 401 strokes." Stroke **44**(10): 2821-2828.
- Petro, T. M., et al. (1999). "Smokeless tobacco and nicotine bring about excessive cytokine responses of murine memory T-cells." International journal of immunopharmacology **21**(2): 103-114.
- Pinto, M. H. and M. M. F. Zago (2000). "A compreensão do significado cultural do aneurisma cerebral e do tratamento atribuídos pelo paciente e familiares: um estudo etnográfico." Revista Latino-Americana de Enfermagem **8**(1): 51-56.
- Ponce, F. A. and A. M. Lozano (2010). "Highly cited works in neurosurgery. part ii: the citation classics: A review." Journal of neurosurgery **112**(2): 233-246.
- Radanovic, M. (2000). "Características do atendimento de pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário." Arq Neuropsiquiatr **58**(1): 99-106.
- Rangel, E. S. S., et al. (2013). "Qualidade de vida de pacientes com acidente vascular cerebral em reabilitação." Acta paul enferm **26**(2): 205-212.
- Reith, F. C., et al. (2016). "Lack of Standardization in the Use of the Glasgow Coma Scale: Results of International Surveys." Journal of neurotrauma **33**(1): 89-94.

Robinson, S. R., et al. (2013). "Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke." Redox Report.

Rodrigues, E. S. R., et al. (2013). "Fatores de risco cardiovascular em pacientes com acidente vascular cerebral." AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH **1**(2): 21-28.

Rodrigues, E. S. R., et al. (2016). "Fatores de risco para doenças ateroscleróticas cardiovasculares em escolares: uma ação preventiva primária. Relato de experiência." AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH **4**(2): 16-26.

Rolindo, S. J. S. and L. T. Oliveira (2016). "ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO: REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ASPECTOS ATUAIS DO TRATAMENTO NA FASE AGUDA." Revista de Patologia do Tocantins **3**(3): 18-26.

Rudd, C. E. (2008). "The reverse stop-signal model for CTLA4 function." Nature Reviews Immunology **8**(2): 153-160.

Sajib, A., et al. (2016). "Phylogenetic analysis of Bangladeshi population with reference to D1S80 VNTR locus." Biores Comm **2**(1): 146-151.

Salazar Pelaéz, L. M., et al. (2012). "Polimorfismos genéticos da interleucina-1 e o risco de periodontite periapical crônica numa população de Antioquia, Colômbia."

Saleh, H. M., et al. (2013). "Association of CTLA-4 Polymorphisms with Type 1 Diabetes in the Egyptian Population." Journal of Diabetes & Metabolism **2013**.

Salimi, S., et al. (2008). "Lack of evidence for contribution of intron4a/b polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene to plasma nitric oxide levels." Acta cardiologica **63**(2): 229.

Salimi, S., et al. (2012). "Association of plasma nitric oxide concentration and endothelial nitric oxide synthase T-786C gene polymorphism in coronary artery disease." Pathophysiology **19**(3): 157-162.

Sandrim, V. C. and J. E. Tanus-Santos (2008). "O conhecimento em farmacogenômica pode auxiliar no controle da pressão arterial em pacientes com hipertensão de difícil controle." Revista brasileira de hipertensão **15**(1): 34-36.

SCHINCARIOL, L. P. (2011). "Identificação de marcadores SNP pelas técnicas de PCR-RFLP e Tetra-primer ARMS-PCR e suas associações com qualidade de bebida em café." Instituto agrônomo curso de pós-graduação em agricultura tropical e subtropical.

Silva, D. C. S., et al. (2013). "Efeitos da Mobilização Precoce nas Complicações Clínicas Pós-AVC: Revisão da Literatura." Rev. Neurociencia **21**(4): 620-627.

Silva, I. F. G. d., et al. (2016). "Viver e Cuidar Após o Acidente Vascular Cerebral." Revista de Enfermagem Referência(8): 103-111.

Silva, M. V. d. (2013). "Aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos de acidente vascular encefálico hemorrágico intraparenquimatoso: perfil epidemiológico em uma série monocêntrica no Distrito Federal."

- Sinici, I., et al. (2010). "Endothelial nitric oxide gene polymorphism and risk of systemic sclerosis: predisposition effect of T-786C promoter and protective effect of 27 bp repeats in Intron 4." Clinical & Experimental Rheumatology **28**(2): 169.
- Somarajan, B., et al. (2011). "Evaluation of MTHFR C677T polymorphism in ischemic and hemorrhagic stroke patients. A case-control study in a Northern Indian population." Journal of the neurological sciences **304**(1): 67-70.
- Sponton, C. G., et al. (2014). "The presence of the NOS3 gene polymorphism for intron 4 mitigates the beneficial effects of exercise training on ambulatory blood pressure monitoring in adults." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology: ajpheart. 00844.02013.
- Staalsø, J. M., et al. (2014). "Association of the NOS3 intron-4 VNTR polymorphism with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: clinical article." Journal of neurosurgery **121**(3): 587-592.
- Starke, R. M., et al. (2014). "Vascular smooth muscle cells in cerebral aneurysm pathogenesis." Translational stroke research **5**(3): 338-346.
- Strbian, D., et al. (2012). "Symptomatic intracranial hemorrhage after stroke thrombolysis: the SEDAN score." Annals of neurology **71**(5): 634-641.
- Sundseth, A., et al. (2014). "Factors related to knowledge of stroke symptoms and risk factors in a Norwegian stroke population." Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases **23**(7): 1849-1855.
- Suzano, D. S., et al. (2016). "A IMPORTÂNCIA DA QUALIDADE DE VIDA EM PACIENTES HIPERTENSOS." Saúde em Redes **2**(1): 53-63.
- Tada, H., et al. (2014). "Twelve-Single Nucleotide Polymorphism Genetic Risk Score Identifies Individuals at Increased Risk for Future Atrial Fibrillation and Stroke." Stroke **45**(10): 2856-2862.
- Tao, H.-m. and G.-z. Chen (2009). "Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: a meta-analysis." Neuroscience research **64**(3): 311-316.
- Taylor, A., et al. (2016). "Advances in stroke treatment are within reach." South African Medical Journal **106**(5): 454-455.
- Teasdale, G. and B. Jennett (1974). "Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale." The Lancet **304**(7872): 81-84.
- Teasdale, G., et al. (2014). "The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time." The Lancet Neurology **13**(8): 844-854.
- Teles, P. d. B. (2013). "Polimorfismo genético da apolipoproteína E e avaliação sociodemográfica em pacientes com periodontite crônica."
- Tempfer, C. B., et al. (2001). "An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia." Hypertension in pregnancy **20**(1): 107-118.
- Ting, W.-H., et al. (2016). "Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study." PLoS one **11**(4): e0154394.

- Trialists' Collaboration, S. U. (2013). "Organised inpatient (stroke unit) care for stroke." Cochrane Database Syst Rev **9**.
- Türkanoglu Özçelik, A., et al. (2014). "Importance of NOS3 Genetic Polymorphisms in the Risk of Development of Ischemic Stroke in the Turkish Population." Genetic testing and molecular biomarkers **18**(12): 797-803.
- Villela, P. B., et al. (2016). "Evolução da Mortalidade por Doenças Cerebrovasculares e Hipertensivas no Brasil entre 1980 e 2012." hypertension **107**(1): 26-32.
- Wanderley Filho, L. E. R., et al. (2013). "ANEURISMA DO SEGMENTO P3 DA ARTÉRIA CEREBRAL POSTERIOR NA INFÂNCIA." Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria **17**(2).
- Wang, J., et al. (2014). "Sex differences in trends of incidence and mortality of first-ever stroke in rural Tianjin, China, from 1992 to 2012." Stroke **45**(6): 1626-1631.
- Wang, J. J., et al. (2009). "The association of CTLA-4 and CD28 gene polymorphisms with idiopathic ischemic stroke in the paediatric population." International journal of immunogenetics **36**(2): 113-118.
- Wang, L., et al. (2015). "Associations between CTLA-4+ 49 A/G (rs231775) polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 52 case-control studies." International journal of clinical and experimental medicine **8**(5): 6835.
- Weih, M., et al. (1999). "Attenuated Stroke Severity After Prodromal TIA A Role for Ischemic Tolerance in the Brain?" Stroke **30**(9): 1851-1854.
- Weiss, J., et al. (2012). "No difference in genotype frequencies of polymorphisms of the nitric oxide pathway between Caucasian normal and high tension glaucoma patients."
- Wu, Z., et al. (2013). "A systematically combined genotype and functional combination analysis of CYP2E1, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 in different geographic areas of mainland China—a basis for personalized therapy." PloS one **8**(10): e71934.
- Yasukochi, Y. and Y. Satta (2015). "Molecular evolution of the CYP2D subfamily in primates: Purifying selection on substrate recognition sites without the frequent or long-tract gene conversion." Genome biology and evolution **7**(4): 1053-1067.
- Zalata, A., et al. (2015). "Cytochrome P450-2D6* 4 polymorphism seminal relationship in infertile men." Andrologia **47**(5): 525-530.
- Zaletel, K., et al. (2006). "Thyroid autoantibody production is influenced by exon 1 and promoter CTLA-4 polymorphisms in patients with Hashimoto's thyroiditis." International journal of immunogenetics **33**(2): 87-91.
- Zhang, Q., et al. (2013). "Ideal cardiovascular health metrics and the risks of ischemic and intracerebral hemorrhagic stroke." Stroke **44**(9): 2451-2456.
- Zhao, H.-Y., et al. (2014). "Meta-analysis of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene+ 6230G/A polymorphism and cancer risk." Clinical and Translational Oncology **16**(10): 879-885.

Zhao, S., et al. (2012). "Nitric oxide synthase 3 (NOS3) 4b/a, T-786C and G894T polymorphisms in association with diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis." Ophthalmic genetics **33**(4): 200-207.

Zis, P., et al. (2013). "Ambulatory blood pressure monitoring in acute stroke: pathophysiology of the time rate of blood pressure variation and association with the 1-year outcome." Blood pressure monitoring **18**(2): 94-100.

Zordoky, B. N. and A. O. El-Kadi (2010). "Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases." Pharmacology & therapeutics **125**(3): 446-463.

ANEXOS

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

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



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/SES-DF

PARECER Nº 0095/2010

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

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

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

Validade do Parecer: 15/12/2012

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

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

Brasília, 16 de dezembro de 2010.

Atenciosamente,

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

AL/CEP/SES-DF

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

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE

ANEXO B – Ficha de identificação dos participantes da pesquisa.

Nome do participante: _____

Nome do representante legal (se houver): _____

Idade: _____

Sexo: Masc. Fem.

Cor: _____

Estado Civil: _____

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

Hipertensão arterial: Sim Não

Pressão Arterial: _____

Diabetes: Sim Não

Glicemia: _____

Tabagismo: Sim Não Se sim, quantos maços por dia: _____Etilismo: Sim Não Se sim, quanto por dia: _____

Uréia: _____

Creatinina: _____

Plaquetas: _____

Escala de Glasgow: _____

Escala de Rankin: _____

Índice de Barthel: _____

Tomografia: _____

Angiografia: _____

Observações: _____

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente

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

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

Natureza e objetivos do estudo:

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

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

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

Procedimentos do estudo:

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

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

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

Riscos:

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

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

Benefícios:

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

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

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

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:

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

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

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

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

Confidencialidade:

Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

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

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

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

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

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

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

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

Brasília, _____ de _____ de _____

Participante

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Representante Legal

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

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

Natureza e objetivos do estudo:

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

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

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

Procedimentos do estudo:

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

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

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

Riscos:

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

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

Benefícios:

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

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

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

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo :

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

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

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

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

Confidencialidade:

Os registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

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

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

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

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

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

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

Responsável pelo Participante da pesquisa

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

Termo de Guarda de Material Biológico – Indivíduos “saudáveis”

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Assinatura do participante

Brasília, _____ de _____ de _____

Termo de Guarda de Material Biológico – Paciente

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

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

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

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

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

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

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

Assinatura do participante
Brasília, _____ de _____ de _____

Termo de Guarda de Material Biológico – Representante Legal

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Assinatura do participante
Brasília, _____ de _____ de _____

ANEXO E – Anais de Congressos

Anais do Congresso Brasileiro Internacional de Genética – Brazilian-International Congress of Genetics – 2016



Resumos do GENÉTICA 2016 – 62º Congresso Brasileiro de Genética - 11 a 14 de setembro de 2016
Hotel Glória - Caxambu - MG - Brasil
www.sbg.org.br - ISBN 978-85-89109-06-2



CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) -318 C/T polymorphism in Brazilian cases with hemorrhagic stroke

Cardoso, LCA¹; Perreira, IS¹; Ferrelira, LB²; Freire, DO³; Kogawa, EM⁴; Siqueira, LBN⁵; Silva, ICR⁶.

¹Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, Brazil; ²Centro Universitário de Brasília (Uniceub); ³Faculdade LS, Brasília, Brazil; ⁴Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; ⁵Curso de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ⁶Faculdade de Cellândia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.

ilgia.canongla@gmail.com

Palavra-chave: Keywords: Polymorphism genetic, CTLA4, hemorrhagic stroke, cytokines, aneurism.

Hemorrhagic stroke (HS) is one of the leading causes of mortality around the world and is an important health problem. It is a multi-factorial disease resulting from combination of environmental and genetic factors. The World Health Organization (WHO) reports that stroke has accounted for 15 million cases worldwide every year, of these more than 5 million die and another 5 million are permanently disabled. Most of these deaths are usually in developed countries. Pro-inflammatory cytokines are associated with stroke and functional polymorphisms of inflammatory genes maybe influence the incidence and outcome of others types of stroke. For individualized treatment and screening susceptible populations at risk of hemorrhagic stroke, it is important to find the genes involved at occurrence. In this study, we examined the Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA4) gene polymorphism. CTLA-4 is one of the most important immunosuppressive cytokines that inhibits T-cell activation and terminates the T-cell response by blocking signals stimulates via CD28. CTLA4 is located on chromosome 2q33 in humans and encodes cell surface molecules that play a dominant role in the regulation of T-cell activation. The aim of this study was to verify in a Brazilian population the association between CTLA4 (-318 C/T, rs5742909) gene polymorphism in the promoter region and the risk of developing stroke. There have been no previous studies examining this gene in the Brazilian population with HS. An PCR-RFLP was designed for screening the allele C and T of SNP rs5742909 in a Federal District (Brazil) sample with 126 HS or aneurism patients and 39 healthy persons paired by gender and age. After the calculation of allele and genotypic frequencies of each group were used statistical tests appropriate for each type of comparison. The heterozygous genotype CT was more prevalent on case group than the control group (34.1% and 15.4%, respectively) demonstrating a significant difference in frequencies between the groups ($P = 0.025$). *Odds ratio* indicate that the presence of genotype CT is a risk factor for HS/aneurism (OR: 2.849; CI: 1.11-7.32). Statistics differences were also observed in the clinical characteristics such as the diabetes presence ($P = 0.015$). In summary, this study demonstrated that presence of genotype CT at position -318 of the CLTA4 gene is a risk factor for HS/aneurism on Brazilians. In view of the complexity of the process to causes HS, we cannot exclude the possibility that polymorphisms in other genes can be also responsible for risk factors for HS.

Fonte de financiamento: Financial Support: Research supported by the University LS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq with support from Universidade de Brasília – UnB and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – FAP-DF.

Anais do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016



284. ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (ENOS/NOS3) INTRON 4 POLYMORPHISM IN CASES OF ANEURYSM AND HEMORRHAGIC STROKE IN BRAZIL

Cardoso LCA^a, Borges FSA^a, Pereira IS^a, Kogawa EM^b, Ferreira LB^c, Freire DO^d, Silva ICR^a

^a Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

^b Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF, Brazil

^c Centro Universitário de Brasília (UniCEUB), Brasília, DF, Brazil

^d Faculdade LS, Brasília, DF, Brazil

Objectives: The aim of this study was to verify, in a Brazilian population, the association between NOS3 intron 4 gene polymorphism and the risk of developing hemorrhagic stroke (HS) or intracranial aneurysm.

Materials and methods: The study included 92 cases, 39 with aneurysm and 53 with HS, and 92 healthy controls. For the final formation of the groups, the controls were age- and sex-paired to cases. NOS3 4a/b polymorphism was detected by PCR flanking the 27 bp repeat in intron 4 of the gene. The PCR products were electrophoresed on a 3% agarose gel. In the presence of eNOS a allele, a fragment with 393 bp was produced, while the eNOS b allele produced a fragment with 420 bp. An informed consent was obtained for each participant, and the study was approved by the Ethical Committee of FEPECS-DF. Demographic and clinical characteristics were compared by using the chi-squared and Fisher exact tests according to the presence of each eNOS 4a/b genotype. The significance level adopted was 5% ($p < 0.05$). All data analysis was performed in SPSS 22.0. **Results:** The frequency of minor allele of eNOS was higher in the case group (24.5%) than in the control group (17.4%). However, the difference did not reach statistical significance ($p = 0.095$). Also, no significant difference was found between HS and aneurysm related to the controls regarding the distribution of eNOS 4a/b genotypes ($p = 0.255$). The presence of the b/b genotype was not associated with systemic arterial hypertension ($p = 0.877$) or diabetes ($p = 0.369$) in the case group. Furthermore, the b/b genotype in case group was not related a good/poor prognosis based on the Rankin Scale ($p = 0.676$). **Discussion:** A Danish case-control study found that the b/b genotype of the intron-4 27-bp VNTR polymorphism was associated with aneurysmal subarachnoid hemorrhage and that the univariate association was driven by an interaction with sex: the b/b genotype was much more prevalent among male patients than among female patients. Conversely, the intron 4b/b genotype was shown as an important genetic risk factor for early-onset ischemic stroke in the Chinese population. On the contrary, according to some Chinese and Indian studies, the 4a allele was found to be a risk

factor for stroke. A Turkish study found no relevance between intron 4 VNTR polymorphism and ischemic stroke risk. However, there have been no previous studies examining this gene in the Brazilian population with aneurysm and hemorrhagic stroke (HS). **Conclusion:** The results indicate that the polymorphism NOS3 intron 4 is not a risk factor for predisposition of aneurysm and HS in Brazilian population.

276. IL6 -174 G/C POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH PREDISPOSITION AND POOR PROGNOSIS OF HEMORRHAGIC STROKE AND INTRACEREBRAL ANEURYSM

Borges FSA^a, Campos DHM^a, Cardoso LCA^a, Nóbrega OT^a, Kogawa EM^b, Ferreira LB^c, Freire DO^d, Silva ICR^a

^a Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

^b Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF, Brazil

^c Centro Universitário de Brasília (UniCEUB), Brasília, DF, Brazil

^d Faculdade LS, Brasília, DF, Brazil

Objectives: The interleukin 6 (IL6) is a pro-inflammatory cytokine that plays an important role in inflammatory processes and the immune system, among others. Evidence has shown that processes may influence the development of cerebrovascular disease. Polymorphisms in the promoter region of the coding gene IL6 may modify the structure and influence the circulating levels of the cytokine. Therefore, a case-control study was performed to assess whether there is an association between the il6 -174 g/c (rs1800795) polymorphic variants and aneurysm and hemorrhagic stroke (HS) in a Brazilian population. **Materials and methods:** Peripheral venous blood samples were collected from 92 patients with aneurysm/HS (aneurysm, n = 39; HS, n = 53) and 92 healthy individuals as control, as well as clinical characteristics. The gene amplification technique through the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and cleavage with the restriction enzyme NlaIII was used to identify the IL6 genotypes. In order to describe the categorical variables according to the presence of GG genotype, the chi-squared and Fisher exact tests were used. The significance level adopted was 5% ($p < 0.05$). All data analysis were performed in SPSS 22.0 **Results:** It was observed that individuals with IL6 -174G/C (rs1800795) GG genotype present a higher risk of HS or aneurysm when compared with those carrying the wild-type genotype, CC, and GC+CC ($p = 0.024$; odds ratio = 1.99; 95% CI: 1.09 to 3.63), 70/92 cases (47.8%) and 29/63 controls (31.5%) with GG genotype. There were more GG genotype patients with systemic arterial hypertension than patients with GC+CC genotype ($p = 0.005$; OR = 4.15; 95% CI: 1.47 to 11.71) was observed. Furthermore, an association was observed between the presence of GG genotype in case group and poor prognosis based on the Rankin Scale ($p = 0.002$). **Discussion:** The G allele is associated with an increase of IL-6 production, contributing to an excessive inflammatory process. Some studies have evaluated the association between IL6 -174G/C (rs1800795) polymorphic variants and cardiovascular diseases in several populations. Some of these studies did not demonstrate an association; nonetheless, most of them found an increase risk of stroke and cardiovascular events, mostly with the GG genotype. **Conclusion:** The results indicate that the polymorphism IL6 -174G/C (rs1800795) might be a risk factor for predisposition of aneurysm and HS in Brazilian population; it is associated with poor prognosis in these pathologies.