



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE

FARMÁCIA

**Análise do polimorfismo da região promotora do gene do Fator de  
Necrose Tumoral Alfa – TNF- $\alpha$  (-238 A/G) em pacientes com Acidente  
Vascular Encefálico Hemorrágico e Aneurisma Intracerebral**

FILIPE ALMEIDA CARVALHO GONZAGA

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO HADDAD

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. DAIANI CRISTINA CILIÃO ALVES

BRASÍLIA

2015

FILIPPE ALMEIDA CARVALHO GONZAGA

**Análise do polimorfismo da região promotora do gene do Fator de Necrose Tumoral Alfa – TNF- $\alpha$  (-238 A/G) em pacientes com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e Aneurisma Intracerebral**

Monografia de Graduação submetida à Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

---

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO HADDAD

---

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. DAIANI CRISTINA CILIÃO ALVES

BRASÍLIA

2015

Nome: GONZAGA, Filipe Almeida Carvalho

Título: Análise do polimorfismo da região promotora do gene do Fator de Necrose Tumoral Alfa – TNF- $\alpha$  (-238 A/G) em pacientes com Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e Aneurisma Intracerebral

Monografia de Graduação submetida à Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Haddad

Instituição: Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Profa. Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Instituição: Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferreira

Instituição: Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos Profs. Dr. Rodrigo Haddad e a Dra. Daiani Cristina Cilião Alves pela grande disponibilidade, sempre prontos para me fornecer auxílio e sugestões principalmente nos momentos mais críticos, pela ajuda no planejamento, execução e interpretação dos dados. Obrigado por terem acreditado no meu potencial, por todas as exigências e pelo exemplo de excelência acadêmica além de compartilharem sempre que possível toda sua experiência.

Ao Profa. Dra. Izabel Cristina pela receptividade e dedicação em me ensinar da melhor forma possível.

Ao Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento por sempre se mostrar tão prestativo. Obrigado por contribuir indescritivelmente para minha formação como profissional e como pessoa.

Ao Dr. Luziano Brandão Freire, Daniel Oliveira Freire e a enfermeira Hélia Sousa, pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros da FCE e da vida. Obrigado por compartilharem todos os momentos bons e ruins durante esses 5 anos de graduação.

Aos meus professores de graduação que também me serviram de inspiração.

Aos meus pais Francisco Almeida e Raquel Carvalho, pelo exemplo constante de luta e de dignidade. Obrigada por se dedicarem incondicionalmente à nossa família.

Ao meu irmão Thiago, minhas tias Cleia e Celia e a toda a minha família. Obrigado pela amizade e companheirismo.

A todos que, de alguma forma, auxiliaram na minha formação e acreditaram em mim.

"O mundo pode ser muito pequeno se  
você limitar ele ao que você conhece"

Yuuko, Ichihara

## RESUMO

O Aneurisma Intracerebral é uma condição patológica dos vasos intracranianos que pode possuir uma fraqueza anormal da parede, ficando estes propensos à ruptura. A ruptura desses aneurismas pode levar a uma condição conhecida como Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH), um importante problema de saúde pública. O Fator de Necrose Tumoral do tipo Alfa (TNF- $\alpha$ ) induz a expressão de metaloproteinases de matriz, uma família de enzimas proteolíticas que degradam matriz extracelular em torno dos vasos sanguíneos e danificam células do endotélio, o que resultaria em desestabilização e potencial enfraquecimento da parede do vaso, dilatação passiva, e ruptura. Visto a relação do TNF- $\alpha$  com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos, este estudo visa avaliar a relação entre o polimorfismo -238A/G da região promotora do gene do TNF- $\alpha$  em pacientes que apresentam Aneurisma intracerebral e AVEH, atendidos no setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília. Para isto, foram avaliados 52 Indivíduos saudáveis, e 72 pacientes (AVEH e aneurisma intracerebral) através de amostras sanguíneas, informações clínicas (idade, gênero, hipertensão, diabetes, tabagismo, etilismo, glicose, creatinina, e plaquetas), e valores provenientes de instrumentos de avaliação funcional (escala de Glasgow, Rankin, NIHSS, e Bathel). Foi realizada a extração de DNA e em seguida a PCR. No presente estudo não foi encontrada relação estatisticamente significativa do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre os grupos pesquisados. Sendo observado apenas uma tendência de maior frequência do genótipo TNF -238AG nos pacientes com AVEH em relação ao controle saudável e aos piores graus de acometimento nas escalas de Rankin e NIHSS.

**PALAVRAS-CHAVES:** polimorfismos ; citocinas; TNF- $\alpha$ ; acidente vascular encefálico; aneurisma.

## ABSTRACT

Intracerebral aneurysm is a pathological condition of intracranial vessels that may have an abnormal weakened vessel's wall, which are more likely to disrupt. The rupture of these aneurysms can lead to a condition known as Hemorrhagic Stroke, these are major public health problems. The Tumor Necrosis Factor type alpha (TNF- $\alpha$ ) induces expression of matrix metalloproteinases (MMPs), a family of proteolytic enzymes that degraded the extracellular matrix around the blood vessels and damage the endothelium, which would result in destabilization and potential weakening of the vessel wall, passive dilatation and rupture. Therefore, TNF- $\alpha$  acts maintaining the integrity of blood vessels, this study aims to evaluate the relation between the polymorphism -238A / G in the promoter region of TNF- $\alpha$ 's gene in patients with intracerebral aneurysm, hemorrhagic stroke or both. Those patients come from the neurosurgery's sector of Hospital de Base de Brasília. 52 healthy subjects and 72 patients (patients with stroke and / or intracerebral aneurysm) have been evaluated through blood samples, clinical information (age, blood glucose, sex, hypertension, diabetes, smoking information, alcohol consumption, blood glucose, creatinine and number of platelets), and values from functional assessment instruments (Glasgow scale, Rankin, NIHSS, and Bathel). DNA extractions were followed by PCR. In this study, there was no statistically significant relations of TNF- $\alpha$  polymorphism -238A / G between the groups. Regarding to the clinical aspects, there were differences in platelets and creatinine (observing the patients that suffered stroke and / or aneurysm).

**KEYWORDS:** polymorphisms; cytokines; TNF- $\alpha$ ; stroke; aneurysm.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AVE – Acidente Vascular Encefálico

AVEH – Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico

COX-2 – Ciclooxigenase-2

ECG – Escala de Coma de Glasgow

ERm – Escala de Rankin

FET – Teste Exato de Fisher Bicaudal

FTC $\beta$  – Fator Transformador de Crescimento  $\beta$

GOS – *Glasgow Outcome Scale*/ Escala de Resultados de Glasgow

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

IB - Índice de Barthel

IL-1 – Interleucina 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-18 – Interleucina 18

IFN-  $\gamma$  – Interferon-gamma

MET – *Metropolis algorithm*

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

mL – Mililitro

MMPs – Metaloproteinases de Matriz

NGF – Fator de Crescimento Nervoso

NIHSS – *National Institute of Health Stroke Scale*

NOS – Oxido nítrico sintetase

OR – *Odds Ratio*

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa

$\mu$ L – Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Visualização das ampliações do polimorfismo TNF -238A/G em gel de acrilamida corado com gel red.....	29
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Escala de Glasgow.....	17
<b>Tabela 2.</b> Escala de Rankin .....	18
<b>Tabela 3.</b> Reagentes utilizados para amplificação do SNP TNF- $\alpha$ -238 A/G .....	26
<b>Tabela 4.</b> Condições de amplificação do SNP TNF- $\alpha$ – 238A/G.....	26
<b>Tabela 5.</b> Características demográficas dos pacientes e indivíduos saudáveis.....	30
<b>Tabela 6.</b> Características clínicas e laboratoriais dos pacientes apresentando aneurisma e acometidos com AVEH.....	31
<b>Tabela 7.</b> Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.....	33
<b>Tabela 8.</b> Valores de p do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.....	34
<b>Tabela 9.</b> Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes apresentando aneurisma cerebral.....	35
<b>Tabela 10.</b> Valores de p do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes apresentando aneurisma cerebral.....	35
<b>Tabela 11.</b> Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes acometidos por AVEH.....	36
<b>Tabela 12.</b> Valores de p do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes acometidos por AVEH.....	36
<b>Tabela 13.</b> Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes apresentando aneurisma cerebral.....	37
<b>Tabela 14.</b> Valores de p do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes apresentando aneurisma cerebral.....	38
<b>Tabela 15.</b> Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes acometidos por AVEH.....	39
<b>Tabela 16.</b> Valores de p do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes acometidos por AVEH.....	39
<b>Tabela 17.</b> Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes apresentando aneurisma cerebral.....	40

<b>Tabela 18.</b> Valores de p do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes apresentando aneurisma cerebral.....	41
<b>Tabela 19.</b> Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes acometidos por AVEH.....	42
<b>Tabela 20.</b> Valores de p do polimorfismo TNF- $\alpha$ -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes acometidos por AVEH.....	42

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
ANERISMA INTRACEREBAL .....	15
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO .....	15
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO .....	16
INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL .....	17
ESCALA DE GLASGOW .....	17
ESCALA DE RANKIN .....	18
ESCALA DE NIHSS .....	18
ÍNDICE DE BATHEL .....	18
CITOCINAS .....	18
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS .....	19
FATOR DE NECROSE TUMORAL .....	19
FATOR DE NECROSE TUMORAL DO TIPO ALFA (TNF- $\alpha$ ) .....	19
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>METODOLOGIA</b> .....	24
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	24
COLETA DOS DADOS PESSOAIS .....	24
COLETA DAS AMOSTRAS .....	25
EXTRAÇÃO DO DNA .....	25
PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) .....	25
ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	29
CARACTERÍSTICAS DOS SUJEITOS .....	29
ANÁLISE DO POLIMORFISMO NA POSIÇÃO -238 A/G NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE TNF - $\alpha$ .....	33
<b>DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48
<b>ANEXOS</b> .....	54
ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM	

PESQUISAS/SES-DF. ....	54
ANEXO B – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA .....	55
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) .....	57
ANEXO D – TERMO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO .....	64
ANEXO E – GRÁFICOS DOS RESULTADOS OBTIDOS .....	66

## **INTRODUÇÃO**

### **Aneurisma Intracerebral**

O Aneurisma Intracerebral é uma condição patológica dos vasos intracranianos que pode possuir uma fraqueza anormal da parede dos vasos, ficando estes propensos à ruptura. A ruptura desses aneurismas pode levar a uma hemorragia no espaço subaracnóide que envolve o cérebro, e às vezes no parênquima cerebral (Frosen et al, 2012). Um grande número dos pacientes que apresentam ruptura do aneurisma encontra-se na faixa etária de 41 a 70 anos de idade, sendo o pico de incidência máxima entre 51 e 60 anos, e com ocorrência maior entre as mulheres (Zamponi et al, 2012).

O extravasamento agudo de sangue dentro do espaço subaracnóideo é responsável pela maioria dos sinais e sintomas de ruptura de aneurisma cerebral, sendo o causador de varias mudanças inesperadas na condição do paciente podendo alterar o seu estilo de vida. À gravidade do sangramento inicial, a ocorrência de ressangramento e a ocorrência de vasoespasma estão relacionadas ao prognóstico dos doentes (Pinto; Zago 2000).

### **Acidentes Vasculares Encefálicos (AVE)**

O acidente vascular encefálico (AVE) pode ser definido como uma perda súbita da função neurológica decorrente de distúrbio focal do fluxo sanguíneo cerebral (Nie et al 2014). Tal patologia pode ser causada pela ruptura de vasos (origem hemorrágica) (Gomes, 1992 apud Randovic, 2000) ou por uma obstrução de uma artéria (origem isquêmica) (Nie et al 2014). É comumente aceito que o AVE ocorre de maneira multifatorial, ou seja, é causado por um número de diferentes processos de doença, não uma doença única, homogênea. (Huang et al, 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, com o número de mortes projetadas para mais de 20 milhões, em 2020, o AVE vai se tornar a principal causa de morte e incapacidade a nível mundial, e até 2030 o número de mortes é projetado para mais de 24 milhões por ano (Subha et al, 2015).

O AVE é uma doença que ocorre mais entre idosos e adultos de meia-idade, mas sua ocorrência em grupos etários mais jovens não é rara. No jovem resulta em uma grande perda de anos potenciais de suas vidas, visto que, o mesmo é trágico devido ao seu grande potencial em criar um fardo a longo prazo sobre as vítimas, suas famílias e da comunidade (Rathore et al, 2012).

O AVE pode causar sequelas motoras e sensoriais, tais fatores são capazes de trazer impacto negativo na qualidade de vida. (Martins et al, 2012). Especialmente nos países em desenvolvimento tal patologia é uma importante causa de morbidade e mortalidade (Rathore et al,2012). Pacientes com AVE podem apresentar dependências funcionais moderadas (Campos et al, 2012).

Existem diversos fatores de risco associados ao AVE, do qual podemos citar: hipertensão, índice de massa corporal, cardiopatia, diabetes, metabolismo lipídico, traumatismo craniano, idade, sexo, tabagismo, dieta, etilismo crônico, inatividade física, regulação da pressão arterial, coagulação e adesão celular, uso de contraceptivos orais, uso da cocaína. Tais fatores podem ser classificados como modificável (por exemplo, fatores do meio ambiente e comportamental) ou não modificável (por exemplo, genética e idade). (Huang et al, 2015; Pinto; Zago 2000; Chaves, 2000; Wang et al, 2009). No entanto, esses fatores convencionais de risco de AVEH não contam integralmente para o risco total da doença (Wang et al, 2009).

Apesar da identificação desses fatores de risco, muitos são ainda desconhecidos. Grande parte destes fatores desconhecidos acredita-se ser de origem genética. Visto que, tem-se notado que o AVE tende a ocorrer em famílias (Huang et al, 2015). Além disso, estudos familiares, com gêmeos e em modelos animais, têm consistentemente sugerido uma influência genética sobre o risco e prognóstico de AVE (Matarin, 2009).

### **Acidentes Vasculares Encefálicos Hemorrágicos (AVEH)**

Embora menos prevalente que o Acidente vascular encefálico isquêmico, o Acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEH) é uma lesão devastadora que anualmente nos Estados Unidos é responsável por 15% dos acidentes vasculares

cerebrais (Sacco et al, 2009). Atualmente as terapias baseiam-se em controle da pressão arterial, reversão de diátese hemorrágica, e cirurgia. Lesões no Sistema nervoso central (SNC) são muitas vezes agravadas, em parte devido à robustas respostas neuroinflamatórias(Tosun et al, 2013). Novas estratégias para direcionar e reduzir neuroinflamação como a ativação de canais específicos de sulfuniureia 1 demonstrou que novos efeitos anti-inflamatórios podem oferecer um tratamento novo e eficaz para ambas as formas (isquêmica e hemorrágica) de AVE. (Caffes et al, 2015).

### **Instrumentos de avaliação funcional**

Várias escalas podem ser utilizadas na avaliação funcional em pacientes pós AVE, no comprometimento sensório-motor, na prática da reabilitação, em pesquisas para diagnósticos e prognósticos, e na avaliação do tratamento (Caneda et al, 2006). Dentre todas iremos abordar a escala de Glasgow, Rankin, NIHSS, e Bathel.

### **Escala de Glasgow**

A Escala de Coma de Glasgow (ECG), Tabela 1, é utilizada na avaliação clínica do nível de consciência dos pacientes com dano cerebral, com o intuito de avaliar o estado neurológico de pacientes (Rutledge et al, 1996 apud Koizumi; Araujo, 2005)

**Tabela 1.** Escala de Glasgow

<b>Parâmetros</b>	<b>Resposta Observada</b>	<b>Pontuação</b>
Abertura Ocular	Espontânea	4
	Com estímulo verbal	3
	Com estímulo doloroso	2
	Nenhuma	1
Melhor Resposta Verbal	Orientado	5
	Confuso	4
	Palavras impróprias	3
	Sons incompreensíveis	2
	Nenhuma	1
Melhor Resposta Motora	Obedece aos comandos	6
	Localiza e retira o estímulo	5
	Localiza o estímulo	4
	Responde em flexão	3
	Responde em extensão	2
	Nenhuma	1

(Koizumi; Araujo, 2005)

## Escala de Rankin

A escala de Rankin tem como objetivo mensurar o grau de incapacidade e dependência nas atividades da vida diária em pacientes, o grau de incapacidade é pontuado de 0 (sem qualquer sintoma) a 6 (óbito) (Falcão et al, 2010).

**Tabela 2.** Escala de Rankin

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.

(Falcão et al, 2010)

## Escala de NIHSS

National Institutes of Health Stroke (NIHSS), é uma escala de avaliação do estado neurológico de pacientes (Itaquy et al, 2011).

## Índice de Bathel

É utilizado para medir a independência funcional no cuidado pessoal, locomoção, eliminações e mobilidade (na avaliação das atividades da vida diária) (McDowell, 1996).

## Citocinas

São denominados citocinas um grupo heterogêneo de proteínas de baixo peso molecular, extremamente potentes, produzidas por diversos tipos de células no

local da lesão e por células do sistema imunológico, que iniciam sua ação através da ligação a receptores específicos, provocando alteração de proteínas de diferentes células do organismo e da síntese do RNA (Sheeran; Hall, 1997). As citocinas não são armazenadas como moléculas pré formadas e atuam especialmente em células vizinhas e nas próprias células produtoras (Lin et al, 2000). Elas influenciam a sobrevivência, a diferenciação, a atividade e a proliferação da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem agir como pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (Curfs et al, 1997).

### **Citocinas Pró-inflamatórias**

São mediadores que conduzem a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. (Lin et al, 2000)

### **Fator de Necrose Tumoral (TNF)**

O TNF existe sob a forma de dois polipeptídeos antígenicamente diferentes, que são o TNF- $\alpha$  e o TNF- $\beta$  (Hesse et al, 1987 apud Garcia et al, 2002). Ele possui a capacidade de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas e de fatores tróficos (Mc Dermott et al, 2001 apud Kraychete et al, 2006). Seu metabolismo ocorre de forma hepática, trato gastrointestinal e rins (Beutler et al, 1997 apud Garcia et al, 2002).

### **Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ )**

O Fator de Necrose Tumoral do tipo Alfa (TNF- $\alpha$ ) também conhecido como caquetina, é uma citocina pró-inflamatória e imunomodulatória que possui atividade tanto benéfica quanto maléfica ao sistema nervoso central, produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T (Cui et al, 2012; Lin et al, 2000). Foi demonstrado também que essa citocina está relacionada a condições inflamatórias que envolvem processos proteolíticos (Hansson, 2005). Como um modulador de diversas citocinas inflamatórias, o TNF- $\alpha$  induz metaloproteinases de

matriz (MMPs), uma família de enzimas proteolíticas que degradam matriz extracelular em torno dos vasos sanguíneos e danificam células do endotélio, o que resultaria em desestabilização e potencial enfraquecimento da parede do vaso, dilatação passiva, e ruptura (Hashimoto et al, 2003).

## JUSTIFICATIVA

O Aneurisma Intracerebral é uma condição patológica dos vasos intracranianos que pode possuir uma fraqueza anormal da 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, e é responsável por uma grande proporção de distúrbios neurológicos.

O AVEH é uma doença mais incapacitante que fatal, que acarreta em custos enormes, medidos tanto em gastos com cuidados de saúde, como em perda de produtividade (Rowland, 2002). Estudos estabeleceram a hipertensão, tabagismo, diabetes, índice de massa corporal e idade como preditores confiáveis de risco para AVEH. No entanto, esses fatores convencionais de risco de AVEH não contam integralmente para o risco total da doença. Várias vias fisiológicas, incluindo o metabolismo lipídico, regulação da pressão arterial, coagulação e adesão celular, são pensadas a ter papéis críticos na fisiopatologia do curso (Wang, 2009). Além disso, estudos familiares, com gêmeos e em modelos animais, têm consistentemente sugerido uma influência genética sobre o risco e prognóstico de acidente vascular cerebral (Matarin, 2009). Estas evidências apontam que o AVEH é uma doença multifatorial complexa resultante de uma interação entre fatores genéticos e vários fatores ambientais (Yamada, 2008).

O Fator de Necrose Tumoral do tipo Alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocinas pró-inflamatória e imunomodulatória que possui atividade tanto benéfica quando maléfica ao sistema nervoso central (Cui et al, 2012). Foi demonstrado também que essa citocina está relacionada a condições inflamatórias que envolvem processos proteolíticos (Hansson, 2005). Como um modulador de diversas citocinas inflamatórias, o TNF- $\alpha$  induz metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de enzimas proteolíticas que degradam matriz extracelular em torno dos vasos sanguíneos e danificam células do endotélio, o que resultaria em desestabilização e

potencial enfraquecimento da parede do vaso, dilatação passiva, e ruptura (Hashimoto et al, 2003).

Visto a relação do TNF- $\alpha$  com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos, este estudo visa avaliar a relação entre o polimorfismo -238A/G da região promotora do gene do TNF- $\alpha$  em pacientes que apresentam Aneurisma intracerebral, AVEH, atendidos no setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília. A justificativa desta escolha é baseada em estudos que mostram que a presença do genótipo -238AG está relacionada com a expressão aumentada do TNF- $\alpha$  (Hansson, 2005; Reich et al 2002; Achrol et al 2007) e possivelmente a maiores riscos de danos vasculares. A análise deste polimorfismo pode colaborar para o melhor entendimento dos fatores genéticos que favorecem o aparecimento destas doenças, abrindo caminho para uma abordagem individualizada de terapêuticas ou mudanças de hábitos específicas de modo a retardar eventos mórbidos como o AVEH (Azevedo, 2009).

## **OBJETIVO**

### **Objetivos gerais**

O objetivo do presente trabalho foi verificar a influência do polimorfismo gênico TNF- $\alpha$  (-238 A/G) em pacientes que apresentam Aneurisma intracerebral e AVEH, atendidos no setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília comparando os mesmos com o grupo controle.

### **Objetivos específicos**

Identificar a frequência do polimorfismo na posição -238 A/G na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  em indivíduos portadores de acidente vascular encefálico hemorrágico e/ou aneurisma intracerebral atendidos por um hospital do Distrito Federal- Brasil;

Comparar estas frequências gênicas com aquelas observadas em indivíduos não portadores de doenças crônicas, e promover, desta forma, um estudo de caso-controle;

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

## **METODOLOGIA**

### **Considerações éticas**

O presente projeto está aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (ANEXO A). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes do presente estudo no intuito de informa-los sobre o intuito do estudo e em condições de compreender e assinar o TCLE. Os pacientes que não apresentavam condições clínicas de compreender o termo de consentimento devido à sua patologia, tiveram suas solicitações do TCLE encaminhada ao responsável legal dos pacientes. Foi também obtido um TCLE de indivíduos sem as patologias a serem estudadas, que fazem parte do grupo controle (ANEXO B).

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. Além disso, o Termo de Guarda de Material Biológico foi obtido de todos os participantes do presente estudo (ANEXO C). 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 tem acesso a seus dados genéticos, assim como o direito de retirá-los do banco onde se encontram armazenados, a qualquer momento.

### **Coleta dos dados pessoais**

Os dados pessoais foram obtidos através de preenchimento de uma ficha de identificação específica (ANEXO D), contendo as vareáveis: Idade, sexo, cor, estado civil, data do registro da patologia estudada, presença de hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, etilismo. Parâmetros bioquímicos e celulares foram anotados, como uréia, creatinina e plaquetas. Informações referentes a escala de Glasgow, Escala de Rankin, Escala de NIHSS e índice de Bartel, também foram armazenadas. Foram adquiridos dos prontuários os dados de investigação por neuroimagem da tomografia e angiografia.

## **Coleta das amostras**

Os participantes (pacientes acometidos de AVEH e/ou Aneurisma Intracerebral e indivíduos controles) foram submetidos a coleta de aproximadamente 10 mL de sangue através de punção de veia periférica, com material novo e descartável. A coleta de sangue foi realizada pelo setor de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília e o material biológico (sangue) dos participantes foi encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Bioprospecção e Neurociências (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília), onde foi estocado.

## **Extração do DNA**

O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit Invisorb Spin Blood Mini Kit (250) da empresa Invitek (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A fim de padronizar a concentração das amostras em 1uL utilizou-se o equipamento Nanovier da GE. Posteriormente foi encaminhado o Laboratório de Análises Clínicas do Curso de Farmácia da Faculdade de Ceilândia que avaliou o polimorfismo -238 A/G da região promotora do gene do TNF- $\alpha$ .

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

A reação de amplificação para os SNP 238 A/G da região promotora do gene do TNF- $\alpha$  foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores (primers) de sequência específica (Polymerase Chain Reaction - sequence-specific primers – PCR-SSP) utilizando-se 200 ng de DNA de cada amostra. Os reagentes para cada loco tipificado (-238 A e -238 G) foram colocados em microtubos de 0,2 mL, atingindo o volume final de 10  $\mu$ L. Como controle interno, foram utilizados os iniciadores HGBA.A e HGBA.S (genes da hemoglobina humana) Na tabela 3 podemos observar a quantidade de reagentes por tubo.

**Tabela 3.** Reagentes utilizados para amplificação do SNP TNF- $\alpha$  -238 A/G

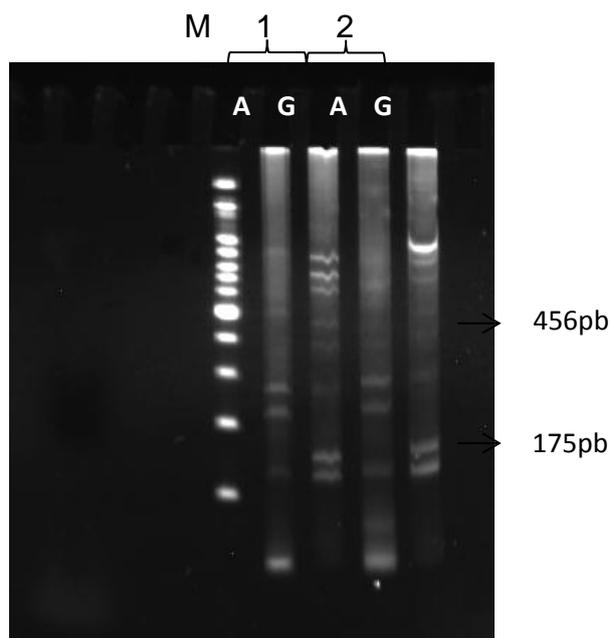
Reagente	Concentração	Quantidade (ul)
Água		2,75
Tampão	10x	1,00
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0,30
DNTP	2,5mM	0,15
HGBA S	10uM	0,30
HGBA A	10uM	0,30
238A ou 238G	10uM	0,50
TNF238 <sub>Up</sub>	10uM	0,50
Taq Polimerase	5U/ul	0,20
DNA	25ng	4,00
Volume Final		10,00

Com o objetivo de amplificar o SNP – 238A/G, os tubos foram colocados no termociclador nas condições presentes na tabela 4.

**Tabela 4.** Condições de amplificação do SNP TNF- $\alpha$  – 238A/G

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	5'	1X
94°C	45"	32X
64°C	45"	
72°C	1'	
72°C	5'	1X
4°C	$\infty$	

Para eletroforese foi utilizado gel de poliacrilamida 10% na voltagem de 180 V por 60 minutos, o gel pode ser visualizado na figura 1.



**Figura 1:** Visualização das amplificações do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G em gel de acrilamida corado com gel red. **(M)** Marcador de peso molecular de 100 pb – KASVI; **1 e 2)** exemplo de amostra de genótipo TNF- $\alpha$  -238GG.

Para cada amostra foram feitas duas reações de PCR, uma com um conjunto de *primers* específicos para o alelo TNF- $\alpha$  -238A e outra com outro conjunto de *primers* específico para o alelo TNF- $\alpha$  -238G; foi adicionado a ambas as reações o conjunto de *primers* para o controle interno da reação ( $\beta$ -globina humana). Dessa forma, observamos uma banda de 456 pb em todas as reações de PCR referentes a amplificação da  $\beta$ -globina humana; caso o indivíduo seja homozigoto para o alelo A (TNF- $\alpha$  -238 AA), observamos a amplificação de uma banda de 175 pb somente para a primeira reação de PCR enquanto não ocorre amplificação na segunda reação (não obtivemos amostra com este genótipo); caso o indivíduo seja homozigoto para o alelo G (TNF- $\alpha$  -238GG) não ocorre amplificação na primeira reação de PCR enquanto a segunda reação apresenta amplificação, apresentando uma banda de 175 pb (amostra 1 e 2); caso a amostra se apresente como heterozigota (TNF- $\alpha$  -238AG), tanto a primeira quanto a segunda reação de PCR amplificam (175 pb) (não representado na figura acima). Observa-se na figura 1 que houve dificuldades em se obter amplificações específicas (presença de bandas inespecíficas).

## **Análise dos resultados**

Após a coleta dos dados, os mesmos foram codificados, criando-se um banco de dados em *Microsoft Excel*. As comparações de dois grupos (paciente e indivíduos controle) as variáveis gênero, diabetes, HAS, tabagismo e etilismo, foram realizados pelo teste exato de Fisher utilizando-se o *software GraphPad InStat 3.06* (INC, 1998). Para comparações de mais de dois grupos (aneurisma, AVEH e indivíduos controle) as variáveis gênero, diabetes, HAS, tabagismo e etilismo, e também para dois grupos com valores absolutos com tabela de contingência maior de 2x2 (escala de Glasgow, escala de Rankin, NIHSS e índice de Barthel), o teste exato foi realizado utilizando o algoritmo *Metropolis* (MET) para obter uma estimativa imparcial do exato valor de  $p$  para uma determinada tabela de contingência  $RXC$  (no caso de diferenças significativas reveladas por esta última análise, comparações pós-teste de *pair-wise* foram realizadas com o teste exato de Fisher).

Amplitudes de variação, médias e desvios-padrão das variáveis contínuas (idade e glicose, creatinina e plaquetas) foram estimadas utilizando-se novamente o *software GraphPad InStat 3.06* (INC., 2003). Para a comparação de médias entre 2 grupos (paciente e indivíduos controle), foram aplicados os testes *t de Student* (paramétrico) ou *Mann-Whitney* (não-paramétrico) bicaudais. A comparação de médias entre 3 grupos foi realizada por meio das análises de ANOVA (paramétrica) seguido do pós testes de *Tukey* ou *Kruskal-Wallis* (não-paramétrica), seguido do pós testes de *Dunn*. A decisão entre aplicação de testes paramétricos e não-paramétricos foi baseada no resultado do teste *Kolmogorov-Smirnov* de normalidade.

A determinação das frequências alélicas e genotípicas foi calculada pela contagem direta em *Microsoft Excel*. A comparação de frequências alélicas ou genotípicas absolutas entre grupos, para identificar eventuais associações, foi feita por meio do teste exato de Fisher bicaudal com auxílio do *software GraphPad InStat 3.06* (INC., 2003). A magnitude das associações (susceptibilidade ou resistência) foi determinada pelo cálculo de *Odds Ratio* (OR), acompanhado de intervalo de confiança de 95% (I.C. 95%) ambas realizadas utilizando-se o *software GraphPad InStat 3.06* (INC, 1998).

## RESULTADOS

### Características dos sujeitos

Na tabela 5 estão presentes os dados referentes às características demográficas dos indivíduos analisados. Em relação ao gênero, podemos observar diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. indivíduos saudáveis ( $p = 0,031$ ), e entre os grupos AVEH vs. indivíduos saudáveis ( $p = 0,017$ ), referente aos grupos Aneurisma / AVEH / Indivíduos saudáveis, podemos visualizar diferenças significativas entre os mesmos ( $p = 0,030$ ). Quando comparado o gênero entre pacientes em geral vs. indivíduos saudáveis mostrou diferença estatística ( $p = 0,0034$ ). Em relação à idade, houve significância estatística na comparação entre os grupos aneurisma/ AVEH/ indivíduos saudáveis ( $p < 0,001$ ) e entre pacientes vs. indivíduos saudáveis ( $p = 0,001$ ).

**Tabela 5.** Características demográficas dos pacientes e indivíduos saudáveis.

	Pacientes			Indivíduos saudáveis	p-valores da comparação entre:	
	Aneurisma	AVEH	Total		Aneurisma / AVEH / Indivíduos saudáveis <sup>I</sup>	Pacientes total / Indivíduos saudáveis <sup>II</sup>
<b>Gênero</b>	(n = 33)	(n = 39)	(n = 72)	(n = 52)		
Masculino / Feminino	12 / 21	17 / 22	32 / 41	37 / 15	<b>0,0030<sup>a</sup></b> (MET)	<b>0,0034<sup>b</sup></b> (FET)
<b>Idade</b>	(n = 33)	(n = 39)	(n = 72)	(n = 52)		
Média (anos) ± Desvio padrão	52,42 ± 9,24	55,51 ± 7,88	54,10 ± 8,61	44,23 ± 3,83	<b>&lt;0,0001<sup>c</sup></b> (KW)	<b>&lt;0,0001<sup>d</sup></b> (MW)
Intervalo (anos)	29 – 63	46 – 74	29 – 74	40 – 59		

<sup>I</sup> Comparação entre os três grupos (Aneurisma / AVEH / Indivíduos saudáveis) analisadas por *one-way ANOVA* seguida de múltiplas comparações pós teste, *Tukey*, *Kruskal-Wallis test* (KW) seguido de múltiplas comparações pós teste, *Dunn's*, ou por teste exato que aplica *Metropolis algorithm* (MET) para obter um estimativa imparcial do exato valor de para uma dada tabela de contingência RxC (no caso de reveladas diferenças significativas por esta ultima análise, comparações pós teste *pair-wise* foram feitas com teste exato de Fisher).

<sup>II</sup> Comparações entre os grupos (pacientes e indivíduos saudáveis) feitas por media ou teste-t bicaudal, media *Mann-Whitney* (MW) ou teste exato de Fisher bicaudal (FET).

<sup>a</sup> Comparação *Metropolis algorithm* (MET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH ( $p < 0,05$ ). Comparações pós teste *pair-wise* feitas com teste exato de Fisher revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. indivíduos saudáveis;  $p = 0,031$ ; *Odds ratio* = 23,17; intervalo de confiança 95% = 0,09148 a 0,5867 e entre os grupos AVEH vs. indivíduos saudáveis;  $p = 0,017$ ; *Odds ratio* = 22,11; intervalo de confiança 95% = 0,08771 a 0,5575.

<sup>b</sup> Teste exato de Fisher bicaudal (FET),  $p = 0,0034$ ; *Odds ratio* = 0,3164 intervalo de confiança 95% = 0,1483 a 0,6750.

<sup>c</sup> Pós teste de múltiplas comparações, *Dunn's*, revelou diferenças significativas na comparação entre os grupos aneurisma vs. indivíduos saudáveis ( $p < 0,001$ ) e AVEH vs. indivíduos saudáveis ( $p < 0,001$ ); não foi observada diferença significativa na comparação entre os grupos aneurisma vs. AVE ( $p > 0,05$ ).

<sup>d</sup> Comparação pós teste, *Mann-Whitney test* (MW), revelou diferenças significativas entre os grupos pacientes vs. Indivíduos saudáveis ( $p < 0,001$ ).

Na tabela 6, observam-se as características clínicas e laboratoriais, e também a diferença na proporção de indivíduos nas escalas: Glasgow, Rankin, NIHSS e Barthel dos pacientes apresentando aneurisma e acometidos com AVEH. Não houve diferença estatisticamente significante quanto a glicose, diabetes, hipertensão arterial (HAS), tabagismo, e elitismo em ambos os grupos. Entretanto, na contagem de plaquetas ( $p = 0,0116$ ) e na creatinina ( $p = 0,0279$ ) houve diferença significativa.

Ainda na tabela 6 observa-se a diferença na proporção de indivíduos nas escalas: Glasgow, Rankin, NIHSS e Barthel, sendo que apenas a escala Glasgow não apresentou diferença estatística entre os grupos aneurisma vs. AVEH ( $p = 0,1810$ ). Todos os pacientes com aneurisma e grande maioria dos pacientes com AVEH avaliados por tal escala apresentaram um alto grau de comprometimento (tabela 1).

Os pacientes também foram avaliados pelos parâmetros da Escala de Rankin, em tal escala observou-se diferença estatisticamente significante ( $p = 0,0020$ ) entre os grupos de pacientes com AVEH e aneurisma. Grande parte dos pacientes com aneurisma receberam a pontuação 1 em tal escala (sem incapacidade significativa) e grande parte dos pacientes com AVEH receberam a pontuação 0 e 1 em tal escala (sem incapacidade e sem incapacidade significativa respectivamente), conforme descrito na tabela 2. As escalas NIHSS ( $p = 0,0100$ ) e o índice de Barthel ( $p = 0,0001$ ) também apresentaram diferença significativa.

**Tabela 6.** Características clínicas e laboratoriais dos pacientes apresentando aneurisma e acometidos com AVEH

	Aneurisma	AVEH	P-valores da comparação entre: Aneurisma / AVEH <sup>i</sup>
Glicose	(n = 28)	(n = 37)	
Média (mg/dL) ± Desvio padrão	118,0 ± 24,5	113,4 ± 27,8	0,3358 (MW)
Intervalo (mg/dL)	91 – 169	61 – 183	
Plaquetas	(n = 31)	(n = 36)	
Média (x106 mm <sup>3</sup> ) ± Desvio	337,6 ± 69,8	282,8 ± 95,8	<b>0,0116<sup>a</sup></b> (MW)
Intervalo	252 – 478	36 - 426	
Creatinina	(n = 31)	(n = 37)	
Média (mg/dL) ± Desvio padrão	1,932 ± 2,772	0,786 ± 0,181	<b>0,0279<sup>a</sup></b> (MW)
Intervalo (mg/dL)	0,7 – 9,0	0,5 – 1,1	

<b>Diabetes</b>	(n = 33)	(n = 39)	
Sim / Não	2 / 31	0 / 39	0,2065 (FET)
<b>HAS</b>	(n = 33)	(n = 39)	
Sim / Não	25 / 8	28 / 11	0,7918 (FET)
<b>Tabagismo</b>	(n = 33)	(n = 39)	
Sim / Não	12 / 21	15 / 24	0,1215 (FET)
<b>Etilismo</b>	(n = 33)	(n = 39)	
Sim / Não	6 / 27	12 / 27	0,2794 (FET)
<b>Escala de Glasgow</b>	(n = 33)	(n = 39)	0,0870 (MET)
8	0	2	
12	0	3	
13	0	2	
15	33	32	
<b>Escala de Rankin</b>	(n = 33)	(n = 39)	<b>0,0020<sup>b</sup></b> (MET)
0	4	15	
1	25	13	
2	0	2	
3	4	2	
4	0	2	
5	0	5	
<b>NIHSS</b>	(n = 33)	(n = 39)	<b>0,0100<sup>c</sup></b> (MET)
0	13	11	
1	3	0	
2	6	7	
3	2	10	
4	4	6	
6	5	0	
18	0	2	
20	0	3	
<b>Índice de Barthel</b>	(n = 33)	(n = 39)	<b>&lt;0,0001<sup>d</sup></b> (MET)
0	0	2	
10	0	3	
40	0	2	
70	0	4	
73	0	3	
80	9	0	
90	3	4	
95	9	0	
100	12	21	

<sup>l</sup> Comparações entre os grupos de pacientes (aneurisma e AVEH) feitas por media com teste-t bicaudal, Mann-Whitney (MW), teste exato de Fisher bicaudal (FET) ou por um teste exato que aplica o Metropolis algorithm (MET) para obter uma estimativa imparcial do exato valor de  $p$  para uma dada tabela de contingência RxC.

<sup>a</sup> Comparação pós teste, Mann-Whitney test (MW), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> Comparação Metropolis algorithm (MET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH ( $p = 0,0020$ ). Comparações pós teste *pair-wise* feitas com teste exato de Fisher revelou diferenças significativas para as escalas 0 ( $p = 0,0156$ ; *Odds ratio* = 0,2207; intervalo de confiança 95% = 0,06459 a 0,7541) e 1 ( $p = 0,004$ ; *Odds ratio* = 6,250; intervalo de confiança 95% = 2,213 a 17,65).

<sup>c</sup> Comparação Metropolis algorithm (MET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH ( $p = 0,0100$ ). Comparações pós teste *pair-wise* feitas com teste exato de Fisher revelou diferenças significativas para as escalas 3 ( $p = 0,0307$ ; *Odds ratio* = 0,1871; intervalo de confiança 95% = 0,03774 a 0,9274) e 6 ( $p = 0,0170$ ; *Odds ratio* = 15,25; intervalo de confiança 95% = 0,8095 a 287,1).

<sup>d</sup> Comparação Metropolis algorithm (MET), revelou diferenças significativas entre os grupos aneurisma vs. AVEH ( $p < 0,0001$ ). Comparações pós teste *pair-wise* feitas com teste exato de Fisher revelou diferenças significativas para os índices 80 ( $p = 0,0005$ ; *Odds ratio* = 30,63; intervalo de confiança 95% = 1,704 a 550,5), 90 ( $p = 0,0192$ ; *Odds ratio* = 0,04094; intervalo de confiança 95% = 0,001721 a 0,9737) e 95 ( $p = 0,0005$ ; *Odds ratio* = 30,63; intervalo de confiança 95% = 1,704 a 550,5).

## **Análise do polimorfismo na posição -238 A/G na região promotora do gene do TNF- $\alpha$**

Na tabela 7 podemos visualizar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis. Nela observamos que a frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A é bem menor que a frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238G em todos os grupos de pacientes estudados. Esta diferença reflete no resultado encontrado referente ao genótipo onde pode-se observar que nenhum paciente apresenta o genótipo TNF- $\alpha$  -238AA, e o número do genótipo TNF- $\alpha$  -238AG é bem menor quando comparado ao genótipo TNF- $\alpha$  -238GG. Esse resultado também está representado no gráfico 1 disponível no anexo E.

**Tabela 7.** Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.

GRUPOS DE PACIENTES	n	ALELOS		GENOTIPOS		
		A	G	AA	AG	GG
Aneurisma	33	0,0909	0,9091	0,0000	0,1818	0,8182
AVEH	39	0,1154	0,8846	0,0000	0,2308	0,7692
Total (Aneurisma + AVEH)	72	0,1042	0,8958	0,0000	0,2083	0,7917
Controle saudável	52	0,0962	0,9038	0,0000	0,1923	0,8077

Cálculo das frequências alélicas e genóticas em programa *Excel*.

Não foi encontrada relação estatisticamente significativa do polimorfismo TNF -238A/G entre os grupos de Aneurisma x controle saudável e pacientes totais x controle saudável. Foi encontrada uma ligeira diferença quando comparamos os pacientes Aneurisma x AVEH e AVEH x Controle saudável referente aos genótipos TNF -238AG e TNF -238GG. Em suma não foi encontrada relação estatisticamente significativa do polimorfismo TNF -238A/G entre os grupos de pacientes e controle saudável (Tabela 8). Esse resultado também está representado no gráfico 2, disponível no anexo E.

**Tabela 8.** Valores de  $p$  do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.

GRUPOS DE PACIENTES	GENOTIPOS			ALELOS
	AA	AG	GG	
Aneurisma x AVEH	1,0000	0,7725	0,7725	0,7860
Aneurisma x Controle saudável	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
AVEH x Controle saudável	1,0000	0,7953	0,7953	0,8230
Total x Controle saudável	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

O polimorfismo TNF -238A/G foi avaliado quanto ao respectivo grau de comprometimento dos pacientes de acordo com as escalas e Rankin, NIHSS e índice de Barthel. A escala de Glasgow não foi avaliada, visto que praticamente todos os pacientes encontram-se no nível 15 desta escala (tabela 6). Observou-se que as mesmas frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas categorias 0 e 3 da escala de Rankin nos pacientes apresentando aneurisma. Na categoria 1 observamos uma baixa frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG, e alta do alelo TNF- $\alpha$  -238G e genótipo TNF- $\alpha$  -238GG (Tabela 9). Esse resultado também está representado nos gráficos 3 e 4, disponíveis no anexo E.

**Tabela 9.** Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes apresentando aneurisma cerebral.

ESCALA RANKIN	n	ALELOS		GENOTIPOS		
		A	G	AA	AG	GG
0	4	0,1250	0,8750	0,0000	0,2500	0,7500
1	25	0,0800	0,9200	0,0000	0,1600	0,8400
3	4	0,1250	0,8750	0,0000	0,2500	0,7500

Cálculo das frequências alélicas e genotípicas em programa *Excel*.

De acordo com a tabela 10, não foi encontrado resultado estatisticamente significativo do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre as diferentes categorias da escala de Rankin em pacientes acometidos por aneurisma cerebral.

**Tabela 10.** Valores de  $p$  do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes apresentando aneurisma cerebral.

ESCALA RANKIN	GENOTIPOS			ALELOS
	AA	AG	GG	
0 x 1	1,0000	0,5526	0,5526	0,5376
0 x 3	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 x 3	1,0000	1,0000	1,0000	0,5376

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Na tabela 11, relacionando as frequências alélicas dos indivíduos acometidos por AVEH e as categorias da Escala de Rankin, pode-se observar que todos os pacientes das categorias 2, 3 e 4 possuem somente o alelo TNF- $\alpha$  -238G. Nas categorias 0, 1 e 5 observamos uma baixa frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG, e alta do alelo TNF- $\alpha$  -238G e genótipo TNF- $\alpha$  -238GG. Ainda, podemos observar a maior frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG presente no grau 5 da escala de Rankin. Esse resultado também está representado nos gráficos 5 e 6, disponíveis no anexo E.

**Tabela 11.** Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes acometidos por AVEH.

ESCALA RANKIN	N	ALELOS		GENOTIPOS		
		A	G	AA	AG	GG
0	15	0,1333	0,8667	0,0000	0,2667	0,7333
1	13	0,0769	0,9231	0,0000	0,1538	0,8462
2	2	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
3	2	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
4	1	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
5	5	0,2000	0,8000	0,0000	0,4000	0,6000

Cálculo das frequências alélicas e genotípicas em programa *Excel*.

Não foi encontrado resultado estatisticamente significativo do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre as diferentes categorias da escala de Rankin em pacientes acometidos por AVEH (Tabela 12).

**Tabela 12.** Valores de  $p$  do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes acometidos por AVEH.

ESCALA RANKIN	GENOTIPOS			ALELOS
	AA	AG	GG	
0 x 1	1,0000	0,6546	0,6546	0,6749
0 x 2	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 3	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 5	1,0000	0,6126	0,6126	0,6287
1 x 2	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 x 3	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 x 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 x 5	1,0000	0,5327	0,5327	0,3048

2 X 3	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2 X 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2 X 5	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
3 x 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
3 x 5	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
4 x 5	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Quando foram analisadas as frequências alélicas dos indivíduos acometidos por aneurisma cerebral nas categorias da NIHSS, pode-se observar que os pacientes da categoria 1 possuem somente o alelo TNF- $\alpha$  -238G. Nas categorias 0, 2, 4 e 6 observamos uma baixa frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG, e alta do alelo TNF- $\alpha$  -238G e genótipo TNF- $\alpha$  -238GG. Na categoria 3 os pacientes possuem o genótipo TNF- $\alpha$  -238AG e TNF- $\alpha$  -238GG distribuídos por igual. Ainda, podemos observar a maior frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG presente nos maiores graus (3, 4 e 6) da NIHSS (Tabela 13). Esse resultado também está representado nos gráficos 7 e 8, disponíveis no anexo E.

**Tabela 13.** Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes apresentando aneurisma cerebral.

NIHSS	N	ALELOS		GENOTIPOS		
		A	G	AA	AG	GG
0	13	0,0769	0,9231	0,0000	0,1538	0,8462
1	3	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
2	6	0,0833	0,9167	0,0000	0,1667	0,8333
3	2	0,2500	0,7500	0,0000	0,5000	0,5000
4	4	0,1250	0,8750	0,0000	0,2500	0,7500
6	5	0,1000	0,9000	0,0000	0,2000	0,8000

Cálculo das frequências alélicas e genotípicas em programa *Excel*.

Não foi encontrado resultado estatisticamente significativo do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre as diferentes categorias da NIHSS de pacientes apresentando aneurisma cerebral (Tabela 14).

**Tabela 14.** Valores de  $p$  do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes apresentando aneurisma cerebral.

NIHSS	GENOTIPOS			ALELOS
	AA	AG	GG	
0 x 1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 2	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 3	1,0000	0,3714	0,3714	0,3596
0 x 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 6	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 x 2	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 x 3	1,0000	0,4000	0,4000	0,4000
1 x 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 x 6	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2 x 3	1,0000	0,4643	0,4643	0,4500
2 x 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2 x 6	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
3 x 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
3 x 6	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
4 x 6	1,0000	1,0000	0,0000	1,0000

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Quando analisada as frequências alélicas e genóticas dos indivíduos acometidos por AVEH nas categorias da NIHSS, pode-se observar que os pacientes na pontuação 2, 3 e 18, possuem somente o alelo TNF- $\alpha$  -238G. Nas pontuações 0, 4 e 20 observamos uma baixa frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG, e alta do alelo TNF- $\alpha$  -238G e genótipo TNF- $\alpha$  -238GG. Ainda, podemos

observar a maior frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG no grau 20 da NIHSS. (Tabela 15). Esse resultado também está representado nos gráficos 9 e 10, disponíveis no anexo E.

**Tabela 15.** Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes acometidos por AVEH.

NIHSS	N	ALELOS		GENOTIPOS		
		A	G	AA	AG	GG
0	11	0,2273	0,7727	0,0000	0,4545	0,5455
2	7	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
3	10	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
4	6	0,1667	0,8333	0,0000	0,3333	0,6667
18	2	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
20	3	0,3333	0,6667	0,0000	0,6667	0,3333

Cálculo das frequências alélicas e genotípicas em programa *Excel*.

Os valores de  $p$  do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes acometidos por AVEH também foram analisados. Pode-se observar diferença estatística quando comparados os grupos que apresentaram pontuação 0 x 3 e 3 x 20 entre os genótipos TNF- $\alpha$  -238AG, TNF- $\alpha$  -238GG, e nos alelos. Esse resultado também está representado nos gráficos 9 e 10, disponíveis no anexo E.

**Tabela 16.** Valores de  $p$  do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes acometidos por AVEH.

NIHSS	GENOTIPOS			ALELOS
	AA	AG	GG	
0 x 2	1,0000	0,1013	0,1013	0,1336
0 x 3	1,0000	<b>0,0351<sup>a</sup></b>	<b>0,0351<sup>b</sup></b>	<b>0,0492<sup>c</sup></b>
0 x 4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

0 x 18	1,0000	0,4872	0,4872	0,5552
0 x 20	1,0000	1,0000	1,0000	0,6219
2 x 3	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2 x 4	1,0000	0,1923	0,1923	0,2031
2 x 18	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2 x 20	1,0000	0,0667	0,0667	0,0789
3 x 4	1,0000	0,1250	0,1250	0,1331
3 x 18	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
3 x 20	1,0000	<b>0,0385<sup>d</sup></b>	<b>0,0385<sup>e</sup></b>	<b>0,0462<sup>f</sup></b>
4 x 18	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
4 x 20	1,0000	0,5238	0,5238	0,4667
18 x 20	1,0000	0,4000	0,4000	0,4667

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

<sup>a</sup>  $p = 0,0351$ ; Odds ratio = 17,00; intervalo de confiança de 95%= 0,8360 a 377,7.

<sup>b</sup>  $p = 0,0351$ ; Odds ratio = 0,05628; intervalo de confiança de 95%= 0,002648 a 1,196.

<sup>c</sup>  $p = 0,0492$ ; Odds ratio = 12,89; intervalo de confiança de 95%= 0,6642 a 250.

<sup>d</sup>  $p = 0,0385$ ; Odds ratio = 0,02857; intervalo de confiança de 95%= 0,0008749 a 0,9330.

<sup>e</sup>  $p = 0,0385$ ; Odds ratio = 35,00; intervalo de confiança de 95%= 1,072 a 1143.

<sup>f</sup>  $p = 0,0462$ ; Odds ratio = 0,04390; intervalo de confiança de 95%= 0,001782 a 1,081.

Quando relacionada as frequências alélicas e genóticas dos indivíduos acometidos por aneurisma cerebral nas categorias do índice de Barthel, pode-se observar que os pacientes na pontuação 90 possuem somente o alelo TNF- $\alpha$  -238G. Nas pontuações 80, 95 e 100 observamos uma baixa frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG, e alta do alelo TNF- $\alpha$  -238G e genótipo TNF- $\alpha$  -238GG (Tabela 17). Esse resultado também está representado nos gráfico 11 e 12, disponíveis no anexo E.

**Tabela 17.** Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes apresentando aneurisma cerebral.

ÍNDICE BARTHEL	N	ALELOS		GENOTIPOS		
		A	G	AA	AG	GG

80	9	0,1111	0,8889	0,0000	0,2222	0,7778
90	3	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
95	9	0,0556	0,9444	0,0000	0,1111	0,8889
100	12	0,1250	0,8750	0,0000	0,2500	0,7500

Cálculo das frequências alélicas e genóticas em programa *Excel*.

Como pode ser observado na tabela 18, não foi encontrado resultado estatisticamente significativo do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre as diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes apresentando aneurisma cerebral.

**Tabela 18.** Valores de  $p$  do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes apresentando aneurisma cerebral.

ÍNDICE BARTHEL	GENOTIPOS			ALELOS
	AA	AG	GG	
80 x 90	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
80 x 95	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
80 x 100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
90 x 95	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
90 x 100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
95 x 100	1,0000	0,6030	0,6030	0,6227

Teste exato de Fisher (GraphPad InStat, INC 2003).

Quando analisada as frequências alélicas e genóticas dos indivíduos acometidos por AVEH nas categorias do índice de Barthel, pode-se observar que os pacientes na pontuação 0, 70 e 73 possuem somente o alelo TNF- $\alpha$  -238G. Nas pontuações 10, 40, 90 e 100 observamos uma baixa frequência do alelo TNF- $\alpha$  -238A e genótipo TNF- $\alpha$  -238AG, e alta do alelo TNF- $\alpha$  -238G e genótipo TNF- $\alpha$  -238GG (Tabela 19). Esse resultado também está representado nos gráficos 13 e 14, disponíveis no anexo E.

**Tabela 19.** Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes acometidos por AVEH.

ÍNDICE BARTHEL	n	ALELOS		GENOTIPOS		
		A	G	AA	AG	GG
0	2	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
10	3	0,3333	0,6667	0,0000	0,6667	0,3333
40	2	0,2500	0,7500	0,0000	0,5000	0,5000
70	4	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
73	3	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
90	4	0,1250	0,8750	0,0000	0,2500	0,7500
100	4	0,1190	0,8810	0,0000	0,2381	0,7619

Cálculo das frequências alélicas e genóticas em programa *Excel*.

Como representado na tabela 20, não foi encontrado resultado estatisticamente significativo do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre as diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes acometidos por AVEH.

**Tabela 20.** Valores de  $p$  do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes acometidos por AVEH.

ÍNDICE BARTHEL	GENOTIPOS			ALELOS
	AA	AG	GG	
0 x 10	1,0000	0,4000	0,4000	0,4667
0 x 40	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 70	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 73	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 90	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
0 x 100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 0x 70	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1 0 x 73	1,0000	0,1429	0,1429	0,1648

10 x 90	1,0000	0,4000	0,4000	0,4545
10 x 100	1,0000	0,4857	0,4857	0,5385
40 x 70	1,0000	0,1937	0,1937	0,2061
40 x 73	1,0000	0,3333	0,3333	0,3333
40 x 90	1,0000	0,4000	0,4000	0,4000
40 x 100	1,0000	1,0000	1,0000	0,4400
70 x 73	1,0000	0,4625	0,4625	0,4400
70 x 90	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
70 x 100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
73 x 90	1,0000	0,5494	0,5494	0,5774
73 x 100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
90 x 100	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

---

Teste exato de Fisher (GraphPad Instat, INC 2003).

## DISCUSSÃO

Dentre os 33 pacientes com aneurisma estudados 21 são do sexo feminino (63,64%) e 12 são do sexo masculino 36,36%. Outros estudos, também realizados na população brasileira, também apresentam resultados semelhantes (Zamponi et al, 2012) (Cardozo 2011). Tal resultado sugere que o sexo feminino está mais propenso ao desenvolvimento de aneurismas entre essa população. Dentre os pacientes com AVEH, 17 são do sexo masculino (43,58%) e 22 do sexo feminino (56,42%). Em um estudo publicado por Sacco et al, após a avaliação de 549 pacientes com AVEH, foi observado que 247 (45,00%) eram homens e 302 (55,00%) eram mulheres. Tais valores estão próximos ao encontrado no nosso estudo e demonstra que mulheres estão mais propensas a essa patologia apesar da diferença demográfica. Por outro lado, outro estudo não encontrou diferença significativa entre homens e mulheres. (Grysiewicz, 2008).

Nossos resultados mostram que a idade média dos pacientes com aneurisma foi de  $52,42 \pm 9,24$  anos. No estudo de Zamponi et al (2012) o principal grupo afetado foi entre 51 e 60 anos, seguido pela faixa entre 41 e 50 anos, sendo este resultado esse próximo ao encontrado em nosso estudo. Ainda, nossos resultados mostram que a idade média dos pacientes acometidos por AVEH foi de  $55,51 \pm 7,88$  anos. Outro estudo avaliou 549 pacientes com AVEH dos quais média  $\pm$  SD idade,  $73,60 \pm 12,50$  anos, a diferença encontrada na idade pode ser proveniente da diferença demográfica e geográfica (Sacco, 2009).

Grande parte dos nossos pacientes, tanto de aneurisma quanto de AVEH, possuem hipertensão. Esse fator também foi achado em outro estudo, onde a hipertensão arterial esteve presente em 415 de 549 pacientes (75,6%) com AVEH (Sacco, 2009). Segundo um estudo publicado por Xin Yu et al (2010) os níveis séricos de TNF- $\alpha$  foram significativamente mais elevados em pacientes com hipertensão quando comparado ao grupo controle. Tal fato demonstra que hipertensos estão mais propensos ao desenvolvimento dessas patologias e que o TNF- $\alpha$  está notavelmente aumentado em pacientes hipertensos.

Neste estudo também foi observado as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TNF -238A/G entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis. A frequência do alelo TNF -238A é bem menor que a frequência do alelo

TNF -238G em todos os grupos estudados. Esta diferença reflete no resultado encontrado referente ao genótipo, onde se pode observar que nenhum paciente apresenta o genótipo TNF- $\alpha$  -238AA, e o número do genótipo TNF- $\alpha$  -238AG é bem menor quando comparado ao genótipo TNF- $\alpha$  -238GG. Fontanella et al (2007) observou que no polimorfismo TNF- $\alpha$  -308A/G, o alelo TNF- $\alpha$  -308G foi estatisticamente mais frequente em pacientes com hemorragia subaracnóide por ruptura de aneurisma intracraniano (HSA). Nesse estudo foram analisados 171 pacientes com HSA, e 144 indivíduos controle pareados por idade e características geográficas. Os autores encontraram que os pacientes com HSA foram significativamente mais propensos a expressar o alelo TNF- $\alpha$  -308 G, o que tornaria este alelo relacionado com tal patologia. Já Karahan et al (2005), observou que o TNF- $\alpha$  -308A/G não está associado a ocorrência de AVE.

Ainda, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos relacionados ao polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G entre os grupos de Aneurisma vs. controle saudável e pacientes totais vs. controle saudável. Foi encontrada uma ligeira diferença quando comparamos os pacientes Aneurisma vs. AVEH e AVEH vs. Controle saudável referente aos genótipos TNF- $\alpha$  -238AG e TNF- $\alpha$  -238GG. Gu et al (2015) verificou que o genótipo relacionados ao polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G pode não estar relacionado ao AVE isquêmico em populações chinesas. Cui et al (2012) verificou que TNF- $\alpha$  esya fortemente envolvido na patogênese de acidente vascular cerebral isquemco. Um estudo demonstrou que a presença do genótipo TNF- $\alpha$  -238AG está relacionada com a expressão aumentada do TNF- $\alpha$  (Hansson, 2005; Reich et al 2002; Achrol et al 2007) e possivelmente isso levaria a maiores riscos de danos vasculares. Isso é esperado, pois foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  induz metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de enzimas proteolíticas que degradam matriz extracelular em torno dos vasos sanguíneos e danificam células do endotélio (resultando em desestabilização e potencial enfraquecimento da parede do vaso, dilatação passiva, e ruptura (Hashimoto et al, 2003)). Além disso, Chyatte et al (1999) sugeriu que a inflamação pode contribuir a formação e na ruptura do aneurisma, e sendo assim o TNF- $\alpha$ , por ser uma importante citosina pro-inflamatória, poderia desempenhar um papel importantíssimo no desenvolvimento e na ruptura de aneurismas. Ainda, Aoki et al (2011) observou que a concentração de TNF- $\alpha$  plasmática está aumentada em pacientes com

aneurisma, sugerindo um papel crítico de TNF- $\alpha$  na formação e ruptura de aneurismas. Assim, esperava-se que pacientes acometidos de problemas vasculares possuísem frequência do genótipo TNF- $\alpha$  -238AG aumentada em relação ao grupo de pacientes saudáveis. Apesar de não encontrarmos nenhuma relação estatisticamente significativa, observamos maior frequência do genótipo TNF- $\alpha$  -238AG no grupo AVEH que nos indivíduos saudáveis. Talvez uma análise de um maior número de indivíduos de todos os grupos pudesse comprovar alguma relação.

Nas análises do polimorfismo TNF- $\alpha$  -238A/G com o grau de comprometimento dos pacientes, observamos relação estatística de pacientes acometidos por AVEH na escala NIHSS, mostrando relação estatística entre o grau 0 vs.3 e 3 vs. 20, com a maior frequência do genótipo TNF- $\alpha$  -238AG presente no grau 20 que representa maior acometimento do paciente. Ainda, nos pacientes acometidos por AVEH, apesar de não ser estatisticamente significativa, observamos a maior frequência do genótipo TNF- $\alpha$  -238AG presente no grau 5 (maior grau encontrado) da escala de Rankin.

E nos pacientes com aneurisma, apesar de não encontrarmos significância estatística, também observamos que a maior frequência do genótipo TNF- $\alpha$  -238AG estava presente nos maiores graus (3, 4 e 6) da NIHSS, que representam maiores graus de acometimento do paciente.

Segundo Hajeer (2001), os polimorfismos de TNF- $\alpha$  são encontrados em uma região de grande variação polimórfica, o que pode ter influenciado o fato de não termos identificado diferença estatisticamente significativa na região promotora estudada. Além disso, não foram encontrados outros estudos que avaliaram a influência do polimorfismo gênico TNF $\alpha$  -238 A/G em pacientes que apresentam Aneurisma intracerebral, AVEH, mostrando que o estudo neste campo ainda deve ser mais explorado. Assim, os resultados obtidos nesse estudo devem ser confirmados por meio de repetições, estudos com um grande número de amostras (pacientes e controles), e estudos adicionais em diferentes populações.

## **CONCLUSÃO**

No presente estudo não foi encontrada diferença alélica e genotípica estatisticamente significativa relacionada ao polimorfismo TNF -238A/G entre os grupos de pacientes que apresentam Aneurisma intracerebral ou AVEH e o controle saudável. Sendo observado apenas uma tendência de maior frequência do genótipo TNF -238AG nos pacientes com AVEH em relação ao controle e aos piores graus de acometimento nas escalas de Rankin e NIHSS.

Não foram identificados outros estudos que avaliaram a influência do polimorfismo gênico TNF $\alpha$  (-238 A/G) em pacientes que apresentam Aneurisma intracerebral ou AVEH. Portanto os resultados obtidos nesse estudo devem ser confirmados por meio de repetições, estudos com um grande número de amostras (pacientes e controles), e estudos adicionais em diferentes populações.

## REFERÊNCIAS

ACHROL A,S. et al. Association of tumor necrosis factor-alpha-238G>A and Apolipoprotein E2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment. *Neurosurgery*. V. 61, p. 731–739, 2007.

AZEVEDO, R. S.. Evidências de genes associados a acidente vascular cerebral. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo , v. 55, n. 3. 2009.

BEUTLER. B et al. Control of cachectin (Tumor Necrosis Factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science*. v.232, p. 977-979, 1997.

BRITO, R. G. ; LINS, L. C. R. F ; ALMEIDA, C. D. A. ; RAMOS NETO, E. S. ; ARAUJO, D. P. ; FRANCO, C. I. F.. Instrumentos de Avaliação Funcional Específicos Para o Acidente Vascular Cerebral. *Revista de Neurociências (EPM. Impresso)* , v. 21, p. 593-599, 2014.

CAFFES, N. et al. Glibenclamide for the treatment of ischemic and hemorrhagic stroke. *Int J Mol Sci*, v. 16, n. 3, p. 4973-84, 2015..

CAMPOS, T. F. et al. Comparison of instruments for sleep, cognition and function evaluation in stroke patients according to the international classification of functioning, disability and health (ICF). *Rev Bras Fisioter*, v. 16, n. 1, p. 23-9, Jan-Feb 2012.

CANEDA, M. A. G. de et al . Confiabilidade de escalas de comprometimento neurológico em pacientes com acidente vascular cerebral. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo , v. 64, n. 3a, p. 690-697, Sept. 2006 .

CARDOZO J., L. C. M. ; BARROS, B. P. ; HOLANDA,M. F. C. . Fatores de risco em pacientes com aneurismas intracranianos atendidos em um hospital de referência de Belém - PA.. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia* , v. 22, p. 95-99, 2011.

CAVACO, N. S.; ALOUCHE, S. R.. Instrumentos de avaliação da função de membros superiores após acidente vascular encefálico: uma revisão sistemática. *Fisioter. Pesqui.*, São Paulo , v. 17, n. 2, p. 178-183, June 2010 .

CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. *Rev.Bras. Hipertensão*, v. 7, n. 4, p. 372-382, out./dez. 2000

CHYATTE, D. et al. Inflammation and intracranial aneurysms. *Neurosurgery*, v. 45, n. 5, p. 1137-46; discussion 1146-7, Nov 1999.

CUI, G. et al. Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke. *J Neuroinflammation*, v. 9, p. 235, 2012.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev*, v. 10, n. 4, p. 742-80, Oct 1997.

DE HAAN, R. et al. The clinical meaning of Rankin 'handicap' grades after stroke. *Stroke*, v. 26, n. 11, p. 2027-30, Nov 1995.

FALCAO, C. H. et al. Trombólise intra-arterial associada a angioplastia adjunta na fase aguda do acidente vascular cerebral isquêmico. *Rev. Bras. Cardiol. Invasiva*, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 263-272, 2010.

FONTANELLA, M. et al. Tumor necrosis factor-alpha gene and cerebral aneurysms. *Neurosurgery*, v. 60, n. 4, p. 668-72; discussion 672-3, Apr 2007.

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

GARCIA, J. B. S.; ISSY, A. M.; SAKATA, R. K.. Citocinas e anestesia. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, Campinas, v. 52, n. 1, p. 86-100, Feb. 2002.

GOMES, M.M. Doenças do cérebro: prioridade de política de saúde pública no Brasil? *Rev Bras Neurol*. V.28, P. 11-16, 1992.

GRYSIEWICZ, R. A.; THOMAS, K.; PANDEY, D. K. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin*, v. 26, n. 4, p. 871-95, vii, Nov 2008..

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol*, v. 62, n. 11, p. 1191-9, Nov 2001.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, v. 352, n. 16, p. 1685-95, Apr 21 2005..

HASHIMOTO, T. et al. Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. *Stroke*, v. 34, n. 4, p. 925-31, Apr 2003.

HESSE. D et al. Cachectin/tumor necrosis factor gene expression in Kupffer cells. *J Leuk Biol*. V.42, p.422. 1987.

HUANG, H. D. et al. Genetic predisposition of stroke: understanding the evolving landscape through meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, v. 8, n. 1, p. 1315-23, 2015.

ITAQUY, R. B. et al . Disfagia e acidente vascular cerebral: relação entre o grau de severidade e o nível de comprometimento neurológico. *J. Soc. Bras. Fonoaudiol.*, São Paulo , v. 23, n. 4, p. 385-389, Dec. 2011.

KARAHAN, Z. C. et al. TNF- $\alpha$  -308G/A and IL-6 -174 G/C polymorphisms in the Turkish pediatric stroke patients. *Thrombosis Research*, v. 115, p. 393 – 398, 2005.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L.. Citocinas pró-inflamatórias e dor. *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo , v. 46, n. 3, p. 199-206, June 2006 .

KOIZUMI, M. S.; ARAUJO, G. L. . Escala de Coma de Glasgow: subestimação em pacientes com respostas verbais impedidas. *Acta paul. enferm.* São Paulo, v. 18, n. 2, p. 136-142, June 2005 .

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, v. 127, n. 2, p. 117-26, Feb 2000.

MATARIN, M. et al. Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. *Stroke*, v. 40, n. 11, p. 3436-42, Nov 2009.

MARTINS T, RIBEIRO JP, GARRETT C. Disability and quality of life of stroke survivors: evaluation nine months after discharge. *Rev Neurol*. V.42, p. 655-9, 2006.

MCDERMOTT, M.F et al. TNF and TNFr biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. v. 47, p. 619-35, 2001.

MCDOWELL, I. *Measuring health: a guide to rating scales and questionnaires*. 2nd ed. New York: Oxford University Press. 1996.

MINOSSO, J. S. M. et al . Validação, no Brasil, do Índice de Barthel em idosos atendidos em ambulatórios. Acta paul. enferm., São Paulo , v. 23, n. 2, p. 218-223, Apr. 2010 .

MUNIZ, E. C. S. et al . Utilização da Escala de Coma de Glasgow e Escala de Coma de Jovet para avaliação do nível de consciência. Rev. esc. enferm. USP, São Paulo , v. 31, n. 2, p. 287-303, Aug. 1997 .

NIE S-W, WANG X-F, TANG Z-C. Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke. International Journal of Clinical and Experimental Medicine. v.7, n. 2, p. 400-404, 2014.

OKI, T. et al. PGE(2) -EP(2) signalling in endothelium is activated by haemodynamic stress and induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF-kappaB. Br J Pharmacol, v. 163, n. 6, p. 1237-49, Jul 2011.

OLIVEIRA, C. M. B. de et al . Citocinas e dor. Rev. Bras. Anesthesiol., Campinas , v. 61, n. 2, p. 260-265, Apr. 2011 .

PINTO, M. H.; ZAGO, M. M. F.. A compreensão do significado cultural do aneurisma cerebral e do tratamento atribuídos pelo paciente e familiares: um estudo etnográfico. Rev. Latino-Am. Enfermagem, Ribeirão Preto , v. 8, n. 1, jan. 2000 .

RADANOVIC, M. Características do atendimento de pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário. Arq. Neuro-Psiquiatr., São Paulo , v. 58, n. 1, p. 99-106, Mar. 2000

RATHORE J.A, KANGO Z.A, MEHRAJ A. A. Predictors of mortality after acute stroke a prospective hospital based study. J Ayub Med Coll Abbottabad. v.23, p. 144-6, 2011.

REICH, K. et al. Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. J Invest Dermatol. V. 118, p.155–163. 2002.

RUTLEDGE, R, et al. Appropriate use of the Glasgow Coma Scale in intubated patients: a linear regression prediction of the Glasgow verbal score from the Glasgow eye and motors scores. *J Trauma*. v. 41, p. 514 – 22, 1996.

SACCO, S. et al. Incidence and 10-year survival of intracerebral hemorrhage in a population-based registry. *Stroke*, v. 40, n. 2, p. 394-9, Feb 2009.

SANTOS, A. M. B.; OLIVEIRA, T. P.; PIEMONTE, M. E. P.. Elaboração de um manual ilustrado de exercícios domiciliares para pacientes com hemiparesia secundária ao acidente vascular encefálico (AVE). *Fisioter. Pesqui.*, São Paulo, v. 19, n. 1, Mar. 2012.

SANTOS, B. R. L. et al . Situação vacinal e associação com a qualidade de vida, a funcionalidade e a motivação para o autocuidado em idosos. *Rev. bras. epidemiol.*, São Paulo , v. 12, n. 4, Dec. 2009.

SHEERAN. P, HALL G.M. Cytokines in anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*. v. 78, p 201-219. 1997.

SORIANO, F. S. et al. Escalas de avaliação funcional aplicáveis a pacientes pós acidente vascular encefálico. *Conscientiae saúde (Impr.)*, v. 9, n. 3, 2010.

SUBHA, P. P. et al. Pattern and risk factors of stroke in the young among stroke patients admitted in medical college hospital, Thiruvananthapuram. *Ann Indian Acad Neurol*, v. 18, n. 1, p. 20-3, Jan-Mar 2015.

TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*, v. 2, n. 7872, p. 81-4, Jul 13 1974.

TOSUN, C. et al. Inhibition of the Sur1-Trpm4 channel reduces neuroinflammation and cognitive impairment in subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. V.44, p. 3522–3528, 2013.

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

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

YU, X.; YANG, Z.; YU, M. Correlation of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 with hypertensive renal damage. *Ren Fail*, v. 32, n. 4, p. 475-9, May 2010.

ZAMPONI JUNIOR, J. O. et al. Analysis of intracranial aneurysms treated at a University Hospital in Curitiba. *Arq. bras. neurocir*, v. 31, n. 2, 2012.

## ANEXOS

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



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



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/SES-DF

PARECER Nº 0095/2010

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

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

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

**Validade do Parecer: 15/12/2012**

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

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

Brasília, 16 de dezembro de 2010.

Atenciosamente,

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

AL/CEP/SES-DF

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

BRASILIA - PATRIMONIO CULTURAL DA HUMANIDADE

## ANEXO B – Ficha de identificação dos participantes da pesquisa.

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

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Nome do representante legal (se houver): \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo:  Masc.  Fem.

Cor: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_

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

Hipertensão arterial:  Sim  Não

Pressão Arterial: \_\_\_\_\_

Diabetes:  Sim  Não

Glicemia: \_\_\_\_\_

Tabagismo:  Sim  Não Se sim, quantos maços por dia: \_\_\_\_\_

Etilismo:  Sim  Não Se sim, quanto por dia: \_\_\_\_\_

Uréia: \_\_\_\_\_

Creatinina: \_\_\_\_\_

Plaquetas: \_\_\_\_\_

Escala de Glasgow: \_\_\_\_\_

Escala de Rankin: \_\_\_\_\_

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

Índice de Barthel: \_\_\_\_\_

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

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

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

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

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

Você está sendo convidado a participar do estudo “Polimorfismos genéticos associados ao acidente vascular encefálico e ao aneurisma intracerebral”. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

Natureza e objetivos do estudo:

O objetivo do presente estudo é o de verificar a frequência de determinadas variantes do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) em uma população de indivíduos que não apresentam aneurisma cerebral diagnosticado ou acidente vascular encefálico.

Procedimentos do estudo:

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

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

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

Riscos e benefícios:

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

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local. Caso haja algum problema você receberá a atenção necessária e o ressarcimento de alguma eventual despesa.

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

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:

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

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

Confidencialidade:

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente

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

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

Natureza e objetivos do estudo:

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

Existe uma possibilidade de associação de fatores genéticos com o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), assim, este estudo tem o objetivo geral de

conhecer um pouco melhor como “funciona” estas doenças, do ponto de vista genético.

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

**Procedimentos do estudo:**

Sua participação consiste em responder um questionário e autorizar que 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:61-3325-4955). Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

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

\_\_\_\_\_  
Responsável pelo Participante da pesquisa

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

### Termo de Guarda de Material Biológico – Indivíduos “saudáveis”

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## Termo de Guarda de Material Biológico – Paciente

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

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

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

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

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

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

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

Assinatura do participante

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

## Termo de Guarda de Material Biológico – Representante Legal

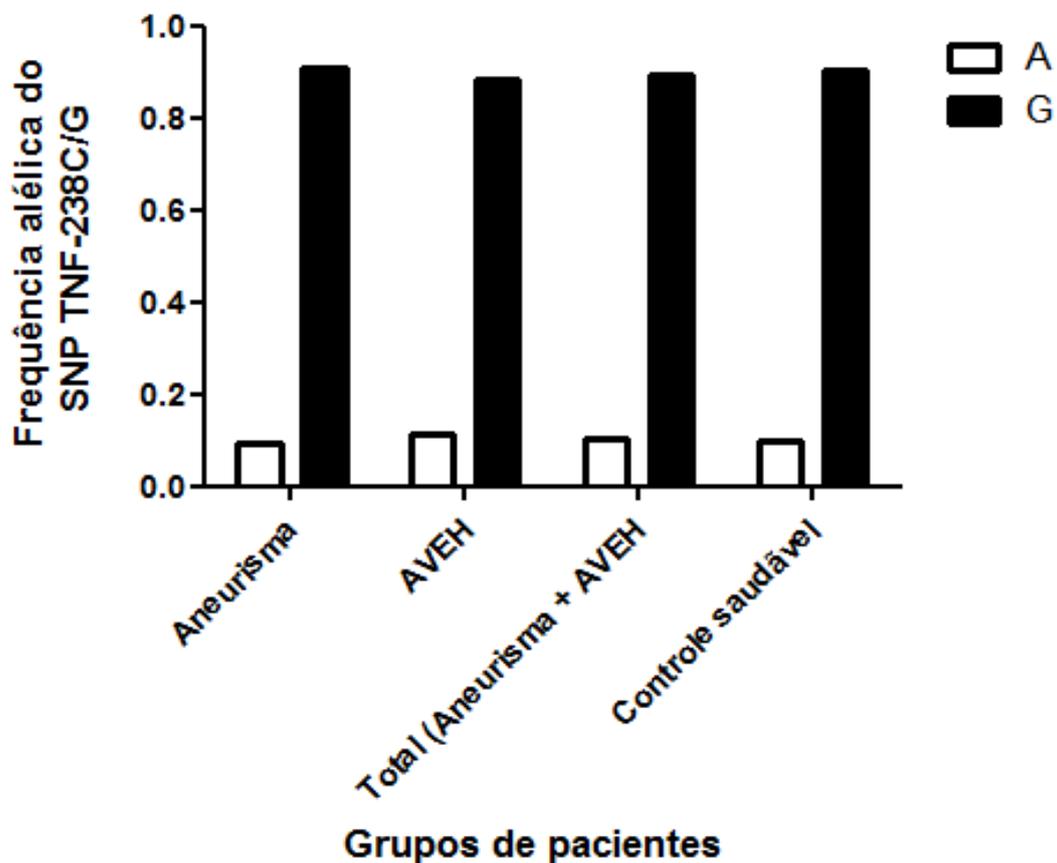
Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob sua responsabilidade. Você poderá autorizar ou não a guarda do material biológico do paciente sob sua responsabilidade.

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.

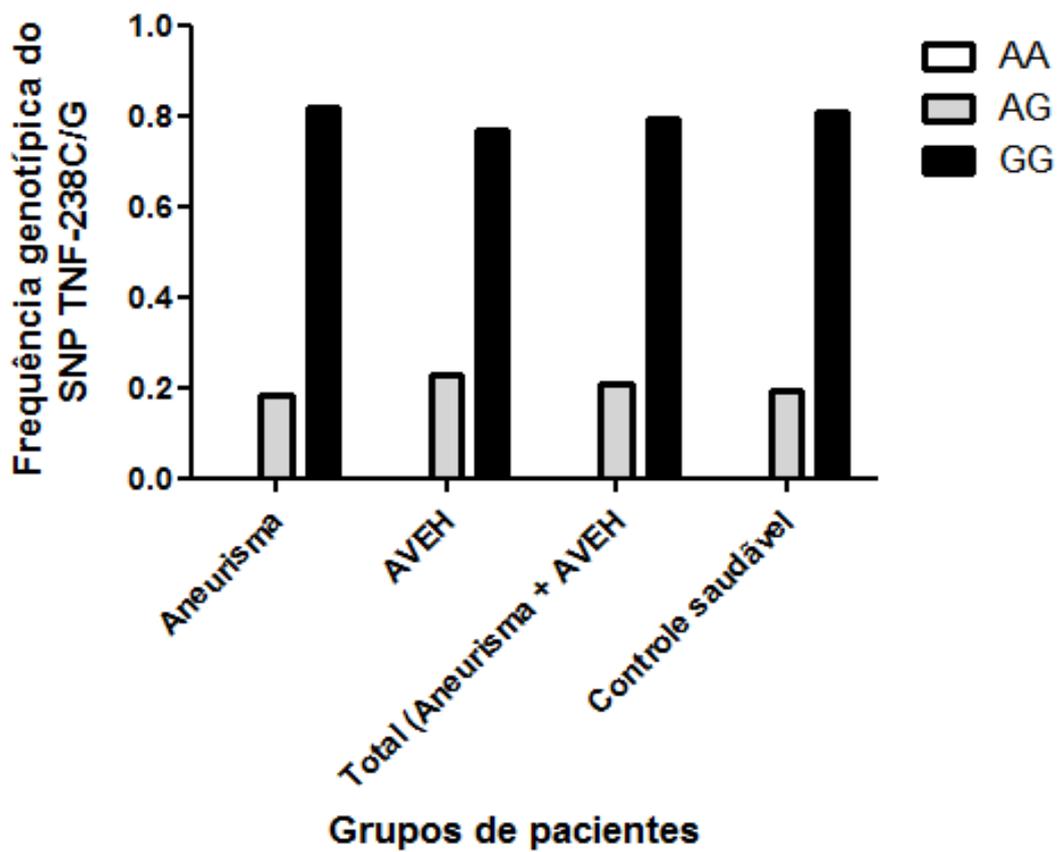
A qualquer momento você terá acesso aos dados do paciente sob sua responsabilidade e de seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar o material biológico do banco onde se encontra armazenado.



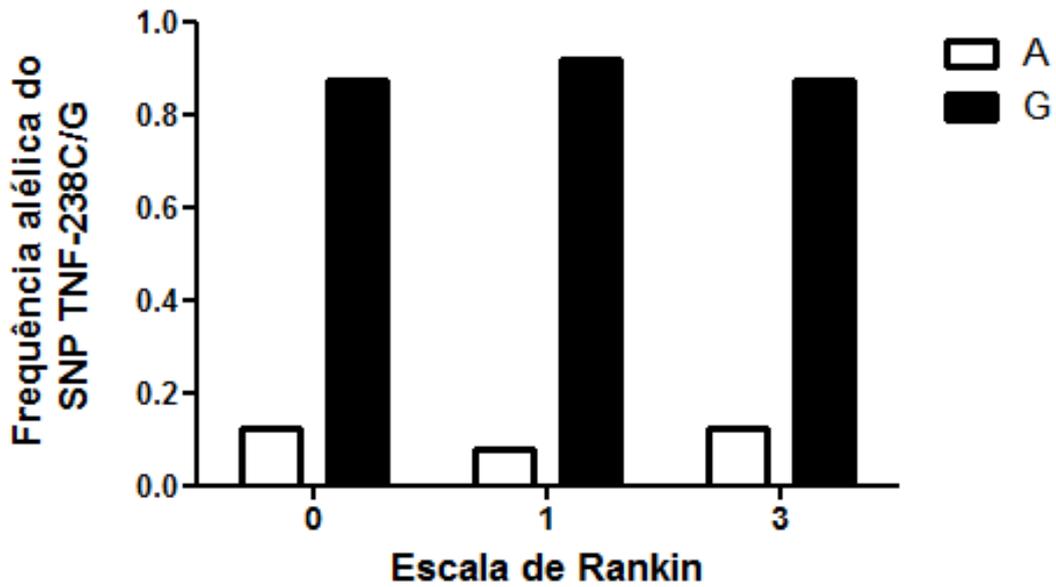
ANEXO E - Gráficos dos resultados obtidos.



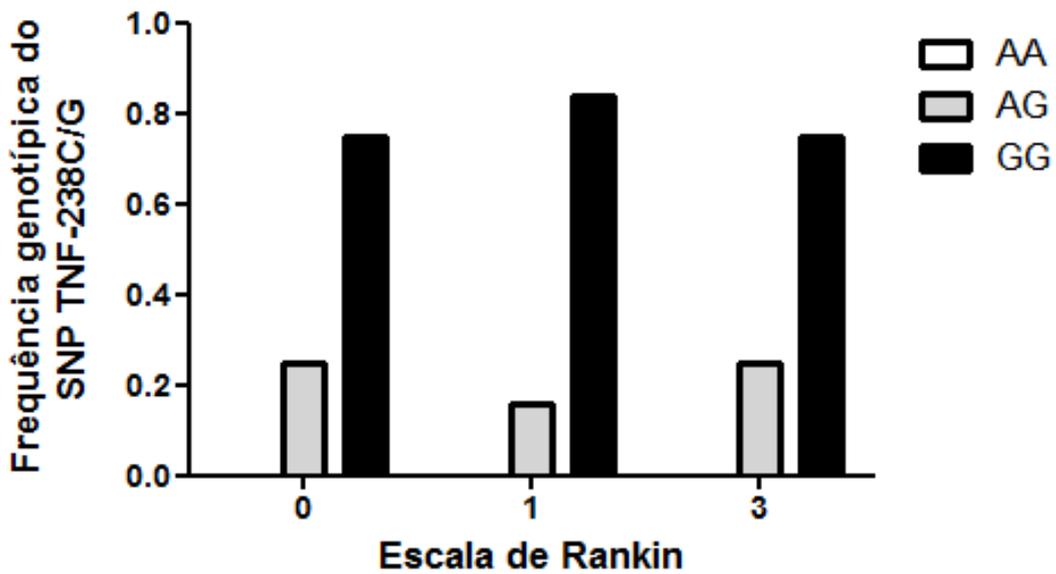
**Gráfico 1.** Frequências alélicas do polimorfismo TNF -238A/G entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.



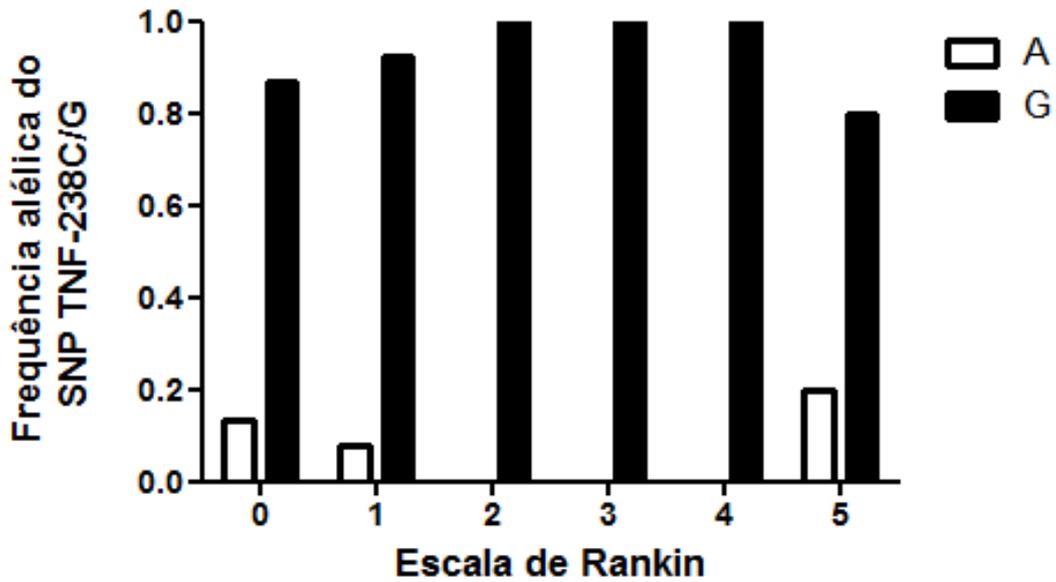
**Gráfico 2.** Frequências genóticas do polimorfismo TNF -238A/G entre os diferentes grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.



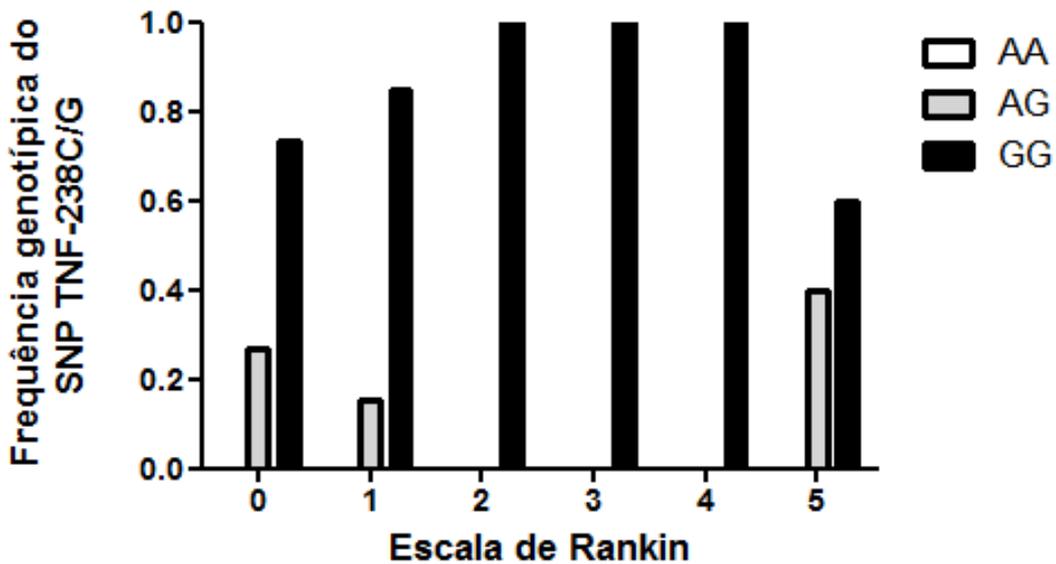
**Gráfico 3.** Frequências alélicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes apresentando aneurisma cerebral.



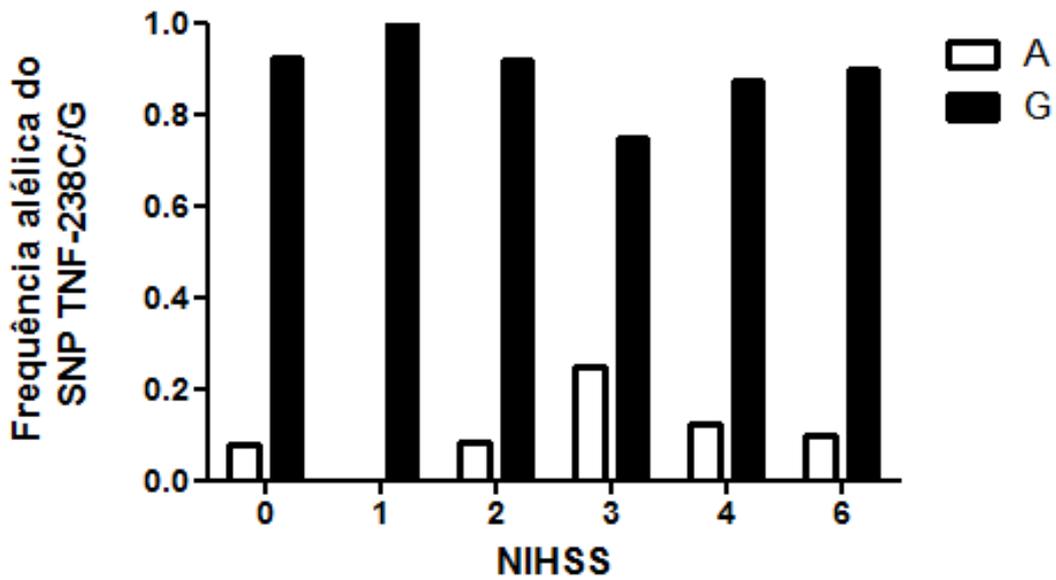
**Gráfico 4.** Frequências genotípicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes apresentando aneurisma cerebral.



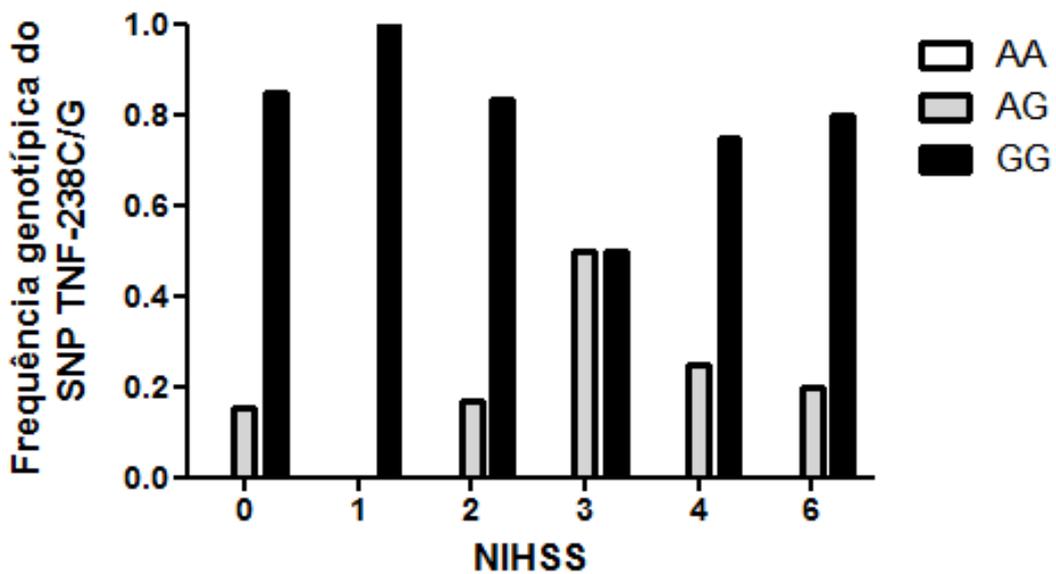
**Gráfico 5.** Frequências alélicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes acometidos por AVEH.



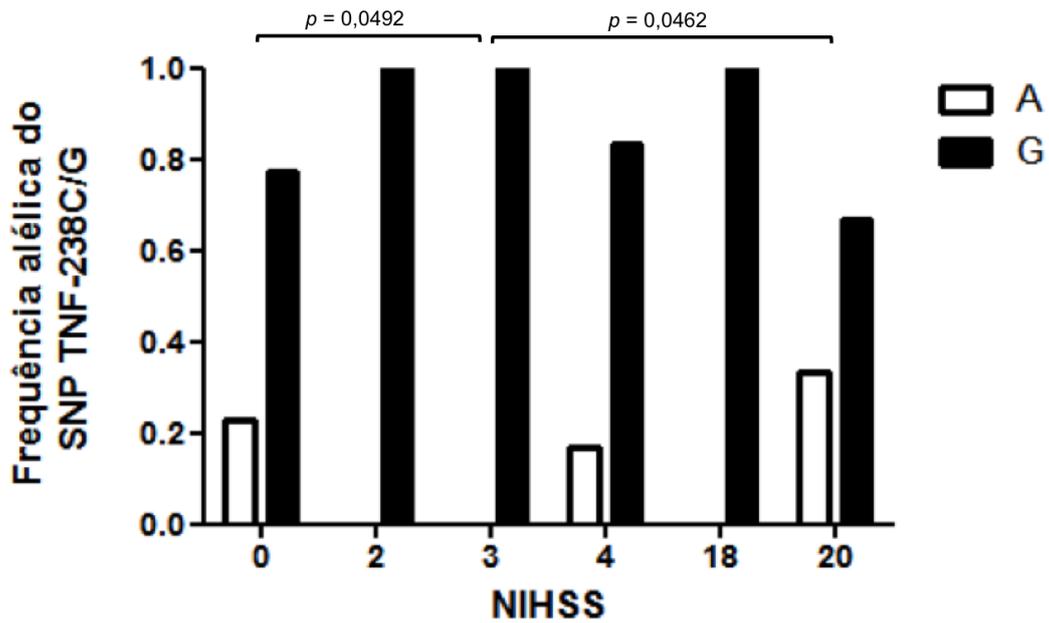
**Gráfico 6.** Frequências genotípicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias da escala de Rankin de pacientes acometidos por AVEH.



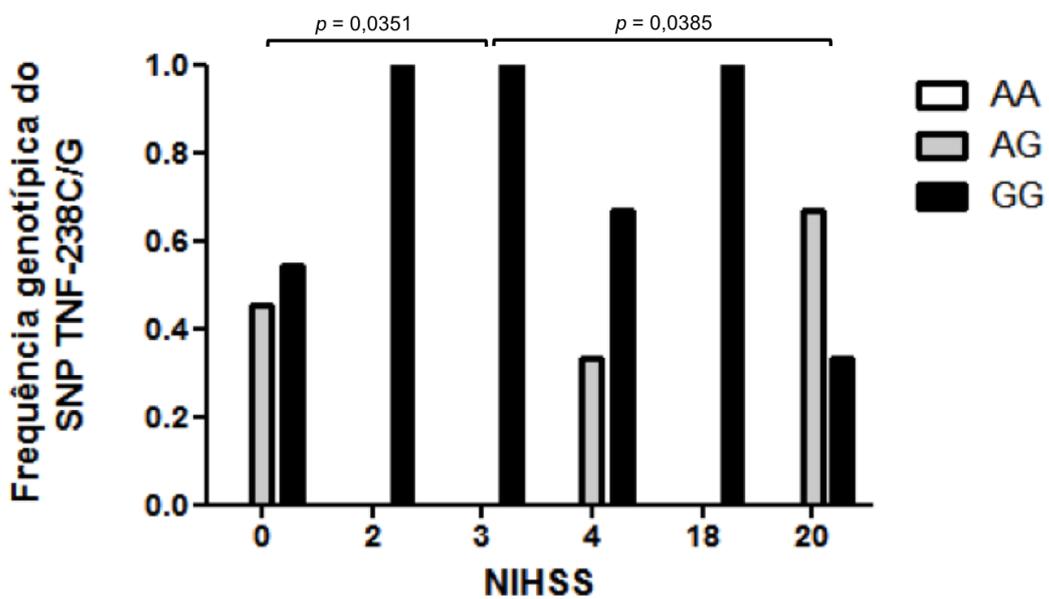
**Gráfico 7.** Frequências alélicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes apresentando aneurisma cerebral.



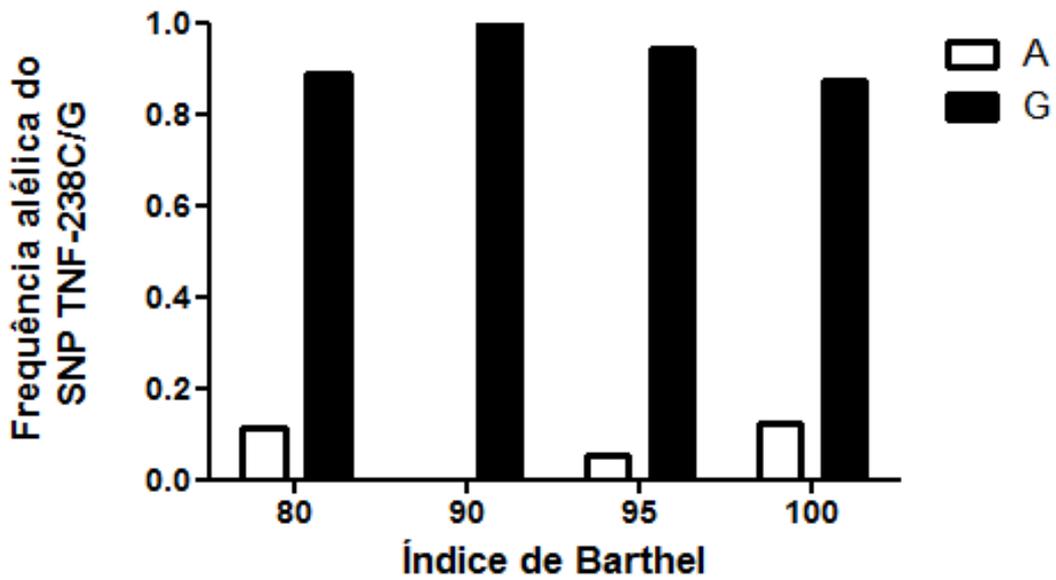
**Gráfico 8.** Frequências genotípicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes apresentando aneurisma cerebral.



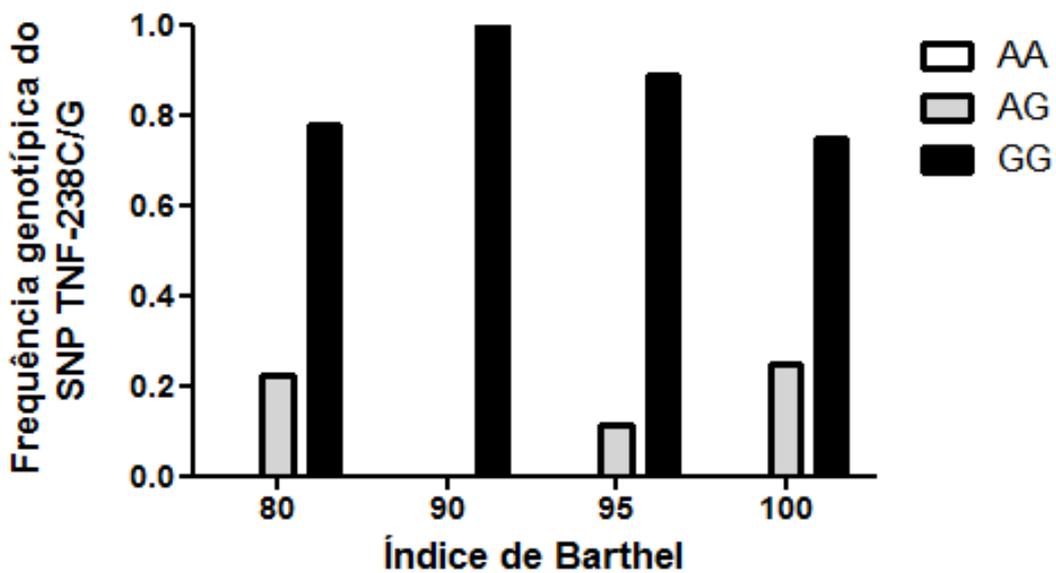
**Gráfico 9.** Frequências alélicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes acometidos por AVEH.



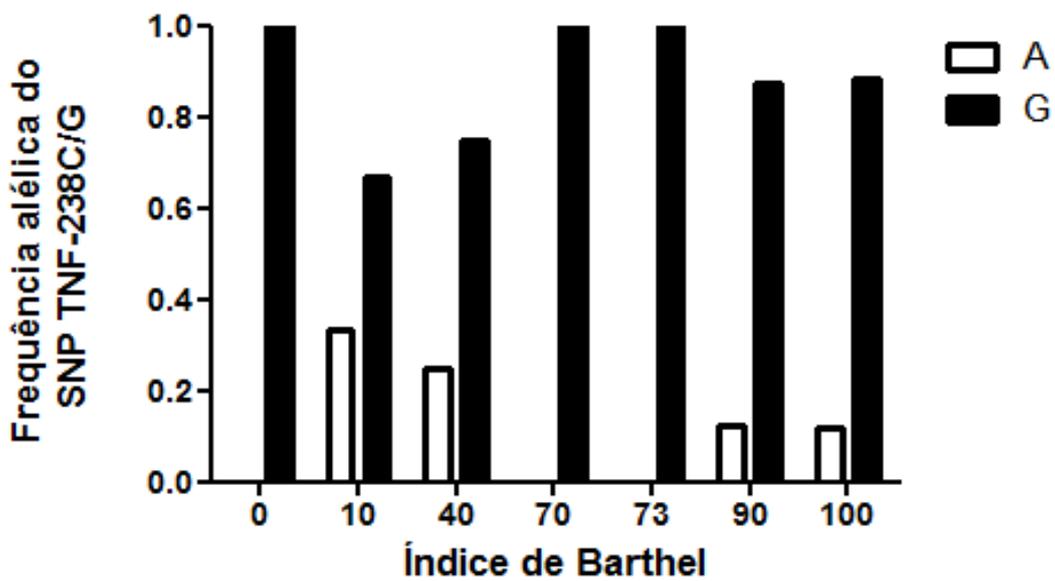
**Gráfico 10.** Frequências genotípicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias da NIHSS de pacientes acometidos por AVEH.



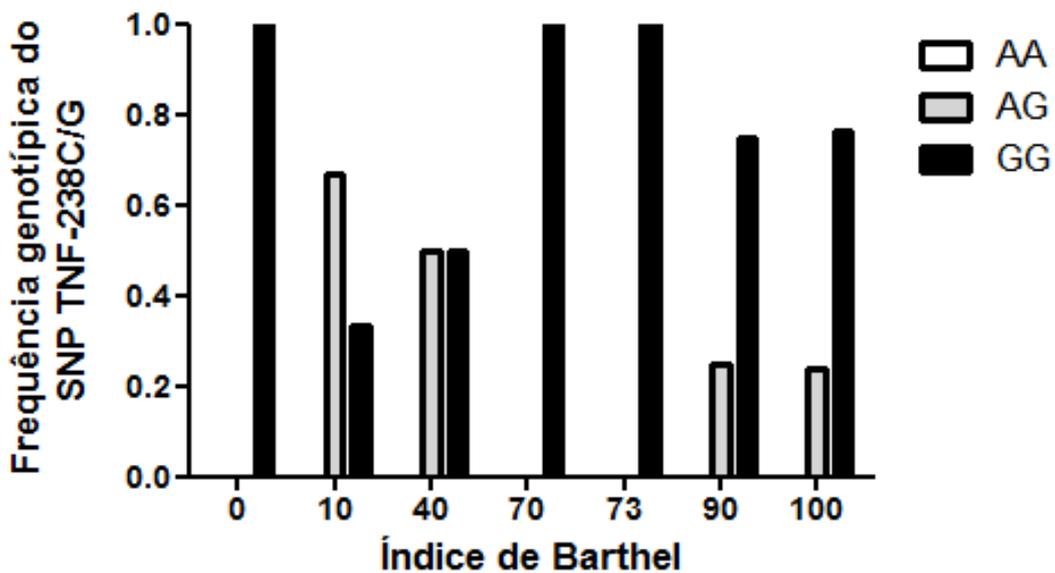
**Gráfico 11.** Frequências alélicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes apresentando aneurisma cerebral.



**Gráfico 12.** Frequências genotípicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes apresentando aneurisma cerebral.



**Gráfico 13.** Frequências alélicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes acometidos por AVEH.



**Gráfico 14.** Frequências genotípicas do polimorfismo TNF -238A/G nas diferentes categorias do índice de Barthel de pacientes acometidos por AVEH.