

# Associação do polimorfismo genético no gene BCL2 no Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico/Aneurisma

## Association of genetic polymorphism in the BCL2 gene in/with Hemorrhagic Stroke/Aneurysm

### Asociación de polimorfismo genético en el gen BCL2 en/con el accidente cerebrovascular hemorrágico/aneurisma

Anyelle Stephane Nascimento de Lima<sup>1</sup>, Caroline Ferreira Fratelli<sup>2</sup>, Daniel Oliveira Freire<sup>3</sup>, Luzitano Brandão Ferreira<sup>4</sup>, Hêlia Carla Souza<sup>4</sup>, Izabel Cristina Rodrigues da Silva<sup>1,2</sup>

**Como citar:** Lima ASN, Fratelli CF, Freire DO, Ferreira LB, Souza HC, Silva ICR. Associação do polimorfismo genético no gene BCL2 no Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico/Aneurisma. REVISA. 2020; 9(1): 118-24. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v9.n1.p118a124>

# REVISA

1. Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

2. Universidade de Brasília, Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

3. Faculdade LS. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

4. Centro Universitário de Brasília. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Recebido: 22/11/2019  
Aprovado: 14/01/2020

#### RESUMO

**Objetivo:** Verificar a distribuição do polimorfismo do gene BCL2 (rs1801018), em sua região codante, em pacientes portadores de Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCh)/Aneurisma. Além de associar o presente polimorfismo as manifestações clínicas da doença. **Método:** O estudo foi conduzido com 158 participantes de pesquisa. Os grupos foram pareados quanto ao sexo e idade. A genotipagem foi conduzida pela técnica PCR-RFLP. Após o cálculo das frequências alélicas e genotípicas de cada grupo, foram utilizados testes estatísticos apropriados para cada tipo de comparação. O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** Os dados indicaram que a frequência dos genótipos apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo caso e controle, encontrando-se o genótipo ala43ala na maioria dos participantes de ambos os grupos. **Conclusão:** A presença do alelo mutante (trh) foi vista como um fator protetor para AVCh/aneurisma. Porém, estudos em outras populações devem ser realizados para se obter uma melhor compreensão sobre a doença AVCh/aneurisma.

**Descritores:** Polimorfismo genético; Acidente Vascular Cerebral; Genes bcl-2.

#### ABSTRACT

**Objective:** Verify the distribution of the BCL2 gene polymorphism (rs1801018), located in its coding region, in patients with Hemorrhagic Stroke (HS)/Aneurysm (A). Furthermore, to associate this polymorphism with the HS/A clinical manifestations. **Method:** The study was conducted with 158 research participants and the groups matched by sex and age. Genotyping was done by the PCR-RFLP technique. After calculating the allele and genotype frequencies of each group, appropriate statistical tests were performed for each comparison type with the adopted significance level of 5%. **Results:** The data indicated that the frequency of the genotypes showed a statistically significant difference between the case and control group, and the ala43ala genotype was found in most participants in both groups. **Conclusion:** The presence of the mutant allele (trh) was observed as a protective factor for HS/A. However, studies in other populations should be performed to obtain a better understanding of this disease.

**Descriptors:** Genetic polymorphism; Stroke; Bcl-2 genes.

#### RESUMEN

**Objetivo:** Verificar la distribución del polimorfismo del gen BCL2 (rs1801018), en ubicado su región de codificación, en pacientes con accidente cerebrovascular hemorrágico (ACVh)/aneurisma. Asimismo, asociar el presente polimorfismo con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. **Método:** El estudio se realizó con 158 participantes, y los grupos fueron agrupados por sexo y edad. La determinación del genotipo se realizó mediante la técnica PCR-RFLP. Después de calcular las frecuencias de alelos y genotipos de cada grupo, se realizaron pruebas estadísticas apropiadas para cada tipo de comparación con el nivel de significación adoptado de 5%. **Resultados:** Los datos indicaron que la frecuencia de los genotipos mostró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo caso y el control, con el genotipo ala43ala encontrado en la mayoría de los participantes de ambos grupos. **Conclusión:** La presencia del alelo mutante (trh) fue visto como un factor protector para el ACVh/aneurisma. Sin embargo, se deben realizar más estudios en otras poblaciones para obtener una mejor comprensión de la enfermedad de ACVh/aneurisma.

**Descritores:** polimorfismo genético; Accidente vascular cerebral; Genes Bcl-2.

ORIGINAL

## Introdução

O Aneurisma cerebral tem como característica a distensão e consequentemente a dilatação de uma artéria cerebral, causada pelo enfraquecimento e destruição de um vaso. Quando se rompe, ocasiona o Acidente Vascular Cerebral Hemorrágico (AVCh), o qual é caracterizado pelo extravasamento sanguíneo, em uma determinada região cerebral, devido a uma obstrução ou ruptura de um vaso.<sup>1-3</sup>

O AVCh é dividido em três grandes grupos quanto aos principais fatores de risco: modificáveis, que incluem a hipertensão arterial sistêmica, o tabagismo e a diabetes mellitus; os fatores não modificáveis, tais como a idade, gênero, raça e histórico familiar; e o grupo de risco potencial, como sedentarismo, obesidade e alcoolismo. Logo, é uma enfermidade que envolve fatores genéticos e ambientais.<sup>4</sup>

A família Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*) é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose. Os membros da família Bcl-2 inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c, e são chamados de reguladores antiapoptóticos.<sup>5</sup>

Localizado no cromossomo humano 18q21.33, genes da família Bcl-2 vêm sendo associados como importantes mediadores de efeitos neurotóxicos em alguns estudos ao AVCh, por estarem associadas à cascata apoptótica determinada pelo BAX/BCL2 e caspase 9, que ativam a inflamação.<sup>6-7</sup>

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar a distribuição do polimorfismo do gene *BCL2* (rs1801018), em sua região codante, em pacientes portadores de AVC Hemorrágico/aneurisma. Além disso, buscou-se associar o presente polimorfismo as manifestações clínicas da doença.

## Método

### Sujeitos

Neste estudo observacional, transversal e de caso controle, os participantes de pesquisa foram divididos em dois grupos.

Os participantes do grupo caso foram selecionados através dos prontuários médicos de um hospital do Distrito Federal (Brasil). Todos os participantes eram de ambos os sexos e maiores de 18 anos de idade. Logo, selecionaram 78 pacientes portadores de AVC Hemorrágico/Aneurisma.

O grupo controle era formado por participantes de pesquisa que não possuíam histórico de AVC Hemorrágico/Aneurisma e nem parentesco com o grupo caso, além disso, eram de ambos os sexos e maiores de 18 anos de idade. Sendo assim, 80 indivíduos participaram neste grupo.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPECS e todos os participantes tiveram o histórico clínico detalhado e a evolução clínica acompanhados.

## Métodos laboratoriais

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, 10 mL de sangue venoso fora coletado de todos os participantes. A partir disso, técnicas de biologia molecular foram aplicadas.

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído do sangue venoso utilizando o *Invisorb Spin Blood Mini Kit (250)* da *Invitek* (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300), alcançando uma concentração média de 20ng/ $\mu$ L. A genotipagem do gene *BCL2* rs 1801018 se deu utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos utilizados foram: Senso 5'CCCGTTGCTTTTCCTCTGGGA3' e Antisenso 5'GGGAGGAGAAGATGCCCGCCGCGGGG3'. As seguintes condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, acompanhada de 48°C por 45 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 60 segundos para a etapa de extensão. Por fim, o processo de extensão final se deu a 72°C por 10 minutos.

Ao final da realização da amplificação do DNA pela PCR e tendo como produto o fragmento de 178pb, realizou-se o processo de digestão enzimática, onde se utilizou a enzima *BglI* (*New England Biolabs, Inc. Beverly, MA, USA*), que cliva o fragmento do alelo Ala43 em dois fragmentos: 157 bp e 21 pb, e não é capaz de clivar o alelo Thr43, permanecendo este com 178pb.

## Análise estatística

Foi realizado o equilíbrio de *Hardy Weinberg*, no qual o grupo controle foi considerado dentro do equilíbrio. Frequências genotípicas e alélicas foram estimadas utilizando o programa SPSS, versão 23.0. Para a comparação das frequências, o teste Qui-Quadrado foi utilizado. Associações probabilísticas menores que 5% foram consideradas.

As características clínicas dos pacientes, como Hipertensão Arterial, Diabetes, também tiveram as suas frequências calculadas. Porém, variáveis como Glicose, creatinina e plaquetas, foram descritas por estatística-resumo (média e desvio-padrão).

## Resultados

Tendo, no total, 158 participantes de pesquisa, estes foram alocados em dois grupos. O grupo caso foi constituído por 78 portadores de AVC Hemorrágico/Aneurisma, sendo que 49 eram mulheres (62,8%) e 29 eram homens (37,2%), com idade média de 55  $\pm$  6 anos. Já o grupo controle, era formado por 80 participantes de pesquisa considerados saudáveis, sendo 39 mulheres (48,8%) e 41 homens (51,2%), com idade média de 54  $\pm$  1 anos. Vale ressaltar que não houve diferença estatística entre as variáveis sexo ( $p=0,075$ ) e idade ( $p=0,186$ ).

A Tabela 1 apresenta as frequências genotípicas e alélicas do gene *BCL2*, em ambos os grupos. O genótipo *ala43ala* foi encontrado em 88,5% dos pacientes do grupo caso ( $n = 69$ ) e em 75% do grupo controle ( $n = 60$ ). Enquanto que o genótipo *thr43thr* não fora visto no grupo caso, mas foi encontrado em 21,3% dos participantes de pesquisa do grupo controle. Além disso, foi encontrado uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,048$ ).

Ao avaliar as frequências alélicas, nota-se que o alelo *ala* foi encontrado com maior frequência em ambos os grupos estudados. Logo, o alelo mutante, *thr*, atuou como um fator protetor para a ocorrência de AVC Hemorrágico/Aneurisma ( $p=0,011$ ;  $OR=2,74$ ;  $IC= 1,22-6,13$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1-** Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo *BCL2* rs1801018 no estudo de caso-controle.

	<i>BCL2</i> rs1801018						
	Grupo				P	OR	IC
	AVCh/aneurisma		Controle				
	N	%	N	%			
<i>ala43ala</i>	69	88,5	60	75,0			
<i>ala43thr</i>	9	11,5	17	21,3	0,048*	NA	NA
<i>thr43thr</i>	0	0,0	3	3,8			
Total	78	100,0	80	100,0			
<i>ala43ala</i>	69	69,0	60	75,0			
<i>ala43thr/thr43thr</i>	9	9,0	20	25,0	0,028*	2,55	1,08-6,03
Total	78	78,0	80	100,0			
<i>ala</i>	147	94,2	137	85,6			
<i>thr</i>	9	5,8	23	14,4	0,011*	2,74	1,22-6,13
Total	156	100,0	160	100,0			

Teste qui-quadrado; NA = Não se aplica;  $p^* < 0,05$ .

Ao avaliar algumas características como, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), Diabetes, Tabagismo e Etilismo, somente nos participantes portadores do AVC Hemorrágico/Aneurisma, observou-se que não houve associação estatística entre a presença do polimorfismo do gene *BCL2* com as presentes características (Tabela 2).

**Tabela 2-** Associação entre o polimorfismo *BCL2* rs1801018 e as características clínicas/hábito relacionada aos pacientes do grupo caso.

Característica clínica/hábitos		<i>BCL2</i> rs1801018				P
		<i>ala43ala</i>		<i>ala43thr/thr43thr</i>		
		N	%	N	%	
HAS	Sim	55	88,7%	7	11,3%	0,893
	Não	14	87,5%	2	12,5%	
Diabetes	Sim	3	100,0%	0	0,0%	0,524
	Não	66	88,0%	9	12,0%	
Tabagismo	Sim	28	90,3%	3	9,7%	0,676
	Não	41	87,2%	6	12,8%	
Etilismo	Sim	18	81,8%	4	18,2%	0,250
	Não	51	91,1%	5	8,9%	

Teste qui-quadrado; HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica.

A Tabela 3 descreve estatísticas-resumo de alguns parâmetros bioquímicos, como glicemia, creatinina e plaquetas. Analisando somente o parâmetro plaquetas, percebe-se um aumento em sua média quando associado à ausência

do alelo mutante *thr*. Porém, o valor ainda encontra-se dentro da normalidade. Vale realçar que, somente para este parâmetro, fora encontrado uma diferença estatisticamente significativa ao analisar os genótipos ( $p=0,010$ ).

**Tabela 3-** Estatísticas-resumo da glicemia, creatinina e plaquetas conforme a presença polimorfismo *BCL2* rs1801018 relacionada aos pacientes do grupo caso.

Variável laboratorial	<i>BCL2</i> rs1801018						p
	<i>ala43ala</i>			<i>ala43thr/thr43thr</i>			
	Média	Desvio padrão	N válido	Média	Desvio padrão	N válido	
Glicose (mg/dL)	107	22	62	95	21	9	0,131
Creatinina (mg/dL)	1,1	1,4	67	0,9	0,1	9	0,578
Plaquetas (x100.000 mm <sup>3</sup> )	330	72	67	262	70	9	0,010*

Teste qui-quadrado;  $p^* < 0,05$ .

## Discussão

O Acidente Vascular Cerebral é uma doença que apresenta maior prevalência de óbitos no Brasil, sendo também vista como uma das patologias que causa incapacidade no mundo. Como característica, acomete predominantemente adultos de meia-idade e idosos.<sup>8</sup> Essa é vista mais mulheres do que homens, porém no estudo de Carvalho e colaboradores<sup>9</sup>, realizado em Rio Verde - Goiás (Brasil), o AVC foi encontrado mais em homens do que em mulheres, sendo justificado pelos autores, que provavelmente esse achado se deve ao fato da amostra ser composta, em sua maior parte, pelo gênero masculino.

O AVC é uma patologia que envolve causas multifatoriais, o que torna o seu diagnóstico mais complexo, além de deixar claro que é necessário a mudança no estilo de vida.<sup>10-11</sup> Os membros da família Bcl-2 são conhecidos por seu papel antiapoptótico<sup>5</sup>, e a supressão de sua expressão aumenta o risco de apoptose e necrose celular.

No presente trabalho, foi explorada a possibilidade da associação do polimorfismo rs1801018 no gene *BCL2* e a sua relação com as manifestações clínicas em pacientes portadores do AVC Hemorrágico/Aneurisma.

Ao avaliar a frequência alélica do polimorfismo no gene *BCL2* (rs1801018), nota-se que o alelo *ala* foi encontrado em 94,2% dos participantes de pesquisa do grupo caso, e que esse alelo foi considerado um fator de risco para o desenvolvimento de AVC Hemorrágico/Aneurisma ( $p=0,011$ ; OR=2,74). No estudo de Avetyan e colaboradores<sup>12</sup>, realizado na Armênia (Ásia), o alelo *ala* (A), ou selvagem, era visto com maior frequência em pacientes com estresse pós traumático. Estudos em outras doenças, como câncer de tireoide, câncer de esôfago e hepatite C, também encontraram o mesmo achado.<sup>13-15</sup>

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de um AVC/Aneurisma é a pressão arterial alta, não controlada, diabetes, uso de bebidas alcoólicas em excesso e o tabagismo.<sup>16-17</sup> Ao analisar o polimorfismo do

gene *BCL2* associado com a presença das manifestações clínicas, HAS e Diabetes, e hábitos, Tabagismo e Etilismo, notou-se que não estavam estatisticamente associada a ocorrência do AVC Hemorrágico/Aneurisma.

Características bioquímicas e hematológicas, como glicose e plaquetas, foram avaliadas. A glicemia média encontrada não está acima dos valores de referência para risco de diabetes, e também não demonstra diferença estatística significativa ( $P=0,131$ ). É importante destacar que os critérios de diagnóstico da Organização Mundial de Saúde (OMS) para diabetes são: glicose no plasma em jejum  $\geq 126\text{mg/dL}$  ou 2-h glicose plasmática  $\geq 200\text{mg/dL}$ .<sup>18</sup>

No entanto, um fato relevante identificado neste estudo foi a diferença estatística ( $p=0,010$ ) em relação à média do número de plaquetas dos pacientes, sendo que o alelo mutante (*thr*) apresentou um número de plaquetas reduzidas. Na literatura, um estudo, realizado por Xiang e colaboradores<sup>19</sup>, verificou a existência da associação entre o aumento da pressão com um excesso na tensão de cisalhamento do sangue - este fenômeno provoca poros nos vasos, o que poderia ativar as plaquetas como um mecanismo de trombose do aneurisma.

Portanto, verificar que, em pacientes com AVC Hemorrágico/Aneurisma, a ausência do alelo mutante aumenta o número de plaquetas, pode ser um passo de entender que a ausência da mutação está contribuindo para o acionamento antiapoptótico destas células, o que favorece, indiretamente, o aumento do número de células. No entanto, estudos de expressão gênica deverão ser executados para dar suporte a esta hipótese.

## Conclusão

Observa-se que no polimorfismo do gene *BCL2* (rs1801018), o alelo *thr* (mutante) está associado ao AVC Hemorrágico/Aneurisma, sendo este considerado um fator de proteção para o desenvolvimento da enfermidade.

A ausência do alelo mutante no polimorfismo estudado, foi associada ao aumento médio do número de plaquetas nos indivíduos portadores da enfermidade AVC Hemorrágico/Aneurisma. Porém, ao avaliar as demais condições clínicas, hábitos e variáveis laboratoriais, não foi encontrada nenhuma diferença estatística.

Estudos em outras regiões gênicas e em outras populações devem ser realizados para a melhor compreensão da participação dos mecanismos pró e antiapoptóticos na enfermidade AVC Hemorrágico/Aneurisma.

## Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. FAP-DF.

Agradecemos a Patrícia Albuquerque de Andrade Nicola pelas opiniões acerca da escrita do artigo.

## Financiamento

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

## Referências

1. Nettina SM. Práticas da enfermagem. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.
2. Lopes LF. Perfil dos pacientes com aneurisma cerebral em um instituto de neurologia no município de porto velho - rondônia. Centro Univversitário São Lucas. 2018.
3. Bath PMW, Krishnan K. Interventions for deliberately altering blood pressure in acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2014(10).
4. Botelho T de S, Neto CDM, de Araújo FLC, de Assis SC. Epidemiologia do Acidente Vascular Cerebral no Brasil. *Temas de saúde.* 2016;16(2):1-18.
5. Siddiqui WA, AHAD A, Ahsan H. No Title The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis. *Arch Toxicol.* 2015;89:289-317.
6. NCBI. BCL2 BCL2 apoptosis regulator [Homo sapiens (human)]. 2020.
7. Simani L, Naderi N, Khodaghali F, Mehrpour M, Nasoohi S. Association of Long-Term Atorvastatin with Escalated Stroke-Induced Neuroinflammation in Rats. *Journal Mol Neurosci.* 2016;61.
8. Almeida SRM. Análise epidemiológica do acidente vascular cerebral no Brasil. *Rev Neurociencias.* 2012;20(4):481-2.
9. Carvalho VP, Ribeiro HLS, da Rocha BVE, Barcelos KA, de Andrade FV, Vasconcelos GR, et al. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com acidente vascular cerebral. *Rev Saúde e Desenvol.* 2019;13(2011):50-61.
10. Alves CL, de Santana DS, Aoyama E de A. Acidente vascular encefálico em adultos jovens com ênfase nos fatores de risco. *ReBIS Rev Bras Interdiscip Saúde.* 2020;2:1-6.
11. Cardoso M. O AVC no jovem adulto. Quais são as causas? [Internet]. 2017. Available from: <https://lifestyle.sapo.ao/saude/saude-e-medicina/artigos/o-avc-no-jovem-adulto-quais-sao-as-causas>
12. Avetyan D, Arakelyan A, Mkrtchyan G. Association of Bax and Bcl-2 Functional Polymorphisms and Protein Levels with Posttraumatic Stress Disorder. *J Biosci Med.* 2018;06(02):23-32.
13. Eskander EF, Abd-Rabou AA, Mohamed MS, Yahya SMM, Shaker OG. Does HCV patients who have BCL2 43Ala genotype and normal GH1 levels can achieve response to IFN based therapy? *Indian J Clin Biochem.* 2012;27(4):344-50.
14. Eun YG, Hong IK, Kim SK, Park HK, Kwon S, Chung DH, et al. A polymorphism (rs1801018, Thr7Thr) of BCL2 is associated with papillary thyroid cancer in Korean population. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2011;4(3):149-54.
15. Jain M, Kumar S, Lal P, Tiwari A, Ghoshal UC, Mittal B. Role of BCL2 (ala43thr), CCND1 (G870A) and FAS (A-670G) polymorphisms in modulating the risk of developing esophageal cancer. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(3):225-32.
16. Ministério da Saúde. Aneurisma [Internet]. Biblioteca Virtual em Saúde. 2018. Available from: <http://bvsmms.saude.gov.br/dicas-em-saude/2795-aneurisma>
17. Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares. Acidente Vascular Cerebral [Internet]. Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares. Available from: [http://www.sbdcv.org.br/publica\\_avc.asp](http://www.sbdcv.org.br/publica_avc.asp)
18. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. 2019.
19. Xiang J, Ma D, Snyder K V., Levy EI, Siddiqui AH, Meng H. Increasing Flow Diversion for Cerebral Aneurysm Treatment Using a Single Flow Diverter. *Neurosurgery.* 2014;75(3):286-94.

### Autor de Correspondência

Izabel Cristina Rodrigues da Silva.  
Campus Universitário, s/n, Centro  
Metropolitano. CEP: 72220-275. Brasília, Distrito  
Federal, Brasil.  
[belbiomedica@gmail.com](mailto:belbiomedica@gmail.com)