



UnB

Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia

Curso de Farmácia

Ana Camila Carvalho de Freitas Martins

**Análise do polimorfismo gênico da enzima Óxido Nítrico Sintase
Endotelial (eNOS) 894 G/T em indivíduos acometidos por acidente vascular
encefálico hemorrágico e aneurisma intracerebral no Distrito Federal**

Brasília-DF

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada pela autora

Martins C. F, Ana Camila

Análise do polimorfismo gênico da enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS)- 894 G/T em indivíduos acometidos por acidente vascular encefálico hemorrágico e aneurisma intracerebral/ Ana Camila Martins- 2015

81f

Orientação: Profa. Dra. Izabel Cristina da Silva.

Monografia (Bacharel em Farmácia) – Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, 2015.

1. Genética humana. 2. Hemostasia. 3. Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico. 4. Aneurisma intracerebral. 5. Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS)



UnB

Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia

Curso de Farmácia

Ana Camila Carvalho de Freitas Martins

Análise do polimorfismo gênico da enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) 894 G/T em indivíduos acometidos por acidente vascular encefálico hemorrágico e aneurisma intracerebral no Distrito Federal

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília – UnB, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Silva

Brasília-DF

2015

Dedicatória

Aos anos vividos nesta universidade. Aos aprendizados que vão além dos livros e aulas. A todas as forças que me levaram por onde andei e me proveram experiências que hoje compõem quem sou. Em especial a todos os profissionais da educação que cruzaram meu caminho nestes muitos anos de ensino e aprendizado.

Agradecimentos

A Deus que me permitiu a vida, obrigada por todas as bênçãos e por ouvir minhas orações nas vésperas de prova.

Aos meus pais Claudia Carvalho de Freitas Martins e João Luiz Martins da Silva que, por mecanismos indiretos, foram agonistas totais dos processos mentais de motivação e reforço que me permitiram ultrapassar limites e vencer o comodismo. Obrigada pelo aporte extra de monoaminas.

A Ana Lúcia Martins da Silva, minha amada tia e pedagoga particular. Obrigada pela extrema paciência e carinho durante minha alfabetização e exercícios de frações matemáticas. Minha tia amiga, Arlene Martins da Silva, por ser um exemplo de dedicação e perseverança, obrigada por me ensinar a autovalorização.

Ao meu querido amigo e namorado John James Finbarr Quinlan por ser o maior estimulante de produção e liberação de ocitocina, serotonina e dopamina que meu organismo foi capaz de reconhecer. Obrigada pelas palavras de amor, carinho e autoestima. Terás sempre meu amor e gratidão.

Poucos são os capazes de te transformar e te fazer querer ser melhor. Tive a felicidade de conhecer e ser aluna de um professor ímpar, que se portou como um verdadeiro mestre. Os desafios por ele impostos foram duros e necessários. Obrigada por ser meu maior motivador e amigo, obrigada professor José Eduardo Pandóssio.

A minha querida orientadora Izabel Silva a minha gratidão e respeito, obrigada por aceitar este desafio e por desempenhar seu papel de forma tão determinante. Saiba que a tenho como um modelo de profissional ético e dedicado.

A todos que, de forma direta ou não, são responsáveis por este feito. Obrigada.

“Phil provavelmente está inconsciente por aí, usufruindo do legado do falecido pai. Já me peguei desejando ter um ente querido morrendo e me deixando os barbitúricos, mas não consegui pensar em ninguém que me amasse tanto.” (“A Origem do Prazer”,

David Linden)

RESUMO

O estudo da correlação entre polimorfismos do gene eNOS e sua influência no desencadeamento de acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) e aneurisma intracerebral tem sua importância quanto ao entendimento da patologia, que é multifatorial, para se obter dados que auxiliem no desenvolvimento de estudos clínicos e possível reversão e prevenção da situação patológica. Além dos riscos já recorrentemente aceitos sobre doenças vasculares, há uma crescente evidência sobre o papel genético na patofisiologia do AVEH e aneurisma. O gene eNOS da origem à enzima óxido nítrico sintase endotelial, uma enzima de alta importância para a manutenção da fisiologia do organismo em especial do sistema vascular, sua função, entre outras, é a de disponibilizar Óxido Nítrico (NO) no endotélio. Nas últimas décadas, o NO tem se destacado como um dos mais importantes mediadores biológicos, desempenhando funções em processos que variam desde função neuronal e tonicidade vascular à erradicação de patógenos. Este trabalho contou com dois grupos de estudos sendo um grupo de indivíduos acometidos por AVEH ou aneurisma intracerebral somando um total de 42 participantes, e um grupo controle composto por 16 indivíduos saudáveis. Foram coletadas amostras de sangue destes grupos e por meio de técnicas laboratoriais de PCR-RFLP pode-se obter o perfil gênico desta amostra para o polimorfismo 894 G/T do gene eNOS. A análise estatística dos resultados encontrados comprovou uma ausência do genótipo TT (mutação em ambos os alelos) nos indivíduos saudáveis em detrimento dos indivíduos portadores de AVEH e aneurisma ($p = 0,007$). O achado deste estudo piloto pode indicar que este genótipo configura risco ao desenvolvimento de AVEH e aneurisma intracerebral na população do Distrito Federal.

Palavras chave: Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH), Aneurisma intracerebral, Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS), Polimorfismos genéticos, Hemostasia.

ABSTRACT

The correlation of polymorphisms of eNOS gene and its influence on the onset of hemorrhagic stroke (AVEH) and intracerebral aneurysms has its importance to the understanding of the pathology, which is multifactorial, to the obtainment of data which assist in the development of clinical studies and possible reversal and prevention of the pathological situation. In addition to the risks already accepted for recurrently vascular disease, there is an increasing evidence for a genetic role in the pathophysiology of AVEH and aneurysm. The eNOS gene originated the enzyme endothelial nitric oxide synthase, an enzyme of high importance for the maintenance of the organism's physiology of the vascular system in particular, its function, among others, is to provide nitric oxide (NO) in the endothelium. In recent decades, the NO has emerged as one of the most important biological mediators, playing roles in processes ranging from neuronal function and vascular tone to the eradication of pathogens. This study included two groups of people, a group of individuals affected by AVEH or intracerebral aneurysm with a total of 42 participants and a control group of 16 healthy individuals. Blood samples were collected from these groups and analyzed followed by laboratory techniques, PCR-RFLP, in order to obtain the genetic profile of this sample for polymorphisms 894 G / T of the eNOS gene. Statistical analysis of the results found demonstrated an absence of TT genotype (mutation on both alleles) in healthy individuals in detriment of individuals with AVEH and aneurysm ($p = 0.007$). The finding of this pilot study may indicate that this genotype configures risk to the development of AVEH and intracerebral aneurysm in the population of the Distrito Federal.

Keywords: Vascular Brain Hemorrhagic Stroke (AVEH), Intracerebral Aneurysm, Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), Genetic Polymorphisms, Hemostasis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Óxido Nítrico, parâmetros químicos e seu impacto no processo de sinalização celular 11	
1.1.1	<i>Meio celular e reações redox do Óxido Nítrico</i>	12
1.1.2	<i>Faixa de concentração de NO endógeno</i>	13
1.1.3	<i>Formação do Óxido Nítrico</i>	14
1.1.4	<i>Difusão do Óxido Nítrico</i>	18
1.1.5	<i>Consumo</i>	19
1.1.6	<i>Formação de RNS</i>	19
1.2	Desacoplamento da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) em Doenças Cardiovasculares	21
1.2.1	<i>Fisiologia enzimática da eNOS</i>	21
1.2.2	<i>Regulação fisiológica da atividade da eNOS</i>	22
1.2.3	<i>Mecanismos moleculares que reduzem os níveis de NO bioativo nas doenças vasculares</i>	24
1.2.4	<i>Mecanismos moleculares envolvidos no desacoplamento da eNOS</i>	24
1.3	O Óxido Nítrico no dano e regeneração vascular	26
1.3.1	<i>Sinalização do Óxido Nítrico na parede arterial</i>	26
1.3.2	<i>O Óxido Nítrico na disfunção vascular</i>	28
1.4	Gene eNOS	30
1.5	Acidente Vascular Encefálico	32
2	JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36

3.2	Objetivos Específicos.....	36
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	Aprovação em comitê de ética de pesquisa e ficha de avaliação clínica.....	37
4.2	Coleta de material para análise de Patologia Molecular clínica.....	40
4.3	Participantes da pesquisa	40
4.4	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	41
4.5	Termo de Guarda de Material Biológico	41
4.6	Procedimentos Laboratorias.....	42
4.6.1	<i>Extração de DNA</i>	42
4.6.2	<i>PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo</i>	42
4.6.3	<i>Digestão Enzimática</i>	43
4.7	Análise Estatística	43
4.7.1	<i>Estimativa das frequências genotípicas</i>	43
4.7.2	<i>Análise dos dados dos sujeitos de pesquisa.</i>	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Características dos sujeitos.....	45
5.2	Análise do Glu298Asp (894 G/T) no Cromossomo 7 região Q35-36.....	49
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	54
8	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Óxido Nítrico, parâmetros químicos e seu impacto no processo de sinalização celular

Nas últimas décadas, o Óxido Nítrico (NO) tem se destacado como um dos mais importantes mediadores biológicos, desempenhando funções em processos que variam desde função neuronal e tonicidade vascular à erradicação de patógenos (FULTON *et al* 2001). Além disso, o NO pode apresentar ações distintas e frequentemente opostas numa situação patológica aparentemente similar (THOMAS *et al* 2004). Dada esta questão, muitas das inconsistências podem ser explicadas ao se considerar detalhes experimentais relacionadas à química do NO.

O resultado fisiológico em resposta ao NO é determinado por suas características químicas. Diferente de uma interação proteína-receptor, o NO é um radical diatômico que tende a estabilizar seu grau energético formando ligações covalentes. No entanto, o resultado final da interação do NO em um microambiente, e as condições que determinam o resultado biológico, vão muito além de uma simples relação entre estrutura e função. (FULTON *et al* 2001)

As reações bioquímicas do NO podem ser classificadas em dois tipos: a) reações mediadas por ações diretas, b) reações mediadas por ações indiretas. Os efeitos diretos ocorrem a baixas concentrações de NO e referem-se à interação química direta entre o NO e seu alvo biológico. Este tipo de reação inclui interações com complexos metálicos e espécies radicalares. Os efeitos indiretos envolvem Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS) derivadas sob condições de concentração relativamente alta de NO (>400 nM). Incluem-se espécies como NO₂ e N₂O₃ que são derivadas da reação do NO com superóxido ou oxigênio molecular. São estes intermediários reativos, e não o NO, que atuam sobre específicos alvos (ESPEY *et al* 2002).

Ao contrário do que se possa imaginar sobre a formação de RNS's ser maléfica ao organismo, estes intermediários podem mediar eventos de sinalização importantes.

Por exemplo, a oxidação do grupo tiol proporciona efeitos de proteínas regulatórias, incluindo PTPase, PTEN e PP2A, que mediam uma variedade de processos incluindo a proliferação e sobrevivência celular (TURPAEV *et al*/2004).

Neste sentido, após o exame de várias proteínas conhecidas por serem modificadas em nível pós-traducional por NO/RNS, foi revelado que há correlação dose-dependente quanto à concentração de NO e o perfil de sinalização. Ou seja, tais proteínas são ativadas por diferentes concentrações de NO e, por conseguinte, ativam diferentes vias de sinalização. Este e outros estudos ajudam no entendimento da natureza dicotômica do NO sobre vários microambientes e sugere que a seu efeito é dependente do contexto. Observações sugerem que baixas concentrações de NO tendem a ser pró-crescimento celular e anti-apoptose enquanto níveis elevados favorecem caminhos que levam à inibição do crescimento celular e apoptose (RIDNOUR *et al.* 2007).

Além da concentração, a duração da exposição ao NO é igualmente importante. Enquanto certas proteínas respondem imediatamente ao NO, outras demoram horas ou mesmo dias para ativação. Por exemplo, HIF-1 α responde rapidamente ao NO e requer a manutenção do limiar de concentração, pois quando os níveis de NO estão abaixo da concentração mínima necessária para regular HIF-1 α , a proteína desaparece. (VODOVOTZ *et al.* 1999) Do contrário, a fosforilação do gene p53 em resposta ao NO (>400 nM) leva algumas horas mas é mantida mesmo após os níveis de NO estarem baixos.

1.1.1 Meio celular e reações redox do Óxido Nítrico

O superóxido (O_2^-) e a subsequente formação de peróxidos estão envolvidos em muitos processos patológicos. O superóxido é gerado sob uma variedade de condições normais e patológicas e induz várias vias de transdução de sinais (FORMAN *et al.*, 2002). Ele pode ativar complexos metálicos e promover danos por meio de reações redox. De forma similar, peróxidos reagem com complexos metálicos e iniciam cascatas de fosforilação. O óxido nítrico tem demonstrado ter propriedades antioxidantes por

meio de reação por difusão controlada com O_2^- (WINK *et al.*, 2001). Esta reação previne o potencial redox de O_2^- e inibe a formação de H_2O_2 . Há uma relação interessante entre O_2^- e H_2O_2 na sinalização de NO. Enquanto NO inibe os efeitos de O_2^- , o próprio O_2^- aparenta regular a sinalização de NO (FORMAN *et al.*, 2002).

Por exemplo, a degradação/geração de O_2^- durante exposição ao NO, regula a concentração do óxido nítrico e, portanto, afeta a resposta de seus alvos de maneira dose-dependente. Como certas proteínas regulatórias respondem a diferentes níveis de concentração de NO, a consequência de O_2^- estar presente é a diminuição de NO disponível, o que efetivamente converte uma resposta citostática para uma proliferativa, e estimula a divisão celular. Estes resultados demonstram uma habilidade mutual entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO na co-regulação de mecanismos de sinalização (FORMAN *et al.* 2007). Assim sendo, a superóxido desmutase (SOD), pode reverter estas respostas ao aumentar a biodisponibilidade de NO quando superóxido esta presente.

1.1.2 Faixa de concentração de NO endógeno

Os macrófagos não são somente uma importante parte do sistema imune, mas também uma fonte principal de NO. Eles desempenham uma grande variedade de funções, desde o combate a bactérias e supressão do crescimento tumoral à regulação do processo de reparo e restauração tecidual. Os macrófagos podem gerar diferentes níveis de NO que, por sua vez, mediam diferentes funções (ESPEY *et al.*, 2000). Interessantemente, a quantidade de NO produzida por macrófagos ativados é dependente da maneira pela qual ele foi ativado. Quando macrófagos de cultura são pré-tratados com interferon gama (IFN)- γ , seguido de ativação por TNF- α ou IL-1- β , a quantidade de NO mensurada na solução é aproximadamente 10 vezes menor do que macrófagos tratados com IFN- γ e o antígeno LPS (lipopolissacarídeo), ainda que haja apenas uma modesta diferença na atividade da NOS (Óxido Nítrico Sintase). Isto sugere que estimulação dos macrófagos por citocinas leva a uma quantidade baixa de NO, quando comparado com fatores que ativam a NOS via receptores Toll-like. Estes

exemplos mostram que as concentrações geradas de NO por estas células parcialmente dependem dos agentes que ativam esta célula de defesa.

Evidências clínicas sugerem que ocorre alta concentração micromolar de NO em humanos durante doenças inflamatórias. Análises imunohistoquímicas têm demonstrado uma co-localização de um determinado tipo de NOS e P53 fosforilada em serina-15 em pacientes com colite ulcerativa. E ainda, uma correlação entre expressão da NOS e estabilização de HIF-1 α foi reportada em câncer colorretal humano. Estes artigos sugerem que ocorrem efeitos indiretos do NO durante inflamações. (VODOVOTZ *et al.* 1999)

O óxido nítrico media uma gama de respostas no sistema nervoso, como a liberação de dopamina no *striatum* (HANBAUER *et al.*, 1994). Estudos sugerem que a liberação local de dopamina mediada por NO, requer um rápido influxo de NO produzido por células pós-sinápticas, e em grande quantidade (> 200 nM), ultrapassando o limiar de responsividade. O alto limiar de resposta ao NO para este fim, sugere que baixos níveis de NO derivado de outras fontes não irão aleatoriamente ativar esta resposta. Assim, no microambiente de fendas sinápticas, as NOS podem alcançar níveis 100 vezes maiores de NO do que o necessário para estimular vasodilatação, o que sugere que altas concentrações de NO podem ser usadas para mediar respostas fisiológicas específicas em uma área bem restrita por um curto período de tempo.

Pesquisas indicam que a faixa de concentração de NO que promove respostas fisiológicas pode ocorrer a níveis sub nanomolares. Esta faixa de nM a > μ M, indica que o NO pode provocar diferentes, e até opostas, ações ao longo de um intervalo de concentração 100 vezes maior ou menor, o que ajuda a explicar, ao menos em parte, o porque de a complexidade biológica das respostas ao NO estar em função de sua concentração (HANBAUER *et al.*, 1994).

1.1.3 Formação do Óxido Nítrico

Apesar das vias alternativas para a geração de NO (acidificação ou redução de nitrito), a maioria do NO de mamíferos é derivado enzimaticamente de Óxido Nítrico Sintases (NOS). Esta família de enzimas converte arginina a citrulina e NO via utilização de NADPH- e O₂. (Figura 1).

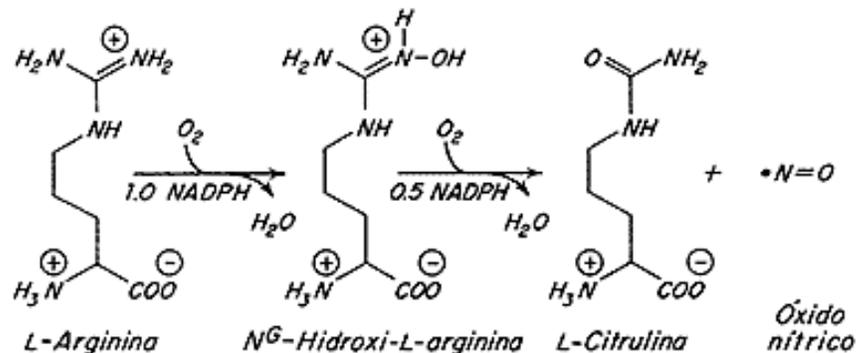


Figura 1. Representação esquemática da biossíntese de óxido nítrico a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintase (NOS). (QUEIROZ *et al.*, 1999)

Existem três isoformas de NOS, que promovem diferentes gamas de concentração e duração de NO. Duas destas isoformas são constitutivas (NOS1 ou neuronal – nNOS e NOS3 ou endotelial – eNOS), enquanto a terceira é induzível (NOS2 ou iNOS) (STUEHR *et al.*, 2004). As isoformas são diferentemente reguladas em vários níveis, incluindo transcrição, tradução, pós-tradução, assim como bioquimicamente. As duas maiores distinções entre as isoformas envolve a duração da produção de NO e a concentração local de NO que pode ser gerado. A dependência à calmodulina é importante para as formas constitutivas de NOS em que o influxo de cálcio regula suas atividades para promover curtas explosões de NO (QUEIROZ *et al.*, 1999).

Em contraste, iNOS têm a calmodulina como uma subunidade e é, portanto, permanentemente ativa e capaz de gerar NO por períodos prolongados. Modificações pós-traducionais, incluindo a fosforilação da eNOS, podem converter a isoforma constitutiva produtora de curtas explosões controladas a fluxos prolongados de NO (FULTON *et al.*, 2001).

A atividade da NOS é firmemente controlada e dependente da disponibilidade de substrato e cofator, assim como da taxa de transferência de elétrons. A quantidade de

enzima e a sua localização celular determina a concentração de NO dentro do microambiente do alvo molecular. O substrato e cofatores que controlam a atividade da NOS também estão envolvidos em outras vias metabólicas dentro da célula, e isto conecta a atividade da NOS com outras vias metabólicas.

Na presença de cofatores e de grupos prostéticos (NADPH, FMN, BH₄, FAD) (Figura 2), a atividade da NOS é dependente da disponibilidade de arginina e oxigênio (Figura 1). Três principais vias da arginina influenciam a atividade da NOS: 1) competição pela arginase, 2) captação e metilação de arginina, e 3) proteólise para formar dimetilarginina assimétricas (ADMA) (MORRIS, 2007). A arginase pode ter uma influência significativa na atividade da NOS ao competir pela arginina celular.

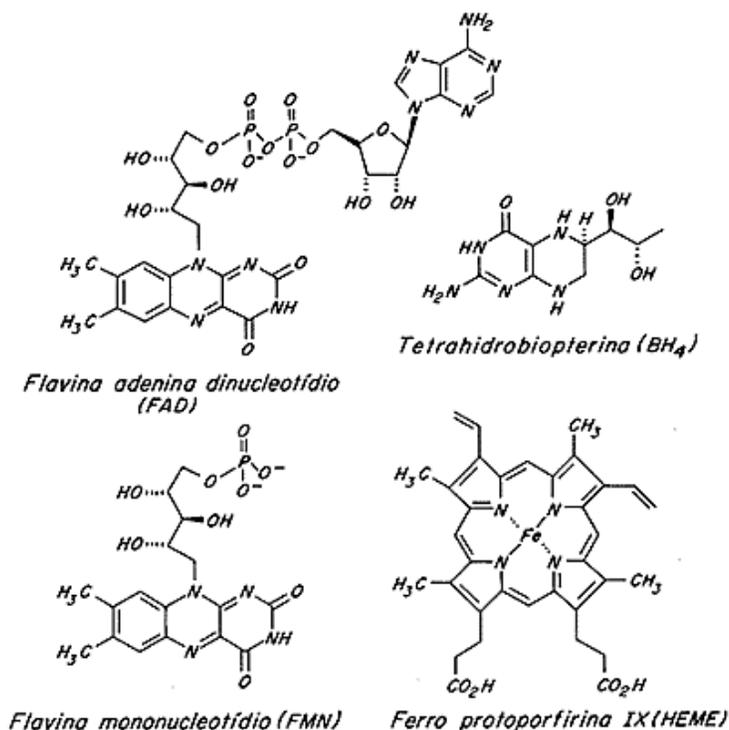


Figura 2. Grupos prostéticos componentes da NOS. (QUEIROZ *et al.*, 1999)

Vários estudos sugerem que a atividade da NOS é controlada pela biodisponibilidade de arginina. A captação celular de arginina é facilitada pelo transportador de aminoácidos catiônicos (CAT), o qual é regulado por vários fatores. A lisina também compete diretamente pela captação de arginina. Interessantemente, nitroxila (HNO), ao invés do NO, tem sido demonstrada como capaz de diminuir a

atividade de CAT e pode promover um feedback para a atividade da NOS. Uma das consequências de reduzir a disponibilidade de arginina é que a NOS se torna um gerador de superóxidos ao invés de NO. Isto pode explicar porque a NOS é benéfico em certas condições e deletéria em outras.

Outro aspecto importante do metabolismo da arginina é a geração de ADMA, um conhecido inibidor da NOS, que é derivado da metilação de proteínas pela arginina e subsequente proteólise. Um estudo mostrou que ADMA não somente inibe nNOS, mas converte a enzima a produzir superóxidos (CARDOUNEL *et al.*, 2005), o que pode ter grandes implicações em vários processos patológicos. Portanto, a produção e a sinalização celular de NO é influenciada pela captação de arginina, vias metabólicas competitivas e a geração de inibidores endógenos da NOS. E ainda mudanças na produção de arginina podem não somente afetar a taxa de produção de NO, mas também ser importante na produção de superóxidos.

O oxigênio é um importante substrato na regulação da NOS, mudanças na pO_2 tem grande influência na atividade da enzima. O $K_M O_2$ de cada isoforma (isto é, a concentração de oxigênio na qual a atividade da enzima é metade da máxima) é consideravelmente diferente. O K_M da eNOS, iNOS e nNOS é, respectivamente, 23, 135 e 350 μM (STUEHR *et al.*, 2004). Esta vasta diferença nos valores de K_M , indica que a taxa de síntese de NO para nNOS, por exemplo, será substancialmente mais afetada pela flutuação da pO_2 do que a eNOS. Em contraste a eNOS poderia ter completa atividade mesmo com baixas concentrações de O_2 , permitindo regulação rigorosa de funções críticas do sistema cardiovascular, incluindo a tonicidade vascular.

O pO_2 de tecidos normais varia de 10-20 μM a um máximo de 60 μM . Portanto, a atividade enzimática vai depender da localização em tecidos específicos de cada isoforma. Uma complicação adicional envolve a inibição da respiração mitocondrial mediada por NO, que é o primeiro mecanismo de consumo tecidual de O_2 (MASON *et al.*, 2006).

Para este fim, NO aumentado leva ao aumento da concentração de O_2 , o que mais a frente aumenta a atividade da NOS. Enquanto estes mecanismos celulares sugerem que a produção de NO pode se tornar descontrolada, existem dois mecanismos de *feedback* negativo que limitam este ciclo. Assim que os níveis de NO

atingem um certo limite, a NOS limita a sua própria atividade enzimática para suprimir a produção de NO (STUEHR *et al.*, 2004). E ainda, o consumo celular de NO é dependente de O_2 , e proporcional ao pO_2 ; enquanto os níveis de O_2 aumentam, também aumenta a taxa de metabolismo do NO.

Contudo, existe uma íntima relação entre estes dois gases diatômicos, que é crucial na regulação da oxigenação e perfusão tecidual. Um fator igualmente importante na regulação da NOS é a sua localização dentro da célula. Por exemplo, certos gases (NO, CO e O_2) são mais solúveis em regiões hidrofóbicas e são, portanto, cerca de 10 vezes mais concentradas naquelas regiões de uma célula (como membranas) quando comparadas a regiões aquosas. Enquanto a NOS pode existir no citosol e na membrana, sua presença em ambientes com diferentes concentrações de oxigênio podem alterar sua atividade e resposta fisiológica de forma dramática.

1.1.4 Difusão do Óxido Nítrico

A difusão é outra característica física importante do NO, tendo grande influência na determinação da concentração do mesmo. O óxido nítrico é uma pequena e não iônica molécula, e solúvel em ambientes aquoso e hidrofóbico além de altamente difusível. O coeficiente de difusão do oxigênio molecular é $2800 \mu m^2/s$, enquanto o do NO é $3300 \mu m^2/s$ (CHEN *et al.*, 2007). Nos tecidos, as células estão entre 50-300 μm , ou entre de distância de um vaso sanguíneo, onde o NO é rapidamente consumido. Uma vez que o NO se difunde até 100 μm por segundo, sua difusão para o vaso sanguíneo se transforma em uma barreira cinética na determinação de vias reativas viáveis.

À medida que a distância do ponto onde o NO foi produzido aumenta, sua concentração cai, assim sendo, dentro de 1 s após sua produção, a concentração de NO pode ser diluída cerca de 200 vezes simplesmente por difusão. Enquanto a produção de NO pode ser confinada a específicas áreas na célula, a difusão em uma pequena distância pode diminuir substancialmente sua concentração. Por exemplo, nNOS localizada na fenda sináptica, que é cerca de $< 1 \mu m$ distante, requer uma

concentração de NO de cerca de $1\mu\text{M}$ para que a estimulação de liberação de catecolaminas. Esta relação difusão/diluição do NO pode resultar em exposição diferencial de específicos sítios ao NO, mesmo dentro de uma mesma célula, culminando em resultados fenotípicos distintos. No caso do endotélio, a NOS é localizada.

1.1.5 Consumo

Outro fator importante que determina a concentração de NO é a sua taxa de consumo. Isto é mediado por vias que incluem interações do NO com eritrócitos e ROS, assim como o seu metabolismo celular. De forma similar à síntese de NO, a maioria dos mecanismos de consumo de NO é dependente de O_2 , o que sugere, novamente, que o oxigênio molecular é um fator chave na determinação da taxa de consumo e o alcance das reações com alvos moleculares. Simulações têm demonstrado que processos de consumo são competitivos com os de difusão e influenciam significativamente o perfil de concentração de NO (LAMKIN-KENNARD *et al.*, 2004).

Um grande mecanismo de consumo de NO é via reações com ROS. Estas reações resultam na eliminação de NO assim como a produção de espécies reativas de nitrogênio associados com o os efeitos indiretos do NO. Estas interações modulam a sinalização de NO ao diminuir a sua concentração, e diretamente potencializam novos mecanismos de sinalização mediados por RNS. O NO reage com superóxido resultando em peroxinitrito (ONOO^-), que é convertido na presença de NO a NO_2 e N_2O_3 .

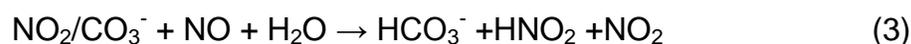
1.1.6 Formação de RNS

Existe uma variedade de alvos de RNS dentro das células e incluindo tióis, lipídeos e amino ácidos aromáticos (RIDNOUR *et al.*, 2004). Uma citotoxicidade severa pode ocorrer se a sinalização bioquímica normal esta debilitada por modificação

química destes alvos por RNS. Assim, as altas concentrações de NO aumentam a probabilidade de ocorrência destas interações, aumentando a incidência de toxicidade.

A formação de RNS pela reação entre NO/O₂⁻ ou NO/O₂ ocorre em diferentes lugares dentro da célula. Estes metabólitos reativos são eletrofílicos, portanto o pK_a do substrato é um importante determinante na dinâmica da reação. Os três principais RNS derivados do NO são N₂O₃, NO₂ e peroxinitrito. Este último é um importante produto do consumo de NO, enquanto que N₂O₃ e NO₂ podem ser derivados da auto-oxidação do NO e de reações NO/O₂⁻.

A reação NO/O₂⁻ que forma peroxinitrito (ONOO⁻), é uma das mais rápidas reações conhecidas na química. Como o superóxido é um ânion de vida curta, esta reação ocorre em compartimentos aquosos de tecidos. No meio biológico, o peroxinitrito rapidamente reage com CO₂, convertendo-o em milissegundos a uma espécie aniônica ONOOCO₂⁻, que rapidamente se decompõe em um complexo radicalar NO₂/CO₃⁻, cuja reação está representada a seguir.



Múltiplas considerações devem ser feitas quando se avalia a resposta ao NO em situações fisiológicas e patológicas. A concentração e a dependência temporal se combinam com determinantes cinéticos e a função celular para direcionar os processos de sinalização do NO. Taxas de formação de óxido nítrico, difusão e consumo, interação radical/alvo e a concentração de oxigênio molecular, contribuem para respostas celulares e teciduais específicas ao NO. Ainda mais importante, a concentração de NO direciona o seu efeito (direto ou indireto), a distância de difusão e os alvos específicos com o qual interage. Um exame cuidadoso da concentração e o perfil temporal do NO combinado com a identificação de específicos determinantes cinéticos pode prover um melhor entendimento do papel do NO e de RNS nos processos biológicos.

1.2 Desacoplamento da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) em Doenças Cardiovasculares

As células do endotélio vascular produzem fatores parácrinos que regulam a homeostase vascular, um exemplo é o óxido nítrico derivado do endotélio, que desempenha um papel primordial, o NO dilata todos os tipos de vasos ao estimular guanilil ciclase solúvel e ao aumentar GMPc em células de músculo liso. O óxido nítrico lançado no lúmen vascular é, também, um potente inibidor de agregação plaquetária e adesão à parede vascular, e inibidor da ligação de leucócitos à parede do vaso ao interferir com a habilidade da molécula de adesão leucocitária CD11/CD18, de ligar-se à superfície da célula endotelial ou mesmo por suprimir a expressão da molécula na superfície dos leucócitos. A deposição leucocitária é um evento inicial no desenvolvimento da aterosclerose e, portanto o NO pode ser um inibidor do desencadeamento de um processo aterosclerótico.

1.2.1 Fisiologia enzimática da eNOS

Todas as isoenzimas NOS são hemodiméricas. (Figura 3^a e b). Em uma NOS funcional, o domínio do carbono-terminal redutase de um monômero (bom locais de ligação para NADPH, FMN e FAD) é ligado ao domínio N-terminal oxigenase do monômero oposto. (Figura 3b). Este domínio oxigenase carrega um grupo heme prostético. O domínio oxigenase também se liga a (6R) 5,6,7,8-tetrahydrobiopterina (BH₄), oxigênio molecular e ao substrato molecular L-arginina (ALDERTON *et al.*, 2001). Todas as isoformas da NOS possuem um grupo tiolato de zinco (Zn). A retirada de Zn da NOS, ou uma possível expressão de NOS ativa Zn deficiente, demonstram que o Zn possui uma função estrutural na molécula da enzima.

Todas as isoenzimas catalisam a transferência de elétron mediada por flavina, do C-terminal de NADPH para o grupo heme no N-terminal. A calmodulina (CaM), sob a indução de cálcio, se liga à NOS aumentando a transferência de elétron através do

domínio redutase (de NADPH para flavinas) e também pode transferi-los do domínio redutase para o grupo heme no domínio de oxigenase. No heme, os elétrons são usados para reduzir e ativar O_2 . Para produzir NO, a enzima precisa ciclar duas vezes. Primeiramente a NOS hidroliza L-arginina a N_{ω} -hidroxi-L-arginina, e em um segundo passo, oxida N-hidroxi-L-arginina a citrulina e NO. (Figura 3)

1.2.2 Regulação fisiológica da atividade da eNOS

A atividade da eNOS aumenta nitidamente quando a concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular se eleva, pois a enzima produz NO de uma maneira Ca^{2+}/CaM dependente. O Ca^{2+} induz a ligação do CaM à enzima, o que em troca aumenta a taxa de transferência eletrônica de NADPH ao centro heme. (HEMMES E MAYER, 1998). (Figura 3). No entanto, a eNOS também pode ser ativada por estímulos que não produzam uma alta na concentração de Ca^{2+} , levando a uma liberação prolongada de NO. Um exemplo de tal estímulo bem conhecido é a tensão de corte exercida pelo sangue circulante, que pode aumentar a atividade da enzima, independente dos níveis de Ca^{2+} . Esta ativação é mediada pela fosforilação da enzima.

A proteína eNOS pode ser fosforilada em diversos resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr), contudo a maioria das mudanças na atividade enzimáticas estão relacionadas à fosforilação de resíduos dos amino ácidos Ser1177 e Thr495. A fosforilação de Ser1177 estimula o fluxo de elétrons entre o domínio redutase, aumenta a sensibilidade da enzima ao Ca^{2+} e representa um mecanismo adicional e independente de ativação da eNOS. Diversas proteína-quinases podem fosforilar a eNOS em Ser1177 e podem participar na ativação da enzima seguindo estimulação hormonal e/ou mecânica de células endoteliais. O resíduo de aminoácido Thr495, por outro lado, é um sítio de regulação negativo onde a fosforilação diminui a atividade enzimática. Este sítio tende a ser fosforilado sob condições não-estimulantes (mais provavelmente pela proteína quinase C e PKC). A fosforilação de Thr495 é um provável interferente na ligação de CaM ao seu sítio. De fato, a desfosforilação de

Thr495, é associada a estímulos que, como histamina e bradicinina, aumentam a concentração de Ca^{2+} intracelular e a atividade da eNOS.

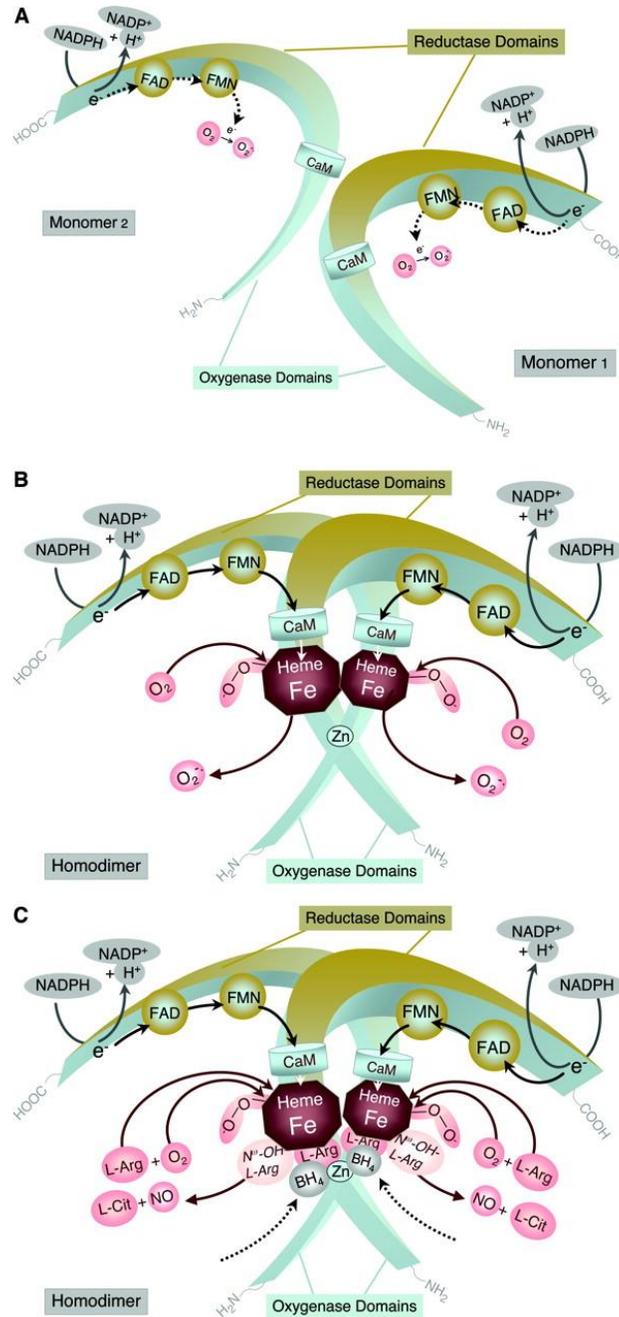


Figura 3. A. Estrutura da eNOS e esquema de catálise enzimática. Todas as enzimas são sintetizadas como monômeros. Cada subunidade é constituída por um domínio redutase e um domínio oxigenase. Monômeros e mesmo domínios redutase isolados são capazes de transferir elétrons de NADPH para as flavinas FAD e FMN e tem uma capacidade limitada de reduzir o oxigênio a O_2^- . Monômeros e domínios redutase isolados podem ligar calmodulina (CaM), o qual estimula a transferência

de elétrons por entre o domínio redutase. No entanto, os monômeros não são capazes de se ligar ao BH_4 ou ao L-arginina e não pode catalisar a produção de NO. **B.** A presença do grupo heme permite a dimerização da NOS, de fato, o heme é o único cofator que é absolutamente requerido para a formação de dímeros de NOS ativos. O heme é também essencial para a interação entre os domínios redutase e oxigenase e para a transferência eletrônica interdomínios das flavinas para o heme do monômero oposto. A taxa de oxidação do NADPH é significativamente aumentada em dímeros quando comparada a monômeros, e consiste em uma produção mais efetiva de O_2^- . **C.** Quando há presença suficiente de L-arginina e BH_4 dímeros de NOS intactos se acoplam ao heme e reduzem O_2 para a síntese de NO. L-citrulina é formada como um subproduto, a N-hidroxil-L-arginina é um intermediário na reação. (FÖRSTERMANN E MÜNZEL, 2006).

1.2.3 Mecanismos moleculares que reduzem os níveis de NO bioativo nas doenças vasculares

A disfunção endotelial é largamente equivalente à inabilidade do endotélio de gerar quantidades adequadas de NO e de produzir vasodilatação mediada pelo NO. A disfunção endotelial é um dos fatores de risco cardiovascular comumente encontrado em pacientes. Diversos defeitos podem contabilizar para a redução de NO bioativo. Estes incluem aumentada depleção de NO devido à reação com $\text{O}_2^{\bullet-}$, produção diminuída de NO devido à mudanças na atividade da eNOS (e.g. desemparelhamento da eNOS) e à mudanças na expressão desta enzima. E ainda, depleção de L-arginina, por exemplo, pela elevada atividade da arginase, poderia contribuir para a disfunção endotelial.

1.2.4 Mecanismos moleculares envolvidos no desacoplamento da eNOS

O desacoplamento da eNOS tem sido atribuído à falha na capacidade da enzima em formar dímeros. Na verdade, tem sido mostrado que a transferência de elétrons não é dependente da formação dimérica e que monômeros de NOS são suficientes para produzir O_2^- . No entanto a atividade da NADPH oxidase nestas condições é limitada, a forma dimérica possui atividade enzimática muito mais elevada. Portanto, torna-se

interessante do ponto de vista de pesquisa, identificar fatores que levam ao desacoplamento da eNOS. (PIEPER, 1997)

A ativação da proteína quinase C (PKC) está envolvida na indução do estresse oxidativo em vasos. A elevada expressão e atividade de NADPH oxidase, aumentada geração de $O_2^{\cdot-}$ e o desacoplamento da eNOS são tidos como consequência da atividade de PKC, pois inibidores de PKC reduz tais expressões e inibe o desacoplamento da eNOS. (LAURSEN *et al.*, 2001)

A produção de NO pela eNOS nas células endoteliais é correlacionada com a concentração intracelular de BH_4 . Em artérias isoladas ou ratos *in vivo*, a depleção de BH_4 leva rapidamente à disfunção endotelial, e a suplementação é capaz de reverter a disfunção da eNOS em diversos tipos de fisiopatologias. A administração de BH_4 restaurou a função endotelial em modelos animais de diabetes (PIEPER, 1997) e insulino-resistentes (SHINOZAKI *et al.*, 2000), assim como em pacientes com hipercolesterolemia (STROES *et al.*, 1997), diabetes mellitus (HEITZER *et al.*, 2000), hipertensão (HIGASHI *et al.*, 2000) e em tabagistas crônicos (HEITZER *et al.*, 2000).

Os níveis intracelulares de BH_4 dependem do balanço de sua síntese *de novo* e sua degradação/oxidação. BH_4 é um dos agentes redutores mais potentes que ocorrem naturalmente. É, portanto, razoável a hipótese de que o estresse oxidativo possa levar a uma excessiva oxidação e depleção de BH_4 (LAURSEN *et al.*, 2001). Como o estresse oxidativo ocorre na fisiopatologia cardiovascular, a oxidação de BH_4 pode ser uma causa comum da disfunção da eNOS nestas situações.

Efeitos benéficos da suplementação de L-arginina têm sido documentados em estudos com animais e humanos em condições fisiopatológicas como hipercolesterolemia e hipertensão (DREXLER *et al.*, 1991). Isto incita a questão sobre o quão limitante para o funcionamento da eNOS o substrato L-arginina pode ou não ser. A princípio isto parece improvável. O K_M da eNOS para a L-arginina é $\sim 3 \mu\text{M}$ (POLLOCK *et al.*, 1991) enquanto que a concentração normal de L-arginina no plasma é $\sim 100 \mu\text{M}$ (mesmo em situações patológicas, os níveis dificilmente chegam a menos de $60 \mu\text{M}$), então há cerca de dez vezes mais L-arginina dentro das células do que o necessário para sua atuação como substrato da eNOS. E ainda, as células endoteliais humanas sequer são dependentes de captação de L-arginina do meio extracelular; elas

podem efetivamente reciclar L-citrulina e produzir L-arginina e ainda adquiri-la via proteólise.

1.3 O Óxido Nítrico no dano e regeneração vascular

O óxido nítrico controla a vasodilatação, a regeneração endotelial, a inibição da adesão plaquetária e a quimiotaxia leucocitária. A deficiência de NO, vital no desenvolvimento de aterosclerose e doenças renovasculares, decorre da expressão e atividade reduzida da NO sintase (NOS), baixos níveis de L-arginina e alta taxa de degradação desta molécula por mecanismos oxidativos (NAPOLI E IGNARRO, 2001). A manipulação genética da NO sintase foi capaz de gerar importantes conhecimentos sobre as vias patogênicas de doenças vasculares. Resultados de estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que a modulação de mecanismos oxidativos e o aumento da produção de NO pela administração de L-arginina e antioxidantes melhora, a neovascularização seguido de terapia genética e terapia de células da medula.

1.3.1 Sinalização do Óxido Nítrico na parede arterial

O óxido nítrico (NO) funciona como um mensageiro chave no sistema cardiovascular (IGNARRO *et al.*, 1999). Níveis adequados de esta molécula gasosa são importantes na preservação da fisiologia vascular. Conhecidas funções regulatórias são controladas pelo NO. (NAPOLI E IGNARRO, 2001). Certamente, o NO participa do controle homeostático, fibrinólise, apresentação de antígenos de histocompatibilidade, tônus vascular e proliferação de células de músculo liso vasculares, homeostasia do sangue e da pressão, e de interação entre leucócitos e plaquetas com a parede arterial. (RABELINK E LUSCHER, 2006).

A diminuição da biodisponibilidade de NO e anormalidades na sinalização NO-dependente, estão entre as causas centrais de doenças vasculares, apesar de ainda

não ser claro o quanto estes são a causa ou o resultado da disfunção endotelial, ou ainda, mais provavelmente, ambos. A biodisponibilidade alterada de NO causa disfunção endotelial, o que aumenta a susceptibilidade a aterosclerose, diabetes mellitus, hipertensão, hipercolesterolemia, falência congestiva cardíaca, trombose e infarto. (NAPOLI E IGNARRO, 2001).

O NO é produzido por uma família de NO-sintases (NOS), das quais três formas principais, identificadas no ser humano e em outros organismos, são expressas em diferentes tipos celulares: a NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS), como citado anteriormente.

As isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) são enzimas constitutivas reguladas por cálcio e calmodulina e por modificações pós-traducionais. A terceira isoforma, iNOS (ou NOS2), regulada por estimulação de citocinas, produz vasta quantidade de NO comparada às outras duas isoformas. As três isoformas de NOS têm mecanismos similares que envolvem transferência de elétrons para oxidação do terminal guanidino nitrogênio da L-arginina. Todas estas enzimas requerem cofatores para uma função ótima, incluindo tetrahydrobiopterina (BH₄), fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). (Figura 2) (NAPOLI E IGNARRO, 2001)

Estudos envolvendo disfunções genéticas de cada isoforma de NOS desvendaram importantes informações sobre o múltiplo envolvimento do NO nas doenças cardiovasculares. De fato, a falta de eNOS causa hipertensão, disfunções endoteliais e uma severa resposta à injúria vascular, isquemia vascular e aterosclerose induzida por hábitos alimentares, enquanto que a falta de nNOS está ligada a uma resposta menos severa à isquemia cerebral mas um aumento da aterosclerose induzida por hábitos alimentares (LIU *et al.*, 2008). Finalmente, ratos com ausência de iNOS mostram reduzida hipotensão à choques sépticos.

O alvo fisiológico do NO é a guanilato ciclase solúvel (NAPOLI *et al.*, 2006). O NO ativa a guanilato ciclase ao ligar-se ao grupamento heme, resultando em níveis elevados de cGMP. Na vasculatura o cGMP media o relaxamento NO-dependente do músculo liso vascular, resultando em vasodilatação. Similarmente, o NO em sua função de neurotransmissor no trato gastrointestinal, urinário e respiratório media o

relaxamento muscular ao aumentar a produção de cGMP. Estes efeitos parecem ser devido à fosforilação de proteínas por quinases dependentes de cGMP, incluindo a miosina.

1.3.2 O Óxido Nítrico na disfunção vascular

Um primeiro evento na fisiopatologia da aterosclerose é o prejuízo da função arterial (NAPOLI *et al.*, 2006). Níveis diminuídos de NO biodisponível ocorre por diversos mecanismos potenciais, como: redução da expressão de eNOS, da atividade da eNOS e da biodisponibilidade de NO (Figura 4). A disfunção endotelial esta ligada a um aumento na produção de ROS na vasculatura, que decorre da ativação da NAD(P)H-Oxidase no endotélio, músculo liso vascular, ou em células adventícias. Ou ainda, via ativação da enzima Xantina Oxidase.

Taxas elevadas de reações com superóxido determinam um decréscimo na biodisponibilidade de NO e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que induzem nitração de proteínas. Assim sendo, o radical superóxido reage com NO para formar o peroxinitrito. Este composto possui a mesma atividade biológica do NO em concentrações bem baixas. No entanto, em altas concentrações, o peroxinitrito é toxico, pois forma o ácido peroxinitroso, que é citotóxico, assim como induz modificações em proteínas por nitrosação de amino ácidos. (NAPOLI *et al.*, 2006).

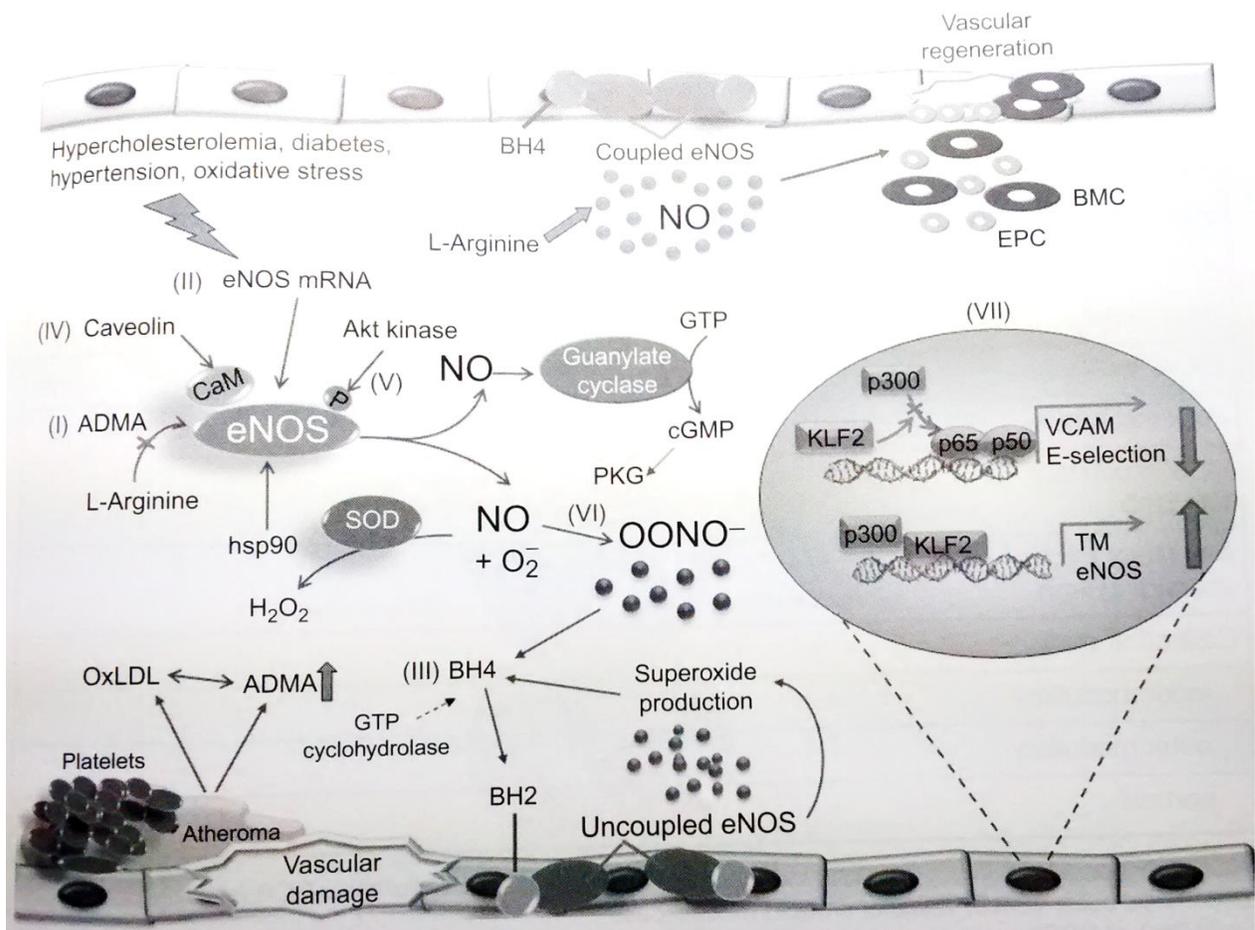


Figura 4. Mecanismos de regulação da eNOS no dano e regeneração vascular. Em situação de doença vascular, como diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia, a produção de superóxido por oxidases é marcadamente aumentada. Diversos mecanismos podem contabilizar para o dano vascular e a disfunção endotelial, incluindo: (I) baixa disponibilidade de substrato; (II) mudanças no mRNA da eNOS ou de seus níveis proteicos; (III) baixa disponibilidade de cofatores; (IV) localização subcelular imprópria; (V) fosforilação anormal; (VI) desgaste dos níveis NO pelo superóxido (O_2^-) para formar ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) e, (VII) regulação por KLF2. O peroxinitrito e outras espécies reativas de oxigênio oxidam BH4, via radical BH3 a BH2 e biopterina, o que reduz a biodisponibilidade de BH4 e promove desacoplamento da eNOS. Esta forma da eNOS não é capaz de produzir NO, ao invés disso, gera superóxido. KLF2 é inibida pela citocina pró-inflamatória IL-1 β e é induzida pelo limiar de estresse nas células endoteliais. A super expressão de KLF2 induz fortemente a produção de eNOS e, inibe a molécula de adesão endotelial, E-selectina e a indução de VCAM-1, mediada por citocinas pró-inflamatórias. A suplementação de L-arginina exerce efeitos benéficos na produção endotelial de NO durante a regeneração vascular ao aumentar a capacidade de neovascularização de células da medula óssea e aumentar o número de células endoteliais progenitoras que se incorporam nos locais do dano vascular. (IGNARRO, 2010)

Apesar de todo o envolvimento chave da baixa disponibilidade de NO na disfunção endotelial e no dano vascular, a NOS por si própria é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), (SATOH *et al*, 2005) na ausência do substrato L-arginina, ou cofatores como o BH4. BH4 é particularmente um importante cofator, porque na sua ausência o transporte de elétron através da eNOS pode se tornar 'desacoplada', resultando na geração de ânion superóxido. (Figura 4).

De forma geral, mudanças no mRNA da eNOS ou na expressão do gene, podem contribuir para a disfunção endotelial. Estas condições determinam um nível reduzido da atividade da eNOS.

1.4 Gene eNOS

O gene *eNOS* encontra-se no cromossomo 7, mais especificamente no braço longo deste cromossomo na região 7q35-36 (LEE *et al.*, 2012). A primeira descrição desse gene foi em 1993, apontando as características das regiões promotoras, exons e íntrons (WANG; WANG, 2000). Desde então é sabido que o cromossomo em questão codifica um RNA mensageiro de 4052 nucleotídeos e 26 exons (FARRELL; BLAKE, 1996).

Estuda-se geralmente, três polimorfismos nesse gene, são eles: - 786 (T/C) na região promotora do gene, o Glu298Asp no exon 7 (-894 G/T) e um VNTR (*Variable Number of Tandem Reapeats*) de 27 pares de bases no íntron 4. A Figura 5 mostra a organização do cromossomo 7 e as principais regiões estudadas.

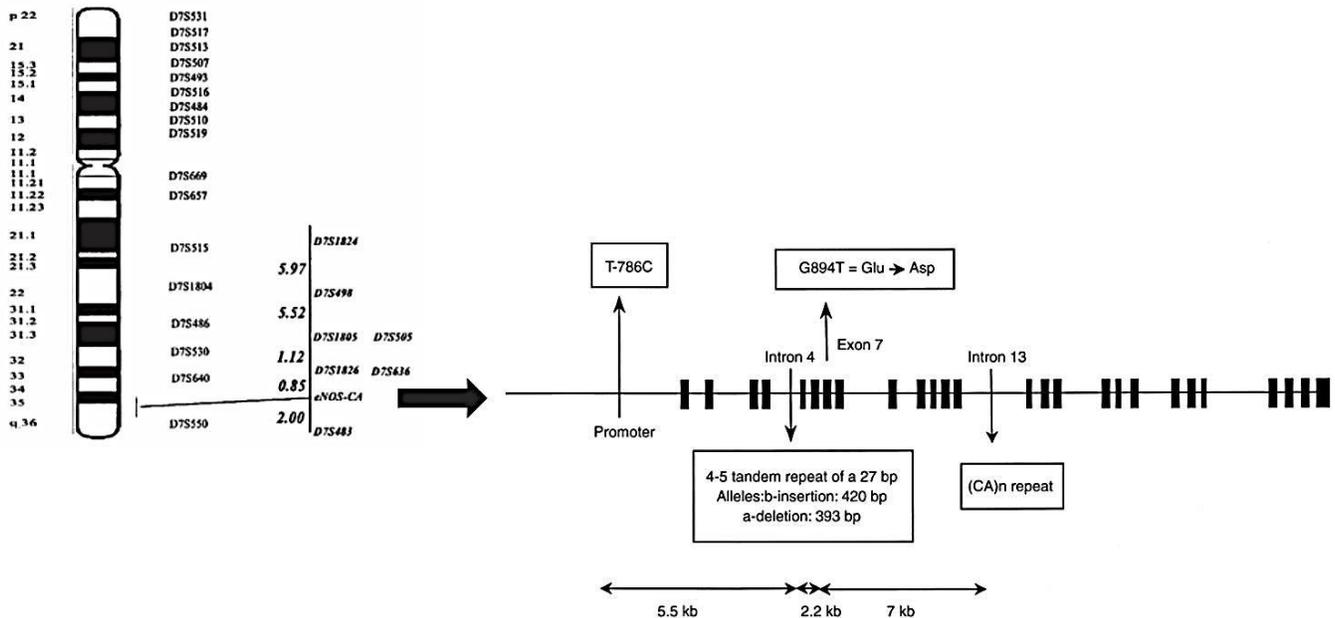


Figura 5. Localização do gene eNOS no cromossomo 7. O gene e a região dos principais polimorfismos estudados. (Adaptado de GUO *et. al.*, 1999 e ZANCHI *et. al.* 2000).

O polimorfismo Glu298Asp (894 G/T) é o alvo dessa pesquisa e ele tem uma importância singular na funcionalidade do óxido nítrico sintase endotelial. Sabe-se que a substituição do glutamato pelo aspartato na posição 298 da eNOS aumenta a suscetibilidade da clivagem por proteínas, em consequência disso se tem a diminuição da produção de óxido nítrico basal, que é responsável por manter a homeostase corporal (CHOUDHARI *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2006).

Em especial, o óxido nítrico desempenha um papel importante na regulação da circulação sanguínea no cérebro, perdas na sua função levam a alterações do relaxamento vascular, o que o coloca como um agente principal na patofisiologia do sistema vascular. Diversos estudos reiteram que o polimorfismo Glu298Asp da eNOS pode ter efeitos adversos sobre a expressão e atividade da óxido nítrico sintase endotelial, o que pode resultar em desajuste fisiológico do endotélio e contribuir para o desenvolvimento do acidente vascular.

Polimorfismos de Glu298Asp são frequentemente encontrados em doenças vasculares como infarto do miocárdio, espasmo coronário e hipertensão arterial. Estudos sugerem que polimorfismos do gene eNOS podem estar associados à incidência de acidente vascular isquêmico em Asiáticos. Esta conclusão evidencia a

importância do gene e ainda sugere ser este, uma importante via terapêutica de intervenção clínica. (WANG *et al.*, 2013)

Contudo, o proposto papel deste polimorfismo em pacientes que sofreram acidente vascular isquêmico tem sido inconstante, uma vez que alguns estudos apresentam associação, enquanto outros reportam o oposto. Estas inconstâncias se justificam muitas vezes por questões de amostragem e limitante étnicos. Estudos de metanálise foram empregados na tentativa de eximir tais diferenças entre os estudos de caso e prover uma análise precisa desta associação, chegando à conclusão de que polimorfismos no gene eNOS têm implicação quanto a incidência de acidente vascular encefálico em diferentes grupos étnicos. (WANG *et al.*, 2013; CASAS *et al.*, 2004)

1.5 Acidente Vascular Encefálico

O AVE é caracterizado pela falta de subsídio sanguíneo em uma dada região cerebral que pode ser ocasionada pela ruptura ou obstrução arterial. Existem dois tipos de AVE, e são eles: isquêmico e hemorrágico. O AVE isquêmico é caracterizado pela interrupção do fluxo sanguíneo em determinada região cerebral, em geral a interrupção ocorre pela presença de um trombo, que é um processo inadequado de coagulação sanguínea, na artéria ou na veia, pela presença de um êmbolo, coágulo de sangue com agregados bacterianos e células inflamatórias (BATH e KRISHNAN, 2014)

O AVE Hemorrágico é resultado de uma fraqueza vascular que pode levar a uma ruptura do vaso e conseqüente extravasamento sanguíneo em regiões do cérebro. Os dois tipos de AVEH são o intracerebral, que ocorre dentro da massa encefálica, e subaracnóide, quando o sangue extravasado fica confinado entre as meninges aracnóide e pia-mater. (VAGAL, KHATRI *et al.*, 2014).

De acordo com a Academia Americana de Acidente Vascular (AAS), o acidente vascular encefálico hemorrágico contabiliza aproximadamente 13% dos casos de acidente vascular encefálico. No geral, os casos de aneurisma são rotineiramente observados no ambiente emergencial de hospitais, e representam a principal causa de morte no Brasil (FERNANDES, BENSENOR *et al.*, 2014).

Existem dois tipos de fraqueza vascular que usualmente levam a ruptura do vaso, o aneurisma e malformações arteriovasculares. As malformações são congênitas e ocorrem raramente. O aneurisma é, grosseiramente, um distúrbio da morfologia vascular de uma região enfraquecida do endotélio. Se não tratado, o aneurisma continua a se desenvolver e pode chegar à ruptura e subsequente extravasamento de sangue. Os locais mais suscetíveis ao desenvolvimento dos aneurismas são as bifurcações de artérias e veias. Estima-se que até 80% dos AVEHs tem como evento primário os aneurismas (WIWANITKIT, 2014).

Os aneurismas podem ser classificados quanto a sua causa, lesão que os originaram ou quanto a sua conformação geométrica. Quanto à lesão os aneurismas são subdivididos em: arterioscleróticos, que são os aneurismas decorrentes de casos de arteriosclerose avançada; e congênitos e infecciosos, esses são os aneurismas cuja fragilidade na parede arterial ou vascular é fruto de infecções diversas (HAJI, VAN ADEL *et al.*, 2014).

Atualmente, o diagnóstico de AVE é dado com base no histórico clínico do paciente e com o auxílio da tomografia computadorizada. Os sintomas do AVE podem ser vários e estão relacionados com diferentes áreas do cérebro, é comum que haja alteração neurológica podendo interferir na fala, visão, cognição, sensibilidade, no equilíbrio e nos movimentos (NETO, NEVILLE *et al.*, 2014).

Os casos de AVE não são distribuídos uniformemente pelo mundo, os números variam de região pra região, de sociedade pra sociedade, de costume pra costume, de hábitos de vida para hábitos de vida. O AVE está relacionado com uma série de fatores que influenciam no evento, dentro desses fatores existem aqueles que os indivíduos não exercem influência, como por exemplo sexo e idade, e fatores que podem ser controlados pelo indivíduo, como a hipertensão arterial (BACZKO, LEPRAN *et al.*, 2014).

Vários são os fatores de risco para o acontecimento do AVE, dentre eles pode-se citar: a hipertensão arterial, o fumo, o diabetes, o colesterol e o uso de anticoncepcionais. A hipertensão arterial é a primeira causa associada ao evento e é ainda mais importante se associada à doenças de grandes e pequenas artérias (EL-KOUSSY, SCHROTH *et al.*, 2014).

O fumo é o segundo fator de risco mais importante relacionado ao aneurisma, aumentando a chance do acontecimento de infarto intracerebral. Já os anticoncepcionais orais estão relacionados com população de mulheres acima dos 35 anos fumantes, que tem histórico de enxaqueca ou hipertensão arterial anos e o evento mais comum nesses casos é o AVE isquêmico. (CAI, CUI *et al.*, 2014).

Níveis alterados colesterol se apresentam como fator de risco e pode interferir e influenciar no evento do AVE. Concentrações muito baixas de colesterol atuam como fator de risco para a hemorragia cerebral, enquanto que concentrações altas são fatores de risco para o infarto cerebral (SULTAN, SCHUPF *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

O estudo da correção entre polimorfismos do gene eNOS e sua influência no desencadeamento de acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) e aneurisma intracerebral (AI) tem sua importância quanto ao entendimento da patologia, que é multifatorial, visando obter dados que auxiliem no desenvolvimento de estudos clínicos e possível reversão e prevenção da situação patológica. Além dos riscos já recorrentemente aceitos sobre doenças vasculares, há uma crescente evidência sobre o papel genético na patofisiologia do AVEH e aneurisma.

O Aneurisma Intracerebral é uma condição patológica dos vasos intracranianos que pode possuir uma fraqueza anormal na parede dos vasos, ficando estes propensos a ruptura. A ruptura desses aneurismas pode levar a uma hemorragia no espaço subaracnóide que envolve o cérebro, e às vezes no parênquima cerebral (FRÖSEN *et al*, 2012). Essas condições hemorrágicas conhecidas como Acidentes Vasculares Encefálicos Hemorrágicos (AVEH) são um importante problema de saúde pública, que se situam entre as quatro maiores causas de morte em muitos países e é responsável por uma grande proporção de distúrbios neurológicos (ROWLAND, 2002). Mais incapacitante que fatal, o AVEH 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).

Os polimorfismos dos genes codificantes de eNOS tem grande potencial de se tornar um parâmetro genético relevante para estudos de acidentes vasculares, contudo os resultados da literatura ainda são escassos. Outro ponto que justifica a realização desse trabalho é que os marcadores genéticos podem variar de acordo com a constituição genotípica de cada população, logo se faz necessário um estudo específico em nossa população. Além disso, existe grande relevância desse gene no controle de doenças cardiovasculares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar polimorfismos no gene eNOS e determinar sua possível associação com acidente vascular encefálico hemorrágico e aneurisma intracerebral.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Identificar a frequência do polimorfismo 894 G/T do gene eNOS em indivíduos portadores de acidente vascular encefálico hemorrágico e/ou aneurisma intracerebral atendidos por um hospital do Distrito Federal- Brasil;

3.2.2. Comparar estas frequências gênicas com aquelas observadas em indivíduos sadios não portadores de doenças crônicas, habitantes da mesma região, e, a partir daí, desenvolver um estudo de caso-controle;

3.2.3. Investigar aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes portadores da patologia e compará-los a indivíduos do grupo controle, quando for o caso.

4 METODOLOGIA

4.1 Aprovação em comitê de ética de pesquisa e ficha de avaliação clínica

Após a aprovação do projeto (ANEXO A), os dados pessoais dos participantes da pesquisa foram obtidos por meio de preenchimento de uma ficha de identificação específica (ANEXO B). Esta ficha abrangia as seguintes variáveis: idade, sexo, cor, estado civil, data do registro da patologia estudada, presença de hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, etilismo. Parâmetros bioquímicos e celulares também foram anotados, exemplos: uréia, creatinina e plaquetas. Foram computadas as informações sobre a escala de Glasgow, Escala de Rankin, Escala de NIHSS, índice de Bartelm e ICH.

O uso de escalas é importante. No ambiente da emergência, a avaliação neurológica deve abranger principalmente a gravidade do AVC, o seu tipo e sua localização, dado que exames neurológicos extensos são inexecutáveis.

A escala de Rankin (ERm) é um instrumento de mensuração da incapacidade que tem sido amplamente utilizado na avaliação da recuperação neurológica e como *end-point* primário (prognóstico) em estudos clínicos para o tratamento do AVC (acidente vascular cerebral). A versão mais atual dessa escala é uma adaptação da escala de Rankin e consiste de 6 categorias que vão do 0 a 5, sendo que, eventualmente, agrega-se o score 6 (óbito) em estudos clínicos. Resumidamente, a escala avalia a capacidade do indivíduo de realizar as atividades de vida diária. A escala é essencialmente baseada na incapacidade global (em particular a incapacidade física) e na necessidade de assistência para realizar atividades instrumentais e básicas da vida diária com ênfase no comprometimento motor. Ela pode ser aplicada por qualquer profissional da área da saúde, possuindo moderada confiabilidade entre observadores. Na figura 6, tem-se a graduação da respectiva escala.

Escala de Rankin modificada

Pontuação	Descrição
0	Sem qualquer sintoma.
1	Sem incapacidade significativa apesar dos sintomas; capaz de realizar todos os deveres e atividades usuais.
2	Incapacidade leve; incapaz de realizar todas as atividades prévias, mas é capaz de cuidar de si próprio sem auxílio.
3	Incapacidade moderada; necessita de alguma ajuda, mas é capaz de caminhar sem assistência.
4	Incapacidade moderadamente grave, incapaz de caminhar sem assistência e incapaz de atender a suas necessidades físicas sem assistência.
5	Incapacidade grave, acamado, incontinente, requer constante atenção e cuidados de enfermagem.
6	Óbito.

Figura 6. Graduação da escala de Rankin (Adaptada de FALCÃO *et al.*, 2010).

O Índice de Barthel (IB) é uma escala de incapacidade que mensura 10 aspectos básicos da atividade diária relacionados à mobilidade e aos cuidados pessoais, tais como: alimentação, higiene pessoal, controle dos esfíncteres vesical e intestinal, independência no banheiro, transferência da cadeira, marcha e capacidade para subir escadas. Tem sido bastante utilizada como medida de prognóstico pós-AVC, porém também é utilizada para avaliação de outras desordens neurológicas. O escore normal é de 100 (máximo), com pontuações indicando o grau de dependência sendo que abaixo de 50 significa dependência.

O IB pode ser avaliado de duas 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 à 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) é uma escala padrão, validada, e quantitativa da severidade e magnitude do déficit neurológico após o AVC e deve ser realizada antes de eventual terapia fibrinolítica. Esta escala baseia-se em 11 itens do exame neurológico que são comumente afetados pelo AVC, sendo eles: nível de consciência, desvio ocular, paresia facial, linguagem, fala, negligência/extinção, função motora e sensitiva dos membros e ataxia. Ela foi desenvolvida para ser aplicada rapidamente (5 – 8 minutos), no contexto do tratamento de pacientes com AVC agudo.

A NIHSS pode ter sua pontuação variando de 0 (sem evidência de déficit neurológico pela esfera testada na escala) a 42 (paciente em coma e irresponsivo). Dos 42 possíveis pontos na NIHSS, 7 pontos são diretamente relacionados com a linguagem (orientação 2, comandos 2, afasia 3) e somente 2 pontos relativos a negligência (MARTIN-SCHILD, ALBRIGHT *et al.*, 2011).

A escala de AVC do NIH auxilia no seguimento neurológico e na decisão terapêutica: pacientes com menos de 4 pontos têm déficits leves (ou em melhora), não sendo candidatos a terapia com ativador de plasminogênio tissular recombinante (rtPA) (exceção: afasia grave isolada ou hemianopsia completa) e pacientes com mais de 22 pontos têm um alto risco de desenvolver hemorragia sintomática, requerendo avaliação caso a caso. Apesar de críticas ao seu uso, sugere-se também a utilização da escala de coma de Glasgow para auxílio no segmento do exame neurológico (KWAH E DIONG, 2014).

A escala de coma de Glasgow (ECG) é uma escala neurológica que representa um método confiável para registrar o nível de consciência de um indivíduo, com intuito da avaliação inicial e contínua após um traumatismo craniano. Seu valor também é utilizado no prognóstico do paciente e é de grande utilidade na previsão de sequelas casuais. Inicialmente usado para avaliar o nível de consciência depois de trauma encefálico, a escala é atualmente aplicada a diversas circunstâncias (BARLOW, 2012). A interpretação desta escala está aqui descrita: 3 = Coma profundo; (85% de probabilidade de morte); 4 = Coma profundo; 7 = Coma intermediário; 11 = Coma superficial; 15 = Normalidade.

As escalas para análise de hemorragia intracerebral espontânea visam o entendimento fisiopatológico da doença, determinam a mortalidade e dependência funcional. Modelos matemáticos utilizando regressão logística identificam variáveis clínicas e tomográficas. As associações destas variáveis constituem ferramentas úteis nas unidades de emergência para uma compreensão global de um paciente portador de doença cerebrovascular. Em 2001, foi proposta a escala "ICH Score" que associa variáveis clínicas e tomográficas. Esta escala apresenta acurácia na determinação da mortalidade como do bom prognóstico funcional. A pontuação é determinada por cinco componentes relacionados ao resultado após hemorragia intracerebral espontânea

(SICH): Escala de Glasgow Outcome (GOS), volume ICH, presença de hemorragia intraventricular, origem infratentoriais e idade. 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, LU *et al.*, 2013)

4.2 Coleta de material para análise de Patologia Molecular clínica

O único procedimento a que os participantes foram submetidos foi a coleta de aproximadamente 10 mL de sangue por meio de punção de veia periférica, com material novo e descartável. A coleta de sangue foi realizada pela enfermeira chefe do setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília, Hélia Sousa, responsável pelo projeto de pesquisa aprovado no comitê de ética.

O material biológico, no caso o sangue, dos participantes foi levado ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Bioprospecção e Neurociências (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília), onde foi estocado sob a guarda da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari para realização da extração do DNA das amostras e os exames para verificação dos polimorfismos genéticos, também foi fracionado com o Laboratório de Análises Clínicas da FCE sob supervisão da professora Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva.

4.3 Participantes da pesquisa

Os participantes da pesquisa foram divididos em dois grupos, 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 (n = 22) e aneurisma intracerebral (n = 20). Os critérios de exclusão deste grupo foram idade, neste caso indivíduos menores de 18 anos, indivíduos que não apresentaram diagnóstico de AVEH e/ou aneurisma intracerebral, indivíduos que não desejaram participar da pesquisa ou representantes legais que não consentiram em participar.

O grupo controle teve como critérios de inclusão indivíduos sadios (n = 16) de ambos os sexos, idade maior que 18 anos, sem histórico de AVEH e aneurisma intracerebral, não aparentados dos pacientes do grupo caso. Os critérios de exclusão foram idade, aqui indivíduos menores de 18 anos, parentes de indivíduos com AVEH e/ou aneurisma intracerebral, indivíduos que não desejaram participar da pesquisa.

4.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

4.5 Termo de Guarda de Material Biológico

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

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

4.6 Procedimentos Laboratorias

4.6.1 Extração de DNA

O kit usado para a extração do DNA foi o *Invisorb Spin Blood Mini Kit (250)* da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A concentração de DNA foi determinada em corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/μL.

4.6.2 PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativo

A técnica de PCR Qualitativa permite que uma região do DNA genômico seja amplificada milhões de vezes, o que permite um estudo minucioso do ácido nucleico citado. Baseando-se nesse fato, usou-se essa metodologia para avaliação do polimorfismo 894 G/T do gene eNOS.

As sequências de oligonucleotídeos que foram utilizadas para avaliar o polimorfismo eNOS 894 G/T foram (fabricante: IDT Technologies):

Senso 5'-CCCCTCCATCCCACCCAGTCAATCC-3'

Antisenso 5'- AGGAAACGGTCGCTTCGACGTGCTG -3' (YU *et al.*, 2006)

As condições de termociclagem foram: 95°C por 4 minutos (denaturação inicial), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, acompanhada de 63 °C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos. Por último, foi realizada o processo de extensão a 72°C por 7 minutos, obtém-se, então um fragmento de 151 pb. O equipamento utilizado foi *termociclador Techne modelo TC-512*.

Em cada reação, foi utilizado: 4,0 μL de DNA genômico na concentração de 2,5 ng/ μL , descongelado; 3 μL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl); 0,75 μL de MgCl_2 (Fermentas), 2 μL de dNTPs (2,5mM; LGC); 0,4 μL de Taq-Polimerase (Fermentas, 5U/ μL); 1 μL de cada oligonucleotídeo forward e reverse (10 μM); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 μL por reação.

4.6.3 Digestão Enzimática

Realizada a PCR e tendo como produto o fragmento de 151 pares de base (pb), partiu-se para o processo de digestão enzimática. A enzima usada na digestão foi a Sau3A1 (Jena, USA), sendo que esse processo foi realizado a 37°C por 2 horas. O alelo 1 (G/G) não sofreu clivagem pela enzima, portanto obteve-se um fragmento de 151 pb. O alelo 2 (T/G) apresentou um novo sítio de restrição, ou seja, o fragmento de DNA foi clivado em três fragmentos um de 102 pb, outro de 49 pb e outro de 151 pb. Já o alelo 3 (T/T), também apresentou um sítio de clivagem, sendo o fragmento dividido em outros dois, um de 49 pb e outro de 151. À vista disso, o polimorfismo pode ser dividido em genótipo de não clivagem (GG), heterozigoto (TG) e genótipo de clivagem (TT).

A montagem do sistema de digestão utilizados foi a seguinte: 10,0 μL da PCR; 2,0 μL de tampão 10x NEB4 (Biolabs); 1 μL de enzima Sau3A1 (10U/ μL), completando com água Milli-Q para um volume final de 20 μL por reação.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3%, com brometo de etídio em uma potência de 100W por um tempo de 90 minutos.

4.7 Análise Estatística

4.7.1 Estimativa das frequências genotípicas

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

4.7.2 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.

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

5 RESULTADOS

5.1 Características dos sujeitos

Na tabela 1 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 ($P = 0,833$) dos demais grupos: AVEH (45,5%), Aneurisma (40,0%). A diferença estatística não foi observada também na distribuição da presença de diabetes (apenas dois indivíduos – 10,0% - com aneurisma eram portadores da doença crônica, $P = 0,140$); do hábito de fumar (31,3% do grupo controle; 45,5% do grupo AVEH e 40,0% do grupo aneurisma, $P = 0,676$); e da ingestão de bebidas alcoólicas (25,0%; 36,6%; e 10,0%; respectivamente, $P = 0,136$). Porém, a presença de hipertensão arterial (HAS) era a diferença marcante entre os grupos, sendo que apenas 12,5% dos sujeitos do grupo controle eram portadores desta característica, contra 72,7% dos sujeitos com AVEH e 75% dos sujeitos pertencentes do grupo aneurisma ($P = 0,000$).

Para a análise das características quantitativas dos sujeitos, construiu-se a tabela 2. Não foi observada uma diferença significativa na proporção de indivíduos com relação à idade ($P = 0,057$), e, portanto, os sujeitos do grupo controle, AVEH e aneurisma apresentavam, em média, a mesma idade. A importância desta homogeneidade está no fato de que a doença acomete principalmente indivíduos acima de cinquenta anos, assim sendo não há discrepância ou mesmo tendência entre os grupos. Além disso, neste tipo de análise foi possível notar que, todos os grupos não se diferenciaram quanto à glicemia média ($P = 0,069$).

Tabela 1- 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								P
		Controle		AVEH		Aneurisma		Total		
		%								
Sexo	Masculino	8	50,0	0	45,5	8	40,0	26	4,8	0,833
	Feminino	8	50,0	12	54,5	12	60,0	32	55,2	
	Total	16	100,0	22	100,0	20	100,0	58	100,0	
HAS	Sim	2	12,5	16	72,7	15	75,0	33	56,9	0,000*
	Não	14	87,5	6	27,3	5	25,0	25	43,1	
	Total	16	100,0	22	100,0	20	100,0	58	100,0	
Diabetes	Sim	0	0,0	0	0,0	2	10,0	2	3,4	0,140
	Não	16	100,0	22	100,0	18	90,0	56	96,6	
	Total	16	100,0	22	100,0	0	100,0	58	100,0	
Tabagismo	Sim	5	31,3	10	45,5	8	40,0	23	39,7	0,676
	Não	11	68,8	12	54,5	12	60,0	35	60,3	
	Total	16	100,0	22	100,0	20	100,0	58	100,0	
Etilismo	Sim	4	25,0	8	36,4	2	10,0	14	24,1	0,136
	Não	12	75,0	14	63,6	18	90,0	44	75,9	
	Total	16	100,0	22	100,0	20	100,0	58	100,0	

*diferença estatística ($P < 0,05$); teste qui-quadrado.

Tabela 2- Estatísticas-resumo (média e erro padrão) da idade e glicemia dos grupos controle, AVEH e aneurisma.

		Grupo								P [#]
		Controle		AVEH		Aneurisma		Total		
		Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	
Idade		56	2	56	2	51	2	54	1	0,057
Glicose (mg/dL)		99	2	113	6	119	6	111	3	0,069

[#]Conforme o teste estatístico ANOVA.

Na tabela 3, 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. Em relação às escalas, foi possível verificar que a maioria dos indivíduos foi considerada em normalidade, conforme a escala de Glasgow (sendo que apenas dois indivíduos com AVE apresentava coma intermediário; quanto à

avaliação funcional, em conformidade com a escala de Rankin, observou-se que mais da metade 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, 22,5% 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 AVE.

Tabela 3- Distribuição das características clínicas (escala de Glasgow, Rankin, NIHSS, Barthel, nos indivíduos pertencentes ao grupo caso (AVEH e Aneurisma).

Características clínicas	Grupo							P
	AVEH		Aneurisma		Total			
		%	N	%	N	%		
Escala de Glasgow	8	1	4,5	0	0,0	1	1,7	0,346
	9	1	4,5	0	0,0	1	1,7	
	12	2	9,1	0	0,0	2	3,4	
	13	1	4,5	0	0,0	1	1,7	
	15	17	77,3	0	100,0	3	91,4	
Escala de Rankin	0	6	27,3	2	10,0	8	19,0	0,069
	1	9	40,9	6	80,0	5	59,5	
	2	1	4,5	0	0,0	1	2,4	
	3	1	4,5	2	10,0	3	7,1	
	4	2	9,1	0	0,0	2	4,8	
	5	3	13,6	0	0,0	3	7,1	
Escala NIHSS	0	8	36,4	8	40,0	6	38,1	0,257
	1	0	0,0	2	10,0	2	4,8	
	2	3	13,6	4	20,0	7	16,7	
	3	4	18,2	2	10,0	6	14,3	
	4	3	13,6	2	10,0	5	11,9	
	6	0	0,0	2	10,0	2	4,8	
	8	2	9,1	0	0,0	2	4,8	
	0	2	9,1	0	0,0	2	4,8	
Índice de Barthel	0	1	4,5	0	0,0	1	2,4	0,053
	2	1	4,5	0	0,0	1	2,4	
	0	2	9,1	0	0,0	2	4,8	
	0	1	4,5	0	0,0	1	2,4	
	0	2	9,1	0	0,0	2	4,8	
	3	2	9,1	0	0,0	2	4,8	
	0	1	4,5	6	30,0	7	16,7	
	0	2	9,1	2	10,0	4	9,5	
	5	0	0,0	4	20,0	4	9,5	
	100	10	45,5	8	40,0	8	42,9	

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 há uma diferença significativa, já que $P < 0,05$.

Tabela 4- 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	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	
Glicose (mg/dL)	113	6	119	6	115	4	0,530
Creatinina (mg/dL)	0,77	0,04	1,79	0,62	1,24	0,29	0,085
Plaquetas (X100.000 mm ³)	284	22	345	20	312	16	0,049*

*Diferença estatística, teste ANOVA.

5.2 Análise do Glu298Asp (894 G/T) no Cromossomo 7 região Q35-36

As frequências genótípicas estão apresentadas na tabela 6. Foi observado em relação ao genótipo GG, ausência de sujeitos no grupo controle, mas 63,6% no grupo AVEH e 35,0% no grupo aneurisma. Quando se divide os sujeitos em grupos caso (aneurisma ou AVEH) e controle, é possível checar a forte associação estatística de GG e os portadores do distúrbio circulatório, com 50,0% dos casos sendo portadores deste genótipo (tabela 7).

Tabela 5- Distribuição das frequências genótípicas do eNOS 894 G/T nos diferentes grupos (controle, AVEH e aneurisma)

		Grupo								P
		Controle		AVEH		Aneurisma		Total		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
eNOS 894 G/T	GG	6	37,5	14	63,6	12	60,0	32	55,2	0,038*
	TG	10	62,5	4	18,2	5	25,0	19	32,8	
	TT	0	0	4	18,2	3	15,0	7	12,1	
	Total	16	100,0	22	100,0	20	100,0	58	100,0	

* Associação estatística, teste qui-quadrado

Tabela 6- Distribuição das frequências genótípicas do eNOS 894 G/T nos diferentes grupos (controle e caso- AVEH e aneurisma).

		Grupo						P
		Caso (AVEH/Aneurisma)		Controle		Total		
		N	%	N	%	N	%	
eNOS 894 G/T	GG	26	61,9	6	37,5	32	55,2	0,007*
	TG	9	21,4	10	62,5	19	32,8	
	TT	7	16,7	0	0,0	7	12,1	
	Total	42	100,0	16	100,0	58	100,0	

*Associação estatística, teste qui-quadrado

6 DISCUSSÃO

O Aneurisma Intracerebral é uma condição patológica multifatorial dos vasos intracranianos que pode possuir uma fraqueza anormal na parede dos vasos, ficando estes propensos a ruptura. O óxido nítrico (NO) funciona como um mensageiro chave no sistema cardiovascular (IGNARRO *et al.*, 1999). Níveis adequados desta molécula gasosa são importantes na preservação da fisiologia vascular. De forma geral, mudanças no mRNA da eNOS ou na expressão do gene, podem contribuir para a disfunção endotelial. Estas condições determinam um nível reduzido da atividade da eNOS.

Foi observada diferença estatística entre o grupo controle e o grupo de pacientes acometidos pelos distúrbios circulatórios estudados. O genótipo TT esteve presente em 16,7% do grupo doença enquanto que no grupo controle não foi encontrado este perfil gênico, havendo forte associação estatística ($p = 0,007$). Contudo, segundo os dados deste projeto piloto e corroborado pela literatura, pode-se presumir que este genótipo confere susceptibilidade e/ou risco de desenvolvimento de AVEH e aneurisma.

E ainda, levando-se em conta os estudos e revisões elaborados, pode-se associar o genótipo TT a um fenótipo de expressão enzimática defeituosa. Possivelmente a enzima eNOS codificada por esta sequência tem sua atividade ou mesmo expressão alteradas. Como elucidado anteriormente, diversas situações levam a uma enzima não otimizada. Presumidamente, a enzima pode ter um déficit em seu grau de transcrição e/ou tradução, ativação, incapacidade de associação aos cofatores e mesmo impossibilidade de formação de dímeros funcionais. Tal situação bioquímica, associada a diversos outros fatores predisponentes, pode ser um determinante no desenvolvimento desta situação clínica de distúrbio neurovascular.

Contudo, quanto à outra parcela de indivíduos, os outros 39,1% que apresentaram perfis GG e GT, sabe-se que diferentes vias e diferentes fatores atuam sobre essa doença multifatorial que é o AVEH e o aneurisma, como por exemplo a hipertensão arterial (EL-KOUSSY, SCHROTH *et al.*, 2014). De todo modo, não se pode excluir completamente, nestes casos, a papel da eNOS/NO. Como elucidado

anteriormente, ainda que a enzima seja expressa e funcional, diferentes situações fisiopatológicas podem alterar o funcionamento ótimo da enzima e biodisponibilidade do NO e assim prover as concentrações ideais de NO para o funcionamento normal do endotélio. A presença de cofatores em concentrações orretas, ausência de distúrbios bioquímicos (diabetes, tabagismo, idade, hipercolesterolemia, etc), são importantes para a manutenção da fisiologia vascular.

Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) são comuns entre os seres humanos, com uma incidência de 1% na população. Estas variantes genéticas são influenciadas por muitos fatores, dentre eles, a etnia e meio ambiente (WENG, HUANG *et al.*, 2014). A identificação de associações entre SNPs e a presença de patologia é crítica para o desenvolvimento de novos tratamentos e como medida de prevenção (identificação de fator de risco genético) para uma série de doenças que acometem os humanos. (BESIROGLU, SAHIN *et al.*, 2014)

Quanto a outros aspectos clínicos, no presente estudo, o tabagismo e etilismo não tiveram frequências diferenciadas entre os grupos. Um estudo sobre o impacto da legislação anti-tabaco na Escócia verificou que a diminuição do hábito de fumar só teve impacto preventivo contra infarto cerebral, mas não em outros tipos de acidentes encefálicos (MACKAY, HAW *et al.*, 2013). Em contrapartida, um estudo de acompanhamento por 20 anos, mostrou que o excesso de bebida pode estar fortemente associado ao AVE. (RANTAKOMI, KURL *et al.*, 2014). É importante ressaltar que em diversos estudos há sim uma possível correlação entre a incidência de AVEH e aneurisma e tabagismo, até mesmo porque tabagismo e hipertensão arterial são reiteradamente associados, além do etilismo. No entanto, neste presente estudo conta-se com a limitante de quantidade de indivíduos em estudo, possivelmente uma amostra maior poderia mostrar associação entre estes fatores e a patologia.

Os dados da tabela 3 demonstram uma homogeneidade entre os participantes do grupo controle, assim sendo esta amostra apresenta características clínicas semelhantes quanto ao comprometimento neurológico, isto pode estar associado ao fato de que a maioria dos indivíduos do grupo caso (61,9%) apresenta mutação em ambos os alelos.

Estudos demonstram que o nível elevado de glicose está associado a um aumento da mortalidade e prognóstico desfavorável nos pacientes com AVEH e aneurisma intracerebral. (WARD, 2014)

Atualmente, os critérios de diagnóstico da Organização Mundial da Saúde (OMS) para diabetes são: glicose no plasma em jejum $\geq 7,0$ mmol / l (126mg/dl) ou 2-h glicose plasmática $\geq 11,1$ mmol / l (200mg/dl). Tais critérios têm como objetivo distinguir um grupo com um significativo aumento de risco microvascular e complicações cardiovasculares (DINARDO, DONIHI *et al.*, 2011). A glicemia média dos sujeitos nos grupos não se encontra acima dos valores de referência para risco de diabetes, e também não demonstra diferença significativa entre os grupos.

A prevalência de hiperglicemia tem sido observada em dois terços de todos os subtipos de AVE e em, pelo menos, 50% em cada subtipo (DINARDO, DONIHI *et al.*, 2011). Autores defendem que a hiperglicemia tem efeitos adversos sobre o tecido, e uma associação entre a glicose no sangue e o resultado funcional do tecido tem sido encontrada em um número crescente de estudos clínicos. (YOO, CHANG *et al.*, 2014)

A HAS é duas vezes mais frequente nos diabéticos do que na população em geral, afetando 30 a 80% destes doentes (sendo que está presente em 60% dos indivíduos com acidente vascular encefálico agudo) e também é considerada um dos maiores fatores de risco para a ocorrência do AVEH e do aneurisma intracerebral (MILLER, KINNI *et al.*, 2014). Tal achado se confirma nesse estudo, considerando que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando a HAS (P = 0,000).

Outro fator marcante foi a diferença média do número de plaquetas dos pacientes com aneurisma. Em recente estudo, analisou-se que o aumento da pressão arterial pode provocar ultra tensão de cisalhamento sangue e provocar poros nos vaso, o que poderia potencialmente ativar as plaquetas como um mecanismo de trombose do aneurisma (XIANG, MA *et al.*, 2014)

7 CONCLUSÃO

Foi observada ausência de genótipo TT nos indivíduos sadios do estudo e uma presença significativa deste perfil gênico nas amostras do grupo doença (16,7%; $p = 0,007$). Este genótipo caracteriza mutação gênica em ambos os alelos e esta condição pode estar associada ao desenvolvimento de AVEH e aneurisma nesta amostragem de projeto piloto.

Quanto à distribuição, entre os grupos, de fatores epidemiológicos como idade, sexo, HAS, diabetes, tabagismo e etilismo, só foi encontrada diferença estatística entre os grupos quanto à incidência de hipertensão arterial HAS. Nosso dado corrobora a literatura que largamente associa a HAS e risco elevado de acidentes vasculares, como o AVEH e aneurisma intracerebral, porém não evidencia a correlação entre diabetes e tabagismo, que na literatura são vistos como dados de associação. Isto pode ser devido ao limitado número de participantes na pesquisa.

Os grupos estudados apresentaram homogeneidade de distribuição de idade estando ambos na faixa de cinquenta ou mais anos, o que é importante pelo fato de que a patologia apresenta maior importância nesta faixa etária. E ainda, quanto ao sexo, os dados apresentaram concordância, isto é relevante uma vez que não há prevalência da patologia sobre sexo.

Os dados bioquímicos de glicose e creatinina não apresentam variação entre o grupo sadio e doença, no entanto a variação da quantidade de plaquetas foi relevante. A distribuição das características clínicas, obtidas pelas escalas de incapacidade, entre os indivíduos do grupo de portadores de AVEH e aneurisma intracerebral foi equivalente. Isto nos garante certa homogeneidade da situação clínica dos pacientes deste estudo.

Destaca-se que o estudo apresenta algumas limitações de amostragem. Sugere-se um estudo posterior que ofereça maior representação das características da população do Distrito Federal. Valendo-se de grupos maiores e compostos por pacientes de diferentes regiões/ hospitais do DF visando a representatividade das frequências gênicas variadas, em relação aos alelos estudados.

8 REFERÊNCIAS

ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem.** 17 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221991/>>. Acesso em 17 Março 2015.

BACZKO, I. et al. Future Perspectives in the Pharmacological Treatment of Atrial Fibrillation and Ventricular Arrhythmias in Heart Failure. **Curr Pharm Des**, Oct 28 2014. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25354185>> .

BARLOW, P. A practical review of the Glasgow Coma Scale and Score. **Surgeon.** 30 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300893> > Acesso em 30 Maio 2015.

BATH, P. M.; KRISHNAN, K. Interventions for deliberately altering blood pressure in acute stroke. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 10, p. CD000039, 2014. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25353321> >.

BESIROGLU, H. et al. Calcium-sensing receptor gene polymorphisms in patients with calcium urolithiasis: a systematic review. **Ren Fail.** 30 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25019182> >. Acesso em 30 Maio 2015.

CAI, Y.; ZENG, T.; CHEN, L. Association of adiponectin polymorphisms with the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: A meta-analysis. **J Diabetes**, May 13 2014. ISSN 1753-0407 (Electronic) 1753-0407 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825737>>

CARDOUNEL, A.J., DOUGHTY, L., ZWEIER, J.L. Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase: differences in the effects of monomethyl- and dimethylarginines in the presence of tetrahydropterin. **J. Biol. Chem.** 15 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15574418>>. Acesso em 15 Março 2015.

CASAS, J.P., BAUTISTA, L.E., HUMPHRIES, S.E., HINGORANI, A.D. s Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Ischemic Heart Disease: Meta-Analysis of 26 Studies Involving 23028 Subjects. **Circulation.** 25 Maio 2015. Disponível em: <<http://discovery.ucl.ac.uk/7284/1/7284.pdf>>. Acesso em 25 maio 2015.

CHEN, X., BUERK, D.G., BARBEE, K.A., JARON, D. A model of No/O₂ transport in capillary-perfused tissue containing an arteriole and venule pair. **Ann. Biomed.** 16 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17235703>>. Acesso em: 16 Março 2015.

CHOUDHARI, S. K. et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World J Surg Oncol**, v. 11, p. 118, Nov. 2013.

DINARDO, M. et al. Standardized glyceimic management and perioperative glyceimic outcomes in patients with diabetes mellitus who undergo same-day surgery. **Endocr Pract.** 25 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247843>>. Acesso em 25 Maio 2015.

DREXLER, H., ZEIHNER, A.M., MEINZER, K., JUST, H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. **Lancet.** 24 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1683971>>. Acesso em 24 Março 2015.

ELBAZ, A., POIRIER, O., MOULIN, T. ET AL. Association between the Glu298Asp polymorphis in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. **Stroke**. 22 Maio 2015. Disponível em: <<http://stroke.ahajournals.org/content/31/7/1634.full>>. Acesso em 22 Maio 2015.

EL-KOUSSY, M. et al. Imaging of Acute Ischemic Stroke. **Eur Neurol**, v. 72, n. 5-6, p. 309-316, Oct 14 2014. ISSN 1421-9913 (Electronic) 0014-3022 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25323674>>.

ESPEY, M.G., MIRANDA, K.M., PLUTA, R.M., WINK, D.A. Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals. **J. Biol. Chem.** 13 Março 2015. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/275/15/11341.full.pdf>>. Acesso em 13 Março 2015.

ESPEY, M.G., THOMAS, D.D., MIRANDA, K.M, WINK, D.A. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative dioxide vs. peroxynitrite mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 27 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC123221/>>. Acesso em 27 Março 2015.

FALCÃO, C. H., FALCÃO, A. L. E, ULHOA, A., REZENDE, M.T, SALGADO, C.G., MALHEIROS, W.G., SILVA, J. A. C, PEIXOTO, E.C.S. Trombólise intra-arterial associada a angioplastia adjunta na fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**. 27 Maio 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-83972010000300007&lng=en&tlng=pt.10.1590/S2179-83972010000300007>. Acesso em 27 Maio 2015.

FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide. **Ann Rheum Dis**, v. 55, n. 1, p. 7-20, Jan 1996.

FERNANDES, T. G. et al. Stroke in the rain forest: prevalence in a ribeirinha community and an urban population in the Brazilian Amazon. **Neuroepidemiology**, v. 42, n. 4, p. 235-42, 2014. ISSN 1423-0208 (Electronic) 0251-5350 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903570>>.

FLINT AC, CONELL C, RAO VA, et al. Effect of statin use during hospitalization for intracerebral hemorrhage on mortality and discharge disposition. **JAMA Neurol.** Sep 22 2014.

FORMAN, H.J, TORRES, M., FUKUTO, J. Redox Signaling. **Mol. Cell. Biochem.** 13 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12162460>>. Acesso em 13 Março 2015.

FORMAN, H.J., TORRES, M., FUKUTO, J. Redox signaling. **Mol. Cell. Biochem.** 27 Março 2015. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274531>>. Acesso em 27 Março 2015.

FÖRSTERMANN, U., MÜNDEL, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: from marvel to menace. **Circulation.** 23 Março 2015. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585403>>. Acesso em 23 março 2015.

FULTON, D., GRATTON, J.P, SESSA, W.C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 14 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714864>>. Acesso em 14 Março 2015.

FULTON, D., GRATTON, J.P., SESSA, W.C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 23 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714864>>. Acesso 23 Março 2015

GUO, G., LADE, J.A., WILTON, A.N, MOSES, E.K., GREHAN, M., FU, Y., QIU,H., COOPER, D.W., BRENNECKE, S.P. Genetic susceptibility to pre-eclampsia and chromosome 7q36. *Human Genetics*. 06 Junho 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s004399900172>>. Acesso em 6 Junho 2015.

HAJI, F. et al. Intracranial aneurysm rupture following intravenous thrombolysis for stroke. **Can J Neurol Sci**, v. 41, n. 1, p. 95-8, Jan 2014. ISSN 0317-1671 (Print) 0317-1671 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384346>> .

HANBAUER, I., COX, G.W., WINK., D.A. Synaptic and extrasynaptic action of free radicals on cell-to-cell signaling. **Ann. N.Y Acad Sci**. 14 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=7832427>>. Acesso em 14 Março 2015.

HEITZER, T., KROHN, K., ALBERS, S., MEINERTZ, T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. **Cir. Res.** 24 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666424>>. Acesso em 24 Março 2015.

HEITZER, T., KROHN, K., ALBERS, S., MEINERTZ. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. **Diabetologia**. 24 Março, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11126415>>. Acesso em 24 Março 2015.

HEMMES, B., MAYER, B. Enzymology of nitric oxide synthases. **Methods Mol. Biol.** 23 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906988>>. Acesso em 23 Março 2015.

HIGASHI, Y., SASAKI, S. NAKAGAWA, K., FUKUTA, Y., MATSUURA, H., OSHIMA, T., CHAYAMA, K. Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. **Am. J. Hypertens.** 24

Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991218>>. Acesso em 24 Março 2015.

IGNARRO, L.J., CIRINO, G., CASINI, A., NAPOLI, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 24 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10598133>>. Acesso em 24 Março 2015.

IGNARRO, L.J., CIRINO, G., CASINI, A., NAPOLI, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 29 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10598133>>. Acesso em 29 Maio 2015.

KWAH, L. K.; DIONG, J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). **J Physiother.** 30 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856948>>. Acesso em 30 Maio 2015.

LAMKIN-KENNARD, K.A., BUERK, D.G., JARON, D. Interactions between NO and O₂ in the microcirculation: a mathematical analysis. **Microvasc.** 16 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15219419>>. Acesso em: 16 Março 2015.

LAURSEN, J.B, SOMERS, M., KURZ, S., McCANN, L., WARNHOLTZ, A., FREEMAN, B.A., TARPEY, M., FUKAI, T., HARRISON, D.G. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. **Circulation.** 24 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238274>>. Acesso em 24 Março 2015.

LEE, Y. H. et al. Associations between eNOS polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Inflamm Res**, v. 61, n. 2, p. 135-41, Feb 2012.

LIU, V.W., HUANG, P.L. Cardiovascular roles of nitric oxide; a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. **Cardiovasc. Res.** 26 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17658499>>. Acesso 26 Março 2015.

MACKAY, D. F. et al. Impact of Scotland's comprehensive, smoke-free legislation on stroke. **PLoS One.** 30 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23667497>>. Acesso em 30 Maio 2015.

MARTIN-SCHILD, S. et al. Zero on the NIHSS does not equal the absence of stroke. **Ann Emerg Med.** 25 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828876>>. Acesso em 23 Maio 2015.

MASON, M.G., NICHOLLS, P., WILSON, M.T, COOPER, C.E. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (cooper) binding to cancer of known exposures to NOC. **Cancer Lett.** 15 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2572721/>>. Acesso em 15 Março 2015.

MILLER, J. et al. Management of hypertension in stroke. **Ann Emerg Med.** 24 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em 24 Maio 2015.

MORRIS, S.M.J. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. **J. Nutr.** 15 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513435>> Acesso em 15 Março 2015.

NAPOLI, C., DE NIGRIS, F., WILLIAMS-IGNARRO, S., PIGNALOSA, O., SICA, V., IGNARRO, J.L. Nitric Oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric Oxide.** 26 Março 2015. Disponível em: <<http://level1testing.org/research/N/NitricOxideAndAtherosclerosisAnUpdate.pdf>>. Acesso em 26 Março 2015.

NAPOLI, C., IGNARRO, L.J. Nitric oxide and atherosclerosis. **Nitric Oxide**. 25 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292358>>. Acesso em 25 Março 2015.

NETO, H. S. et al. Hemodynamic stroke caused by strangulation. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 9, p. 2932-5, 2014. ISSN 1940-5901 (Electronic) 1940-5901 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356163>> .

PIEPER, G.M. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. **J. Cardiovasc. Pharmacol**. 23 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007664>>. Acesso em 23 Março 2015.

POLLOCK, J.S., FORSTERMANN, U., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D. SCHIMIDT, H.H., NAKANE, M., MURAD, F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 24 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52952/>>. Acesso em 24 Março 2015.

QUEIROZ, S. L; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quím. Nova**. 18 Maio 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000400017&lng=en&nrm=iso> . Acesso em 18 Maio 2015.

RABELINK, T.J., LUSCHER, T.F. Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**. 25 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293798>>. Acesso em 25 Março 2015.

RANTAKOMI, S. H. et al. The frequency of alcohol consumption is associated with the stroke mortality. **Acta Neurol Scand.** 30 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24606050>>. Acesso em 30 Maio 2015.

RIDNOUR, L.A., ISENBERG, J.S., ESPEY, M.G., THOMAS, D.D., ROBERTS, D.D., WINK, D.A. the chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situation. **Biol. Chem.** 26 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977040>>. Acesso em 26 Maio 2015.

RIDNOUR, L.A., THOMAS, D.D., MANCARDI, D., ESPEY, M.G., MIRANDA, K.M., PAOLOCCI, N., FEELISCH, M., FUKUTO, J., WINK, D.A. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. **Biol. Chem.** 16 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977040>>. Acesso em 16 Março 2015.

ROGER VL, GO AS, LLOYD-JONES DM, BENJAMIN EJ, BERRY JD, BORDEN WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. **Circulation.** Jan 3 2012.

SATOH, M., FUJIMOTO, S., HARUNA, Y., ARAKAWA, S., HORIKE, H., KOMAI, N., SASAKI, T., TSUJIOKA, K., MAKINO, H., KASHIHARA, N. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** 29 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15687247>>. Acesso em 29 Março, 2015.

SHINOZAKI, K., NISHIO, Y., OKAMURA, T., YOSHIDA, Y., MAEGAWA, H., KOJIMA, H., MASADA, M., TODA, N., KIKKAWA, R., KASHIWAGI, A. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the

aortas of insulin-resistant rats. **Circ. Res.** 23 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009561>>. Acesso em 23 Março 2015.

STROES, E.S., VAN FAASSEN, E.E., YO, M., MARTASEK, P., BOER, P., GOVERS, R., RABELINK, T.J. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. **Cir. Res.** 24 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850963>>. Acesso em 24 Março 2015.

STUEHR, D.J., SANTOLINI, J., WANG, Z.Q., WEI, C.C., ADAK, S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. **J. Biol. Chem.** 15 Março 2015. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/279/35/36167.full>>. Acesso em 15 Março 2015.

SULTAN, S. et al. Predictors of Cholesterol and Lipoprotein(a) Testing in Children with Arterial Ischemic Stroke. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 23, n. 9, p. 2405-13, Oct 2014. ISSN 1532-8511 (Electronic) 1052-3057 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25174567>>.

TANUS-SANTOS, J. E.; DESAI, M.; FLOCKHART, D. A. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. **Pharmacogenetics**, v. 11, n. 8, p. 719-25, Nov 2001

THOMAS, D.D, ESPEY, M.G., VITEK, M.P, MIRANDA, K.M., WINK, D.A. Protein nitration is mediated by heme and free metals through Fenton-type chemistry: an alternative to the NO/O₂- reaction. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 20 Março 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12226478>>. Acesso em 20 Março 2015.

TURPAEV, K., BAUTON, C., DRAPIER, J.C. Nitric oxide-derived nitrosating species and gene expression in human monocytic cells. **Biochemistry**. 25 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4403761/>>. Acesso 25 Março 2015.

VAGAL, A. S. et al. Time to Angiographic Reperfusion in Acute Ischemic Stroke: Decision Analysis. **Stroke**, Oct 28 2014. ISSN 1524-4628 (Electronic) 0039-2499 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352484>>.

VODOVOTZ, Y., CHESLER, L., CHONG, H. KIM, S.J., SIMPSOM, J.T, DEGRAFF, W., COX, G.W., ROBERTS, A.B., WINK, D.A. BARCELLOS-HOFF, M.H. Regulation of transforming growth factor beta1 by nitric oxide. **Cancer. Res.** 23 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19614923>>. Acesso em 23 Maio 2015.

WANG, M., JIANG, X., WU, W., ZHANG, D. Endothelial NO Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke in Asian Population: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n 3, p. 1-9, Mar 2013.

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.** 30 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24146993>>. Acesso em 30 Maio 2015.

WANG, X. L.; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. **Mol Genet Metab**, v. 70, n. 4, p. 241-51, Aug 2000.

WARD, L. Blood glucose and stroke. **Nurs Stand.** 27 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25159978>>. Acesso em 27 Maio 2015.

WINK, D.A., MIRANDA, K.M., MG, E., PLUTA, R.M., HEWETT, S.J., COLTON, C., VITEK, M., FEELISCH, M., GRISHMAN, M.B. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. **Antioxid. Redox. Signal.** 13 Março 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11396476>>. Acesso em 13 Março 2015.

WIWANITKIT, V. Aneurysm, ischemic stroke and cysticercosis. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 119, p. 135-6, Apr 2014. ISSN 1872-6968 (Electronic) 0303-8467 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555987>>

XIANG, J. et al. Increasing flow diversion for cerebral aneurysm treatment using a single flow diverter. **Neurosurgery**. 24 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867201>>. Acesso em 24 Maio 2015.

YOO, D. S. et al. Various blood glucose parameters that indicate hyperglycemia after intravenous thrombolysis in acute ischemic stroke could predict worse outcome. **PLoS One**. 23 Maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24747428>>. Acesso 23 Maio 2015.

YU, C. K. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis. **BMC Pregnancy Childbirth**. v. 6, p. 7, 2006.

ZANCHI, A., MOCZULSKI, D.K, HANNA, L.S, WANTMAN, M.,WARRAM, J.H., KROLEWSKI, A.S. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. **Kidney International**. 06 Junho 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/ki/journal/v57/n2/full/4491346a.html>>. Acesso em 06b Junho 2015.

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

BRASILIA - PATRIMONIO CULTURAL DA HUMANIDADE

ANEXO B – Ficha de identificação dos participantes da pesquisa.

Ficha de identificação dos participantes da pesquisa: Polimorfismo genético eNOS -894 (G/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 seu os pesquisadores possam ver seu prontuário, para que tenham maior conhecimento de seus exames, tratamento e da história da sua doença.

Após isso será coletado de você, uma única vez, aproximadamente 10 ml (uma seringa pequena) de sangue, através de uma punção da veia do seu antebraço. O

procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

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

Riscos:

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

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

Benefícios:

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

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

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

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:

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

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

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

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

Confidencialidade:

Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

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

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

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

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

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

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

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

Brasília, ____ de _____ de _____

Participante

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Representante Legal

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

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

Natureza e objetivos do estudo:

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

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

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

Procedimentos do estudo :

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

Após isso será coletado do paciente sob sua responsabilidade, uma única vez, aproximadamente 10 ml (uma seringa pequena) de sangue, através de uma punção da

veia do seu antebraço. O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

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

Riscos:

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

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

Benefícios:

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

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

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

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo :

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

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

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

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

Confidencialidade:

Os registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

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

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

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

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

Se o Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com a enfermeira Hélia Carla de Souza, no setor de Neurocirurgia, do Hospital de Base de Brasília, no horário matutino. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. Qualquer dúvida com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: [\(61\) 3325-4955](tel:6133254955). Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

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

Responsável pelo Participante da pesquisa

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

Termo de Guarda de Material Biológico – Indivíduos “saudáveis”

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Assinatura do participante
Brasília, ____ de _____ de _____

Termo de Guarda de Material Biológico – Paciente

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

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

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

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

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

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

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

Assinatura do participante

Brasília, ____ de _____ de _____

Termo de Guarda de Material Biológico – Representante Legal

Este documento é chamado 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 _____