



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**PAULO AUGUSTO BAPTISTA DOS SANTOS**

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO HLA-G 14 pb  
INSERÇÃO/DELEÇÃO EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR  
ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E ANEURISMA INTRACEREBRAL**

CEILÂNDIA, DF

2014

PAULO AUGUSTO BAPTISTA DOS SANTOS

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO HLA-G 14 pb  
INSERÇÃO/DELEÇÃO EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR  
ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E ANEURISMA INTRACEREBRAL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, Universidade de Brasília, Faculdade de  
Ceilândia.

Orientador: Prof. Rodrigo Haddad

Co-Orientador: Profa. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

CEILÂNDIA, DF

2014

PAULO AUGUSTO BAPTISTA DOS SANTOS

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO HLA-G 14 pb  
INSERÇÃO/DELEÇÃO EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR  
ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E ANEURISMA INTRACEREBRAL**

BANCA EXAMINADORA

---

Orientador: Prof. Rodrigo Haddad  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Profa. Daiani Cristina Cilião Alves Haddad  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Prof. Diêgo Madureira de Oliveira  
(FCE/Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF

2014

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Luis Augusto e Cátia pelos ensinamentos, educação e esforços até aqui dedicados. Por serem minha base, e pela confiança em mim depositada. Amo vocês.

Aos meus irmãos Mário Pedro e João Guilherme, pela amizade e parceria desde sempre, além das vezes em que tiveram que me buscar no laboratório tarde da noite. Amo vocês independente das brigas ocasionais.

Ao meu amor, minha namorada Júlia pela paciência, amor, carinho, além dos conselhos e palavras de força nas horas difíceis.

Aos meus amigos como um todo, tanto da UnB, quanto da Católica e aqueles que estão comigo ao longo da vida.

Aos meus professores que contribuíram na minha formação acadêmica e no amadurecimento do meu caráter.

A professora Izabel por todo apoio, conselhos e orientação que sempre vieram independentes da hora e do dia da semana mesmo estando de licença maternidade e tendo que conciliar a minha orientação com a missão de ser mãe de primeira viagem.

Ao professor Rodrigo pela orientação e direcionamento. Pelos sábados passados no laboratório ensinando-me as técnicas necessárias para o desenvolvimento da pesquisa realizada e interpretação dos resultados.

## **Lista de abreviaturas**

AIT – Acidente Isquêmico Transitório

AVE – Acidente Vascular Encefálico

AVEH – Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico

IB - Índice de Barthel

ECG – Escala de Coma de Glasgow

ERm – Escala de Rankin

GOS – Glasgow Outcome Scale/ Escala de Resultados de Glasgow

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NIHSS – National Institute of Health Stroke Scale

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## **Sumário**

<b>RESUMO</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>47</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>59</b>

## **Lista de ilustrações**

**Figura 1** - Estrutura e localização do gene do HLA-G

**Figura 2** - Isoformas HLA-G

**Figura 3** - HLA-G e isoformas presente nos tecidos

**Figura 4** - Mecanismo de escape imunológico dependente de HLA-G em tumores

**Figura 5** - Gel de eletroforese da amplificação da região 3'UTR do HLA-G

**Tabela 1** - Fatores de risco estabelecidos AVE

**Tabela 2** - Distribuição da frequência e da porcentagem dos grupos estudados

**Tabela 3** – Estatísticas da média e erro padrão da idade, glicemia.

**Tabela 4** - Distribuição das características clínicas e escala de Glasgow, Rankin, NIHSS, Barthel, nos indivíduos pertencentes aos grupo caso (AVEH e Aneurisma).

**Tabela 5** - Estatísticas-resumo (média, erro padrão e mediana) da glicemia, creatinina e plaquetas dos grupos AVEH, aneurisma e AVEH-aneurisma.

**Tabela 6** - Distribuição das frequências genótípicas do polimorfismo 14 pb do gene HLA-G nos diferentes grupos (controle, AVEH e aneurisma)

**Tabela 7** - Distribuição das frequências genótípicas do polimorfismo 14 pares de base do gene HLA-G nos diferentes grupos (controle e caso- AVEH e aneurisma)

**Tabela 8** - Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo 14 pares de base do gene HLA-G nos diferentes grupos (controle e caso- AVEH e aneurisma)

## Resumo

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma doença grave, caracterizada pela desintegração, destruição ou interrupção do fluxo sanguíneo nas regiões do encéfalo. Características como tabagismo, hipertensão arterial, idade avançada e colesterol elevado, são descritos como fatores de risco para o desenvolvimento dessa patologia. Buscando descobrir novas origens da doença, estudos de genética humana são desenvolvidos no intuito de compreender mecanismos que possam culminar no desfecho e formação do AVE. Sendo assim estudos sobre polimorfismos buscam encontrar marcadores moleculares que estejam associados a doença e aplicá-los em estudos de genética populacional afim de avaliá-los. Em vista disso, o presente trabalho objetiva avaliar o polimorfismo de 14bp inserção e deleção do gene HLA-G ao AVE e ao aneurisma intracerebral. Para tal, 16 indivíduos controle e 103 indivíduos caso (portadores de AVE e/ou aneurisma) foram selecionados, e contribuíram com amostras de sangue e informações clínicas (idade, glicemia, sexo, presença ou ausência de hipertensão, tabagismo, diabetes, etilismo, creatinina e número de plaquetas). A extração de DNA do sangue total desses pacientes foi realizada, e posteriormente o PCR para amplificação da região de interesse foi feito. Em seguida realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% para identificação do tipo de polimorfismo entre os casos e os controles, no intuito de elaborar um perfil para esses grupos.



## **Abstract**

*The stroke is a severe disease, characterized by the disintegration, destruction or interruption of blood flow in encephalic regions. Characteristics such as smoking, hypertension, advanced age and high cholesterol, are described as risk factors for the development of stroke. To find new sources of disease, studies of human genetics are developed in order to understand the mechanisms that may culminate in the formation and outcome of stroke. Therefore, polymorphisms studies seek to find molecular markers that are associated with the disease and apply them in studies of population genetics in order to evaluate them. Indeed, this present study aims to evaluate the polymorphism 14bp insertion and deletion of the HLA-G gene in stroke and intracerebral aneurysm. For this, 16 control subjects and 103 case subjects (patients with stroke and/or aneurysm) were selected. They contributed by blood samples donation and clinical information (age, blood glucose, sex, presence or absence of hypertension, smoking, diabetes, alcoholism, creatinine and platelets). DNA from whole blood of these patients was extracted, and subsequently for PCR amplification of the region of interest was performed. Finally, electrophoresis in 10% polyacrylamide gel was performed to identify the type of polymorphism between cases and controls, in order to develop a profile for these groups.*

## **Introdução**

### **Acidente Vascular Encefálico**

Mais incapacitante que fatal, o AVE é a principal causa de incapacidade neurológica grave e acarreta custos enormes, medidos tanto em gastos com cuidados de saúde, como em perda de produtividade (Rowland, 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde o AVE é a terceira causa de morte mais comum nos países desenvolvidos e a maior causa de dependência funcional no Brasil e no Mundo (GO et al., 2014; HOWARD et al., 2011) (FURUKAWA; MATHIAS; MARCON, 2011).

O AVE caracteriza-se como um déficit neurológico focal, não convulsivo e repentino, evidencia-se por uma lesão cerebral secundária e um mecanismo vascular não traumático (KERNAN et al., 2014). Em suma, o acidente vascular encefálico é uma doença neurológica causada pela redução súbita do aporte sanguíneo em uma determinada região cerebral, desencadeada pela obstrução ou rompimento de uma artéria cerebral (JAUCH et al., 2013), sendo, portanto, subdividida em hemorrágico e isquêmico.

Os Acidentes Vasculares Encefálicos Hemorrágicos (AVEH) são um importante problema de saúde pública, e ocorre quando há ruptura de um vaso intracraniano e conseqüentemente extravasamento do sangue para o cérebro (hemorragia intracerebral) (SCHAEFER, 2014). No processo hemorrágico os vasos sanguíneos de pequeno calibre se contraem, resultando em uma baixa perfusão sanguínea para algumas regiões cerebrais. Existe ainda a possibilidade do sangue extravasar e lesionar células e estruturas nervosas próximas (NOUH; REMKE; RULAND, 2014). Além disso, o AVE pode iniciar-se a partir de outra condição patológica dos vasos intracranianos conhecida como aneurisma intracerebral, no qual o enfraquecimento anormal da parede dos vasos com maior incidência em zonas de bifurcação ou interseção de vasos, por ser uma região de fluxo mais turbulento, facilita sua ruptura. A ruptura desses aneurismas podem levar a uma hemorragia no espaço subaracnóide que envolve o cérebro e em algumas vezes no parênquima cerebral ((FROSEN et al., 2012); (JAJA et al., 2013); (LARSEN;

ASTRUP, 2013)). O aparecimento de aneurismas ocorre independentemente das paredes das artérias serem mais resistentes que as das veias (artérias possuem camadas musculares), pois essa resistência não é suficiente para suportar a tensão naquela região, fator este que ocasiona o aneurisma. As razões que levam a ruptura e desencadeiam AVE são diversas, mas a espessura da parede arterial, ausência de constituinte celular, deformidades morfológicas, fatores hemodinâmicos (relação entre a perfusão sanguínea) como hipertensão e lesões na parede da arterial (traumas, tumores, infecções) são fatores considerados importantes no aparecimento da AVE (ADAMCZYK et al., 2013). A classificação dos aneurismas é dada a partir da causa da fragilidade ou da lesão da parede do vaso que provoca esse aparecimento. Baseados nesses aspectos, os aneurismas podem ser classificados em os aneurismas arterioscleróticos (resultado de complicações em casos de aterosclerose avançada), aneurismas congênitos e aneurismas infecciosos (debilidade da parede arterial por diferentes tipos de infecções) (JAJA et al., 2013).

No processo de AVE isquêmico, há interrupção do fluxo sanguíneo, que pode ser devido a embolia ou trombose em áreas específicas do encéfalo. Na fisiopatologia do processo trombótico, o coágulo é formado no interior da artéria cerebral (normalmente artérias estreitadas por aterosclerose) bloqueando o fluxo sanguíneo, enquanto que no embólico, o coágulo sanguíneo (êmbolo) circula até o cérebro e bloqueia a artéria. Em alguns casos, a interrupção de fluxo sanguíneo pode ocorrer de forma temporária, condição esta conhecida como Acidente Isquêmico Transitório (AIT). O AIT consiste em um déficit neurológico focal originário de uma instalação súbita, que dura menos de 24 horas e desaparece sem sequelas (FAN et al., 2014).

De um modo geral, os sinais e sintomas do AVE estão associados a alterações neurológicas nas regiões do cérebro afetadas e que podem estar relacionadas a fala, coordenação, equilíbrio, movimento, entre outros (SORITA et al., 2014). O diagnóstico da doença é baseado na história clínica e diagnósticos diferenciais, como a tomografia computadorizada de crânio (BIESBROEK et al., 2013).

## Fatores de risco

A hipertensão é o principal fator de risco de AVE (MILLER et al., 2014). No Brasil, a hipertensão arterial é o fator de risco mais importante para doenças cerebrovasculares, sendo que 85% dos indivíduos com AVE apresentam hipertensão (LOTUFO; BENSENOR, 2013). Outro fator importante que está relacionado ao infarto cerebral (AVE) é a diabetes, que constitui risco para AVE devido a interação direta com a hipertensão e hiperlipidemia (LUITSE et al., 2012); em diabéticos de ambos os sexos, o risco de desenvolver um AVE é duas vezes maior (BRUNO et al., 2010). Em relação a etnias, estudos afirmam que o AVE atinge todas elas, mas com maior incidência nas de origem hispânicas e africanas (KOCH et al., 2013; WANG, Y.; RUDD; WOLFE, 2013). Além disso, outros fatores como o tabagismo pode influenciar no aparecimento do AVE, uma vez que estudos mostram que tabagismo aumenta ocorrência de AVE entre duas a quatro vezes em mulheres (SLEIMAN et al., 2013). Além disso, o tabagismo também tem influência no risco e gravidade do AVE e infarto cerebral (BEJOT et al., 2014);(XU et al., 2013).

Já em relação ao AVEH, estudos estabelecem que a hipertensão, tabagismo, diabetes, índice de massa corporal anormal e a idade, geram riscos maiores para o seu desenvolvimento. Entretanto, esses fatores não contam integralmente para o risco total da doença, pois diversas vias fisiológicas, desde o metabolismo de lipídios, regulação e controle da pressão arterial, coagulação e adesão celular, possuem papéis críticos na fisiopatologia desta comorbidade (WANG, X. et al., 2009). Evidências apontam que o AVEH é uma doença multifatorial complexa resultante de uma interação entre fatores genéticos e vários fatores ambientais (YAMADA et al., 2008). Portanto, no cuidado e prevenção do AVEH é crucial a identificação e controle dos fatores de risco como medidas de prevenção primária, enquanto que a prevenção secundária tem a caracterização de determinantes de recorrência e mortalidade após um evento isquêmico (WAGSTAFF et al., 2014).

Outros fatores estão relacionados com o risco de desenvolvimento de AVE, como idade, níveis de colesterol, uso de álcool e de anticoncepcionais. Estudos indicam que a idade também é levada em consideração quando relacionada com o fator de risco, uma vez que a incidência aumenta drasticamente após os 55 anos de

idade (CHRY SANT; CHRY SANT, 2014; GIANG et al., 2013). Outros trabalhos sugerem a interação direta do colesterol e que a sua baixa concentração no sangue aumenta o risco de hemorragia cerebral, enquanto em altos níveis predizem infarto cerebral (LIU et al., 2013). Já o uso abusivo de álcool predispõe a formação do AVE e AVEH (IKEHARA et al., 2013; RANTAKOMI et al., 2013).

Quando considerado o uso de anticoncepcionais associado ao tabagismo, estudos apontam um aumento da incidência de AVE isquêmico e hemorrágico principalmente em mulheres fumantes com idade superior aos 35 anos de idade, que possuam hipertensão arterial e apresentam enxaqueca (ZAKHAROVA et al., 2011). Entretanto, o tabagismo associado ao uso de baixas doses de anticoncepcionais à base de estrógeno como fator de risco ainda é controverso na literatura (RYAN et al., 2014) O'SULLIVAN; SCHMITZ, 1993).

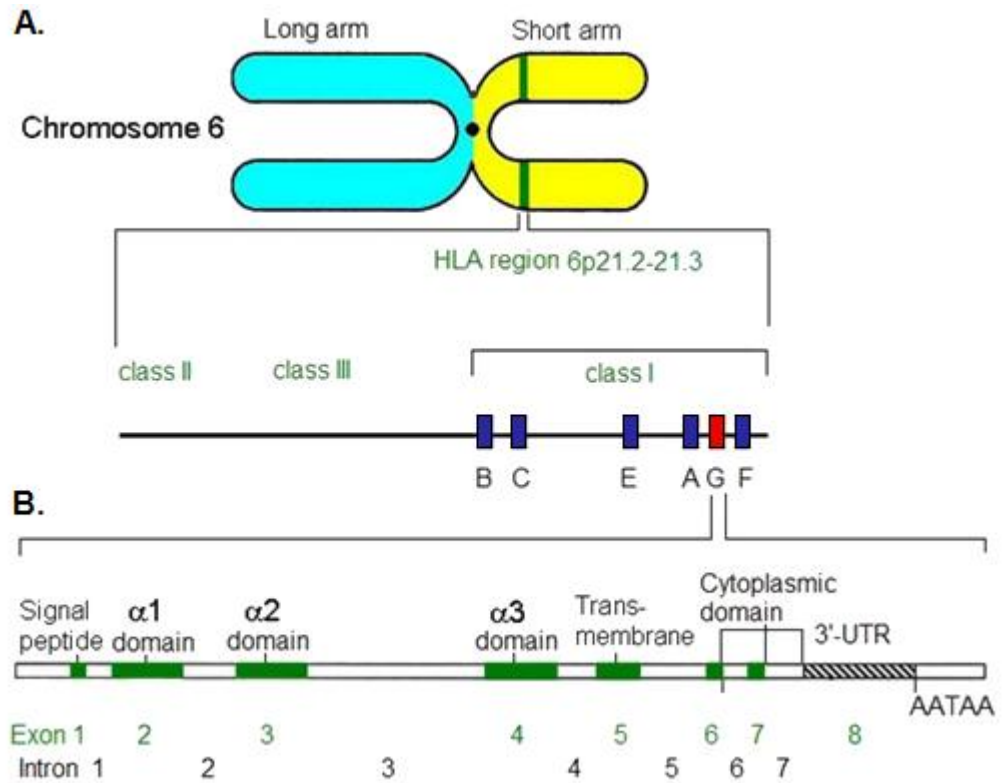
Por fim, as taxas de incidência de AVE variam completamente entre diferentes populações, devido às diferenças de prevalência de fatores de risco, portanto, como existem populações com incidência maiores que outras, sugere-se que características genéticas possam ser responsáveis por esse fator (ROGER et al., 2011).

## **HLA-G**

Os genes do complexo HLA são subdivididos em clássicos IA (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e não clássicos IB (HLA-E, HLA-F e HLA-G). Esses genes são considerados de grande variação e seu papel de apresentação de antígenos já é bem descrito e conhecido (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Portanto, o HLA-G (antígeno leucocitário humano) é uma molécula de HLA não clássica codificada pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que consiste em um grupo de moléculas do sistema imunológico o qual a principal função é apresentar fragmentos peptídicos de agentes patogênicos na superfície celular e assim induzir a resposta imune (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

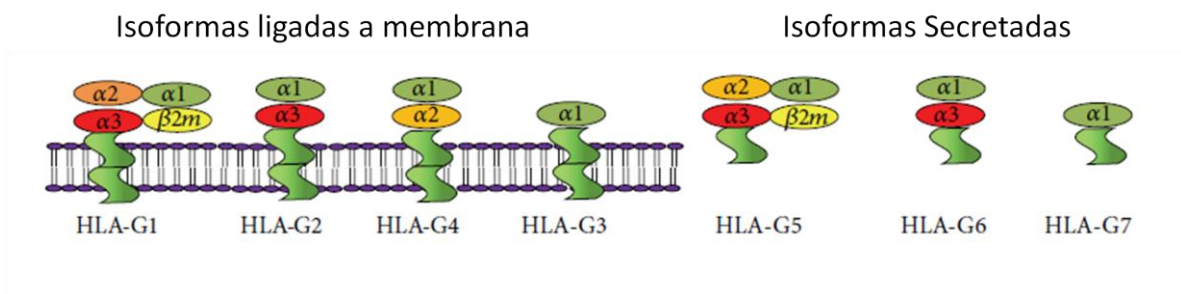
O gene do HLA-G localiza-se no braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.31 e apresenta 4396 pares de base, com oito éxons, sete íntrons e uma região 3' UTR, é caracterizado por baixas taxas de polimorfismo na região codificadora,

possui 47 alelos descritos (até o ano de 2012) com padrão de expressão limitado em condições saudáveis (Figura 1). O HLA-G tem uma característica única, dentre as moléculas de HLA, que é a de formar multímeros (BRENOL, et AL 2012).



**Figura 1: Estrutura e localização do gene do HLA-G (Atlas de Genética e Citogenética em Oncologia e Hematologia)**

O HLA-G é uma molécula de classe IB, cuja estrutura assemelha-se as moléculas clássicas do HLA de classe I, apresentando uma cadeia alfa constituída por até três domínios não covalentemente, associado a uma cadeia de  $\beta 2$ microglobulina.



**Figura 2: Isoformas HLA-G. Fonte: (ZILBERMAN et al., 2012)**

Por meio de splincing alternativo podem ser geradas sete isoformas diferentes da molécula, sendo quatro de proteínas de membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e três isoformas solúveis (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7) ((CAROSELLA et al., 2003); (DONADI et al., 2011)) (Figura 2). Além disso a forma HLA-G1 pode sofrer ação proteolítica e tornar se livre igual as isoformas solúveis. Essas isoformas secretadas são descrita como sHLA-G (ALEGRE et al., 2014).

As proteínas codificadas pelo HLA-G possuem baixa variabilidade, modulação do sistema imune e expressão restrita a alguns tecidos (DONADI et al., 2011). Fisiologicamente a expressão de HLA-G está restrita a alguns órgãos e tecidos em função da sua ação na tolerância imunológica. Essa ação foi descoberta estudando a sua expressão nas células trofoblásticas, e na sua correlação entre feto e mãe. Conseqüentemente, sabe se que em células embrionárias, especificamente as do trofoblasto, apresentam aumento da expressão de HLA-G (CAROSELLA et al., 2008). Esse aumento de expressão ocorre para que o sistema imune da mãe não rejeite o feto e permite assim que o feto se desenvolva. Estudos descreveram que o HLA-G está envolvido na inibição dos linfócitos T citotóxicos e das células NK (natural killer) o que permite o desenvolvimento do feto e uma relação com a modulação do sistema imune como demonstrado da figura 4 (LeMaout et al. 2004).

Além de ter a expressão restrita a tecidos saudáveis, a superexpressão de HLA-G pode ser induzida em condições patológicas (Figura 3), onde a sua função pode ser a de gerar tolerância para o indivíduo ou desencadear efeitos prejudiciais, dependendo da natureza da doença (CAROSELLA, et al 2008). Estudos demonstram que o HLA-G é expresso em baixas quantidades em tecidos específicos em adultos saudáveis, como em eritrócitos, células precursoras endoteliais, córnea, timo e células de Langerhans (CAROSELLA, et al 2008). Células dendríticas e macrófagos também podem expressar HLA-G (PARK GM et al. 2004) e a expressão anormal de HLA-G já foi descrita em condições não fisiológicas, como em infecções virais, câncer, transplantes, além de doenças autoimunes, o que sugere a importância do HLA-G como crucial para diferentes patologias (ALEGRE et al., 2014). Tomando como exemplo, pacientes submetidos a alotransplantes e que apresentam HLA-G super expresso, possuem uma maior taxa de sucesso, enquanto

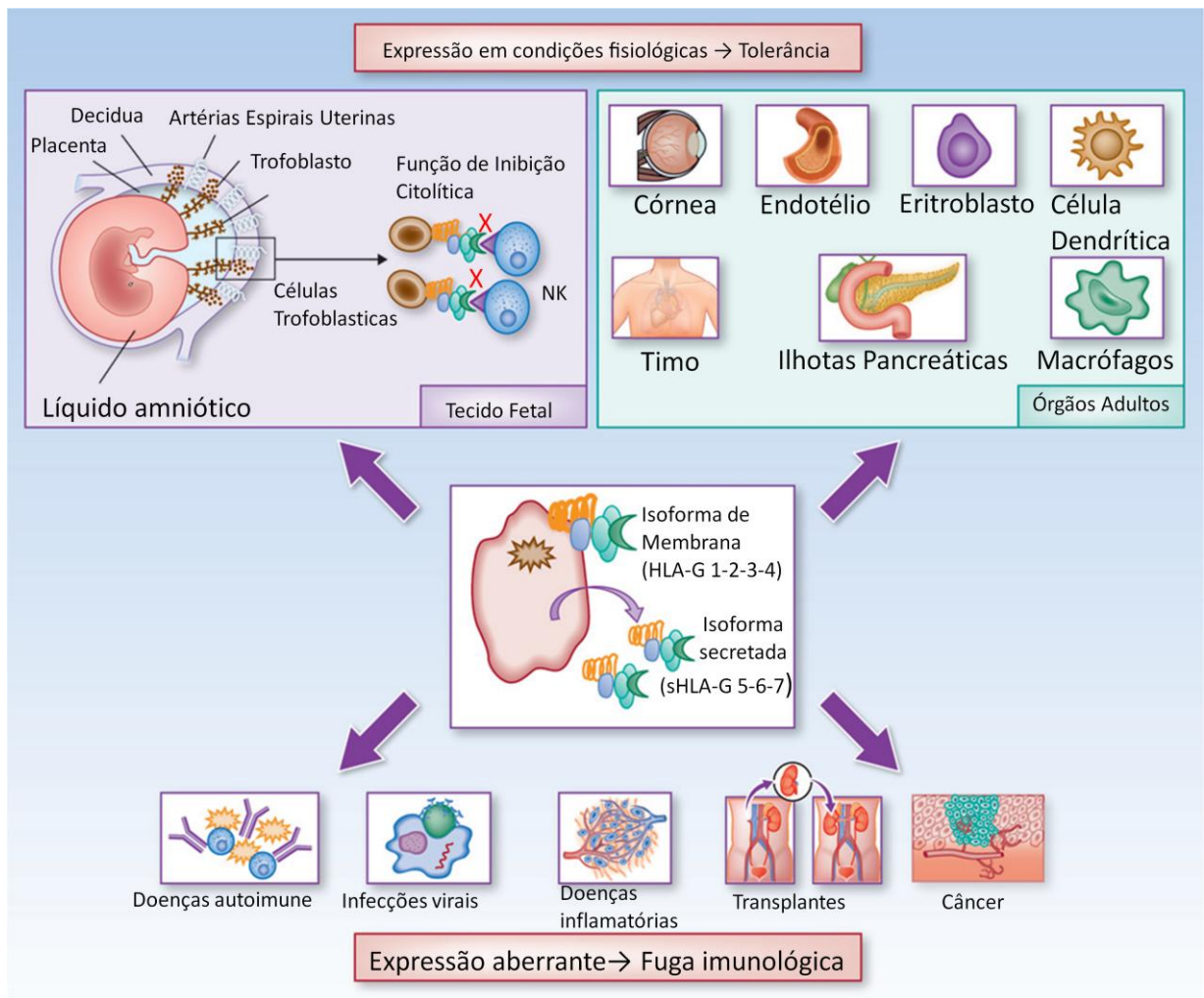
que em cânceres está associado ao desenvolvimento de tumores mais avançados (MENIER et al., 2010) .

HLA-G apresenta função imunotolerante e de inibição em células imunocompetentes diferentes. Esse efeito é mediado pela ação direta das isoformas circulantes e ligado a membrana. Sendo assim HLA-G interage diretamente com diferentes sub-populações de células imunitárias, incluindo células NK, células T e células apresentadoras de antígeno. Essa interação é acompanhada da geração a manutenção da tolerância em diferentes fases da resposta imunitária, desde atividades de diferenciação, proliferação e secreção citosinas (AMIOT et al., 2011). A indução da tolerância induzida pelo HLA-G consiste em direcionar a ligação com receptores inibitórios de células imunológicas tais como as NK, linfócitos T e células dendríticas (CANTONI et al., 1998), (LEMAOULT et al. 2004). O efeito de interação de HLA-G com os receptores inibitórios depende do seu estado de multimerização, ainda assim foi demonstrado uma ação direta na resposta imune desde inibição da atividade proliferativa de linfócitos T e células NK, até mesmo na inibição da maturação de células dendríticas e linfócitos citotóxicos (CAROSELLA, et al , 2011).

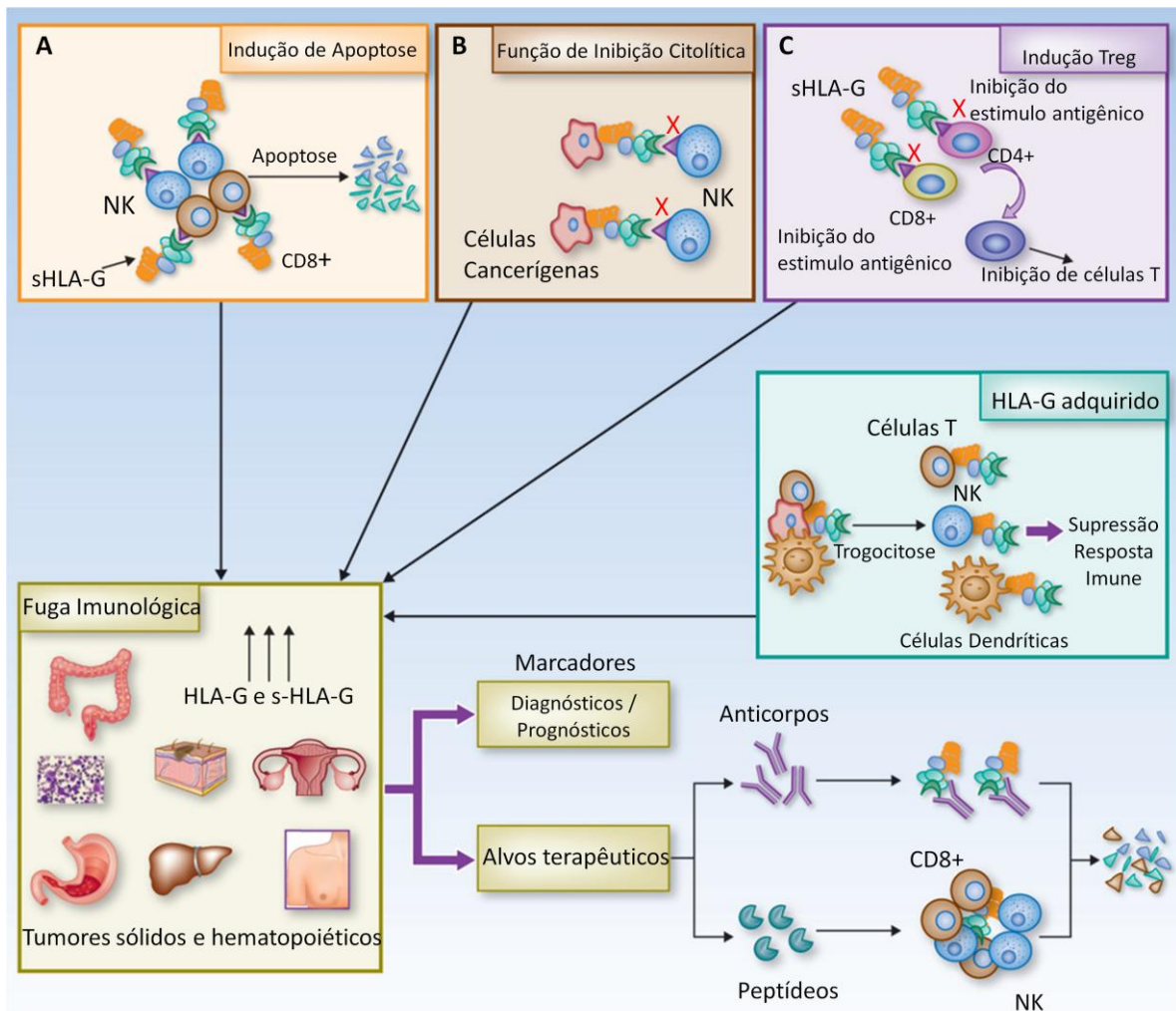
Sabendo da atividade reguladora de HLA-G, e ainda que alguns tumores podem apresentar HLA-G expresso, foi sugerido que ele desencadeia um papel prejudicial para a resposta imunológica do indivíduo contra o seu próprio tumor (PANGAULT et al., 2002), onde de fato a expressão de HLA-G pode inibir a atividade de linfócitos T citotóxicos e ainda induzir a diferenciação para a formação de linfócitos T regulatórios (LEMAOULT et al., 2004). Uma vez que os tumores passam a expressar HLA-G eles conseguem escapar da ação imunológica através de diversos mecanismos, como induzindo a apoptose por interação de sHLA-G com receptores CD8, pela interação célula-célula (onde as moléculas de HLA-G ligadas a membrana das células tumorais “passam” por meio de trogocitose as moléculas de HLA-G para as células NK), células T e células dendríticas ativas, resultando na supressão da resposta imune de diversos mecanismos como é demonstrado na figura 4 (CURIGLIANO et al.2013). Mais especificamente, no mecanismo de trogocitose, uma célula adquire o conteúdo citoplasmático ou fragmentos da membrana celular



de uma outra célula com quem interagiu e assim passa a expressar o antígeno da outra célula, como por exemplo o HLA-G.



**Figura 3: HLA-G e isoformas presente nos tecidos: é encontrado fisiologicamente no feto, derivado de células placentárias e em adultos em células de órgãos imuno-privilegiados, tais como a córnea, timo, ilhotas pancreáticas, eritroblastos, macrófagos, e precursores de células endoteliais. A expressão de HLA-G pode ser induzida em condições patológicas como em doenças autoimunes, inflamatórias, infecções virais e câncer ou em pacientes transplantados. Sendo que a expressão de HLA-G faz com que cânceres e vírus consigam escapar da resposta imune do organismo. Fonte: (CURIGLIANO et al., 2013)**



**Figura 4: Mecanismo de escape imunológico dependente de HLA-G em tumores. A)** Interação entre os receptores das células NK e células CD8+, com sHLA-G expresso no tumor faz com que as células CD8+ entrem em apoptose e as NK ativas sejam bloqueadas; **B)** Células NK ativas sendo bloqueadas diretamente pela interação com as células tumorais que expressam sHLA-G; **C)** Na presença de sHLA-G as células CD4+ e CD8+ perdem a capacidade de reagir a estímulos antigênicos e estímulos diferenciais de células T regulatórias; **D)** Durante a interação célula-célula, as moléculas de HLA-G ligadas a membrana das células tumorais são “adquiridas” pelas células NK ativas, células T e células dendríticas, através de trogocitose, o que resulta na supressão da atividade imune. Fonte: (CURIGLIANO et al., 2013)

A produção de HLA-G é regulada por vários sítios, tanto na região promotora quanto na região não traduzida (3'UTR) que modifica a afinidade das sequências pré e pós-transcricional (SOLIER et al., 2001). Essa regulação ocorre através

modificação da região promotora, que faz com que aumente a afinidade das sequências do gene e direcionem os fatores de transcrição, aumentando assim a expressão desse gene. Ou ainda através de modificações pós transcricionais (ROUSSEAU et al., 2003). Têm sido demonstrado que polimorfismos na região promotora 3' não traduzida (3'UTR) do gene HLA-G, é relacionado com diferenças de expressão da proteína codificada por ele. Dentre os polimorfismos presentes nessa região, destaca-se um polimorfismo de fragmento que pode ser de deleção ou inserção de 14 pares de bases (pb); a inserção de 14 (pb) está associada a níveis reduzidos de RNA mensageiro. Foi demonstrado que as transcrições com a sequência 14 pb (ins) podem sofrer uma etapa adicional de splicing que retira 92 pb da região em que esta sequência está localizada, tornando este RNA mensageiro mais estável em relação a isoformas completas (ROUSSEAU et al., 2003). Dessa forma o polimorfismo de inserção/deleção de 14 pb localizado na posição +2960 no éxon 8 (rs1704) tem se mostrado importante devido ao seu papel potencial de splicing alternativo e na estabilidade do RNA mensageiro (ROUSSEAU et al., 2003).

Outros polimorfismos também tem sido descritos como importantes na regulação dos níveis de expressão gênica do HLA-G. O polimorfismo posição 3187 do exon 8 está relacionado com a estabilidade do RNA mensageiro e conseqüentemente com a expressão de HLA-G no tecidos ((HVIID et al., 2003)). Nesta posição (3187) a deleção em um dos alelos garante uma estabilidade maior, enquanto que a inserção de uma adenina diminui a estabilidade do RNA mensageiro (Estibaliz Alegre et al 2014). Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) como a de citosina por guanina na posição 3142 bp têm demonstrado influencia direta na expressão desse gene, uma vez que essa mudança aumenta a afinidade dessa região por microRNAs e que posteriormente tem um efeito supressor sobre o RNA mensageiro.

### **Problema a ser abordado**

Desde a década de 70, estudos vem demonstrando que fatores intrínsecos do próprio organismo humano como idade, condições fisiológicas, doenças crônicas, estilo de vida, infecções oportunistas, características genéticas individuais, entre

outros, podem influenciar na susceptibilidade, gravidade e desfecho de doenças (CHAPMAN; HILL, 2012; STANKIEWICZ; LUPSKI, 2010). Os polimorfismos consistem em variações na sequência de pares de bases do DNA que faz com que os indivíduos sejam diferentes entre si, mesmo com 99% da informação genética sendo similar para todos os indivíduos da espécie humana (ABECASIS et al., 2010; PANG et al., 2010). Estatisticamente estima-se que ocorram variações no DNA humano na média de 1 a cada 300 a 500 pares de base, ou seja, aproximadamente 10 milhões de polimorfismos em 3 bilhões de pares de base que compreendem o genoma humano (FEERO; GUTTMACHER; COLLINS, 2010; LANDER, 2011). Nesse contexto diversos tipos de polimorfismos estão descritos e as variações são decorrentes de eventos como as deleções (perda de um segmento nucleotídeo parcial ou completo), inserções (adição de um ou mais nucleotídeos a sequência), transições (substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina) ou duplicações (adição de um segmento nucleotídeo homólogo) de um par de bases a centenas ou milhares de pares de base do DNA (MARDIS, 2011), modificando assim a matriz de leitura de todas as trincas de pares de bases. (KORNMAN *et al.*, 1997).

Os polimorfismos são elementos chave em estudos de pesquisa e genética humana. Tanto para relacionar o funcionamento normal quando para entender os processos de saúde e doença. Sendo assim, quando um determinado genótipo está relacionado a uma patologia, estudos funcionais são realizados no intuito de encontrar a função do polimorfismo na patogênese da doença. Portanto, os polimorfismos são utilizados como marcadores para localizar genes associados a doenças em estudos genéticos populacionais de ligação e associação, a partir de cálculos das frequências alélicas e observação da diferença genotípica entre casos e controles (SCHNEIDER; SCHMIDTKE, 2014). Dessa forma é imprescindível a identificação das relações entre esses polimorfismos e a fisiopatologia da doença, para o desenvolvimento de medidas preventivas e novos tratamentos (HART; MUENKE, 2014); LU *et al.*, 2013).

Em relação ao HLA-G, já foi demonstrado que o HLA-G atua como regulador da resposta imune em diversas condições inflamatórias (Carosella ED, et al. 2001)

como as vasculites, que por sua vez afetam a estrutura histológica das paredes dos vasos e frequentemente podem desencadear processos trombóticos e leões isquêmicas, associadas com doenças sistêmicas. A ocorrência concomitante de arterite cerebral, doenças infecciosas e vasculites de etiologia imunológica são amplamente conhecidas (Younger et al, 1997), (Guimarães Rocha et al, 2001). Além disso, estudos demonstram que o HLA-G está relacionado com hemorragia cerebral (Enrico Fainardi., et al 2011).

A região 3'UTR do gene do HLA-G possui diversos elementos regulatórios, como o sítio responsável pela sinalização de poliadenilação do RNA mensageiro, que é fundamental para a estabilidade do transcrito primário. Esse transcrito deve ser processado onde liga-se a proteínas estabilizadoras antes de migrar para o citoplasma (Aguilera et al 2005). As proteínas ligadas ao RNA mensageiro influenciam diretamente na tradução e degradação, assim como os polimorfismos da região 3'UTR. Estudos mostraram que diferentes genótipos na região 3'UTR podem influenciar diretamente no prognóstico de pacientes. Como exemplo, foi demonstrado que mulheres homocigotas para a Ins/Ins de 14pb apresentam menor fertilidade e maiores riscos de abortos recorrentes (O'BRIEN et al., 2001; HVIID, 2004a; HVIID et al., 2004; HYLENIUS et al., 2004). Somado a importância do padrão polimórfico do HLA-G no prognóstico de diferentes processos fisiológicos e patológicos, sabe-se que variantes polimórficas em genes envolvidos em funções endoteliais, inflamação, metabolismo lipídico e trombose estão associados a doenças circulatórias (GURURAJAN et al., 2011; LEKAKIS et al., 2008). Além disso, indícios indicam que o HLA-G pode desempenhar um importante papel na remodelação vascular (CARTWRIGHT; WAREING, 2006; LE BOUTEILLER et al., 1999) pois o sHLA-G1 inibe a proliferação de células endoteliais através de ativação de mecanismos apoptóticos. Essa atividade é desejável em condições onde exista formação de canais microvasculares formados em regiões de deposição de placas de aterosclerose (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011).

Um estudo recente demonstrou que polimorfismos localizados no gene do HLA-G estão associados com a doença de Kawasaki, um vasculite aguda de caráter auto-limitante e que afeta crianças e adultos (KIM et al., 2008). Além disso, foi

demonstrado que genótipo Ins/Ins esta associado com o desenvolvimento de hipertensão em pacientes diabéticos (GARCIA-GONZALEZ et al., 2014). A hipertensão é uma variável clínica que esta associada com o polimorfismo de 14pb. Constatou se que pacientes com o genótipo Ins/Ins no grupo com diabetes melitus são quase duas vezes mais suscetível a apresentar hipertensão do que indivíduos homozigoto para deleção (Del/Del).

Em suma, a participação do HLA-G em processos fisiológicos e patológicos incluindo eventos relacionados a diversos aspectos como a remodelação vascular, e a presença de associação de polimorfismos de seu gene com doenças relacionadas a vasos sanguíneos, torna importante o presente estudo, principalmente por abordar especificamente um polimorfismo que leva a alterações nos níveis de HLA-G.

## Justificativa

A Organização Mundial de Saúde considera o acidente vascular encefálico (AVE) como uma doença grave, sendo a terceira causa de morte mais comum em países desenvolvidos (GO et al., 2014; HOWARD et al., 2011) e que está frequente em serviços hospitalares.

Sua incidência está associada a fatores de risco modificáveis e não modificáveis, onde os principais são hipertensão e a idade, respectivamente (SUNDSETH et al., 2014)(tabela 1). As rupturas de vasos (NOUH et al., 2014) e/ ou a interrupção do fluxo sanguíneo por embolia ou trombose (OVERGAARD, 2014) são os fatores associados. Dessa forma, o presente estudo foca se na causa da doença por ruptura de vasos, conhecida como AVE do tipo hemorrágico.

**Tabela 1: Fatores de risco estabelecidos AVE**

<b>Riscos modificáveis</b>	<b>Riscos não modificáveis</b>	<b>Outros</b>
Hipertensão	Idade	Álcool
Diabetes	Sexo	Infecção
Fumo	Raça	Homocisteína elevada
Fibrilação atrial	Etnia	Processo Inflamatório
Outras doenças cardíacas	Hereditariedade	Anticorpo antifosfolípídeo
Hiperlipidemias		
Sedentarismo		
Estenose carotídea assintomática		

Ataques isquêmicos  
transitórios

---

**Fonte:( Chaves, 2000)**

Com a finalidade de descobrir novas origens da doença, principalmente em relação a genética humana, estudos sobre polimorfismos são realizados, pois os mesmos são utilizados como marcadores para localizar genes associados a doenças em estudos genéticos populacionais (SCHNEIDER; SCHMIDTKE, 2014).

Portanto com base em pesquisas e estudos, sabe se que o polimorfismo 14bp do HLA-G está relacionado a infecções virais, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, cânceres (Haddad, et al 2011; Donadi E.A, et al 2011; Brenol C.V. 2012; Curigliano et al.2013).

Sendo assim, o presente trabalho objetiva avaliar a associação do polimorfismo 14bp do HLA-G ao AVE hemorrágico e ao aneurisma intracerebral, gerando assim informações para o desenvolvimento de medidas preventivas e de novos tratamentos para a doença.



## **OBJETIVOS**

**Objetivo geral:** Identificar polimorfismos no gene da HLA-G e sua possível associação com acidente vascular encefálico hemorrágico e ao aneurisma intracerebral.

### **Objetivos Específicos:**

- Identificar a frequência do polimorfismo na região 14bp do HLA-G em indivíduos portadores de acidente vascular encefálico hemorrágico e/ou aneurisma intracerebral atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal-Brasil;
- Comparar as frequências gênicas com aquelas observadas em indivíduos não portadores de doenças crônicas, habitantes da mesma região, e promover, desta forma, um estudo de caso-controle;
- Investigar aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes portadores da patologia e compará-los com indivíduos do grupo controle, quando for o caso.

## **Metodologia**

### **Aprovação em comitê de ética de pesquisa e ficha de avaliação clínica**

Submeteu-se o projeto junto ao comitê de ética (ANEXO A), e após aprovação, coletou-se os dados pessoais dos participantes da pesquisa e através do preenchimento de uma ficha de identificação específica (ANEXO B) onde cada paciente foi avaliado e caracterizado.

### **Ficha Individual dos pacientes**

Na ficha individual de cada paciente foi descrito as seguintes variáveis: idade, sexo, cor, estado civil, data do registro da patologia estudada, presença de hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, etilismo. Além disso, exames laboratoriais como parâmetros bioquímicos e celulares como uréia, creatinina e plaquetas foram observados. Foram obtidas também informações sobre a escala de Glasgow, Escala de Rankin, Escala de NIHSS, índice de Bartel, ICH. Além disso, a investigação por neuroimagem por tomografia e angiografia também foram adquiridas dos prontuários, sendo que a angiografia pode ser útil para investigar as causas vasculares.

### ***Classificação dos pacientes em escalas (Glasgow, Rankin, NIHSS, Bartel, ICH)***

Nos serviços de emergência, a avaliação neurológica deve abranger principalmente a gravidade do AVC, o seu tipo e sua localização.

A escala de Rankin (ERM) é usado para avaliar a incapacidade (*disability*). Utiliza-se na avaliação da recuperação neurológica e como *end-point* primário (prognóstico) em estudos clínicos para o tratamento do AVC (acidente vascular cerebral). A versão utilizada da escala modificada de Rankin consiste de 6 categorias que variam de 0 a 5, sendo que o escore 6 consiste em óbito nos estudos clínicos. A escala visa avaliar a capacidade do indivíduo em desempenhar as atividades cotidianas, baseada na incapacidade global (em particular a incapacidade física), na assistência para realizar atividades instrumentais e básicas

da vida com ênfase no comprometimento motor. É um instrumento que pode ser aplicado por qualquer profissional da área da saúde, e que possui moderada confiabilidade entre diferentes observadores (BRUNO; SWITZER, 2013).

O Índice de Barthel (IB) assim com a escala de Rankin, consiste na avaliação da incapacidade (*Disability*) mensurada em 10 aspectos básicos da atividade diária. Relacionadas à mobilidade, cuidados pessoais (alimentação, higiene pessoal, controle dos esfíncteres vesical e intestinal, independência no banheiro, transferência da cadeira, marcha e capacidade para subir escadas). É um instrumento que vem sendo bastante utilizado como medida de prognóstico pós-AVE. Utiliza também para a avaliação de outras desordens neurológicas. O escore varia de 0 a 100 (com intervalos de 5 pontos) onde 100 (máximo) consiste em independência total e 0 dependência total. As pontuações abaixo de 50 caracterizam dependência. (CIONCOLONI et al., 2012). O IB avalia de duas diferentes maneiras: (a) Quanto à classificação prognóstica - Grupo I: 0 a 45 pontos= incapacidade severa; Grupo II: 50 a 70 pontos=moderada; Grupo III: 75 a 95 pontos=leve e Grupo IV: 100 pontos=independência funcional; (b) Quanto aos agrupamentos funcionais Grupo A: auto-cuidados (itens 1 a 7: alimentação, banho, apresentação pessoal, vestir, cuidados com intestinos e bexiga, e uso do banheiro) e Grupo B: mobilidade (itens 8 a 10: deambulação, transferência do leito para cadeira e subir escadas).

A *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) consiste de uma escala de padronização, validação, e quantificação da severidade e magnitude do déficit neurológico após o AVE. A escala baseia-se em 11 itens do exame neurológico como nível de consciência, desvio ocular, paresia facial, linguagem, fala, negligência/extinção, função motora e sensitiva dos membros e ataxia. A pontuação de NIHSS varia de 0 (sem evidência de déficit neurológico pela esfera testada na escala) a 42 (paciente em coma e irresponsivo). Dos 42 pontos na NIHSS, 7 pontos estão diretamente relacionados com a linguagem (orientação 2, comandos 2, afasia 3) e somente 2 pontos relativos a negligência (MARTIN-SCHILD et al., 2011).

A escala de AVE do NIH auxilia no seguimento neurológico e na decisão terapêutica, sendo que pacientes com menos de 4 pontos apresentam déficits leves, enquanto que pacientes com mais de 22 pontos têm um alto risco de desenvolver hemorragia sintomática, necessitando assim avaliação caso a caso. Apesar disso,

sugere-se a utilização da escala de coma de Glasgow para auxílio no segmento do exame neurológico (KWAH; DIONG, 2014).

A escala de coma de Glasgow (ECG) consiste em um método confiável para registrar o nível de consciência de um indivíduo, portanto avalia-se na etapa inicial e de forma continuada. Esses valores são utilizados no prognóstico do paciente e na previsão de sequelas casuais. Inicialmente avalia-se o nível de consciência logo após o trauma encefálico. A interpretação desta escala consiste da seguinte maneira: 3 = Coma profundo; (85% de probabilidade de morte); 4 = Coma profundo; 7 = Coma intermediário; 11 = Coma superficial; 15 = Normalidade (BARLOW, 2012).

Outra escala utilizada foi a "ICH Score", que consiste da análise de variáveis clínicas e tomográficas de forma associada, propiciando assim acurácia na determinação da mortalidade e no bom prognóstico funcional. Nessa análise, leva-se em conta a pontuação de cinco componentes relacionados a hemorragia intracerebral espontânea (SICH): Escala de Glasgow Outcome (GOS), volume ICH, presença de hemorragia intraventricular, origem infratentoriais e idade. Onde a pontuação total ICH é a soma desses pontos, que variam de zero a seis, sendo que um escore de 6 indica alto risco de mortalidade (WANG, W. et al., 2013)

As escalas para análise de hemorragia intracerebral espontânea possibilitam o entendimento fisiopatológico da doença, além de auxiliar na determinação da mortalidade e dependência funcional.

### ***Procedimentos técnicos e laboratoriais***

#### ***Coleta de material para análise de Patologia Molecular clínica***

Os participantes foram submetidos a coleta de aproximadamente 10 mL de sangue por meio de punção de veia periférica, utilizando materiais estéreis e descartáveis. 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.

As amostras de sangue dos participantes foi encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Bioprospecção e Neurociências (Instituto de

Ciências Biológicas, Universidade de Brasília), onde lá foram estocados sob a guarda da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari para posterior etapa de extração do DNA das amostras. As amostras foram fracionadas com o Laboratório de Análises Clínicas da FCE sob supervisão da professora Dra Izabel Cristina Rodrigues da Silva.

### ***Participantes da pesquisa***

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 aneurisma intracerebral.

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

O grupo controle consistia de indivíduos de ambos os sexos, idade maior que 18 anos, sem AVEH e aneurisma intracerebral, que não tivessem parentesco com os pacientes do grupo caso, sendo que os critérios de exclusão foram indivíduos menores de 18 anos, parentes de indivíduos com AVEH e/ou aneurisma intracerebral, indivíduos que não desejavam participar da pesquisa.

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes do presente estudo no intuito de informa-los sobre o intuito do estudo e em condições de compreender e assinar o TCLE. Os pacientes que não apresentavam condições clínicas de compreender o termo de consentimento devido à sua patologia, tiveram suas solicitações do TCLE encaminhada ao responsável legal dos pacientes. Foi também obtido um TCLE de indivíduos sem as patologias a serem estudadas, que fazem 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.

### ***Termo de Guarda de Material Biológico***

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

Aos indivíduos 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 possui acesso a seus dados genéticos, assim como o direito de retirá-los do banco onde se encontram armazenados, a qualquer momento.

### **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). A concentração de DNA foi determinada pela quantificação no NanoDrop, onde posteriormente ajustou-se a concentração de DNA para cada amostra nas reações de amplificação.

### **PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo**

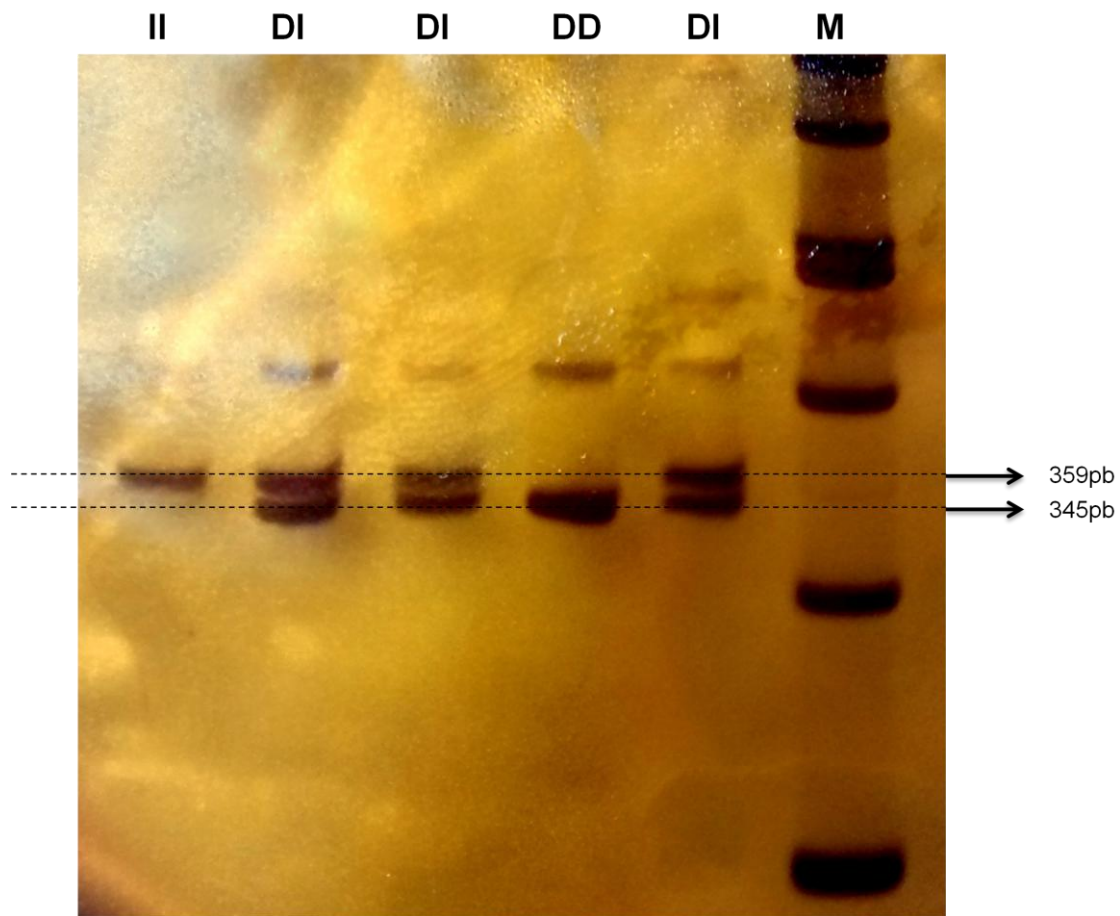
As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar o polimorfismo HLA-G

Toda a região 3'UTR do gene HLA-G foi amplificada por PCR, conforme descrito Bermingham et al. 2000, utilizando os primers HLAG8R –

GTCTTCATTTATTTTGTCTCT e HLAG8F – TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT. As condições de termociclagem foram 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial), seguida por 31 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, acompanhada de 58°C por 25 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 25 segundos para a extensão dos fragmentos. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos. O equipamento utilizado foi termociclador Techne modelo TC-512.

Em cada reação, foram utilizados 5,0 µL de DNA genômico na concentração de (15±) ng/µL; 2,5µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl); 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 2,0 µL de dNTPs (2,5mM; LGC); 0,4 µL de Taq-Polimerase (Fermentas, 5U/µL); 1,0µL de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse* (10µM); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação.

O produto desta PCR é um fragmento de 345-pb quando deleção e 359-pb quando inserção. Essa identificação é feito por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corado por impregnação pela prata, conforme exemplo a seguir (Figura 5).



**Figura 5 - Gel de eletroforese da amplificação da região 3'UTR do HLA-G. (DD) Homozigoto para deleção dos 14 pb; (DI) Heterozigoto para deleção e inserção; (II) Homozigoto para inserção de 14 pb; (M) Marcador.**

Na figura 5 está representada a eletroforese, em gel de poliacrilamida a 10% e corado com prata, das amplificações da região 3'UTR do HLA-G. Os fragmentos de 345 pb e 359 pb indicam que um alelo de 14 pb está ausente na sequência menor e presente na maior. Os indivíduos que apresentam os fragmentos nos dois alelos são homozigotos para inserção (II), os indivíduos que apresentam apenas um fragmento são heterozigotos (DI) e os indivíduos que tem ausência do fragmento nos dois alelos são homozigotos para deleção.



## **Análise estatística**

### ***Estimativa das frequências genotípicas e alélicas***

As frequências genotípicas e léticas foram contabilizadas através de contagem direta, utilizando o programa SPSS versão 20.0. A comparação das distribuições dessas frequências foi feita através das aplicações dos testes qui-quadrado e ANOVA com pós teste de Tukey, de forma a detectar possíveis associações dos genótipos entre os grupos avaliados, grupo caso e grupo controle. Foram consideradas associações com probabilidades menores que 5% ( $P < 0,05$ ).

### ***Análise dos dados dos sujeitos de pesquisa.***

Também foram estimadas as frequências de características dos sujeitos de pesquisa, considerando: 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).

Subsequente a isso, as características clínicas do grupo controle foram descritas estatisticamente, seguindo como exemplo as escalas de Glasgow, Rankin e NIHSS; o Índice de Bartel; e exames laboratoriais tais como os exames bioquímicos, tomografia e angiografia.

Para todas estas variáveis, a comparação das distribuições das frequências foi aplicado o teste do qui-quadrado e ANOVA com pós teste de Tukey, Foram consideradas associações com probabilidades menores que 5% ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### *Características dos sujeitos*

Na tabela 2 estão descritas características dos sujeitos de pesquisa analisados conforme o grupo. Foi observado que, em relação ao sexo, 8 sujeitos do grupo controle (50,0%) eram homens, e que esta distribuição percentual não era diferente estatisticamente ( $P = 0,740$ ) dos demais grupos: AVEH (45,0%), Aneurisma (39,5%). A diferença estatística não foi observada também na distribuição da presença indivíduos com hábito de fumar (31,3% do grupo controle; 40,0% do grupo AVEH e 39,5% do grupo aneurisma;  $P = 0,807$ ); e da ingestão de bebidas alcoólicas (25,0%; 35,0%; e 16,3%; respectivamente,  $P = 0,105$ ). Porém, a presença de hipertensão arterial (HAS) era a diferença marcante entre os grupos, sendo apenas 12,5% dos sujeitos do grupo controle eram portadores desta característica, contra 75,0% dos sujeitos com AVEH e 72,1% dos sujeitos pertencentes do grupo aneurisma ( $P = 0,000$ ). Também em relação ao diabetes, quatro sujeitos do grupo aneurisma eram portadores da patologia, e assim, proporcionalmente o grupo aneurisma diferia estatisticamente dos demais ( $P=0,026$ ).

Para a análise das características quantitativas dos sujeitos, construiu-se a tabela 3. Não observada uma diferença significativa na proporção de indivíduos com relação à idade ( $P = 0,054$ ), e, portanto, os sujeitos do grupo controle, AVEH e aneurisma apresentavam, em média, a mesma idade. Por outro lado, neste tipo de análise foi possível notar que, os grupos se diferenciavam quanto à glicemia média, e o grupo aneurisma era portador da maior glicemia média ( $120 \pm 4$  mg/dL).

**Tabela 2- Distribuição da frequência e da porcentagem dos grupos estudados (controle, AVEH, aneurisma, AVEH) segundo o sexo, presença de HAS e diabetes, tabagismo e etilismo.**

Grupo			
AVEH	Aneurisma	Controle	Total

		N	%	N	%	N	%	N	%	P
Sexo	masculino	27	45,0	17	39,5	8	50,0	52	43,7	0,740
	feminino	33	55,0	26	60,5	8	50,0	67	56,3	
	Total	60	100,0	43	100,0	16	100,0	119	100,0	
HAS	sim	45	75,0	31	72,1	2	12,5	78	65,5	0,000*
	não	15	25,0	12	27,9	14	87,5	41	34,5	
	Total	60	100,0	43	100,0	16	100,0	119	100,0	
Diabetes	sim	0	0,0	4	9,3	0	0,0	4	3,4	0,026*
	não	60	100,0	39	90,7	16	100,0	115	96,6	
	Total	60	100,0	43	100,0	16	100,0	119	100,0	
Tabagismo	sim	24	40,0	17	39,5	5	31,3	46	38,7	0,807
	não	36	60,0	26	60,5	11	68,8	73	61,3	
	Total	60	100,0	43	100,0	16	100,0	119	100,0	
Etilismo	sim	21	35,0	7	16,3	4	25,0	32	26,9	0,105
	não	39	65,0	36	83,7	12	75,0	87	73,1	
	Total	60	100,0	43	100,0	16	100,0	119	100,0	

\*diferença estatística ( $P < 0,005$ ); teste qui-quadrado

**Tabela 3- Estatísticas-resumo (média e erro padrão) da idade e glicemia dos grupos controle, AVEH e aneurisma.**

	Grupo								P
	AVEH		Aneurisma		Controle		Total		
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	
Idade	55	1	52	1	56	2	54	1	0,054
Glicose (mg/dL)	114	4	120	4	99	2	114	3	0,045*

#Conforme o teste estatístico ANOVA.

Na tabela 4, avalia-se a diferença na proporção de indivíduos nas escalas: Glasgow, Rankin, NIHSS e Barthel. Não foi observada diferença na proporção de indivíduos entre os grupos na Escala de Glasgow ( $P=0,066$ ), e somente nesta escala, dado que proporcionalmente, os indivíduos do grupo AVEH diferiam estatisticamente do grupo Aneurisma. Em relação às escalas, foi possível verificar que a maioria dos indivíduos foi considerada em normalidade, conforme a escala de Glasgow (sendo que seis indivíduos com AVE apresentava coma intermediário; quanto à avaliação funcional, em conformidade com a escala de Rankin, observou-se que mais de três quartos dos indivíduos em cada grupo, apresentavam no máximo uma incapacidade leve, sendo portanto capazes de realizar suas necessidades especiais). Porém, pelo índice de Barthel, para os grupos AVEH. 18,3% dos indivíduos apresentou incapacidade severa para realizar aspectos básicos da atividade diária relacionada à mobilidade e aos cuidados pessoais. No entanto, pela avaliação na escala NIHSS, independente do grupo caso, 50% ou mais apresentavam menos de 4 pontos, ou seja, déficits neurológicos leves ou melhoras após AVC.

**Tabela 4- Distribuição das características clínicas (escala de Glasgow, Rankin, NIHSS, Barthel, nos indivíduos pertencentes aos grupo caso (AVEH e Aneurisma).**

		Grupo						P
		AVEH		Aneurisma		Total		
		N	%	N	%	N	%	
Escala de Glasgow	8	3	5,0%	0	0,0%	3	2,9%	0,066
	9	3	5,0%	0	0,0%	3	2,9%	
	12	3	5,0%	0	0,0%	3	2,9%	
	13	2	3,3%	0	0,0%	2	1,9%	
	15	49	81,7%	43	100,0%	92	89,3%	
Escala de Rankin	0	18	30,0%	4	9,3%	22	21,4%	0,000*
	1	25	41,7%	35	81,4%	60	58,3%	
	2	3	5,0%	0	0,0%	3	2,9%	
	3	3	5,0%	4	9,3%	7	6,8%	
	4	5	8,3%	0	0,0%	5	4,9%	
	5	6	10,0%	0	0,0%	6	5,8%	
Escala NIHSS	0	22	36,7%	18	41,9%	40	38,8%	0,003*
	1	0	0,0%	5	11,6%	5	4,9%	
	2	9	15,0%	8	18,6%	17	16,5%	
	3	12	20,0%	4	9,3%	16	15,5%	
	4	8	13,3%	4	9,3%	12	11,7%	
	6	0	0,0%	4	9,3%	4	3,9%	
	18	6	10,0%	0	0,0%	6	5,8%	
	20	3	5,0%	0	0,0%	3	2,9%	
Índice de Barthel	0	3	5,0%	0	0,0%	3	2,9%	
	2	3	5,0%	0	0,0%	3	2,9%	
	10	3	5,0%	0	0,0%	3	2,9%	

40	2	3,3%	0	0,0%	2	1,9%	0,000*
70	6	10,0%	0	0,0%	6	5,8%	
73	6	10,0%	0	0,0%	6	5,8%	
80	3	5,0%	13	30,2%	16	15,5%	
90	6	10,0%	5	11,6%	11	10,7%	
95	0	0,0%	8	18,6%	8	7,8%	
100	28	46,7%	17	39,5%	45	43,7%	

\*diferença estatística (P<0,005); teste qui-quadrado

Com relação aos parâmetros bioquímicos e celulares, a tabela 5 avalia a diferença média de indivíduos dos grupos caso quanto à glicose, creatinina e plaquetas. Quanto às plaquetas e a creatinina há uma diferença significativa, já que P<0,05, mostrando que em relação a estes dois parâmetros, os indivíduos do grupo aneurisma apresentavam as maiores médias.

**Tabela 5- Estatísticas-resumo (média, erro padrão e mediana) da glicemia, creatinina e plaquetas dos grupos AVEH, aneurisma e AVEH-aneurisma.**

	Grupo						P
	AVEH		Aneurisma		Total		
	média	erro padrão da média	média	erro padrão da média	média	erro padrão da média	
Glicose (mg/dL)	114	4	120	4	116	3	0,328
Creatinina(mg/dL)	0,78	0,02	1,72	0,40	1,16	0,17	0,006*
Plaquetas ( x 100.000 mm <sup>3</sup> )	300	11	334	12	314	8	0,037*

\*Diferença estatística, teste ANOVA.

### ***Análise do polimorfismo -14 pb na região 3'UTR do gene do HLA-G***

As frequências genóticas estão apresentadas na tabela 6. Foi observado que não houve diferença proporcional entre os grupos em relação genótipo, com  $P=0,845$ . Em relação ao genótipo DD, verificou-se que 26,7% dos indivíduos com AVEH eram portadores desta característica, contra 34,9% dos indivíduos com aneurisma e 30,3% daqueles do grupo controle. Quando divide-se os sujeitos em grupos caso (aneurisma ou AVEH) e controle ainda não se observa a diferença proporcional ( $P= 0,788$ ; tabela 7). Quando analisada as frequências alélicas, também não foi observada diferença nas proporções dos alelos ente os grupos caso e controle ( $P=0,775$ ; tabela 8).

**Tabela 6- Distribuição das frequências genótípicas do polimorfismo 14 pb do gene HLA-G nos diferentes grupos (controle, AVEH e aneurisma)**

		Grupo								P <sup>#</sup>
		AVEH		Aneurisma		Controle		Total		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
HLA-G 14pb	DD	16	26,7	15	34,9	5	31,3	36	30,3	0,845
	DI	33	55,0	20	46,5	7	43,8	60	50,4	
	II	11	18,3	8	18,6	4	25,0	23	19,3	
	Total	60	100,0	43	100,0	16	100,0	119	100,0	

<sup>#</sup>teste qui-quadrado

A tabela 7 avalia as frequências genótípicas, do grupo controle e do grupo caso em que se enquadram pacientes com AVEH ou aneurisma.

**Tabela 7- Distribuição das frequências genótípicas do polimorfismo 14 pares de base do gene HLA-G nos diferentes grupos (controle e caso- AVEH e aneurisma).**

		Grupo						P
		Caso (AVE/Aneurisma)		Controle		Total		
		N	%	N	%	N	%	
HLA-G 14pb	DD	31	30,1%	5	31,3%	36	30,3%	0,788
	DI	53	51,5%	7	43,8%	60	50,4%	
	II	19	18,4%	4	25,0%	23	19,3%	
	Total	103	100,0%	16	100,0%	119	100,0%	



**Tabela 8- Distribuição das frequências alélicas do polimorfismo 14 pares de base do gene HLA-G nos diferentes grupos (controle e caso- AVEH e aneurisma).**

		Grupo						P
		Caso (AVE/Aneurisma)		Controle		Total		
		N	%	N	%	N	%	
HLA-G	D	115	55,83	17	53,13	132	55,46	0,775
14pb	I	91	44,17	15	46,87	106	44,54	
	Total	206	100	32	100	238	100	

## DISCUSSÃO

Os polimorfismos de (STRs) (short tandem repeats) (sequências curtas de repetições em tandem) estão amplamente distribuídos no genoma humano e constituindo aproximadamente 3% do genoma (Lander et al., 2001). A identificação e associação desse tipo de polimorfismo com condições fisiopatológicas são fundamentais para entendermos e direcionarmos a pesquisa, o desenvolvimento de marcadores moleculares diagnósticos, além da elaboração de medidas preventivas e tratamento.

Dentro desses tipos de polimorfismo o presente trabalho destaca o polimorfismo do gene HLA-G que já vem sendo estudado e descrito em algumas condições fisiológicas e patológicas. Diversos trabalhos associam esse polimorfismo ao sucesso de alo transplantes, à suscetibilidade a infecções virais, à doenças autoimunes e à cânceres (ARUNA et al., 2011; BOUKOUACI et al., 2011; BRENOL et al., 2012; CHEN et al., 2012; CRISPIM et al., 2008; DONADI et al., 2011; FABRIS et al., 2011; HADDAD et al., 2011).

No presente estudo pudemos observar que não houve variação estatística significativa entre o grupo controle e os portadores da patologia, como observado na tabela 7, em que a frequência genotípica entre os indivíduos caso e controle não diferem estatisticamente. Com base em dados da literatura pode-se associar o HLA-G com doenças circulatórias como hipertensão arterial mas no presente estudo não observou-se correlação direta entre o genótipo do polimorfismo de 14 pb HLA-G com aneurisma e AVEH.(DONADI et al., 2011). Apesar de não ser encontradas diferenças entre os grupos outros trabalhos já demonstraram a importância desse polimorfismo nas chances de desenvolvimento de algumas patologias e no desfecho de outras. Estudos demonstraram que mulheres com o genótipo homozigoto para deleção apresentam maiores riscos de desenvolver câncer de mama (ESKANDARI-NASAB et al., 2013). Outro trabalho mostra que crianças com o genótipo homozigoto para deleção apresentam efeito protetor com relação a infecção perinatal do HIV (FABRIS et al., 2009). Já em pacientes com diabetes mellitos tipo 2, o genótipo homozigoto para inserção pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão arterial (GARCIA-GONZALEZ et al., 2014).

Mais de 65% de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 morrem de doenças cardiovasculares e AVE (FERNANDEZ-VELASCO et al., 2014). Por outro lado, Pacientes sem caso clínico de diabetes tem menores riscos de desenvolver aneurisma ((SHANTIKUMAR et al., 2010), fato este também demonstrado no presente estudo.

A HAS é duas vezes mais frequente em indivíduos diabéticos do que na população em geral, afetando 30 a 80% destes doentes, sendo que em 60% dos indivíduos com acidente vascular encefálico agudo apresentam hipertensão e que é um dos maiores fatores de risco para a ocorrência do AVEH e do aneurisma intracerebral (MILLER et al., 2014). Sendo assim o presente estudo confirma essa informação, considerando que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando a HAS (P = 0,000).

Observou-se também que o grupo de pacientes com aneurisma possuíam o parâmetro de glicose próximo do limite máximo, isso ocorreu pois dentro do grupo analisado haviam alguns pacientes diabéticos. Deve-se ressaltar também que a diabetes é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças circulatórias e consequentemente aneurisma (CLARKE, 2008; SHANTIKUMAR et al., 2010)

Apesar dos parâmetros de creatinina e plaquetário estarem dentro do intervalo de normalidade, os valores de AVEH e aneurisma diferem, sendo que o aneurisma apresenta valores maiores desses parâmetros. Esta constatação é importante pois esta descrito na literatura que o nível elevado de creatinina e altas taxas plaquetárias são indicadores de prognóstico ruim para o aneurisma (BROOKS et al., 2011; DAVIES et al., 2011; LEVITT et al., 2013; SCHROCK; GLASENAPP; DROGELL, 2012).

## **Conclusão**

No presente estudo, observou-se que a distribuição do polimorfismo genético de 14 pb na região 3'UTR do gene HLA-G em sujeitos com ao AVEH e aneurisma intracerebral, quando comparados com o grupo controle, não apresentaram diferenças estatísticas.

Quanto aos aspectos clínicos, havia diferença nos valores da glicemia nos pacientes com aneurisma em relação ao AVEH e controle, além disso na presença de hipertensão arterial (quando os casos são comparados com os controles) e creatinina (observando apenas o grupo caso, os pacientes portadores de aneurisma cerebral tiveram níveis séricos de creatinina aumentada) haviam diferenças clínicas.

Até o momento o polimorfismo de 14 pb do HLA-G não se apresenta como um bom marcador molecular que indica risco para as patologias estudadas no presente trabalho.

## Referências

ABECASIS, G. R. et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061-73, Oct 28 2010.

ADAMCZYK, P. et al. Medical Management of Cerebral Vasospasm following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Review of Current and Emerging Therapeutic Interventions. **Neurol Res Int**, v. 2013, p. 462491, 2013.

ALEGRE, E. et al. Some basic aspects of HLA-G biology. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 657625, 2014.

AMIOT, L. et al. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 417-31, Feb 2011.

ARUNA, M. et al. Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 2, p. 131-5, Feb 2011.

BEJOT, Y. et al. Smoking status and severity of ischemic stroke. A population-based study. **Eur Neurol**, v. 71, n. 1-2, p. 59-64, 2014.

BIESBROEK, J. M. et al. Diagnostic accuracy of CT perfusion imaging for detecting acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. **Cerebrovasc Dis**, v. 35, n. 6, p. 493-501, 2013.

BOUKOUACI, W. et al. Association of HLA-G low expressor genotype with severe acute graft-versus-host disease after sibling bone marrow transplantation. **Front Immunol**, v. 2, p. 74, 2011.

BRENOL, C. V. et al. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 1, p. 82-91, Jan-Feb 2012.

BROOKS, C. E. et al. Predictors of creatinine rise post-endovascular abdominal aortic aneurysm repair. **ANZ J Surg**, v. 81, n. 11, p. 827-30, Nov 2011.

BRUNO, A.; SWITZER, J. A. Letter by Bruno and Switzer regarding article, "Prestroke modified Rankin Stroke Scale has moderate interobserver reliability and validity in an acute stroke setting". **Stroke**, v. 44, n. 5, p. e43, May 2013.

BRUNO, A. et al. Opportunity to lower hyperglycaemia faster in patients with acute ischaemic stroke and diabetes. **Int J Stroke**, v. 5, n. 4, p. 338-9, Aug 2010.

CANTONI, C. et al. p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 6, p. 1980-90, Jun 1998.

CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862-70, May 15 2008.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv Immunol**, v. 81, p. 199-252, 2003.

CARTWRIGHT, J. E.; WAREING, M. An in vitro model of trophoblast invasion of spiral arteries. **Methods Mol Med**, v. 122, p. 59-74, 2006.

CHAPMAN, S. J.; HILL, A. V. Human genetic susceptibility to infectious disease. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 3, p. 175-88, Mar 2012.

CHEN, Y. et al. Relationship between HLA-G gene polymorphism and the susceptibility of esophageal cancer in Kazakh and Han nationality in Xinjiang. **Biomarkers**, v. 17, n. 1, p. 9-15, Feb 2012.

CHRYSANT, S. G.; CHRYSANT, G. S. The age-related hemodynamic changes of blood pressure and their impact on the incidence of cardiovascular disease and stroke: new evidence. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 16, n. 2, p. 87-90, Feb 2014.

CIONCOLONI, D. et al. Relationship between the modified Rankin Scale and the Barthel Index in the process of functional recovery after stroke. **NeuroRehabilitation**, v. 30, n. 4, p. 315-22, 2012.

CLARKE, M. Systematic review of reviews of risk factors for intracranial aneurysms. **Neuroradiology**, v. 50, n. 8, p. 653-64, Aug 2008.

CRISPIM, J. C. et al. Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. **Tissue Antigens**, v. 71, n. 1, p. 35-41, Jan 2008.

CURIGLIANO, G. et al. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 20, p. 5564-71, Oct 15 2013.

DAVIES, R. S. et al. Coagulation, fibrinolysis, and platelet activation in patients undergoing open and endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. **J Vasc Surg**, v. 54, n. 3, p. 865-78, Sep 2011.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 369-95, Feb 2011.

ESKANDARI-NASAB, E. et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp ins/del polymorphism and susceptibility to breast cancer. **Cancer Biomark**, v. 13, n. 4, p. 253-9, 2013.

FABRIS, A. et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. **AIDS**, v. 23, n. 2, p. 177-82, Jan 14 2009.

FABRIS, A. et al. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism in celiac disease. **Am J Gastroenterol**, v. 106, n. 1, p. 139-44, Jan 2011.

FAN, S. et al. Safflower yellow for acute ischemic stroke: A systematic review of randomized controlled trials. **Complement Ther Med**, v. 22, n. 2, p. 354-61, Apr 2014.

FEERO, W. G.; GUTTMACHER, A. E.; COLLINS, F. S. Genomic medicine--an updated primer. **N Engl J Med**, v. 362, n. 21, p. 2001-11, May 27 2010.

FERNANDEZ-VELASCO, M. et al. Ca handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. **Cell Calcium**, Aug 17 2014.



FROSEN, J. et al. Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. **Acta Neuropathol**, v. 123, n. 6, p. 773-86, Jun 2012.

FURUKAWA, T. S.; MATHIAS, T. A. D. F.; MARCON, S. S. Mortalidade por doenças cerebrovasculares por residência e local de ocorrência do óbito: Paraná, Brasil, 2007. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 327-334, 2011.

GARCIA-GONZALEZ, I. J. et al. The 14 bp Del/Ins HLA-G polymorphism is related with high blood pressure in acute coronary syndrome and type 2 diabetes mellitus. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 898159, 2014.

GIANG, K. W. et al. Twenty-year trends in long-term mortality risk in 17,149 survivors of ischemic stroke less than 55 years of age. **Stroke**, v. 44, n. 12, p. 3338-43, Dec 2013.

GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 129, n. 3, p. e28-e292, Jan 21 2014.

GURURAJAN, P. et al. Plasma total nitric oxide and endothelial constitutive nitric oxide synthase (ecNOS) gene polymorphism: a study in a South Indian population. **Biochem Genet**, v. 49, n. 1-2, p. 96-103, Feb 2011.

HADDAD, R. et al. HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism is a risk factor for HTLV-1 infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 27, n. 3, p. 283-8, Mar 2011.

HART, S.; MUENKE, M. Genetics and genomic medicine around the world. **Mol Genet Genomic Med**, v. 2, n. 1, p. 1-2, Jan 2014.

HOWARD, V. J. et al. Disparities in stroke incidence contributing to disparities in stroke mortality. **Ann Neurol**, v. 69, n. 4, p. 619-27, Apr 2011.

HVIID, T. V. et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, v. 55, n. 2, p. 63-79, May 2003.

HYLENIUS, S. et al. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. **Mol Hum Reprod**, v. 10, n. 4, p. 237-46, Apr 2004.

IKEHARA, S. et al. Alcohol consumption and risk of stroke and coronary heart disease among Japanese women: the Japan Public Health Center-based prospective study. **Prev Med**, v. 57, n. 5, p. 505-10, Nov 2013.

JAJA, B. N. et al. Clinical prediction models for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. **Neurocrit Care**, v. 18, n. 1, p. 143-53, Feb 2013.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JAUCH, E. C. et al. 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**, v. 44, n. 3, p. 870-947, Mar 2013.

KERNAN, W. N. et al. 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**, May 1 2014.

KIM, J. J. et al. Genetic variants in the HLA-G region are associated with Kawasaki disease. **Hum Immunol**, v. 69, n. 12, p. 867-71, Dec 2008.

KOCH, S. et al. Racial-ethnic differences in lacunar infarction in a multiethnic stroke population. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 22, n. 2, p. 107-12, Feb 2013.

KWAH, L. K.; DIONG, J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). **J Physiother**, v. 60, n. 1, p. 61, Mar 2014.

LANDER, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 187-97, Feb 10 2011.

LARSEN, C. C.; ASTRUP, J. Rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a literature review. **World Neurosurg**, v. 79, n. 2, p. 307-12, Feb 2013.

LE BOUTEILLER, P. et al. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? **Hum Reprod Update**, v. 5, n. 3, p. 223-33, May-Jun 1999.

LEKAKIS, J. et al. Platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism and acute coronary syndromes. **Int J Cardiol**, v. 127, n. 1, p. 46-50, Jun 23 2008.

LEMAOULT, J. et al. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 18, p. 7064-9, May 4 2004.

LEVITT, M. R. et al. Incidence of microemboli and correlation with platelet inhibition in aneurysmal flow diversion. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 34, n. 12, p. 2321-5, Dec 2013.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317-25, May 19 2011.

LIU, Z. et al. Cholesterol-reducing agents for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, p. CD008184, 2013.

LOTUFO, P. A.; BENSENOR, I. J. [Race and stroke mortality in Brazil]. **Rev Saude Publica**, v. 47, n. 6, p. 1201-4, Dec 2013.

LUITSE, M. J. et al. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 3, p. 261-71, Mar 2012.

MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 198-203, Feb 10 2011.

MARTIN-SCHILD, S. et al. Zero on the NIHSS does not equal the absence of stroke. **Ann Emerg Med**, v. 57, n. 1, p. 42-5, Jan 2011.

MENIER, C. et al. Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. **Tissue Antigens**, v. 75, n. 3, p. 201-6, Mar 2010.

MILLER, J. et al. Management of Hypertension in Stroke. **Ann Emerg Med**, Apr 11 2014.

NOUH, A.; REMKE, J.; RULAND, S. Ischemic Posterior Circulation Stroke: A Review of Anatomy, Clinical Presentations, Diagnosis, and Current Management. **Front Neurol**, v. 5, p. 30, 2014.

OVERGAARD, K. The Effects of Citicoline on Acute Ischemic Stroke: A Review. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, Apr 13 2014.

PANG, A. W. et al. Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. **Genome Biol**, v. 11, n. 5, p. R52, 2010.

PANGAULT, C. et al. Lung macrophages and dendritic cells express HLA-G molecules in pulmonary diseases. **Hum Immunol**, v. 63, n. 2, p. 83-90, Feb 2002.

RANTAKOMI, S. H. et al. Alcohol consumption and the risk of stroke among hypertensive and overweight men. **J Neurol**, v. 260, n. 2, p. 534-9, Feb 2013.

ROGER, V. L. et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. e18-e209, Feb 1 2011.

ROUSSEAU, P. et al. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1005-10, Nov 2003.

RYAN, K. A. et al. Prevention opportunities for oral contraceptive-associated ischemic stroke. **Stroke**, v. 45, n. 3, p. 893-5, Mar 2014.

SCHAEFER, S. Review: In older patients without CVD, statins reduce MI and stroke but not all-cause mortality. **Ann Intern Med**, v. 160, n. 10, p. JC8, May 20 2014.

SCHNEIDER, K. I.; SCHMIDTKE, J. Patient compliance based on genetic medicine: a literature review. **J Community Genet**, v. 5, n. 1, p. 31-48, Jan 2014.

SCHROCK, J. W.; GLASENAPP, M.; DROGELL, K. Elevated blood urea nitrogen/creatinine ratio is associated with poor outcome in patients with ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 114, n. 7, p. 881-4, Sep 2012.

SHANTIKUMAR, S. et al. Diabetes and the abdominal aortic aneurysm. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 39, n. 2, p. 200-7, Feb 2010.

SLEIMAN, K. et al. Acute cerebrovascular incident in a young woman: Venous or arterial stroke? - Comparative analysis based on two case reports. **Pol J Radiol**, v. 78, n. 4, p. 70-8, Oct 2013.

SOLIER, C. et al. HLA-G unique promoter region: functional implications. **Immunogenetics**, v. 53, n. 8, p. 617-25, Oct 2001.

SORITA, A. et al. Off-hour presentation and outcomes in patients with acute ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. **Eur J Intern Med**, v. 25, n. 4, p. 394-400, Apr 2014.

STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Structural variation in the human genome and its role in disease. **Annu Rev Med**, v. 61, p. 437-55, 2010.

SUNDSETH, A. et al. Factors Related to Knowledge of Stroke Symptoms and Risk Factors in a Norwegian Stroke Population. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, May 6 2014.

WAGSTAFF, A. J. et al. Is female sex a risk factor for stroke and thromboembolism in patients with atrial fibrillation? A systematic review and meta-analysis. **QJM**, Apr 9 2014.

WANG, W. et al. Prognostic value of ICH score and ICH-GS score in Chinese intracerebral hemorrhage patients: analysis from the China National Stroke Registry (CNSR). **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77421, 2013.

WANG, X. et al. A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in 6 study populations: association of lymphotoxin-alpha in nonhypertensive patients. **Stroke**, v. 40, n. 3, p. 683-95, Mar 2009.

WANG, Y.; RUDD, A. G.; WOLFE, C. D. Age and ethnic disparities in incidence of stroke over time: the South London Stroke Register. **Stroke**, v. 44, n. 12, p. 3298-304, Dec 2013.

XU, L. et al. Smoking and hemorrhagic stroke mortality in a prospective cohort study of older Chinese. **Stroke**, v. 44, n. 8, p. 2144-9, Aug 2013.

YAMADA, Y. et al. Genetic factors for ischemic and hemorrhagic stroke in Japanese individuals. **Stroke**, v. 39, n. 8, p. 2211-8, Aug 2008.

ZAKHAROVA, M. Y. et al. Risk factors for heart attack, stroke, and venous thrombosis associated with hormonal contraceptive use. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 17, n. 4, p. 323-31, Aug 2011.

ZILBERMAN, S. et al. HLA-G1 and HLA-G5 active dimers are present in malignant cells and effusions: the influence of the tumor microenvironment. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 6, p. 1599-608, Jun 2012.





## 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: cepesedf@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.**

Ficha de identificação dos participantes da pesquisa: Polimorfismo genético ctla4 - 318 (c/t) associado ao acidente vascular encefálico hemorrágico e ao aneurisma intracerebral.

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: \_\_\_\_\_

Escala NIHSS: \_\_\_\_\_

Índice de Barthel: \_\_\_\_\_

ICH: \_\_\_\_\_

Tomografia: \_\_\_\_\_

Angiografia: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de todos participantes da pesquisa.**

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - Indivíduos “saudáveis”

Você está sendo convidado a participar do estudo “Polimorfismos genéticos associados ao acidente vascular encefálico e ao aneurisma intracerebral”. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. 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 objetivo do presente estudo é o de verificar a frequência de determinadas variantes do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) em uma população de indivíduos que não apresentam aneurisma cerebral diagnosticado ou acidente vascular encefálico.

#### Procedimentos do estudo:

Sua participação consiste em responder uma ficha de identificação e autorizar uma única vez, a coleta de aproximadamente 10 ml (uma seringa) de sangue, através de uma punção de veia periférica no 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 e benefícios:

Este estudo possui desconfortos inerentes à coleta de sangue, como dor no local e formação de um hematoma (mancha roxa).

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. Caso haja algum problema você receberá a atenção necessária e o ressarcimento de alguma eventual despesa.

Sua participação poderá ajudar no maior conhecimento sobre qual a frequência na população saudável de determinadas características genéticas que podem causar doenças e deste modo na melhor compreensão do fator genético de determinadas doenças.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:

Sua participação é voluntária. Você não terá nenhum prejuízo se não quiser participar. Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

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

Confidencialidade:

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

Os resultados de seus exames serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos. Os resultados dos seus exames poderão ser entregues pela pesquisadora responsável mediante a sua solicitação, a qualquer momento, desde que as amostras já tenham sido processadas e analisadas. Esta solicitação poderá ser feita agora durante a assinatura deste TCLE, por email ou telefone, presentes neste TCLE, e a pesquisadora agendará uma reunião para a entrega do resultado.

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.

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

\_\_\_\_\_

## Assinatura do participante

### 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 seus 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](tel: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) \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Brasília,

---

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 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 \_\_\_\_\_