



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOHNATHAN DE SOUSA PARREIRA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GENÉTICO *NcoI*
(rs909253) DO FATOR DE NECROSE TUMORAL BETA E
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS E O
PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO ATENDIDOS EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

JOHNATHAN DE SOUSA PARREIRA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GENÉTICO *NcoI*
(rs909253) DO FATOR DE NECROSE TUMORAL BETA E
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS E O
PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO ATENDIDOS EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Damácio Ramon Kaimen-Maciel

Co-orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P259a Parreira, Johnathan de Sousa.

Associação entre o polimorfismo genético *NcoI* (rs909253) do fator de necrose tumoral beta e marcadores inflamatórios e metabólicos e o prognóstico em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico atendidos em um hospital universitário. – Londrina, 2014.

72 f.: il.

Orientador: Damacio Ramón Kaimen-Maciel.

Coorientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014. Inclui bibliografia.

1. Acidentes vasculares cerebrais – Teses. 2. Isquemia cerebral – Teses. 3. Fator de necrose de tumor – Teses. 4. Polimorfismo (Genética) – Teses. 5. Inflamação – Teses. 6. Metabolismo – Teses. I. Kaimen-Maciel, Damacio Ramón. II. Reiche, Edna Maria Vissoci. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 616.831

JOHNATHAN DE SOUSA PARREIRA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GENÉTICO *NcoI*
(rs909253) DO FATOR DE NECROSE TUMORAL BETA E
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS E O
PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL ISQUÊMICO ATENDIDOS EM UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Damácio Ramon Kaimen-Maciel
UEL – Londrina - PR

Profª. Dra. Karen Brajão de Oliveira
UEL – Londrina – PR

Profª. Dra. Monica Marcos de Souza
UEL – Londrina - PR

Londrina, 5 de maio de 2014.

JOHNATHAN DE SOUSA PARREIRA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO GENÉTICO *NcoI*
(rs909253) DO FATOR DE NECROSE TUMORAL BETA E
MARCADORES INFLAMATÓRIOS E METABÓLICOS E O
PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL ISQUÊMICO ATENDIDOS EM UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA (suplentes)

Profª. Dra. Andréa Name Colado Simão
UEL – Londrina - PR

Profª. Dra. Marla Karine Amarante
UEL – Londrina - PR

Londrina, 5 de maio de 2014.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades;

À minha querida esposa, que há tempos quero expressar a minha gratidão e alegria por estar ao seu lado, sou de uma sorte grande e a prova disso é ter você comigo e pra mim. Essa grande mulher que com sabedoria se aloja no meu coração, obrigado por tanto amor, pela boa convivência e por me fazer completo;

À minha família, pelo amor incondicional e sacrificio imposto pela distância, por estarem presentes em todos os meus dias. Minha mãe, Joana Dark de Sousa Parreira, meu pai, José Parreira Junior e minha irmã, Jordanna de Sousa Parreira, sou incalculavelmente grato e feliz por tê-los em minha vida;

Ao Prof. Dr. Damácio Ramon Kaimen-Maciel, meu orientador, pela confiança, inspiração, colaboração e incentivo durante toda a execução do projeto;

Agradeço eternamente à Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, iluminada por Deus, pela paciência e fé depositadas em mim. Pela dedicação irrestrita, apoio fundamental e amizade durante todo o desenvolvimento do trabalho. Pela colaboração e seus conhecimentos repassados;

Agradeço aos professores Dr. Marcio Francisco Lehmann, Dra. Andréa Name Colado Simão, Msc. Helena Kaminami Morimoto, por ensinarem, ouvirem, aconselharem, guiarem, por se desdobrarem a ajudar no que fosse possível quando lhes eram solicitados;

Agradeço aos colegas de pós-graduação do Setor de Diagnóstico Molecular do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Hospital Universitário da UEL, em especial à Ana Paula Kallaur, Sayonara Rangel Oliveira, Francieli Delongui e Daniela Frizon Alfieri, que sempre se empenharam, com muito esforço e paciência, a me ensinar, me ajudar, me entender, e que contribuiu demais para a conclusão deste trabalho;

Agradeço aos acadêmicos de medicina, da Universidade Estadual de Londrina, em especial à Maria Caroline Martins de Araújo, Carolina Rossato, Jéssica Tavares de Almeida e Erick Frank Bragato, pela confiança, dedicação e trabalho árduo, sem os quais não teríamos alcançado o sucesso.

Agradeço à Secretaria de Pós-Graduação, pelo excelente trabalho e zelo não só comigo, mas para com todos os alunos, especialmente à secretária Sandra Lage e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do CCS da UEL, Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa;

Agradeço a toda equipe do Hospital Universitário e do Hemocentro Regional de Londrina que, de várias maneiras, contribuíram para o bom andamento e conclusão deste trabalho, e de maneira especial, agradeço aos técnicos dos setores de Diagnóstico Molecular e de Imunologia Clínica do LAC, pela amizade, pelo bom convívio, por serem prestativos e sempre ajudarem de boa vontade.

PARREIRA, Johnathan de Sousa. **Associação entre o polimorfismo genético *NcoI* (rs909253) do fator de necrose tumoral beta (*TNFB*) e marcadores inflamatórios e metabólicos e o prognóstico em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico atendidos em um hospital universitário.** 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo, causando um forte impacto econômico e social. Várias vias fisiológicas, como o metabolismo lipídico, resposta inflamatória crônica, coagulação e hemostasia, regulação da pressão sanguínea e adesão celular têm sido implicadas na fisiopatologia do AVC e polimorfismos em genes que codificam moléculas envolvidas nestas vias representam importantes fatores para a patogênese e curso clínico do AVC. Entretanto, os resultados prévios são contraditórios e não devem ser generalizados para a população brasileira, geneticamente uma das mais heterogêneas do mundo. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo genético *NcoI* (A252G, rs909253) do gene *fator de necrose tumoral beta* (*TNFB*) e marcadores inflamatórios, metabólicos e o prognóstico em pacientes com AVC isquêmico agudo da população brasileira. O estudo incluiu 93 pacientes e 134 indivíduos saudáveis controlados por idade, sexo, etnia e índice de massa corpórea (IMC). A capacidade funcional dos pacientes com AVC foi avaliada no momento da admissão hospitalar pela Escala de Rankin Modificada. O subtipo de AVC isquêmico foi classificado segundo os critérios de TOAST. Amostras de sangue periférico foram coletadas em até 24 horas após o diagnóstico de AVC para a realização da genotipagem do polimorfismo *NcoI* do *TNFB* e determinação dos marcadores inflamatórios e metabólicos. A análise do polimorfismo *NcoI* foi realizada pela técnica de PCR-RFLP, utilizando-se a enzima de restrição *NcoI*. Os marcadores inflamatórios avaliados foram: contagem de leucócitos periféricos totais e plaquetas, velocidade de hemossedimentação (VHS), níveis séricos de proteína C reativa ultrasensível (usPCR), ferritina, níveis plasmáticos de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNFA). Os marcadores metabólicos foram: níveis séricos de ferro, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) colesterol, lipoproteína de baixa densidade (LDL) colesterol, triglicerídeos e níveis plasmáticos de glicose e insulina. O índice de resistência à insulina foi determinado pelo modelo de avaliação da homeostase - resistência à insulina (HOMA-IR). Entre os pacientes, 57,0% eram homens e 43,0% eram mulheres, a mediana de idade foi 65 [interquartil 25%-75% (IQR): 56,0-75,0] e a mediana de IMC foi 25,4 kg/m² (IQR: 21,9 - 29,4). A frequência de hipertensão, sedentarismo e dislipidemia foi maior entre os pacientes que os controles ($p < 0,0001$). Pacientes com AVC apresentaram valores mais elevados de leucócitos totais, usPCR, ferritina, glicose e HOMA-IR ($p < 0,0001$), VHS e insulina ($p < 0,01$) e menores níveis de HDL-colesterol ($p < 0,0001$) comparados aos controles. O subtipo de AVC isquêmico agudo de aterosclerose de grandes artérias foi diagnosticado em 28,0% dos pacientes, infarto lacunar em 23,7%, infarto cardioembólico em 13,9%, outras etiologias em 8,6% e etiologia indeterminada em 25,8%. Entre os pacientes com AVC, a frequência dos genótipos TNFB1/B1, TNFB1/B2 e TNFB2/B2 foi de 9,7%, 46,2%, 44,1%, respectivamente; dos alelos TNFB1 e TNFB2 foi de 0,3280 e 0,6720, respectivamente, sem apresentar diferença significativa entre os pacientes e controles ($p > 0,05$). Entretanto, os pacientes portadores do genótipo TNFB2/B2, comparados aos que possuíam outros genótipos, apresentaram maiores níveis dos marcadores inflamatórios TNFA e leucócitos periféricos e dos marcadores metabólicos ferro sérico, colesterol total, LDL

colesterol, glicemia, insulina e HOMA-IR ($p < 0,05$). Verificou-se uma correlação positiva entre os níveis de leucócitos, IL-6, usPCR e VHS e negativa entre os níveis de ferro com o grau de incapacidade dos pacientes ($p < 0,05$) obtidos na admissão dos mesmos. Os resultados mostram que o polimorfismo *NcoI* do *TNFB* não está associado, por si só, com o desenvolvimento e evolução do AVC isquêmico agudo nesta população; no entanto, o genótipo TNFB2/B2 está associado com maior resposta inflamatória e alterações metabólicas que aumentam a chance de ocorrência do AVC. Os resultados confirmam a intensa reação inflamatória e alterações metabólicas associadas ao AVC isquêmico agudo. Desta forma, esta variante genômica pode interagir com outros fatores genéticos e ambientais criando um perfil favorável que contribua para o desenvolvimento e evolução do AVC.

Palavras-chaves: Acidente vascular encefálico. Polimorfismo genético. Fator de necrose tumoral beta. Escala de Rankin. Citocinas. Inflamação. Metabolismo.

PARREIRA, Johnathan de Sousa. **Association between the *NcoI* (rs909253) tumor necrosis factor beta (*TNFB*) genetic polymorphism and the inflammatory and metabolic markers and the prognosis in ischemic stroke patients attended at an university hospital.** 72p. Dissertation (Master Degree in Health Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2014.

ABSTRACT

Stroke is a major cause of death and long-term adult disability worldwide, causing a strong economic and social impact. Several physiological pathways, such as lipid metabolism, chronic inflammatory response, systemic coagulation, blood pressure regulation, and cell adhesion have been implicated in the pathophysiology of stroke and polymorphisms in genes coding for pro-inflammatory markers may represent important factors for the pathogenesis and outcome of stroke. However, these previous results are conflicting and should not be generalized to all populations, mainly for the Brazilian population, considered one of the most genetically heterogeneous worldwide. The aim of this study was to evaluate the relationship between the *NcoI* (A252G, rs909253) *tumor necrosis factor beta* (*TNFB*) polymorphism and the inflammatory and metabolic markers and the prognosis in acute ischemic stroke patients from Brazilian population. Ninety-three patients from Londrina, Southern Brazil, and 134 age, sex, ethnicity, and body mass index (BMI) controlled healthy individuals were included. The baseline and three-month follow-up disability of patients was evaluated up to eight hours of the stroke using the modified Rankin Scale. The subtype of ischemic stroke was classified according to TOAST criteria. The blood samples were obtained up to 24 hours of the stroke. The *NcoI* polymorphism was evaluated using PCR-RFLP with *NcoI* restriction enzyme. Inflammatory markers, such as white blood cell and platelet counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), plasma levels of interleukin 6 (IL-6), TNFA, serum high sensitive reactive C protein (hsCRP), ferritin, and metabolic markers including total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, triglycerides, plasma levels of glucose and insulin, and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were determined. Among the patients, 57.0% were male and 43.0% were female, the median age was 65 years [interquartile range 25%-75% (IQR): 56.0-75.0], and the median BMI was 25.4 kg/m² (IQR: 21.9 – 29.4). The frequency of hypertension, sedentary lifestyle, and dyslipidemia was higher in stroke patients than in controls ($p < 0.0001$). Stroke patients presented higher levels of white blood cells, hsCRP, ferritin, glucose, and HOMA-IR ($p < 0.0001$); ESR and insulin ($p < 0.01$); and lower HDL cholesterol ($p < 0.0001$) than controls. The subtype of ischemic stroke of large artery atherosclerosis was diagnosed in 28.0% of patients, lacunar infarct in 23.7%, cardioembolic infarct in 13.9%, other etiology in 8.6%, and undetermined etiology in 25.8%. Among the stroke patients, the frequency of TNFB1/B1, TNFB1/B2, and TNFB2/B2 genotypes was 9.7%, 46.2%, and 44.1%, respectively; the frequency of TNFB1 and TNFB2 alleles was 0.3280 and 0.6720, respectively. There was no difference in genotypic distribution and allelic frequency of *TNFB NcoI* polymorphism among stroke patients and controls ($p > 0.05$). However, stroke patients carrying the TNFB2/B2 genotype presented higher levels of TNFA, white blood cell counts, iron, total cholesterol, LDL cholesterol, glucose, insulin, and HOMA-IR ($p < 0.05$) than the carriers of other genotypes. White blood cells, IL-6, hsCRP, and ESR were positively correlated and iron levels were negatively correlated with the neurological disability of the patients ($p < 0.05$). The main result of this study is that *TNFB NcoI* polymorphism, by itself, is neither associated with increased susceptibility of stroke development nor with the outcome. However, the

homozygous genotype for the variant allele TNFB2 was associated with higher expression of classical inflammatory and metabolic markers of development and outcome of stroke, underscoring that these molecules play important role in the pathogenesis and outcome of stroke. At this way, this genetic variant might interact with environmental and other genetic factors creating a favorable profile that contribute to the development and outcome of stroke.

Keywords: Ischemic stroke. Genetic polymorphism. Tumor necrosis factor beta. Cytokines, Rankin Scale. Inflammation. Metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AHA	<i>American Heart Association</i> – Associação Americana de Cardiologia
AHC	Ambulatório do Hospital de Clínicas
AVC	Acidente vascular cerebral
AVE	Acidente vascular encefálico
CADASIL	Arteriopatia cerebral autossômica dominante, infartos subcorticais e leucoencefalopatia
CCL5	Ligante 5 de quimiocina CC
DAC	Doença arterial coronariana
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> - enzimaímunoensaio
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> – Estudos genômicos de associação
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> - Lipoproteína de alta densidade
HIV-1/2	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i> -Vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2
HOMA	<i>Homeostatic Model Assessment</i> - Modelo de Avaliação da Homeostase
HU	Hospital Universitário de Londrina
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IFN	Interferon

IL	Interleucina
IL-1B	Interleucina 1B
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
IQR	<i>Interquartil range</i> – variação interquartil
IR	<i>Insulin Resistance</i> - Resistência à insulina
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LB	Linfócito B
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> - Lipoproteína de baixa densidade
LT	Linfócito T
LTa	Linfotoxina alfa
MELAS	Miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios tipo AVC
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> – complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
<i>NcoI</i>	Enzima de restrição extraída de <i>Nocardia coralii</i> I
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i> - Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i> - matadoras naturais
OR	<i>Odds ratio</i> – razão de chance
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i> – regulado na ativação, secretado e expresso pela célula T normal
RNM	Ressonância nuclear magnética

SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – polimorfismo de único nucleotídeo
T	Timina
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGFB	<i>Transformation growth factor B</i> - Fator de transformação de crescimento beta
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
<i>TNFB</i>	<i>Gene fator de necrose tumoral beta</i>
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral tipo I
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral tipo II
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa
TNFB	Fator de necrose tumoral beta
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
Treg	Célula T regulatória
UEL	Universidade Estadual de Londrina
usPCR	Proteína C reativa ultra-sensível
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
SUMÁRIO	xiv
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.....	15
1.2 OS MARCADORES GENÉTICOS NO AVC	17
1.3 AVC DE GENÉTICA COMPLEXA.....	18
1.4 INFLAMAÇÃO E AVC.....	19
1.4.1 Leucócitos	19
1.4.2 Proteína C Reativa (PCR).....	20
1.4.3 Citocinas e AVC.....	21
1.5 POLIMORFISMO GENÉTICO NcoI DO TNFB NO AVC	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3.2.1 Descrever as Características Demográficas, Epidemiológicas, Clínicas e Laboratoriais dos Pacientes com AVC Isquêmico Agudo, Atendidos no HU de Londrina;	26
3.2.2 Determinar a Frequência Genotípica e Alélica do Polimorfismo Genético NcoI do TNFB em Pacientes com AVC Isquêmico Agudo e em Indivíduos Saudáveis;.....	26
3.2.3 Determinar a Associação Entre o Polimorfismo Genético NcoI do TNFB com as Características Demográficas, Epidemiológicas, Clínicas e Marcadores Inflamatórios e Metabólicos em Pacientes com AVC Isquêmico Agudo;	26

3.2.4	Determinar a Associação entre o Polimorfismo Genético NcoI do TNFB com o Curso Clínico do AVC Isquêmico Agudo.....	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	27
4.2	DELINEAMENTO	27
4.3	POPULAÇÃO.....	27
4.4	AMOSTRA	27
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	27
4.6	EXAMES LABORATORIAIS.....	29
4.6.1	Marcadores Inflamatórios.....	29
4.6.2	Marcadores Metabólicos	30
4.7	POLIMORFISMO GENÉTICO NCOI DO TNFB.....	30
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	34
	ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL	35
6	CONCLUSÕES	58
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
8	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	66
	ANEXO A – Aprovação pelo comite de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da UEL.....	67
	ANEXO B - Termo De Consentimento Livre E Esclarecido	68
	ANEXO C - Questionário Para Coleta De Dados	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O acidente vascular cerebral (AVC) ou encefálico (AVE) é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo, o que causa um forte impacto econômico e social. Entre as mortes que ocorrem em todo o mundo, o AVC foi considerado a segunda maior causa e responsável por 10% dos óbitos. Entretanto, a distribuição global das mortes é heterogênea, com 85% delas ocorrendo nos países em desenvolvimento, afetando um terço da população economicamente ativa. No Brasil, em 2010, segundo dados do Ministério da Saúde, o AVC foi responsável por 52,3 óbitos em 100 mil habitantes, representando 10% de todas as mortes e 10% das internações em hospitais públicos (Yach et al., 2004; Brasil, 2013). Em 2015, o Brasil gastou 2,7 bilhões de dólares em cuidados de saúde para pacientes com doenças cardíacas, AVC e diabetes *mellitus* (Oliveira-Filho, 2012). Apesar disso, a população brasileira desconhece a doença, os fatores de risco são mal controlados, poucos centros têm a estrutura e a organização necessárias para atender e tratar adequadamente a fase aguda da doença e poucos locais oferecem reabilitação aos pacientes (Oliveira-Filho et al., 2012). Nos últimos anos, grandes esforços têm sido realizados para construir um sistema de atendimento que melhore o manejo do AVC no país (Strong et al., 2007).

Assim como a incidência, a mortalidade, nos últimos 30 anos, em países desenvolvidos, tem declinado, principalmente, no Japão, América do Norte e Europa Ocidental e, na última década, também na Europa Oriental. As curvas das taxas de mortalidade nos países em desenvolvimento, especialmente na América Latina, têm diminuído, ainda que menos pronunciadamente do que nos Estados Unidos e Canadá. Utilizando dados oficiais de atestados de óbitos, um estudo das taxas de mortalidade por AVC no Brasil, comparando o início das décadas de 1980, 1990 e 2000, demonstrou um declínio de 68,2 para 40,9 por 100.000 habitantes no período, com variações regionais (Cabral, 2009).

A taxa de mortalidade bruta mostrou uma discreta diminuição, que foi mais evidente no sexo masculino, enquanto a taxa de mortalidade padronizada mostrou uma redução mais acentuada, especialmente entre as mulheres. Mesmo constatada essa tendência de redução da taxa de mortalidade por AVC no Brasil, os valores continuam elevados, sendo superiores aos dos países desenvolvidos e aos da América Latina. Os motivos para explicar a redução da taxa de mortalidade por AVC estão intimamente ligados à incidência e letalidade da doença (Cabral, 2009).

A incidência está relacionada aos fatores de risco como a hipertensão arterial, diabetes, obesidade, tabagismo, Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), entre outros, enquanto a letalidade avalia a eficácia do tratamento instituído. O controle dos fatores de risco, a prevenção primária e secundária das doenças circulatórias e a melhoria das condições socioeconômicas da população podem levar a uma queda da mortalidade. Além disso, os procedimentos de alta tecnologia (angioplastias), maior número de equipamentos nos hospitais para o diagnóstico mais preciso, como tomografia computadorizada (TC) do crânio e ressonância nuclear magnética (RNM), e atendimentos mais rápidos também contribuem para a redução da mortalidade. No entanto, pelas suas dimensões, no Brasil há uma grande desigualdade regional, além de os recursos destinados à saúde pública serem escassos, não sendo possível que a população de algumas localidades seja contemplada com esses procedimentos (Garritano et al., 2012).

A *American Heart Association* estima que, a cada ano, as mulheres apresentam cerca de 60 mil casos a mais de AVC que os homens, sendo que essa tendência também é observada em outros países. Além disso, pessoas de etnia negra apresentam risco de AVC duas vezes maior que outras etnias (AHA, 2009). Observa-se nítida relação entre o nível socioeconômico e a prevalência de AVC. As regiões periféricas e menos favorecidas das grandes cidades apresentam um número significativamente maior de casos de AVC, sugerindo que o impacto dessa doença em áreas desprovidas de recursos pode ser ainda maior (Garritano et al., 2012).

Cerca de 85% dos AVC são isquêmicos e decorrentes de uma obstrução arterial encefálica. Dos 15% restantes, 10% são decorrentes de hemorragia intracerebral espontânea e 5% de hemorragia subaracnóidea. O AVC isquêmico, por sua vez, apresenta três etiologias principais: doença aterosclerótica de grandes artérias, doença de pequenos vasos e cardioembolia. Além dessas, existem inúmeras outras causas, como vasculites, trombofilias, anemia falciforme, dissecação arterial e doenças genéticas. Em até 30% dos casos, a etiologia não pode ser definida. As principais causas relacionadas às hemorragias intracerebral espontânea e subaracnóidea são, respectivamente, a hipertensão arterial sistêmica e os aneurismas e malformações arteriovenosas cerebrais (Rosamond et al., 2008).

Uma classificação do AVC isquêmico merece destaque por sua praticidade e utilidade nos estudos que buscam os fatores de riscos genéticos para a doença e suas influências na evolução clínica (prognóstico). Trata-se da classificação TOAST que descreve cinco subtipos de AVC (Adams et al., 1993):

- (1). **Aterosclerose de grandes artérias:** caracterizado por estenose (>50%) ou oclusão de uma artéria cerebral maior ou de um ramo cortical, presumivelmente causada pela aterosclerose.
- (2). **Infartos cardioembólicos:** caracterizado por oclusões causadas por êmbolos provenientes do coração.
- (3). **Infartos lacunares:** identificado em pacientes diabéticos e hipertensos clinicamente, síndromes lacunares, apresentando exames de imagem (TC ou RMN) normais ou com lesões relevantes subcorticais hemisféricas ou no tronco cerebral com diâmetro menor que 1,5 cm.
- (4). **AVC com outra etiologia determinada:** engloba pacientes com causas raras de AVC, como as vasculopatias não ateroscleróticas, estados de hipercoagulação ou desordens hematológicas. Os pacientes devem ter achados clínicos e TC ou RMN de AVC isquêmico agudo independente do tamanho ou localização.
- (5). **AVC com etiologia indeterminada.** Em várias situações, a causa do AVC isquêmico não pode ser determinada com algum grau de confiabilidade, a despeito de extensiva investigação.

O melhor tratamento para o AVC ainda é a prevenção, possível por meio da abordagem dos fatores de risco cardiovasculares modificáveis, que são: hipertensão arterial sistêmica, fibrilação atrial, diabetes *mellitus*, dislipidemia, obesidade, estresse, tabagismo, sedentarismo e etilismo. Os fatores de risco cardiovasculares não modificáveis são: idade, sexo, etnia e genéticos; destes, a idade é o mais importante (Rosamond et al., 2008).

1.2 OS MARCADORES GENÉTICOS NO AVC

O AVC é uma síndrome multifatorial complexa, com características para as quais não são possíveis demonstrar padrões clássicos de herança. Estudos em gêmeos, em famílias com alta incidência de casos de AVC e em modelos animais têm consistentemente sugerido a influência genética sobre o risco de AVC e seu prognóstico (Wang et al. 1997). Várias vias fisiológicas como a do metabolismo lipídico, da resposta inflamatória crônica local e sistêmica, da coagulação, da regulação da pressão sanguínea e da adesão celular têm sido implicadas na fisiopatologia do AVC. Polimorfismos genéticos envolvidos nestas vias têm sido propostos como fatores associados ao AVC (Wang et al., 2009).

Várias doenças monogênicas podem causar o AVC pela oclusão de grandes artérias e de pequenos vasos. São elas: arteriopatia cerebral autossômica dominante, infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL); anemia falciforme; homocisteinúria; miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios tipo AVC (MELAS) e a doença de Fabry. Em geral, elas são responsáveis por uma proporção muito pequena dos casos de AVC, provavelmente menos de 1%, devendo ser lembradas na investigação dos casos que acometem indivíduos jovens, com pouca ou nenhuma exposição aos fatores de risco convencionais. Os mecanismos pelos quais estes distúrbios monogenéticos resultam no AVC são variados (Leys et al., 2002).

CADASIL é a causa monogênica de AVC mais comum, associada à doença de pequenos vasos cerebrais, resultante de uma mutação no gene *NOTCH3*, caracterizada por infartos lacunares recorrentes, migrânea com aura, depressão e demência de início recente (Markus, 2011). A doença de Fabry é uma doença sistêmica associada ao cromossomo X, causada pela deficiência da enzima lisossomal α -galactosidase A, que resulta no acúmulo de glicosfingolípides no miocárdio, no epitélio renal, pele, olho e nos pequenos vasos, podendo cursar com isquemia cerebral principalmente em jovens. A anemia falciforme é a causa mais comum de AVC na infância, resultado de um estado homozigótico do gene da hemoglobina S ou por um estado heterozigótico associado a outras hemoglobinopatias (hemoglobina C ou α -talassemia). Homocisteinúria engloba um grupo da maioria das deficiências enzimáticas autossômicas recessivas que causa hiperhomocisteinemia e homocisteinúria e deve ser lembrada diante de crianças com AVC, retardo mental, descolamento atraumático de retina, anormalidades esqueléticas semelhantes à síndrome de Marfan. MELAS corresponde à síndrome de miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica, isquemia cerebral recorrente, associada às mutações no DNA mitocondrial (Dichgans, 2007).

1.3 AVC DE GENÉTICA COMPLEXA

O AVC é uma desordem complexa influenciada por grande número de variantes genéticas que apresentam um efeito individual modesto no risco de desenvolvimento da doença (Gulcher et al., 2005). Há duas metodologias diferentes usadas para identificar essas variantes: a análise por *linkage* e os estudos de associação pangênômica (GWAS - do inglês *genome-wide association study*) (Rosand et al., 2003).

A análise por *linkage* é tradicionalmente usada para estudar variantes genéticas entre linhagens cuidadosamente montadas. DNA dos membros da família afetada

pela doença ou traço de interesse é cruzado e testado para a presença de um *locus* genético específico detectado por cálculos estimados de frequência de recombinação. Entretanto, essa metodologia não tem sido bem sucedida na identificação de genes com efeito modesto no desenvolvimento de doenças com fenótipos complexos (Rosand et al., 2003).

Os estudos de GWAS foram desenvolvidos para superar as limitações das análises por *linkage*, testando milhares de variações genéticas comuns dispersas no genoma humano. No caso do AVC, esses estudos têm sido conduzidos por consórcios internacionais, imperativo para se conseguir a inclusão do número necessário de casos e controles e estudar diferenças populacionais. Mesmo assim, as análises das conclusões destes estudos têm mostrado poder estatístico insuficiente para detectar variantes comuns de baixo risco, variantes raras, interações gene-gene, interações gene-ambiente e variações estruturais no genoma (Manolio, 2009).

Muitas vias genéticas candidatas têm sido investigadas, incluindo vias envolvidas na função endotelial, com a liberação do óxido nítrico; no eixo do sistema renina-angiotensina-aldosterona; na coagulação e homeostase; e na inflamação (Markus, 2011).

1.4 INFLAMAÇÃO E AVC

Células cerebrais como astrócitos, oligodendrócitos e endoteliais constituem uma rede neurovascular que é essencial para as necessidades metabólicas dos neurônios. Estas células cerebrais também contribuem para o desencadeamento da inflamação pós-isquêmica com a produção de mediadores inflamatórios. A isquemia cerebral inicia uma complexa cascata de eventos em nível genômico, celular e molecular e a inflamação ocorre tanto no CNS como na periferia (Vila et al., 2000).

1.4.1 Leucócitos

Quatro a seis horas após o início da isquemia, os leucócitos circulantes aderem à parede vascular, levando à migração e acúmulo no tecido cerebral isquêmico com subsequente liberação de mediadores proinflamatórios. Os neutrófilos são geralmente os primeiros subtipos de leucócitos recrutados para o cérebro isquêmico e podem potencializar a lesão diretamente secretando substâncias deletérias ou outros mediadores inflamatórios como os intermediários do oxigênio reativo e os intermediários do nitrogênio reativo. A liberação de alguns destes intermediários e a liberação dos mediadores dos grânulos primários e

secundários dos neutrófilos, como proteinases, fosfolipases, elastases e collagenases, têm um importante papel na inflamação e também contribuem para o dano tissular (Hallenbeck, 1996). Leucocitose com neutrofilia são alterações laboratoriais associadas ao AVC e diminuição do número de neutrófilos foi associada com melhora do curso clínico do AVC (Wang et al., 2007).

Após os neutrófilos, ocorre uma invasão de monócitos/macrófagos que atingem um pico cerca de uma semana após a isquemia (Garcia; Kamijyo (1974) e contribuem para a fisiopatologia do estágio subagudo após o AVC. Os monócitos circulantes são importantes fontes de interleucina 8 (IL-8) que é considerada uma forte quimioquina para neutrófilos. Além disto, os macrófagos derivados de monócitos podem iniciar e amplificar eventos trombogênicos pela expressão do fator tissular nas suas superfícies celulares (Edwards; Rickles; Bobrove, 1979). Com a liberação de proteinases e a expressão de atividade procoagulante, os macrófagos contribuem para a ruptura e formação de trombos nas placas de aterosclerose e podem exercer um importante papel no AVC devido à aterosclerose de grandes artérias (Grau et al., 2001).

1.4.2 Proteína C Reativa (PCR)

PCR é uma proteína de fase aguda marcador de inflamação sistêmica (Gabay et al., 1999). Tem sido descrita como um novo marcador de doença aterotrombótica e pode refletir o nível de atividade inflamatória dentro das placas ateroscleróticas (Danesh et al., 1998; Wilson, 1999; Rost et al., 2001). Os níveis séricos de PCR são indicadores sensíveis de eventos cerebrovasculares iniciais e recorrentes (Arenillas et al., 2003; Di Napoli et al., 2005).

Vários estudos relatam que altos níveis de PCR estão associados com pior evolução após AVC isquêmico e hemorrágico (Castillo et al., 2002; Castellano et al., 2005; Everett et al., 2006). Uma coorte de 15.632 mulheres, inicialmente saudáveis, foram monitoradas clínica e laboratorialmente por um período de 10 anos e os resultados demonstraram um risco relativo de 2,76 (Intervalo de Confiança de 95%: 1,51-5,05) para um futuro AVC isquêmico e sugerem a usPCR como um marcador mais potente de um futuro AVC isquêmico quando comparada aos níveis de lipídeos, isoladamente (Everett et al., 2006).

1.4.3 Citocinas e AVC

A maioria das reações inflamatórias é mediada por citocinas que podem potencializar a lesão causada pela isquemia cerebral. Citocinas são um grupo de pequenas moléculas de glicoproteínas que desempenham um significativo papel como ativador de moléculas de adesão. No cérebro há diferentes tipos celulares capazes de secretar citocinas, tais como micróglia, astrócitos, células endoteliais e neurônios. Há também o envolvimento de citocinas derivadas periféricamente na inflamação cerebral. Células fagocitárias derivadas de células mononucleares da periferia, linfócitos T (LT), células *natural killers* (NK) e leucócitos polimorfonucleares produzem e secretam citocinas e podem contribuir para a inflamação no sistema nervoso central (SNC). Os níveis de citocinas estão elevados no cérebro em resposta a vários estímulos, tais como isquemia, sendo a interleucina 1 beta (IL-1B), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNFA), interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento beta (TGFB) as mais investigadas relacionadas ao AVC (Wang et al., 2007).

A IL-1B é produzida no SNC por vários tipos de células e aumento do mRNA de IL-1B foi observado entre 15-30 minutos após isquemia, o que levou a um aumento da citocina poucas horas depois (Davies et al., 1999). IL-1B promove proliferação e ativação de astrócitos que levam à astrogliose e verificou-se uma correlação entre os níveis de IL-1B após a isquemia e a gravidade do AVC (John et al., 2004). IL-1B induz diretamente a expressão de CC quimiocinas (CCL5 ou RANTES) na micróglia e astrócitos (Shichita et al., 2012).

IL-6 é uma citocina com diversas funções e efeitos deletérios que podem contribuir para a lesão inflamatória inicial no cérebro. IL-6 está envolvida na regulação da apoptose de neurônios (Herrmann et al., 2003) e sua regulação é aumentada após a isquemia cerebral (Wang et al., 1994). Estudos sugerem o papel deletério da IL-6 na isquemia cerebral; portanto, aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 é um potente preditor para deterioração neuronal precoce (Vila et al., 2000) e está associado com maior volume de área infartada (Castillo et al., 2002) e pior prognóstico do paciente (Smith et al., 2004).

O TNFA e fator de necrose tumoral beta (TNFB), também denominado linfotóxina alfa (LTa), são citocinas que desempenham múltiplos papéis nas atividades inflamatórias e imunomoduladoras. TNFA e TNFB são conhecidos por induzir uma resposta inflamatória pela ativação do fator nuclear de transcrição *kappa* B (NF-kB) após a ligação aos

receptores de TNF (TNFRI e TNFRII) que também são expressos em placas ateroscleróticas (Bazzoni; Beutler, 1996; Naoum et al., 2006).

No SNC, a citocina pró-inflamatória TNFA é considerada o principal mediador da neuroinflamação que desencadeia uma cascata de eventos celulares e moleculares que culminam com a morte neuronal. A regulação do TNFA está aumentada no cérebro após isquemia, com aumento inicial em 1-3 horas após o início da isquemia (Liu et al., 1994) e apresenta um padrão de expressão com duas fases com um segundo pico entre 24-36 horas (Murakami et al., 2005; Offner et al., 2006). Níveis séricos de TNFA estão elevados no líquido cefaloraquidiano e no plasma de pacientes que sofreram AVC (Vila et al., 2000) e aumento do TNFA em pacientes que sofreram o subtipo lacunar de AVC está associado com deterioração neurológica precoce e pior evolução clínica e incapacidade funcional (Castellanos et al., 2002).

O TNFA é uma citocina derivada de macrófagos, linfócitos e tecido adiposo que regula a resposta inflamatória, modula o crescimento e diferenciação celular e ativa a coagulação sanguínea (Bazzoni; Beutler, 1996). Em geral, o aumento dos níveis plasmáticos e a atividade de TNFA também estão associados com um aumento da produção de outras interleucinas (DeGraba, 1997).

Entre as diversas funções do TNFA, esta citocina afeta a sinalização da insulina, o metabolismo de lipídios e a função dos adipócitos (Cawthorn; Sethi, 2008). O TNFA desempenha um papel central em vários componentes da síndrome metabólica (Moller, 2000), funciona como um modulador da expressão gênica em adipócitos e está implicado no desenvolvimento da resistência à insulina (Hotamisligil et al., 1995; Jang et al., 2007a; Plomgaard et al., 2007). Além disso, o TNFA pode afetar o metabolismo de lipídeos, inibindo os ácidos graxos livres, a absorção e a lipogênese (Cawthorn; Sethi, 2008).

O papel do TNFB na inflamação crônica, por sua vez, tem sido sugerido pela sua habilidade de induzir a expressão de moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e moléculas de adesão vascular 1 (VCAM-1) nas células endoteliais *in vitro* (Pober et al., 1987; Cavender et al., 1989). A expressão de TNFB resulta em um infiltrado localizado de LT, linfócitos B (LB), células dendríticas foliculares e interdigitais e macrófagos (Kratz et al., 1996).

1.5 POLIMORFISMO GENÉTICO *NcoI* DO *TNFB* NO AVC

Recentemente, tem havido um crescente interesse no fato de que as moléculas inflamatórias, bem como os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes que codificam mediadores inflamatórios, possam contribuir para o desenvolvimento e progressão de um grande número de doenças, incluindo o AVC (Flex et al., 2004). As citocinas pró-inflamatórias são as mais afetadas; portanto, os genes que codificam TNFA e TNFB, que estão localizados dentro do complexo de histocompatibilidade principal classe III (MHC III) no braço curto do cromossomo humano 6, têm sido alvo de muitas pesquisas (Um et al., 2003).

Vários polimorfismos frequentes foram identificados no gene *TNFB* que codifica o TNFB. Foi descrito um SNP localizado na posição +252, no primeiro íntron, denominado polimorfismo *NcoI* do *TNFB* (*A252G*, *rs909253*) que é constituído por uma guanina (G) no alelo *TNFB1* (alelo G) e de uma adenina (A) no alelo *TNFB2* (alelo A) (Messer et al., 1991). Estudos têm demonstrado que este polimorfismo genético é particularmente interessante, uma vez que as variações na região responsável pela regulação da transcrição podem ter implicações na expressão de TNFA e variabilidade na síntese de TNFA (Messer et al., 1991; Sharma et al., 2006; Delongui et al., 2011), o que poderia ser um fator importante na patogênese de muitas doenças, incluindo o AVC.

As diferenças interindividuais na capacidade de produção de TNFA pode ser resultado de diferenças na taxa de transcrição, na regulação da estabilidade do RNAm, na eficiência da tradução ou no processamento da proteína madura (Huizinga et al., 1997), como o que ocorre no polimorfismo *NcoI* do *TNFB*. O alelo *TNFB2* (alelo A) pode levar a uma taxa mais elevada de transcrição do gene *TNFA* e, conseqüentemente, aumento dos níveis de sua proteína (Huizinga et al., 1997).

Messer et al. (1991) relataram, pela primeira vez, que o alelo *TNFB2* está relacionado ao aumento da produção de TNFB. No entanto, a associação entre o polimorfismo *NcoI* do *TNFB* e os níveis de TNFA é controversa. Enquanto alguns estudos mostraram que o genótipo *TNFB2/B2* foi associado a uma maior produção de TNFA (Grimble et al., 2002; Jang et al., 2007b), outros estudos mostraram que o alelo *TNFB2* não determina o nível de liberação de TNFA pelas células mononucleares ativadas durante o curso da inflamação (Somoskövi et al., 1999).

Braun et al. (1998) demonstraram uma associação entre os alelos *NcoI* do *TNFB* com hiperinsulinemia na doença arterial coronariana (DAC) e que esta variante

genômica pode contribuir para o desenvolvimento da síndrome metabólica em pacientes com DAC. Kanková et al. (2002), em um estudo desenvolvido na República Checa, demonstraram que as frequências dos alelos *TNFB1* (alelo G) e *TNFB2* (alelo A) do polimorfismo *NcoI* do *TNFB* foram de 31,9% e 68,1%, respectivamente, e que o genótipo *TNFB2/B2* apresentou associação positiva com glicemia de jejum e parâmetros lipídicos em indivíduos Caucasianos, saudáveis e não obesos.

Uma meta-análise avaliou 105 polimorfismos genéticos, como simples deleção e SNPs de 64 genes relacionados ao processo inflamatório, doenças cardiovasculares e AVC em 3.550 pacientes e 6.560 indivíduos controles e os resultados indicaram um importante papel da resposta inflamatória mediada pelo TNFB na patogênese do AVC isquêmico em indivíduos não hipertensos (Wang et al., 2009a). Um et al. (2003) sugeriram que o polimorfismo *NcoI* do *TNFB* exerce um papel importante na etiopatogênese do infarto cerebral. Já Szolnoki et al. (2005) verificaram que o genótipo em homozigose para o alelo variante *TNFB1* deste polimorfismo foi mais frequente em pacientes com AVC (13,9%) do que em controles (7,2%) e sugeriram que este genótipo seria um novo fator de susceptibilidade para AVC isquêmico de grandes artérias.

Traylor et al. (2012) analisaram dados em estudos GWSA de 15 coortes envolvendo AVC isquêmico, com um total de 12.389 casos e 62.004 controles, todos de descendência européia. Seus resultados mostraram que as variantes genéticas detectadas em pacientes com AVC isquêmico, quando comparados aos controles, tiveram associações específicas para um subtipo de AVC. Esta constatação tem duas implicações. Em primeiro lugar, para maximizar o sucesso dos estudos genéticos em AVC isquêmico, é necessário classificá-los em subtipos. Em segundo lugar, os diferentes mecanismos fisiopatológicos determinados geneticamente parecem estar associados com diferentes subtipos de AVC.

2 JUSTIFICATIVA

Os dados descritos na literatura sugerem que polimorfismos em genes que codificam moléculas envolvidas na fase aguda do AVC podem representar fatores importantes no seu desenvolvimento e prognóstico. Além disto, sabe-se que os processos fisiopatológicos envolvidos no risco e prognóstico do AVC que incluem as respostas inflamatória e metabólica apresentam grande variabilidade individual e que são geneticamente determinados. Diante desta variabilidade genética, a associação entre o polimorfismo *NcoI* do *TNFB* com o desenvolvimento do AVC e com alterações metabólicas tem sido explorada em diferentes populações; no entanto, os resultados são conflitantes e os resultados obtidos em populações com diferentes características genéticas não devem ser generalizados para outras populações, principalmente para a população brasileira, considerada uma das mais geneticamente heterogêneas do mundo (Pimenta et al., 2006; Pena et al., 2011).

Até a presente data, não há registros na literatura sobre estudos que avaliam a frequência do polimorfismo genético *NcoI* do *TNFB* na população brasileira em geral. A identificação de um genótipo associado à maior chance de desenvolvimento ou ao prognóstico do AVC poderá contribuir para uma melhor compreensão da patogênese e heterogeneidade clínica da doença, além de poder auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para estes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre o polimorfismo genético *NcoI* do *TNFB* e os marcadores inflamatórios e metabólicos e o prognóstico dos pacientes com AVC isquêmico agudo, atendidos no Hospital Universitário de Londrina (HU), no período de Janeiro 2012 a Junho de 2013.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Descrever as Características Demográficas, Epidemiológicas, Clínicas e Laboratoriais dos Pacientes com AVC Isquêmico Agudo, Atendidos no HU de Londrina;

3.2.2 Determinar a Frequência Genotípica e Alélica do Polimorfismo Genético *NcoI* do *TNFB* em Pacientes com AVC Isquêmico Agudo e em Indivíduos Saudáveis;

3.2.3 Determinar a Associação Entre o Polimorfismo Genético *NcoI* do *TNFB* com as Características Demográficas, Epidemiológicas, Clínicas e Marcadores Inflamatórios e Metabólicos em Pacientes com AVC Isquêmico Agudo;

3.2.4 Determinar a Associação entre o Polimorfismo Genético *NcoI* do *TNFB* com o Curso Clínico do AVC Isquêmico Agudo.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Anexo 1). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (Anexo 2).

4.2 DELINEAMENTO

Foi realizado um estudo observacional, com os delineamentos caso-controle para atingir os objetivos 3.2.1 e 3.2.2, transversal para atingir o objetivo 3.2.3 e de seguimento para atingir o objetivo 3.2.4.

4.3 POPULAÇÃO

Todos os pacientes com diagnóstico de AVC isquêmico agudo, adultos, de ambos os sexos, que deram entrada no HU de Londrina, no período de Janeiro de 2012 a Junho de 2013, foram convidados a participar do estudo. Neste mesmo período, foram convidados indivíduos saudáveis candidatos a doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e da população em geral, adultos, de ambos os sexos.

4.4 AMOSTRA

Trata-se de uma amostra consecutiva, de conveniência de tempo e local, de um total de 93 pacientes com AVC isquêmico agudo, diagnosticados pelo exame clínico e TC de crânio e/ou RNM, atendidos no Pronto-Socorro do HU de Londrina, recrutados consecutivamente durante o período de Janeiro 2012 a Junho 2013. O AVC isquêmico agudo foi diagnosticado como déficit focal ao exame neurológico, com ou sem distúrbio de consciência; início súbito, agudo ou rapidamente progressivo que persistiu por > 24 horas confirmado por TC de crânio e/ou RNM. O índice de incapacidade neurológica foi expresso pelo Índice de Rankin Modificado (Bonita, Beaglehole, 1988) aplicado até oito horas da admissão no hospital (*baseline*) e após três meses de acompanhamento no Ambulatório de

Neurologia do Ambulatório do Hospital das Clínicas (AHC) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

O grupo controle foi composto de 134 indivíduos saudáveis doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e da população geral de Londrina, controlados por idade, sexo, etnia e índice de massa corpórea (IMC). Os doadores de sangue incluídos deveriam apresentar todos os testes sorológicos com resultado não reagente realizados na triagem de doadores de sangue, como anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (anti-HIV 1/2), anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV), antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), anticorpos contra o antígeno *core* do vírus da hepatite B (anti-HBc), anticorpos contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II (anti-HTLV I/II), anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e teste não treponêmico para sífilis (VDRL) (Brasil, 2004).

Os dados demográficos e clínicos foram coletados pela aplicação de um questionário padrão (Anexo 3), respondidos pelo paciente ou por seus responsáveis e pelo doador de sangue. Os dados foram, também, obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e às bases de dado LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) e do Hemocentro Regional de Londrina. As medidas antropométricas avaliadas foram peso corporal (kg) e altura (m), obtidas, por interrogatório, durante a aplicação do questionário. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. Pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial sistólica (PAS) no período da admissão foram obtidas pelo uso de aparelho digital devidamente calibrado e expressas em mmHg.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os pacientes que: a) recusaram a participar do estudo; b) apresentaram processo inflamatório ou infeccioso em tratamento no momento do AVC, incluindo artrite reumatóide, pneumonia, infecção de trato urinário, infecção pelo HIV-1; c) uso crônico de corticosteróides ou imunossuppressores; d) portadores de doença renal crônica, hepatopatia crônica, infecção pelos vírus da Hepatite B e Hepatite C, neoplasias e doença de Alzheimer; e) apresentaram infarto do miocárdio; f) pós-operatório imediato; e g) trauma nos últimos 30 dias.

4.6 EXAMES LABORATORIAIS

Amostras de sangue periférico foram coletadas nas primeiras 24 horas da admissão no hospital pela equipe de funcionários do LAC do HU, segundo a requisição de exames laboratoriais padronizada pelo hospital. Foram coletados 10 mL em tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante e dois tubos de 5 mL com anticoagulante EDTA. O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. O *buffy coat*, plasma e soro foram obtidos após centrifugação (10 min 2500 rpm) e armazenados -80°C até o momento das análises. Todos os pacientes e controles e suas respectivas amostras foram identificados por número e letra para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos (Teunissen et al., 2009).

Os exames laboratoriais que fazem parte da rotina no atendimento dos pacientes com AVC foram realizados nos setores de Exames Hematológicos, Bioquímica Clínica e Imunologia Clínica do LAC do HU, utilizando-se de métodos padronizados e reagentes disponíveis comercialmente.

4.6.1 Marcadores Inflamatórios

Os exames de contagem de leucócitos periféricos (células/mm³), plaquetas (células/mm³) e velocidade de hemossedimentação (VHS, mm/1ª hora) foram realizados por método automatizado; a dosagem dos níveis plasmáticos de citocinas (TNFA e IL-6) foi realizada por método imunoenzimático (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA), com limite de detecção de TNFA e IL-6 definido como 2,0 ng/mL e 1,0 ng/mL, respectivamente, de acordo com os fabricantes.

Os níveis de ferritina foram avaliados por imunoenensaio de micropartícula com quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os níveis séricos de PCR ultra-sensível (usPCR) foram avaliados pelo método automatizado de nefelometria ultra-sensível (Nephelometer II™, Dade Behring – Siemens Healthcare Diagnostics INC., Deerfield, Illinois, USA), com sensibilidade analítica de 0,175 mg/L.

4.6.2 Marcadores Metabólicos

Os níveis séricos de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) colesterol, lipoproteína de baixa densidade (LDL) colesterol, triglicerídeos, ferro e os níveis plasmáticos de glicose foram mensurados por um autoanalisador bioquímico, com reagentes disponíveis comercialmente (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Os níveis plasmáticos de insulina foram determinados por imunoensaio de micropartícula por quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Todas as avaliações foram realizadas seguindo as recomendações e valores de referência dos fabricantes.

O índice de resistência à insulina (IR) foi determinado pelo Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA) para resistência à insulina (HOMA-IR) (Haffner; Mietinen; Stern, 1997) e foi calculado pelos níveis de insulina em jejum ($\mu\text{U/mL}$) x glicemia em jejum (nmol/L)/22,5. Foi considerado com IR os indivíduos que apresentaram HOMA-IR $\geq 2,5$.

A presença e classificação da dislipidemia foram determinadas segundo a definição da V Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (Xavier et al., 2013) em que considera os valores séricos de triglicerídeos, do colesterol total e as frações LDL e HDL do colesterol: tipo I) Hipercolesterolemia isolada: elevação isolada da fração LDL $\geq 160\text{mg/dL}$; tipo II) Hipertrigliceridemia isolada: elevação isolada dos triglicerídeos ($\geq 150\text{mg/dL}$); tipo III) Hiperlipidemia mista: valores aumentados de ambos LDL ($\geq 160\text{mg/dL}$) e triglicerídeos ($\geq 150\text{mg/dL}$); e tipo IV) HDL baixo: redução do HDL (homens $< 40\text{ mg/dL}$ e mulheres $< 50\text{ mg/dL}$) isolada ou em associação com aumento de LDL ou de triglicerídeos.

4.7 POLIMORFISMO GENÉTICO *NcoI* DO *TNFB*

O DNA genômico foi extraído a partir de células nucleares do sangue periférico com o kit de extração de DNA por coluna de resina (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Paraná) de acordo com instruções do fabricante, com algumas modificações, como o volume de *buffy coat* utilizado ($200\mu\text{L}$) e a temperatura do tampão de eluição (70°C). A presença e integridade do DNA extraído foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, após coloração com brometo de etídio e visualização na

presença de luz ultravioleta (UV), pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil) e comparadas a um DNA padrão (50-100 ng).

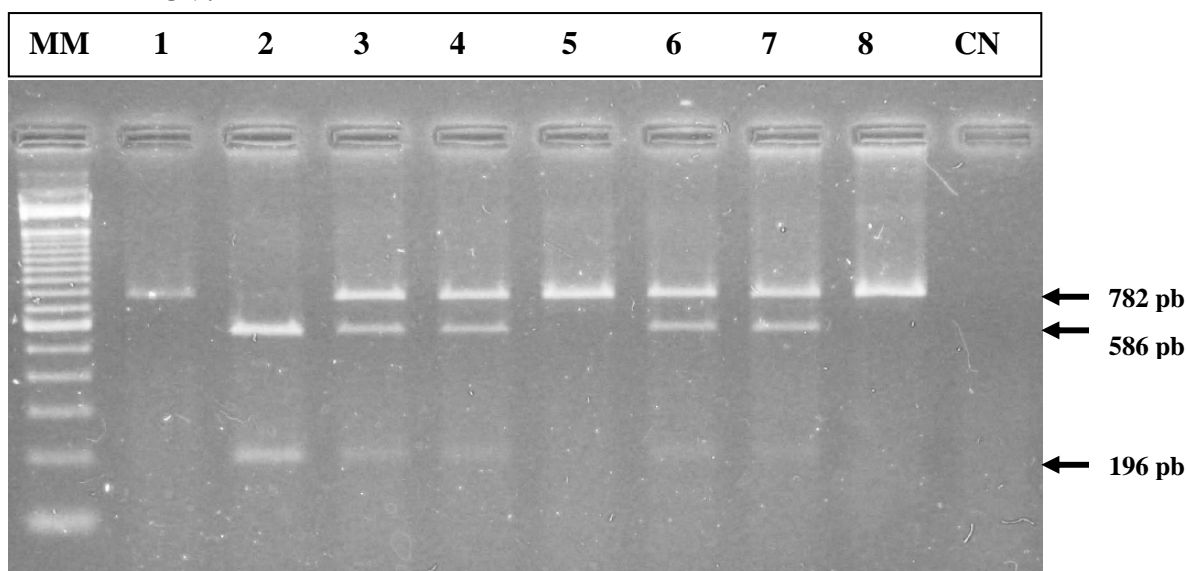
O gene *TNFB* foi amplificado utilizando a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) de acordo com dados descritos na literatura (Majetschak et al., 1999; Majetschak et al., 2002; Delongui et al., 2011) com algumas modificações. Os *primers* foram desenhados de acordo com a sequência cadastrada no *GenBank* número X02911, conforme descrito na literatura (Majetschak et al., 1999). O *Primer 1* (*TNFB1 sense*) é formado pela sequência 5' CCG TGC TTC GTG CTT TGG GAC TA 3' e o *Primer 2* (*TNFB2 antisense*) é formado pela sequência 5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 0,15 µM de cada *primer*, 4 µM de MgCl₂, 0,03 µM de dNTP (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,25U da enzima DNA polimerase recombinante diluída em seu tampão (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2µL de amostra de DNA, contendo 50-100 ng. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PCR Sprint-Thermo Hybaid® (Biosystems, Barcelona, Espanha), com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; seguido por 37 ciclos de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 67°C para o anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão; e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Um controle negativo (sem amostra de DNA) e um positivo foram incluídos em cada bateria de PCR. A amplificação do fragmento em estudo foi avaliada pela eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em presença de luz UV pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil), utilizando-se um marcador de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA),

O produto de PCR, um fragmento de 782 pb, foi submetido à digestão enzimática pela enzima *NcoI* recombinante (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Dez microlitros do produto de PCR foram completamente digeridos com 0,3µL de enzima *NcoI* 10U/µL por 4h a 37°C. Os fragmentos da digestão enzimática foram analisados pelo método de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) em eletroforese com gel de agarose a 3% (70V, 70 minutos), após coloração com brometo de etídio, visualizados em UV pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil), de acordo com dados descritos na literatura (Majetschak et al., 1999; Majetschak et al., 2002; Delongui et al., 2011).

O alelo *TNFB1* (alelo G) apresenta um fragmento de 196 pb e outro de 586 pb e inclui o sítio de restrição da enzima *NcoI* em ambos os alelos. O alelo *TNFB2* (alelo A) resulta em um único fragmento de 782 pb com ausência do sítio de restrição em ambos os alelos. O genótipo heterozigoto *TNFB1/TNFB2* resulta em 3 fragmentos, com 782 pb, 586 pb e 196 pb. As imagens foram capturadas e armazenadas pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotechnology, Cotia, Brasil).

O perfil eletroforético dos fragmentos de restrição que permite a identificação dos genótipos está demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Perfil eletroforético dos fragmentos de restrição para avaliação do polimorfismo genético *NcoI* do *fator de necrose tumoral beta (TNFB)* em amostra de DNA genômico. Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.



MM: marcador molecular de 100 pares de bases (pb);

Linhas 1, 5 e 8: fragmento de 782 pb, caracterizando o genótipo homozigoto *TNFB2/B2* para o alelo *TNFB2* (alelo A); Linha 2: fragmentos de 586pb e 196 pb, caracterizando o genótipo homozigoto *TNFB1/B1* para o alelo *TNFB1* (alelo G); Linhas 3, 4, 6 e 7: fragmentos de 782 pb, 586 pb e 196 pb, caracterizando o genótipo heterozigoto *TNFB1/B2*; CN: controle negativo, com ausência de DNA.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o *Graph Pad Prism* versão 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ou teste Exato de Fisher, quando apropriados, e foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%). As variáveis contínuas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney e foram expressas como mediana e intervalo interquartil (IQR) 25% -75%.

Valores de razão de chance ou *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram apresentados. Para determinar quais os fatores que foram associados de forma independente com genótipos *NcoI* do *TNFB*, as variáveis que apresentaram $p < 0,20$ nas análises univariadas e aquelas com suposta relevância clínica, segundo revisão da literatura, foram incluídas no modelo de regressão logística multivariada. As análises multivariadas foram avaliadas pela *Graph Pad Instat* versão 3.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram apresentados e discutidos em forma de artigo científico original que será submetido à publicação.

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL:***TNF BETA NcoI* POLYMORPHISM (rs909253) IS ASSOCIATED WITH
INFLAMMATORY AND METABOLIC MARKERS IN ISCHEMIC STROKE**

Johnathan de Sousa Parreira, MD, MS; Ana Paula Kallaur, MS; Marcio Francisco Lehmann, MD, MS; Sayonara Rangel Oliveira MS; Andrea Name Colado Simão, DHS; Maria Caroline Martins de Araújo, BMed; Carolina Rossato, BMed; Jéssica Tavares de Almeida, BMed; Daniela Alfieri Frizon, MS; Franciele Delongui, MS; Larissa Moliterno Pelegrino, BMed; Erick Frank Bragato, BMed; Helena Kaminami Morimoto, MS; Damácio Ramon Kaimen-Maciel, MD, Ph.D; Edna Maria Vissoci Reiche*, DHS.

Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil (J.S.P.;A.P.K.; M.F.L.;S.R.O.;D.F.A.; F.D.;H.K.M.), Department of Clinical Surgery, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; Neurosurgery Service of the University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil (M.F.L.), Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

Medicine Faculty, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil (A.N.C.S.; H.K.M.; E. M.V.R.); Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil; Neurology Outpatient Department of the Outpatient Clinical Hospital, State University of Londrina, Paraná, Brazil (D.R.K-M).

Cover Title: *NcoI* polymorphism in *TNFB* in ischemic stroke

Keywords: Genetic polymorphism. Tumor necrosis factor. Ischemic stroke. Inflammation. Insulin resistance.

* **Address for correspondence:** Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: + 55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br

ABSTRACT

Background and Purpose: Polymorphisms in genes coding for pro-inflammatory molecules may represent important factors for the pathogenesis and outcome of stroke. The aim of this study was to evaluate the relationship between the *TNFB NcoI* (rs909253) polymorphism with inflammatory and metabolic markers and outcome in acute ischemic stroke.

Methods: Ninety-three patients and 134 controls were included. The *TNFB* polymorphism was determined using PCR-RFLP with *NcoI* restriction enzyme. Stroke subtypes and neurological deficit score were evaluated. White blood cell and platelet counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), plasma levels of IL-6 and TNFA, serum high sensitive reactive C protein (hsCRP), serum lipid profile, plasma levels of glucose and insulin, and homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were determined.

Results: Stroke patients presented higher white blood cell counts, hsCRP, glucose, HOMA-IR, ESR, and insulin; and lower HDL cholesterol than controls ($p < 0.01$). There was no difference in genotypic and allelic frequency of *TNFB NcoI* polymorphism among patients and controls ($p > 0.05$). However, stroke patients carrying the TNFB2/B2 genotype presented higher levels of TNFA, white blood cell counts, total cholesterol, LDL cholesterol, glucose, insulin, and HOMA-IR ($p < 0.05$) than those with other genotypes. White blood cells, IL-6, hsCRP, and ESR were positively correlated with the neurological disability of the patients ($p < 0.05$).

Conclusions: *TNFB NcoI* polymorphism, by itself, is neither associated with increased susceptibility of stroke development nor with the outcome. However, the homozygous genotype for the allele TNFB2 was associated with higher expression of classical inflammatory and metabolic markers of development and outcome of stroke.

INTRODUCTION

Stroke accounted for 10% of deaths per year is a major cause of long-term adult disability worldwide, causing a strong economic and social impact. The global distribution of deaths is heterogeneous, with 85% of them occurring in developing countries, affecting one third of the economically active population (1).

In Brazil, in 2005, stroke accounted for 10% of all deaths and for 10% of admissions to public hospitals. In that year, Brazil spent 2.7 billion dollars in health care for patients with heart disease, stroke and diabetes mellitus (2). Nevertheless, the Brazilian population is unaware of the disease, the risk factors are poorly controlled, few centers have the structure and organization to appropriately respond to and treat the acute illness and few places offer rehabilitation to these patients (3).

Stroke is a complex disorder with the interaction between several genetic components of the host and environmental factors, defined as a sudden loss of brain function resulting from severe interference in the flow of blood and oxygen in cerebral arteries. At least, 80% of stroke is ischemic, resulting from an obstruction of blood flow whereas 15-20% is due to the intracerebral haemorrhage (4). Conventional risk factors for stroke, such as

hypertension, atherosclerosis, atrial fibrillation, smoking, diabetes, body mass index (BMI), and age account for a significant proportion of stroke risk (5). However, much risk remains unexplained.

The ischemic stroke has significant genetic components and many candidate gene pathways have been investigated. Among them, genes of molecules that are involved in several physiological pathways, such as lipid metabolism (6,7), inflammatory response (8-14), coagulation and haemostasis (15-19), blood pressure regulation (20), and adhesion molecules (21-22).

Despite many hundreds of publications, results have been largely disappointing with few replicable associations identified. Meta-analyses of published data have suggested associations with genes, including methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), angiotensin-converting enzyme (ACE), factor V Leiden and prothrombin genes; however, the odds ratio were modest, ranging from 1.21 to 1.44 (23-24).

Tumor necrosis factor alpha (TNFA) and tumor necrosis factor beta (TNFB), which genes are tandemly located within the major histocompatibility complex class III (MHC III) on the short arm of human chromosome, are the most implicated pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of stroke (25). A single nucleotide polymorphism (SNP) located at position +252 in the first intron of the *TNFB*, named as *NcoI* polymorphism (A252G, rs909253), consists of a Guanine (G) in the allele TNFB1 (allele G) and of an Adenine (A) in the allele TNFB2 (allele A) (26). This polymorphism has been associated with an increase in the transcription of the TNFA and the susceptibility to many diseases including myocardial infarction (27), sepsis (28), and stroke (29).

However, studies carried out in populations with different genetic characteristics presented conflicting results; moreover, these results should not be generalized, especially for the Brazilian population, considered one of the most genetically heterogeneous worldwide as result of a great miscegenation (30-31). To the best of our knowledge, no studies have investigated the association between *NcoI* *TNFB* polymorphism and ischemic stroke among the Brazilian patients. To clarify this issue, this study aimed to determine the frequency of this polymorphism in patients with acute ischemic stroke and the association between the genotypes with inflammatory and metabolic markers, and the clinical outcome.

METHODS

Study subjects

The protocol was approved by the Institutional Research Ethic Committee of the State University of Londrina (Paraná State, Southern Brazil), and a written consent form was obtained from all of the individuals. A total of 93 acute ischemic stroke patients diagnosed with focal neurological signs or symptoms thought to be of vascular origin that persisted for > 24h, confirmed by brain computed tomography (CT) and clinic examination in baseline conditions, were consecutively recruited during 18 months from the Emergency Room of the University Hospital of Londrina. The subtype of acute ischemic stroke was classified according to the TOAST criteria (32).

One hundred and thirty four age, sex, ethnicity, and body mass index (BMI) controlled healthy individuals from the general population of Londrina were enrolled in the same period, with similar demographic and anthropometric characteristics, and from the same geographic area. Stroke patients and controls with fever, inflammatory, infectious, hematological or autoimmune diseases, and with severe renal or liver failure, cancer, as well as those who were under treatment with anti-inflammatory drugs were excluded.

Demographic, epidemiological, anthropometric, and clinical data

Demographic, epidemiological, clinical data, and the medical history with recording of potential traditional stroke risk factors were obtained using a standard questionnaire at the admission. The use of any therapeutic drugs before the inclusion in this study was registered at baseline evaluation of all the individuals. The anthropometric measures were the body weight and height reported by the individuals, when it was possible, or by the patient's family. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian (Asiatic, Black, and Mullato) (33). Three baseline blood pressure evaluations were obtained at the admission to the hospital using digital apparatus properly calibrated, and the mean of these measurements was used in the analysis. Systolic blood pressure (SBP) ≥ 130 mmHg and diastolic blood pressure (DBP) ≥ 85 mmHg or the use of antihypertensive was an indication of hypertension (34).

Neurological deficit score was evaluated using the modified Rankin Index (35) applied within eight hours of the admission in the Emergency Room (baseline) and after

three-month follow-up in the Neurology Outpatient Department of the Outpatient Clinical Hospital, State University of Londrina.

Blood samples

Peripheral blood samples were collected within the 24 hours of the admission at the Emergency Room with and without EDTA as anticoagulant. The buffy coat, plasma, and serum aliquots were immediately separated by centrifugation and stored in aliquots at -80°C until analyzes.

***TNFB* *NcoI* genetic polymorphism**

The genomic DNA was extract from the peripheral leukocytes using a commercial DNA column purification reagent (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brazil). The *TNFB* gene was amplified using polymerase chain reaction (PCR) as previously reported (28,36). The primers used were determined according to the sequence of the GenBank number X02911 as follow: Primer 1 (TNF1 sense) 5' CCG TGC TTC GTG CTT TGG GAC TA 3'; Primer 2 (TNF2 antisense) 5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The TNFB1 allele includes a restriction site for *NcoI* which results in 196 base-pairs (bp) and 586 bp fragments after digestion, and the TNFB2 allele (lacking the restriction site for *NcoI*) results a fragment with 782 bp. The heterozygous genotype TNFB1/B2 results three fragments (782 bp, 586 bp, and 196 bp).

Inflammatory markers

Plasma levels of TNFA and IL-6 were evaluated using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA) White blood cell and platelet counts and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were determined using hematological autoanalyzers. Serum high sensitive CRP (hsCRP) was determined using nephelometry (NephelometerII™, DadeBehring-Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, Illinois, USA).

Metabolic markers

The fasting serum lipids, including total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and triglycerides (TG), and plasma levels of glucose were determined by Dade Behring™ reagents in a biochemical autoanalyzer (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Plasma insulin levels were determined by chemiluminescence microparticle immunoassay (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The homeostasis model assessment (HOMA) was used as a surrogate measurement of insulin resistance (IR) (37) and was calculated by the insulin fasting ($\mu\text{U/mL}$) x glucose fasting (nmol/L)/22.5. IR was considered when subjects exhibited $\text{HOMA} \geq 2.5$.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Graph Pad Prism version 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Categorical variables were analyzed using a chi-square test (or Fisher Exact test when appropriate) and were expressed in absolute number (n) and percentage (%). Continuous variables were analyzed using the Mann-Whitney test and were expressed as median and interquartile range (IQR) 25%-75%. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were also determined. The Spearman's rank correlation test was performed to investigate the relationship between inflammatory markers and modified Rankin Scale obtained at baseline from ischemic stroke patients carrying the *TNFB NcoI* genotypes. All the results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

The characteristics from the acute ischemic stroke patients and controls are shown in Table 1. The median age of the patients was 65 (IQR 56.0-75.0) and most of them was men (57.0%). As expected, patients and controls did not differ in age, sex, ethnicity, and BMI, since all these factors were controlled ($p > 0.05$). Stroke patients showed significantly higher median SBP and DBP and higher frequency of sedentary lifestyle and hypertension than controls ($p < 0.0001$). Stroke patients presented higher peripheral leukocyte counts ($p < 0.0001$), ESR ($p = 0.0060$), serum hsCRP ($p < 0.0001$), glucose ($p < 0.0001$), insulin

($p=0.0069$), and HOMA-IR ($p<0.0001$) than controls; and lower levels of HDL ($p<0.0001$) than controls.

The distribution of the *TNFB NcoI* genotypes was in Hardy-Weinberg Equilibrium in both groups of individuals ($p>0.05$) (Table 2). Difference was not observed between the genotypic and allelic frequency of stroke patients and controls ($p=0.3644$ and $p=0.2847$, respectively). Comparing the frequencies of TNFB1/B1 vs. TNFB1/B2 and TNFB1/B1 vs. TNFB2/B2, the odds ratio was 1.35 (CI 95%=0.46-3.27) and 1.8 (CI 95%=0.74-4.48), respectively. Comparing the frequencies of TNFB2/B2 vs. TNFB1/B2+TNFB1/B1, the odds ratio was 1.41 (CI 95%=0.82-2.43).

General, clinical, and laboratory characteristics of ischemic stroke patients were evaluated according comparing TNFB2/B2 vs. TNFB1/B2+TNFB1/B1 due to the small low *TNFB1* allelic frequency among the stroke patients (Tables 3 and 4). Characteristics such as sex, ethnicity, age, and BMI did not differ according to the *TNFB NcoI* genotypes, since these factors were controlled ($p>0.05$). Patients carrying the TNFB2/B2 genotype presented higher levels of TNFA levels ($p=0.0429$), white blood cells ($p=0.0433$), TC ($p=0.0367$), LDL-cholesterol ($p=0.0429$), glucose ($p=0.0139$), insulin ($p=0.0248$), and HOMA-IR ($p=0.0371$) than those carrying the TNFB1/B2+TNFB1/B1 genotypes.

Spearman's rank correlation test was performed to investigate the relationship between inflammatory markers and modified Rankin Scale obtained at baseline from ischemic stroke patients carrying the TNFB2/B2 genotype (Table 5). A positive correlation was observed between the neurological deficit at baseline and white blood cells ($r=0.5770$, $p=0.0007$), hsCRP ($r=0.6703$, $p<0.0001$), IL-6 ($r=0.5890$, $p=0.0003$), and ESR ($r=0.4639$, $p=0.0342$).

DISCUSSION

The results obtained in the present study demonstrated that most of the stroke patients presented higher frequency of traditional risk factors for stroke than controls, such as hypertension, obesity, sedentary lifestyle, and diabetes, considering the high levels of glucose, insulin and HOMA-IR at baseline (1,10). However, these factors unexplained all the cases of stroke included in this cohort, and genetic and environmental factors should be involved. The stroke patients presented lower levels of total cholesterol and triglycerides than controls probably for the significant difference in the use of hypolipemiant drugs in the premorbid period.

Growing number of evidences suggests that genetic factors play a crucial role in the stroke etiology through their interaction with the environmental components (38). The mechanisms by over 30.0% of ischemic stroke are unexplained by conventional risk factors even after extensive workup (32,39) and the genetic predisposition may be responsible for some of these risks.

The main result of this study is that *TNFB NcoI* polymorphism is neither associated with increase susceptibility for stroke development nor with the outcome. However, the *TNFB2/B2* genotype was associated with higher expression of inflammatory markers, such as white blood cells and TNFA, as well as some metabolic markers, such as total cholesterol, LDL-cholesterol, glucose, insulin, and HOMA-IR, than other genotypes. These markers are key molecules of the inflammatory and metabolic pathways that have important role in the pathogenesis and outcome of stroke.

TNFB NcoI polymorphism is one of the factors involved in the interindividual differences in the TNFA production. This polymorphism is especially interesting since variations in the region responsible for transcriptional regulation may have implications for the *TNFA* gene expression and variability on TNFA synthesis (26,28,40), which is an important key molecule in the pathogenesis of stroke. Some studies suggested that *TNFB NcoI* polymorphism is an independent risk factor for stroke (25,29,41). However, other studies failed to obtain this result (42, 43).

The pro-inflammatory cytokine TNFA is considered the principal mediator of neuroinflammation that elicits a cascade of cellular events culminating in neuronal death. TNFA is rapidly expressed in ischemic brain tissue within 1-3 h after ischemia onset (44), and has a two-phase pattern of expression with a second peak at 24-36h and the upregulation of the TNF receptors is observed thereafter (45, 46). TNFA exerts neurotoxic effects by inducing apoptotic neuronal cell death (47) and enhancing MHC class II and ICAM-1 expression in astrocytes, leading to leukocyte infiltration and blood brain barrier breakdown (48).

A study firstly reported that the *TNFB2* allele is related to increase TNFA production (26). The *TNFB2* allele may lead to a higher rate of *TNFA* transcription and consequently increases TNFA levels (49). An activation-dependent intrachromosomal interactions involved in the activation of *TNFA* gene transcription in activated T cells was described (50). This finding leads to the hypothesis that the occurrence of the allelic forms of *TNFB* gene could undergo intrachromosomal interactions that take place in close proximity to the *TNFA* promoter in a configuration that potentially underlies selective activation of the *TNFA* gene. This possible activation could increase the production of TNFA which may

explain our findings that stroke patients carrying the *TNFB2/B2* genotype presented 4.9-fold increase in the TNFA levels compared with those with other genotypes.

Although TNFA and TNFB are the central mediators of inflammation and may play a critical role in both the development of the immune system and in the immune responses to specific antigens, this study only measured the serum TNFA levels. Unlike TNFA, cellular sources of TNFB are few, and the quantities of TNFB synthesized are much less than those of TNFA. Consequently, TNFB is not easily detected in the circulation and is usually considered a locally acting paracrine factor and not a mediator of systemic injury.

A genetic model of stroke pathogenesis is multifactorial and involves several genetic polymorphisms that each confers small increases in risk (10,51). The genome-wide association studies (GWAS) approach has revolutionized the field of complex genetic diseases and now is having a major impact on understanding the stroke genetics (52, 53). A GWA included 15 ischemic stroke cohorts of individuals with European ancestry and the results showed that, although genetic variants were detected in higher frequency in patients with ischemic stroke compared with controls, all associations they were able to confirm were specific to a stroke subtype (53). Cardio-embolic strokes have a worse clinical picture and produce larger and more disabling strokes than other ischemic stroke subtypes and a possible explanation is the high immuno-inflammatory activation of the acute phase (54). These findings have two implications. First, to maximize the success of genetic studies in ischemic stroke, detailed stroke subtyping is required. Second, different genetic pathophysiological mechanisms seem to be associated with different stroke subtypes (53, 54). In the present study, the stroke subtypes were determined in 58.1% of the patients and the small number of cases in each stroke subtype limited the analysis of the association between the *TNFB NcoI* polymorphism, inflammatory and metabolic markers with the stroke subtypes.

Although stroke patients presented higher IL-6 levels than controls, the values did not differ according to the *TNFB NcoI* polymorphism; however, they were positively correlated with the neurological deficit score of the patients. Cerebral ischemia induces the expression of IL-6 in neurons and astrocytes and the serum of IL-6 levels increase within several days after an ischemic stroke (55-57). IL-6 up-regulates the expression of adhesion molecules on endothelial cells, leukocytes, and platelets, during cerebral ischemia, which leads to secondary neuronal damage (58) and correlates with stroke severity, 12 months mortality, clinical outcome, and brain infarct volume (59). Increased expression of IL-6 is also found in atherosclerotic plaques (60), suggesting that the identified IL-6 association with stroke susceptibility may be mediated by atherosclerosis progression (13). IL-6 plays a key

role in the promotion of acute inflammatory response and in the regulating of the production of the acute phase proteins, such as CRP (61), in the activating of endothelial cells (62), and the stimulating the synthesis of fibrinogen and von Willebrand factor, resulting in hypercoagulability status and is likely important in the pathogenesis of vascular inflammation (63).

Compared to controls, stroke patients of the present cohort showed higher levels of hsCRP, reflecting the inflammatory state of the patients. The CRP is a novel plasma marker for atherothrombotic disease that may reflect the level of inflammatory activity within atherosclerotic plaques and its serum level is a valuable and sensitive indicator of initial and recurrent cerebrovascular events (64-67). Elevated levels of CRP are detected in up to three quarters of patients with acute ischemic stroke and are associated with poor outcome (68).

The hsCRP levels obtained in the present study were not influenced by the *TNFB NcoI* polymorphism. This result is consistent with the fact that the CRP expression depends of several variants in the *CRP* and other genes that may explain the interindividual variation in the serum levels of CRP (69-71).

Stroke patients presented lower levels of HDL-cholesterol than controls, considered a risk factor for atherogenic process, and higher HOMA-IR than controls, increasing the traditional risk factors for stroke in these patients. Some of the metabolic markers were also associated with the *TNFB NcoI* polymorphism, such as total cholesterol and LDL-cholesterol in agreement with previous studies. An association between the *TNFB2* allele with the hyperinsulinemia was demonstrated in the coronary arterial disease (CAD) and may contribute to the development of metabolic syndrome in patients with CAD (72). An association between the *TNFB2* allele with fasting plasma glucose, LDL, and total cholesterol was also observed in normoglycemic non-obese Caucasian subjects (73).

The *TNFB2/B2* genotype was associated with features of metabolic syndrome, such as hyperinsulinemia, dyslipidemia, small LDL-cholesterol particle, and low adiponectin level in CAD patients (74). *TNFB* polymorphism has also been suggested to accelerate inflammatory processes directly in atherosclerotic intima or to affect the intima indirectly by an increased insulin secretion in pancreatic β -cells. All these results suggest that the *TNFB NcoI* polymorphism could be involved in genetic modulation of glucose and lipid homeostasis and regulation of insulin sensitivity already in healthy state (74).

The present study failed to find an association between *TNFB NcoI* polymorphism and the clinical short-term neurological deficit of the stroke patients. Difference was observed neither in the scores of neurological deficit nor in the frequency of

moderate or severe neurological deficits among the patients carrying the *TNFB2/B2* genotype compared to those carrying other genotypes (68.3% vs. 78.8%, $p=0.2482$). This result seems to be contradictory considering the association between this genetic variant with high TNFA levels. However, the increased expression of TNFA might be result of other host and environmental factors and the inflammatory response in stroke depends of several genes with small individual effects rather than few genes of major biologic importance, consistent with a polygenic disease.

The worse clinical course presented by the patients included in this research might be not related with the *TNFB NcoI* by itself. However, this proinflammatory genetic profile potentially exerts additive or synergistic influence with other factors for the development and outcome of stroke, such as environmental agents, epistatic effects (75), the levels of adhesion molecules (22), other inflammatory related cytokines (IL-1B, IL-8, IL-10, TGFB) (8,9,12,21,54,76), and matrix metalloproteinases (13, 77).

Regarding the relationship between the inflammatory and metabolic markers evaluated in the present study with the neurological deficit, the Spearman's ranks correlation showed a significant positive correlation between with blood cell counts, hsCRP, IL-6, and ESR. These results are in agreement with previous studies that have reported the association between high levels of these inflammatory markers with worse outcome after ischemic stroke (68,78-80).

This study certainly included some limitations that should be discussed. First, the single-point measurements of inflammatory and metabolic markers, since repeated measures may be necessary to define the variance as well as the predictive nature of a biomarker, but in support for our findings, several studies previously reported the predictive value of single-point measurement of these markers (68,78,79). Second, the relatively small short-term outcome evaluation, and the small number of stroke patients. These factors, together with differences in sample characteristics and study designs, could explain much of the inconsistency between studies (81).

Taken together, the results underscore the important role of the inflammatory and metabolic markers in the development and outcome of stroke and some of these markers, considered as classical risk factors for stroke and worse outcome, such as white blood cell counts, TNFA, IL-6, hsCRP, and hypercholesterolemia, were associated with the *TNFB2/B2* genotype. Although the *TNFB NcoI* polymorphism was not associated with the susceptibility and outcome of stroke by itself, this genetic variant might interact with environmental and other genetic factors creating a favorable profile that contribute to the

development and outcome of stroke. In this post-genomic era, the identification of variant alleles might allow both better prediction of risk for stroke as well the identification of novel stroke mechanisms that could be target to new therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), State University of Londrina (PROPPG), and Bayer HealthCare. We thank the staff of University Hospital of State University of Londrina and HUTec Foundation for technical and administrative supports.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

All the authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics -2014 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 129:e28-e292.
- 2 Brazil. Ministry of Health. System of Mortality Information (SIM) and IBGE. [Internet] [accessed 2013 Dec 01]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ldb2011/c08.def>.
- 3 Oliveira-Filho J, Martins SC, Pontes-Neto OM, Longo A, Evaristo EF, Carvalho JJ, et al. Guidelines for acute ischemic stroke treatment: part I. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2012; 70: 621-629.
- 4 Markus HS. Stroke genetics. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: R124-R131.
- 5 Rohr J, Kittner S, Feeser B, Hebel JR, Whyte MG, Weinstein A, et al. Traditional risk factors and ischemic stroke in young adults. The Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study. *Arch Neurol*. 1996; 53:603-607.
- 6 Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; **52**: 1544-1568.

- 7 Leigh SE, Foster AH, Whittall RA, Hubbart CS, Humphries SE. Update and analysis of the University College London low-density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann Hum Genet.* 2008; **72**: 485-498
- 8 Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G, et al. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke.* 2004; **35**:2270-2275.
- 9 Cvetkovic JT, Wiklund PG, Ahmed E, Weinehall L, Hallmans G, Lefvert AK. Polymorphisms of IL-1beta, IL-1Ra, and TNF-alpha genes: a nested case-control study of their association with risk of stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2005; **14**: 29-35.
- 10 Gulcher JR, Gretarsdottir S, Helgadottir A, Stefansson K. Genes contributing to risk for common forms of stroke. *Trends Mol Med.* 2005; **11**:217-224.
- 11 Wang Q, Ding H, Tang J-R, Zhang L, Xu Y-J, Yan J-T, et al. C-reactive protein polymorphisms and genetic susceptibility to ischemic stroke and hemorrhagic stroke in the Chinese Han population. *Acta Pharmacol Sin.* 2009; **30**: 291-298.
- 12 Kim OJ, Lee JH, Choi JK, Oh SH, Hong SH, Oh D, et al. Association between tumor necrosis factor alpha (-308G→A and -238G→A) polymorphisms and homocysteine levels in patients with ischemic strokes and silent brain infarctions. *Cerebrovasc Dis* 2010; **30**: 483-490.
- 13 Manso H, Krug T, Sobral J, Albergaria I, Gaspar G, Ferro JM, et al. Variants in the inflammatory *IL6* and *MPO* genes modulate stroke susceptibility through main effects and gene-gene interactions. *J Cereb Blood Flow Metabol.* 2011; **31**: 1751-1759.
- 14 Chakraborty B, Chowdhury D, Vishnoi G, Goswami B, Kishore J, Agarwal S. Interleukin-6 gene -174G/C promoter polymorphism predicts severity and outcome in acute ischemic stroke patients from north India. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013; **22**:683-689.
- 15 Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Gender-specific association of the fibrinogen B beta 488 polymorphism, fibrinogen levels, and acute cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; **17**: 589-594.
- 16 Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet GP IIIa P1A and GP 1b variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; **18**:1124-1131.
- 17 Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Horner S, Becsagh P, Reinhart B, et al. Beta Fibrinogen gene polymorphism (C148→T) is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; **18**: 487-492.
- 18 Kin RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J.* 2003; **146**: 948-957.
- 19 Soare AM, Popa C. Deficiencies of proteins C, S and antithrombin and factor V Leiden and the risk of ischemic strokes. *J Med Life.* 2010; **3**:235-238.

- 20 Malard L, Kakinami L, O'Loughlin J, Roy-Gagnon MH, Labbe A, Pilote L, et al. The association between the Angiotensin-Converting Enzyme-2 gene and blood pressure in a cohort study of adolescents. *BMC Med Genet* 2013; 14:117.
- 21 Pola R, Flex A, Gaetani E, Flore R, Serricchio M, Pola P. Synergistic effect of -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke. *Stroke*. 2003; 34: 881-885.
- 22 Li XX, Liu JP, Cheng JQ, Han SH, Geng YJ, Wei S, et al. Intercellular adhesion molecule-1 gene K469E polymorphism and ischemic stroke: a case-control study in a Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2009; 36: 1565-1571.
- 23 Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Shama P. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch. Neurol*. 2004; 61: 1652-1661.
- 24 Ariyaratnam, R., Casas, J.P., Whittaker, J., Smeeth, L., Hingorani, A.D, Shama, P. Genetics of ischemic stroke among persons of non-European descent: a meta-analysis of eight genes involving approximately 32,500 individuals. *PloS Med*. 2007; 4: e131.
- 25 Um JY, An NH, Kim HM. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in cerebral infarction. *J Mol Neurosci* 2003; 21:167-171.
- 26 Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an *NcoI* polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med*. 1991; 173: 209-219.
- 27 Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*. 2002; 32:650-654.
- 28 Delongui F, Carvalho Grion CM, Ehara Watanabe MA, Morimoto HK, Bonametti AM, Maeda Oda JM, et al. Association of tumor necrosis factor β genetic polymorphism and sepsis susceptibility. *Exp Ther Med*. 2011;2: 349-356.
- 29 Wang X, Cheng S, Brophy VH, Erlich HÁ, Mannhalter C, Berger K, et al. A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in six study populations: association of lymphotoxin-alpha in non-hypertensive patients. *Stroke* 2009; 40: 683-695.
- 30 Pimenta JR, Zuccheratto LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: study with forensic microsatellites. *Hum Hered*. 2006; 62:190-195.
- 31 Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011; 6: e17063.
- 32 Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle JJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions of use in a multicenter

- clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993; 24: 35-41.
- 33 IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics. (2011) Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe. available in://http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Accessed in July 16, 2013.
- 34 Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, Falkner BE, Graves J, Hill MN, et al. Recommendation for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Hypertension*. 2005; 45:142-161.
- 35 Bonita R, Beaglehole R. "Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke." *Stroke*. 1988; 19:1497-1500.
- 36 Majetschak M, Flohé S, Obertacke U, Schröder J, Staubach K, Nast-Kolb D, et al. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg*. 1999; 203:207-214.
- 37 Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 1997; 20:1087-1092.
- 38 Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurol* 2004; 3: 227-235.
- 39 Sacco RI, Ellenberg JH, Mohr JP, Tatemichi TK, Hier DB, Price TR, et al. Infarcts of undetermined cause: the NINCDS Stroke Data Bank. *Ann Neurol* .1989; 25:382-390.
- 40 Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Gosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35: 488-495.
- 41 Szolnoki Z, Havasi V, Talián G, Bene J, Komlósi K, Somogyvári F, et al. Lymphotoxin-alpha gene 252G allelic variant is a risk factor for large-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci*. 2005; 27:205-211.
- 42 Hagiwara N, Kitazono T, Kamouchi M, Kuroda J, Ago T, Hata J, et al. Polymorphisms in the lymphotoxin alpha gene and the risk of ischemic stroke in the Japanese population. The Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama Study. *Cerebrovasc Dis*. 2008; 25:417-422.
- 43 Freilinger T, Bevan S, Ripke S, Gschwendtner A, Lichtner P, Müller-Myhsok B, et al. Genetic variation in the lymphotoxin-alpha pathway and the risk of ischemic stroke in European populations. *Stroke*. 2009; 40:970-972.
- 44 Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994; 25:1481-1488.

- 45 Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, et al. Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem.* 2005; 93: 1616-1622.
- 46 Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentolis ME, Vandenberg AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26: 654-665.
- 47 Robertson J, Beaulieu JM, Doroudchi MM, Durham HD, Julien JP, Mushynski WE. Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *J Cell Biol.* 2001; 155: 217-226.
- 48 Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke.* 1998; 29: 2189-2195.
- 49 Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, et al. TNFA promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J. Neuroimmunol.* 1997; 72:149-153.
- 50 Tsytsykova AV, Rajsbaum R, Falvo JV, Ligeiro F, Neely SR, Goldfeld AE. Activation-dependent intrachromosomal interactions formed by the TNF gene promoter and two distal enhancers. *PNAS.* 2007; 104:16850-16855.
- 51 Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Forte GI, Casuccio A, Vaccarino L, Scola L, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of pro-inflammatory/anti-inflammatory and thrombotic/fibrinolytic genes in patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtype. *Cytokine.* 2012; 58:398-405.
- 52 Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, Fornage M, DeStefano AL, Aulchenko YS, et al. Genomewide association studies of stroke. *N Eng J Med.* 2009; 360: 1718-1728
- 53 Traylor M, Farrall M, Holliday EG, Sudlow C, Hopewell JC, Cheng YC, et al. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2012; 11:951-962.
- 54 Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca, Pinto A. Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic strokes in comparison with other subtypes of ischemic stroke. *Tromb Haemost.* 2009; 101:929-937.
- 55 Maeda Y, Matsumoto M, Hori O, Kuwabara K, Ogawa S, Yan SD, et al. Hypoxia/reoxygenation-mediated induction of astrocyte IL 6: a paracrine mechanism potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med.* 1994; 180:2297-2308.
- 56 Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, et al. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke.* 2000; 31:1715-1720.
- 57 Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, Suzuki N, Adachi K, Kawase T, et al. Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J Neurochem.* 2005; 94: 459-468.

- 58 Wang Q, Tang XN, Yenari MA: The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 2007; 184:53-68.
- 59 Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.* 2004; 4:2.
- 60 Schiffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation.* 2000; 101:1372-1378.
- 61 Heinrich PC, Castell JC, Andus T. Interleukin-6 and acute phase response. *Biochem J.* 1990; 161: 621-636.
- 62 Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 1997; 6: 315–325.
- 63 Yamada Y, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Ichihara S, Kato K, et al. Genetic risk for ischemic and hemorrhagic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1920–1925.
- 64 Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke.* 2001; 32:2575–2579.
- 65 Arenillas JF, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Chacón P, Montaner J, Rovira A, et al. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke.* 2003; 34: 2463–2468.
- 66 Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Di Gianfilippo G, Donati C, et al. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP Pooling Project members. *Stroke.* 2005; 36:1316–1329.
- 67 Welsh P, Lowe GD, Chalmers J, Campbell DJ, Rumley A, Neal BC, et al. Associations of proinflammatory cytokines with the risk of recurrent stroke. *Stroke.* 2008; 39:2226-2230.
- 68 Den Hertog A, Van Den Herik EG, Dippel DW, Koudstaal PJ, De Maat MP. Variation in the C-reactive protein gene is associated with serum levels of CRP in patients with acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2010; 29:372-375.
- 69 Carlson CS, Aldred SF, Lee PK, Tracy RP, Schwartz SM, Rieder M, et al. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet.* 2005; 77:64–77.
- 70 Ladenvall C, Jood K, Blomstrand C, Nilsson S, Jern C, Ladenvall P. Serum C-reactive protein concentration and genotype in relation to ischemic stroke subtype. *Stroke.* 2006; 37: 2018–2023.

- 71 Ben-Assayag E, Shenhar-Tsarfaty S, Bova I, Berliner S, Shopin L, Peretz H, et al. Triggered C-reactive protein (CRP) concentrations and the CRP gene -717A>G polymorphism in acute stroke or transient ischemic attack. *Eur J Neurol.* 2007; 14:315–320.
- 72 Braun J, März W, Winkelmann BR, Donner H, Henning Usadel K, Badenhop K. Tumour necrosis factor beta alleles and hyperinsulinaemia in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 1998; 28:538-542.
- 73 Kanková K, Márová I, Jansen EH, Vasků A, Jurajda M, Vácha J. Polymorphism *NcoI* in tumor necrosis factor B is associated with fasting glycemia and lipid parameters in healthy non-obese Caucasian subjects. *Diabetes Metab.* 2002; 28:231-237.
- 74 Jang Y, Kim HJ, Koh SJ, Hyun YJ, Chae JS, Cho H, et al. Lymphotoxin- α gene 252A>G and metabolic syndrome features in Korean men with coronary artery disease. *Clin Chim Acta.* 2007; 384: 124-128.
- 75 Hsieh YC, Jeng JS, Lin HJ, Hu CJ, Yu CC, Lien LM, et al. Epistasis analysis for estrogen metabolic and signaling pathway genes on young ischemic stroke patients. *PLoS One.* 2012; 7:e47773.
- 76 Grau AJ, Reis A, Buggle F, Al-Khalaf A, Werle E, Valois N, et al. Monocyte function and plasma levels of interleukin-8 in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2001; 192:41-47.
- 77 Manso H, Krug T, Sobral J, Albergaria I, Gaspar G, Ferro JM, et al. Variants of the *Matrix Metalloproteinase-2* but not the *Matrix Metalloproteinase-9* genes significantly influence functional outcome after stroke. *BMC Med Genet.* 2010; 11:40-49.
- 78 Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D, Serio A, D'Aguanno G, La Placa S, et al. Plasma levels of inflammatory and thrombotic/fibrinolytic markers in acute ischemic strokes: relationship with TOAST subtype, outcome and infarct site. *J Neuroimmunol.* 2009; 215: 84-89.
- 79 Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, Licata G. Inflammation in ischemic stroke subtypes. *Curr Pharm Des.* 2012b; 18: 4289-4310.
- 80 Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M, Lowe G, Rumley A, Sattar N, et al. The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke.* 2012; 43:86-91.
- 81 Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 149-161.

Table 1 - General characteristics, clinical and laboratorial findings of acute ischemic stroke patients and controls from Southern Brazilian population

Variable	Stroke patients (n = 93)	Controls (n = 134)	p value
Age (years)	65.0 (56.0 – 75.0)	63.0 (47.5 – 72.5)	0.1214*
Sex n (%)			
Female/ Male	40 (43.0)/ 53 (57.0)	69 (51.5)/65 (48.5)	0.2084†
Ethnicity n (%)			
Caucasian/ Non Caucasian	76 (81.7)/ 17 (18.3)	112 (83.6)/ 22 (16.4)	0.3378†
Body Mass Index (kg/m ²)	25.4 (21.9 – 29.5)	27.0 (24.4 – 29.7)	0.1282*
Systolic Blood Pressure (mmHg)	147.5 (126.8 – 161.0)	120.0 (120.-130.0)	<0.0001*
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	90.0 (80.0 – 100.0)	80.0 (77.0-80.0)	<0.0001*
Hypertension Yes n (%)	79 (84.9)	50 (37.3)	<0.0001†
Sedentary Yes n (%)	49 (52.7)	08 (5.9)	<0.0001†
TNFA levels (pg/μL)‡	10.3 (2.0-10.7)	11.5 (2.0-14.1)	0.7952*
White blood cells (x 10 ³ cells/μL)	9.3 (6.7-11.6)	6.3 (5.4-8.0)	<0.0001*
ESR (mm/h)§	16.0 (5.0-16.5)	10.0 (5.0-16.5)	0.0060*
hsCRP (mg/L)	9.7 (2.7-42.3)	1.6 (0.8-3.8)	<0.0001*
Total cholesterol (mg/dL)	164.5 (134.5-204.0)	195.0 (167.0-222.0)	<0.0001*
HDL-cholesterol (mg/dL)#	38.0 (30.2-50.8)	51.0 (43.0-62.0)	<0.0001*
LDL-cholesterol (mg/dL)**	93.6 (70.0-128.0)	115.0 (90.0-138.0)	0.0015*
Triglycerides (mg/dL)	122.0 (74.0-155.0)	131.5 (98.3-173.8)	0.0720*
Glucose (mg/dL)	129.5 (102.5-175.5)	94.0 (85.0-104.0)	<0.0001*
Insulin (μU/ mL)	12.6 (6.7-21.5)	9.6 (1.5-13.3)	0.0069*
HOMA-IR††	3.9 (2.2-8.3)	2.1 (1.2-3.6)	<0.0001*

Premorbid drugs Yes n (%)			
Antihypertensive	62 (66.7)	45 (33.6)	<0.0001†
Antiplatelet	21 (22.6)	6 (4.4)	<0.0001†
Anticoagulant	8 (8.6)	1 (0.07)	0.0039†
Antidiabetic	21 (22.6)	16 (11.9)	0.0328†
Hypolipemiant	21 (22.6)	16 (11.9)	0.0328†
Stroke subtypes n (%)			
Large Artery Atherosclerosis	26 (28.0)		
Lacunar infarct	22 (23.7)		
Cardio-embolic infarct	13 (13.9)		
Other determined etiology	8 (8.6)		
Undetermined etiology	24 (25.8)		
Modified Rankin Scale at baseline	4.0 (3.0 - 5.0)		
Mild (0-2) n (%)	19 (20.4)	--	--
Moderated/severe (3-6) n (%)	74 (79.6)		

Data were expressed absolute number (n) and percentage (%) or median and interquartile range (25%-75%); *Mann-Whitney test (p<0.05); †Chi-Square test or Fisher exact Test (p<0.05); ‡Tumor Necrosis Factor Alpha; § Erythrocyte Sedimentation Rate; ¶high sensitive C reactive protein; #high-density lipoprotein; **low-density lipoprotein; ††Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance.

Table 2 - Distribution of *tumor necrosis factor beta (TNFB) NcoI* genotypes (rs909253) and allelic frequencies of acute ischemic stroke patients and controls from Southern Brazilian population

Variable	<i>TNFB NcoI</i> polymorphism*			
	Stroke Patients	Controls	Odds Ratio (95% CI)	p value†
	(n = 93) n (%)	(n= 134) n (%)		
TNFB1/B1	9 (9.7)	19 (14.2)	1.00 (reference)	
TNFB1/B2	43 (46.2)	67 (50.0)	1.35 (0.56-3.27)	0.3644
TNFB2/B2	41 (44.1)	48 (35.8)	1.80 (0.74-4.42)	
TNFB1 allele	0.3280	0.3918	1.24 (0.84-1.84)	0.2847
TNFB2 allele	0.6720	0.6082		

Data were expressed absolute number (n) and percentage (%). The genotype distribution was in Hardy-Weinberg Equilibrium in stroke patients and controls ($p > 0.05$); **TNFB*: *tumor necrosis factor beta* gene; *NcoI*: *Nocardia corallis* I restriction enzyme; *TNFB1/B1*: homozygous genotype for the allele *TNFB1*; *TNFB1/B2*: heterozygous genotype; *TNFB2/B2*: homozygous genotype for the allele *TNFB2*; †Chi Square test ($p < 0.05$); when the frequency obtained for the genotypes was evaluated according to the recessive model (*TNFB2/B2* vs. *TNFB1/B2*+*TNFB1/B1*), the odds ratio was 1.41 (CI 95%=0.82-2.43).

Table 3 - Laboratorial variables of acute ischemic stroke patients, according to the *tumor necrosis factor beta (TNFB) NcoI* polymorphism

Variable	<i>TNFB NcoI</i> genotype*		p value†
	TNFB1/B2 + TNFB1/B1 (n=52)	TNFB2/B2 (n = 41)	
TNFA levels (pg/μL)‡	3.6 (2.7-4.5)	17.8 (13.3-22.3)	0.0429
White blood cells (x10 ³ cells/μL)	8.4 (6.4-10.1)	9.4 (7.8-12.8)	0.0433
Total cholesterol (mg/dL)	156.5 (122.8-195.8)	177 (149.3-213.0)	0.0367
LDL-cholesterol (mg/dL)§	85.8 (65.2-118.4)	101.0 (81.0-134.6)	0.0429
Glucose (mg/dL)	119.5 (101.0-145.0)	145.0 (119.0-198.5)	0.0139
Insulin	9.6 (6.4-15.8)	17.9 (9.0-44.3)	0.0248
HOMA-IR	2.5 (2.0-4.8)	5.0 (2.5-11.9)	0.0371

Data were expressed absolute number (n) and percentage (%) or median and interquartile range (25%-75%); **TNFB*: *tumor necrosis factor beta* gene; *NcoI*: *Nocardia corallis* I restriction enzyme; *TNFB1/B1*: homozygous genotype for the allele *TNFB*; *TNFB1/B2*: heterozygous genotype; *TNFB2/B2*: homozygous genotype for the allele *TNFB2*; †Mann-Whitney test (p<0.05); ‡Tumor Necrosis Factor Alpha; §Low-density lipoprotein; ||Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance.

Table 4 - Spearman' rank correlation between inflammatory markers and neurological deficit of acute ischemic stroke patients carrying the TNFB2/B2 genotype of the *TNFB* *NcoI* polymorphism

Inflammatory markers	r ²	p value*
White blood cells (x10 ³ cells/mm ³)	0.5770	0.0007
TNFA (pg/μL)†	0.0184	0.9271
IL-6 (pg/μL)‡	0.5890	0.0003
hsCRP (mg/dL)§	0.6703	<0.0001
ESR (mm/h)	0.4639	0.0342

*Spearman's rank correlation (p<0.05); †Tumor Necrosis Factor Alpha; ‡: Interleukin 6;

§ High sensitive C reactive protein; || Erythrocyte Sedimentation Rate.

The neurological deficit was evaluated using the Modified Rankin Scale (30).

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- As principais características demográficas e antropométricas dos pacientes com AVC foram: a maioria era do sexo masculino, a mediana de 65 anos de idade e mediana de 25,4 kg/m² para o IMC. A frequência de hipertensão, sedentarismo e dislipidemia foi maior entre os pacientes que os controles;
- Pacientes com AVC apresentaram valores mais elevados de marcadores inflamatórios, como contagem de leucócitos totais, VHS, níveis séricos de proteínas de fase aguda como usPCR e ferritina comparados aos controles;
- Pacientes com AVC apresentaram valores mais elevados de marcadores metabólicos como glicemia, insulina, ferro e HOMA-IR e menores níveis de HDL-colesterol comparados aos controles;
- Os subtipos mais frequentes de AVC isquêmico agudo com etiologia determinada foram aterosclerose de grandes artérias, infarto lacunar e infarto cardioembólico;
- Entre os pacientes com AVC, a frequência dos genótipos TNFB1/B1, TNFB1/B2 e TNFB2/B2 foi de 9,7%, 46,2%, 44,1%, respectivamente; dos alelos TNFB1 e TNFB2 foi de 0,3280 e 0,6720, respectivamente;
- Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos e dos alelos do polimorfismo *NcoI* do *TNFB* entre os pacientes e controles. Entretanto, os pacientes portadores do genótipo TNFB2/B2, comparados aos que possuíam outros genótipos, apresentaram maiores níveis dos marcadores inflamatórios como leucócitos periféricos e TNFA, assim como dos marcadores metabólicos como ferro, colesterol total, LDL-colesterol, glicemia, insulina e HOMA-IR;
- Verificou-se uma correlação positiva entre a contagem de leucócitos, VHS, usPCR e IL-6 com o grau de incapacidade dos pacientes obtidos na admissão dos mesmos. Verificou-se, também, uma correlação negativa entre os níveis de ferro sérico com o grau de incapacidade dos pacientes obtidos na admissão dos mesmos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que o polimorfismo *NcoI* do *TNFB* não apresentou associação com o desenvolvimento do AVC isquêmico agudo nesta população; entretanto, o genótipo TNFB2/B2 foi associado à maior resposta inflamatória e alterações metabólicas com correlação positiva entre a contagem de leucócitos, os níveis de IL-6, usPCR e VHS e correlação negativa entre os níveis de ferro com a incapacidade neurológicas dos pacientes. Os resultados confirmam a intensa reação inflamatória e alterações metabólicas associadas ao AVC isquêmico agudo. Os resultados sugerem que esta variante no genoma humano, por si só, não é responsável pelo desenvolvimento do AVC isquêmico agudo, mas pode interagir com outros fatores genéticos e ambientais criando um perfil favorável que contribua para o desenvolvimento e evolução do AVC.

Nesta era pós-genômica, a identificação de variantes alélicas podem permitir uma melhor predição do risco de AVC em uma determinada população e a identificação de novos mecanismos envolvidos na patogênese do AVC pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle JJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions of use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993; 24: 35-41.
- American Heart Association Stroke Council. Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator. A science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2009; 40.
- Arenillas JF, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Chacón P, Montaner J, Rovira A, Ibarra B, Quintana M. C-reactive protein predicts further ischemic events in first-ever transient ischemic attack or stroke patients with intracranial large-artery occlusive disease. *Stroke* 2003; 34: 2463–2468.
- Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334: 1717–1725.
- Bonita R, Beaglehole R. “Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke.” *Stroke* 1988; 19:1497-1500.
- Brazil. Ministry of Health. (2004). National Health Surveillance Agency Board: Resolution RDC no. 153, June 14, 2004. Official Gazette: 24 June, 2004, Brazil.
- Brasil. Ministério da Saúde – Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e IBGE. [Internet] [accessed 2013 Dec 01]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c08.def>.
- Braun J, März W, Winkelmann BR, Donner H, Henning Usadel K, Badenhoop K. Tumour necrosis factor beta alleles and hyperinsulinaemia in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:538-542.
- Cabral NL. Epidemiologia e impacto da doença cerebrovascular no Brasil e no mundo. *Com Ciência* 2009; 109:e5.
- Cawthorn WP, Sethi JK. TNFA and adipocyte biology. *FEBS Letters* 2008; 582: 117-131.
- Castellanos M, Leira R, Tejada J, Gil-Peralta A et al. Predictors of good outcome in medium to large spontaneous supratentorial intracerebral haemorrhages. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 76: 691-695.
- Castillo J, Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Pumar JM, Leira R, Silva Y, Montaner J, Kase CS. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2002; 58: 624-629.
- Cavender DE, Edelbaum D, Ziff M. Endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Am J Pathol* 1989; 134: 551-560.
- Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279:1477-1482.

Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. The progression and topographic distribution of interleukin-1 β expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19:87-98.

DeGraba T. J. Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque. *Neurology* 1997; 49: S515–S519.

Delongui F, Carvalho Grion CM, Ehara Watanabe MA, Morimoto HK, Bonametti AM, Maeda Oda JM, Kallaur AP, Matsuo T, Reiche EM. Association of tumor necrosis factor β genetic polymorphism and sepsis susceptibility. *Exp Ther Med*. 2011;2:349-356.

Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Di Gianfilippo G, Donati C, Emsley HC, Forconi S, Hopkins SJ, Masotti L, Muir KW, Paciucci A, Papa F, Roncacci S, Sander D, Sander K, Smith CJ, Stefanini A, Weber D. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP Pooling Project members. *Stroke* 2005; 36:1316–1329.

Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2007; 6: 149-161.

Edwards RL, Rickles FR, Bobrove AM. Mononuclear cell tissue factor: cell origin and requirements for activation. *Blood* 1979; 54: 359-370.

Everett BM, Kurth T, Buring JE, Ridker PM. The relative strength of C-reactive protein and lipid levels as determinants of ischemic stroke compared with coronary heart disease in women. *JACC* 2006; 48:2235-2242.

Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G, Tondi P, Pola P, Pola R. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35:2270-2275.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine* 1999; 340:448–454.

Garcia JH, Kamijyo Y. Cerebral infarction: evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 1974; 33: 408-421.

Garritano CR, Luz PM, Pires MLE, Barbosa MTS, Batista KM. Análise da tendência da mortalidade por acidente vascular cerebral no Brasil no século XXI. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2012; 98:519-527.

Grimble RF, Howell WM, O'Reilly G, Turner SJ, Markovic O, Hirrell S, East JM, Calder PC. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor α production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor α production. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76:454–459.

Gulcher JR, Gretarsdottir S, Helgadottir A, Stefansson K. Genes contributing to risk for common forms of stroke. *Trends in Molecular Medicine* 2005; 11:217-224.

Haffner SM, Miettinen H, Stern MP. The homeostasis model in San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1997; 20:1087-1092.

Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 2002; 8: 1363-1368.

Hallenbeck JM. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv Neurol*. 1996;71:281-297; discussion 297-300.

Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, Vogel J, Prinz S, Schwab S, Monyer H, Brombacher F, Schwaninger M. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23:406-415.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increase adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415.

Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, García-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Peña AS. TNFA promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J. Neuroimmunol* 1997; 72:149-153.

Jang Y, Kim HJ, Koh SJ, Hyum YJ, Chae JS, Cho H, et al. Lymphotoxin- α 252A>G and metabolic syndrome features in Korean men with coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2007a; 384: 124-128.

Jang Y, Koh SJ, Kim OY, Kim BK, Choi D, Hyun YJ, et al. Effect of the 252A>G polymorphism of the lymphotoxin-alpha gene on inflammatory markers of response to cigarette smoking in Korean healthy men. *Clin Chim Acta* 2007b; 77: 221-227.

John GR, Chen L, Rivieccio MA, Melendez-Vasquez CV, Hartley A, Brosnan CF.

Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci* 2004; 24:2837-28345.

Kanková K, Márová I, Jansen EH, Vasků A, Jurajda M, Vácha J. Polymorphism *Ncol* in tumor necrosis factor B is associated with fasting glycemia and lipid parameters in healthy non-obese Caucasian subjects. *Diabetes Metab* 2002; 28:231-237.

Krazt A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996; 183: 1461-1472.

Leys D, Bandu L, Henon H, Lucas C, Mounier-Vehier F, Rondepierre P, Godefroy O. Clinical outcome in 287 consecutive young adults (15 to 45 years) with ischemic stroke. *Neurology* 2002;59:26-33.

Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25: 1481-1488.

Majetschak M, Flohé S, Obertacke U, Schröder J, Staubach K, Nast-Kolb D, Schade F U, Stüber F. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 1999; 203:207-214.

Majetschak M, Obertacke U, Schade FU, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Bloemeke B, Heesen M. Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. *Clin Diag Lab Immunol* 2002; 9: 1205-1211.

Manolio TA. Cohort studies and the genetics of complex disease. *Nat Genet* 2009; 41:5-6.

Markus HS. Stroke genetics. *Hum Mol Genet* 2011; 20: R124-R131.

Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an *NcoI* polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991; 173: 209-219.

Moller DE. Potential role of TNFA in the pathogenesis of insulin resistance in type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 212-217.

Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, Fujii H, Wada H, Ishiguro H, Mori H, Seishima M. Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem* 2005; 93: 1616-1622.

Naoum JJ, Chal H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Lymphotoxin- α and cardiovascular disease: clinical association and pathogenic mechanisms. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA121-124.

NIND. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Eng J Med* 2005; 333:1581-1587.

Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentolis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Bloo Flow Metab* 2006; 26: 654-665.

Oliveira-Filho J, Martins SC, Pontes-Neto OM, Longo A, Evaristo EF, Carvalho JJ, Fernandes JG, Zétola VF, Gagliardi RJ, Vedolin L, Freitas GR; Executive Committee from Brazilian Stroke Society and the Scientific Department in Cerebrovascular Diseases. Guidelines for acute ischemic stroke treatment: part I. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2012; 70: 621-629.

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; 6: e17063.

Pimenta JR, Zuccheratto LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians: study with forensic microsatellites. *Human Heredity* 2006; 62:190-195.

Plomgaard P, Nielsen AR, Fischer CP, Mortensen OH, Broholm C, Penkowa M, et al. Associations between insulin resistance and TNF- α in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50: 2562-2571.

Pober JS, Lapierre LA, Stolpen AH, Brock TA, Springer TA, Fiers W, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Gimbrone MA Jr. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 1987; 138:3319-3324.

Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N et al. Heart disease and stroke statistics: 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; 117:e25-146.

Rosand J, Altshuler D. Human genome sequence variation and the search for genes influencing stroke. *Stroke* 2003; 34:2512-6.

Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, D'Agostino RB, Franzblau C, Wilson PW. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke* 2001; 32:2575-2579.

Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Gosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 488-495.

Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol*. 2012; 3:132.

Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurology* 2004; 4:2.

Somoskövi A, Zissel G, Seitzer U, Gerdes J, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Polymorphisms at position -308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced TNF-alpha release in sarcoidosis. *Cytokine* 1999; 11:882-887.

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2007; 88: 1-19.

Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol* 2007; 6:182-187.

Szolnoki Z, Havasi V, Talián G, Bene J, Komlósi K, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Lymphotoxin-alpha gene 252G allelic variant is a risk factor for large-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci*. 2005;27(2):205-11.

Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Franciotta D, Frederiksen JL, Fleming JO, Furlan R, Hintzen RQ, Hughes SG, Johnson MH, Krasulova E, Kuhle J, Magnone MC, Rajda C, Rejdak K, Schmidt HK, van Pesch V, Waubant E, Wolf C, Giovannoni G, Hemmer B, Tumani H, Deisenhammer F. A consensus protocol for the standardization of cerebral fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009; 73: 1914-1922.

Traylor M, Farrall M, Holliday EG, Sudlow C, Hopewell JC, Cheng YC, Fornage M, Ikram MA, Malik R, Bevan S, Thorsteinsdottir U, Nalls MA, Longstreth W, Wiggins KL, Yadav

S, Parati EA, Destefano AL, Worrall BB, Kittner SJ, Khan MS, Reiner AP, Helgadottir A, Achterberg S, Fernandez-Cadenas I, Abboud S, Schmidt R, Walters M, Chen WM, Ringelstein EB, O'Donnell M, Ho WK, Pera J, Lemmens R, Norrving B, Higgins P, Benn M, Sale M, Kuhlenbäumer G, Doney AS, Vicente AM, Delavaran H, Algra A, Davies G, Oliveira SA, Palmer CN, Deary I, Schmidt H, Pandolfo M, Montaner J, Carty C, de Bakker PI, Kostulas K, Ferro JM, van Zuydam NR, Valdimarsson E, Nordestgaard BG, Lindgren A, Thijs V, Slowik A, Saleheen D, Paré G, Berger K, Thorleifsson G; Australian Stroke Genetics Collaborative, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), Hofman A, Mosley TH, Mitchell BD, Furie K, Clarke R, Levi C, Seshadri S, Gschwendtner A, Boncoraglio GB, Sharma P, Bis JC, Gretarsdottir S, Psaty BM, Rothwell PM, Rosand J, Meschia JF, Stefansson K, Dichgans M, Markus HS; International Stroke Genetics Consortium. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol* 2012; 11:951-962.

Um JY, An NH, Kim HM. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in cerebral infarction. *J Mol Neurosci*. 2003; 21:167-171.

Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31:2325-2329.

Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 23:103-114.

Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RB, Wilcken DE. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3147-3153.

Wang Q, Tang XN, Yenari MA: The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007; 184:53-68.

Wang X, Cheng S, Brophy VH, Erlich HA, Mannhalter C, Berger K, Lalouscheck W, Browner WS, Shi Y, Ringelstein EB, Kessler C, Luedemann R, Lindpaintner K, Liu L, Rdlar PM, Zee RYL, Cook NR, RMS Stroke SNP Consortium. A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in six study populations: association of lymphotoxin-alpha in non-hypertensive patients. *Stroke* 2009a; 40: 683-695.

Wang Q, Ding H, Tang J-R, Zhang L, Xu Y-J, Yan J-T, Wang W, Hui R-T, Wang C-Y, Wang D-W. C-reactive protein polymorphisms and genetic susceptibility to ischemic stroke and hemorrhagic stroke in the Chinese Han population. *Acta Pharmacol Sin* 2009b; 30: 291-298.

Wilson PW. Metabolic risk factors for coronary heart disease: current and future prospects. *Curr Opin Cardiol* 1999; 14:176-185.

Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hofman KJ. The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. *JAMA* 2004; 291:2616-2622.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação pelo comite de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da UEL



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 268

Parecer CEP/UEL:	294/2011
CAAE:	0250.0.268.000-11
Processo:	29144.2011.42
Folha de Rosto:	462193
Pesquisador(a):	Edna Maria Vissoci Reiche
Unidade/Órgão:	CCS - Departamento Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"BIOMARCADORES GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: estudo da relevância clínica e da influência no prognóstico dos pacientes"

Situação do Projeto: **APROVADO**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.

Londrina, 20 de dezembro de 2011.



Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

ANEXO B

Termo de consentimento livre e esclarecido

(Grupo de pacientes com AVC)

“BIOMARCADORES GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL: ESTUDO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA E DA INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO DOS PACIENTES.”

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa **“BIOMARCADORES GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL: ESTUDO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA E DA INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO DOS PACIENTES”**, realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é saber se existe algum exame de sangue que possa indicar de forma mais rápida e simples sinais de que um acidente vascular cerebral (AVC ou derrame no cérebro) tem maiores riscos de evoluir de maneira desfavorável. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: **coleta de amostra de sangue (20 mL) no dia de sua entrada no hospital e após 3 meses da alta hospitalar, na época do atendimento ambulatorial para avaliação do quadro clínico.** Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Solicitamos ainda sua autorização para que após o término do presente estudo, o material de sangue coletado possa ser armazenado, identificado de maneira sigilosa sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores, para ser utilizada em futuros estudos sobre os fatores de risco associados ao acidente vascular cerebral a serem desenvolvidos por esta mesma equipe de pesquisadores. Caso não autorize, informamos que o material coletado para este estudo, será descartado após o término da presente pesquisa.

Os benefícios esperados são que caso a hipótese da pesquisa seja confirmada, estes resultados poderão agilizar e facilitar os tratamentos disponíveis para um derrame. O sangue que será coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada

independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não vos acarreta em nenhum risco adicional.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode contatar o médico Dr. **Johnathan de Sousa Parreira, pelo telefone 43-9118-1185, ou e-mail jsparreira@yahoo.com.br, ou procurá-lo no Hospital Universitário de Londrina, na Av. Robert Koch 60, 3371-2000, Setor de Neurologia**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº 60, ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 20__.

Pesquisador Responsável: Dr. Johnathan de Sousa Parreira, médico,
CRM/PR 23606. RG 12.880.621-0 SESP/PR, fone: 43-9118-1185,
e-mail: jsparreira@yahoo.com.br

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
 tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Assinatura do responsável (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

ANEXO B

Termo de consentimento livre e esclarecido

(Grupo Controle)**``BIOMARCADORES GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL: ESTUDO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA E DA INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO DOS PACIENTES.``**

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa

BIOMARCADORES GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL: ESTUDO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA E DA INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO DOS PACIENTES, realizada no Hospital Universitário de Londrina. O objetivo da pesquisa é saber se existe algum exame de sangue que possa indicar de forma mais rápida e simples sinais de que um acidente vascular cerebral (AVC ou derrame no cérebro) tem maiores riscos de evoluir de maneira desfavorável. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: **coleta de amostra de sangue (20 mL) no dia de sua entrada no hospital**. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Solicitamos ainda sua autorização para que após o término do presente estudo, o material de sangue coletado possa ser armazenado, identificado de maneira sigilosa sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores, para ser utilizada em futuros estudos sobre os fatores de risco associados ao acidente vascular cerebral a serem desenvolvidos por esta mesma equipe de pesquisadores. Caso não autorize, informamos que o material coletado para este estudo, será descartado após o término da presente pesquisa.

Os benefícios esperados são que caso a hipótese da pesquisa seja confirmada, estes resultados poderão agilizar e facilitar os tratamentos disponíveis para um derrame. O sangue que será coletado para a pesquisa será parte da mesma coleta de exames de rotina que será realizada independentemente de sua participação ou não no estudo e desta forma, não vos acarreta em nenhum risco adicional.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar (**Johnathan de Sousa Parreira, Av. Robert Koch 60, 3371-2000**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº 60, ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 20__.

**Pesquisador Responsável: Johnathan de Sousa Parreira, médico, CRM/PR 23606
RG 12.880.621-0 SESP/PR**

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em
participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

ANEXO C

Questionário para coleta de dados

**RESPOSTA INFLAMATORIA E IMUNOLÓGICA NOS PACIENTES COM
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL E SUA CORRELAÇÃO COM O
PROGNÓSTICO CLÍNICO.**

Projeto de Pesquisa aprovado pelo CEP/UDEL, Protocolo 19382/10,

CAE 0176.0.268.000-10

Data ___/___/___/

Número no projeto: _____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Idade: _____ anos

Sexo : () M () F

Antecedentes Mórbitos Pessoais: () HAS () DM () AVC
 () Dislipidemia () Sedentarismo () IAM
 () Dça Autoimune () Dça Hematológica
 () Dça Infecciosa () Outro: _____

Medicamentos de uso contínuo: _____

() Uso de antioxidantes _____

() Uso de vitaminas _____

() Outros _____

Antecedentes Mórbitos Familiares: () HAS () DM () Dislipidemia

() AVC () IAM () Outro: _____

Condições e hábitos de vida: () Tabagismo () Etilismo () Sedentarismo

Historia Clínica e Exame Físico da Entrada (*baseline*):

Peso (Kg) _____ Altura (m) _____

Pressão arterial (mmHg) _____ Circunferência abdominal (cm) _____

Atividade física:

() SIM () 1x semana () 2x semana () 3x semana () > 3 x semana

() NÃO

Escala de Rankin Modificada

0- Nenhum sintoma

1- Não apresenta incapacidade significativa, apenas sintomas; capaz de realizar as obrigações e atividades habituais

2- Leve incapacidade; incapaz de realizar todas as atividades prévias, porem capaz de realizar os cuidados consigo próprio sem assistência.

3- Moderada incapacidade; necessita alguma ajuda, consegue andar sem ajuda

4- Moderada /ou severa incapacidade; incapaz de andar sem assistência e não consegue realizar sozinho os cuidados consigo próprio

5- Incapacidade grave; acamado e sob cuidados constantes de enfermagem, incontinente.

6- Morte

TOTAL (0-6): _____