

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS COM MALFORMAÇÃO
ARTÉRIOVENOSA CEREBRAL ESPORÁDICA NÃO FOI REPLICADA EM
UMA POPULAÇÃO DO SUL DO BRASIL.

André Cerutti Franciscatto

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stefani

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS COM MALFORMAÇÃO
ARTÉRIOVENOSA CEREBRAL ESPORÁDICA NÃO FOI REPLICADA EM
UMA POPULAÇÃO DO SUL DO BRASIL.

André Cerutti Franciscatto

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stefani

Dissertação de Mestrado
apresentada no Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Cirúrgicas para obtenção de
título de Mestre em Ciências
Cirúrgicas.

CIP - Catalogação na Publicação

Franciscatto, André Cerutti

Associação de polimorfismos genéticos com malformação artériovenosa cerebral esporádica não foi replicada em população do sul do Brasil / André Cerutti Franciscatto. -- 2013.

193 f.

Orientador: Marco Antônio Stefani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Polimorfismo genético. 2. Malformação arteriovenosa cerebral. 3. acidente vascular cerebral hemorrágico. 4. polimorfismo de único nucleotídeo. I. Stefani, Marco Antônio, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Dra. Fernanda Sperb Ludwig, Dra. Úrsula da Silveira Matte e Simone Mota pela colaboração direta e co-autoria da pesquisa.

DEDICATÓRIA

À Maurice Zanini, minha esposa, pela inspiração também no universo da ciência e da pesquisa. Aos Arisoli Adão Franciscatto, Rosane Maria Cerutti Franciscatto, Paulo Cerutti Franciscatto e Miguel Cerutti Franciscatto, pais e irmãos, pelo estímulo e suporte desde o princípio dessa jornada. Aos amigos e colegas da INEURO pela amizade e apoio logístico.

“The true method of knowledge is experiment.”

William Blake

SUMÁRIO

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
2. INTRODUÇÃO	10
3. REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 MÉTODOS DA REVISÃO	11
3.2 RESULTADOS DA REVISÃO.....	13
3.3 DISCUSSÃO DA REVISÃO	14
3.4 CONCLUSÕES DA REVISÃO	32
4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO	33
5. OBJETIVOS.....	43
6. ARTIGOS ORIGINAIS	44
6.1 Artigo 1 em Inglês: SISTEMATIC REVIEW OF GENETIC POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH BRAIN ARTERIOVENOUS MALFORMATION.....	45
6.2 Artigo 1 em Português: REVISÃO SISTEMÁTICA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS COM MALFORMAÇÃO ARTÉRIOVENOSA CEREBRAL.....	79
6.3 ARTIGO 2 EM INGLÊS: POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH SPORADIC BRAIN ARTERIOVENOUS MALFORMATION ARE NOT REPLICATED IN A POPULATION FROM SOUTH BRAZIL.....	115
6.4 artigo 2 em Português: ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS COM MALFORMAÇÃO ARTÉRIOVENOSA CEREBRAL ESPORÁDICA NÃO FOI REPLICADA EM UMA POPULAÇÃO DO SUL DO BRASIL.....	130
7. ANEXOS.....	146
7.1 Figuras Artigo 1 em Inglês	147
7.1.1 Figure 1	148
7.1.2 Figure 2.....	150
7.1.3 Figure 3	152
7.2 Figuras Artigo 1 em Português e da Revisão da Literatura	154
7.2.1 Figura 1	155
7.2.2 Figura 2	157
7.2.3 Figura 3.....	159
7.3 Tabelas Artigo 1 em Inglês	161
7.4 Tabelas Artigo 1 em Português e da Revisão da Literatura	164

7.5 Legendas Artigo 1 em Inglês	167
7.6 Legendas Artigo 1 em Português e da Revisão da Literatura	169
7.7 Tabelas Artigo 2 em Inglês	171
7.7.1 Table 1	172
7.7.2 Table 2	174
7.7.3 Table 3	176
7.7.4 Table 4	178
7.8 Tabelas Artigo 2 em Português	180
7.8.1 Tabela 1	181
7.8.2 Tabela 2	183
7.8.3 Tabela 3	185
7.8.4 Tabela 4	187
7.9 Legendas Artigo 2 em Inglês	189
7.10 Legendas Artigo 2 em Português	191

1. LISTA DE ABREVIATURAS

ACVRL1 – activin receptor-like Kinase.

ANGPT/ANGPTL - Angiopoietins/angiopoietin-like proteins.

APOE - Apolipoprotein E.

BAVM – Brain Arterio-venous Malformation.

DAVF- dural arteriovenous fistulas.

ENG – Endoglin.

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

EPHB4 - Erythropoietin-producing hepatocellular receptor B4.

FAVD – Fístula Artério-Venosa Dural

FLT4 – fms-related tyrosine kinase 4.

GWAS - genome-wide association studies

HHT – Hemorrhagic telangiectasia.

HIC – Hemorragia Intracraniana

HWE – Hardy-Weinberg equilibrium.

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

ICH – Intracranial Hemorrhage.

IL- Interleukin.

IL17A – Interleukin 17A.

KDR – kinase insert domain receptor.

MAV – Malformação artério-venosa cerebral

MMP - Matrix metalloproteinase.

PNU – Polimorfismo de nucleotídeo único

SNP – Single Nucleotide polymorphism.

TEK – tyrosine kinase.

TGFA – transforming growth factor alpha.

TGFB – Transforming Growth Factor-Beta.

TGFBR1 – transforming growth factor beta receptor I, as known as activin-like kinase receptor 5.

TGFRB2 – transforming growth factor beta receptor II.

THH – Teleangiectasia Hemorrágica Hereditária

TNF – tumor necrosis factor alpha. O símbolo mudou de TNFA (TNF-alpha) para TNF em 1996 pelo comitê de Nomenclatura HUGO (decriso na revisão da literatura), uma vez que o gene da linfotóxina alfa, originalmente TNFB (TNF-beta) foi atualizado para LTA.

VEGFA – vascular endothelial growth factor A.

2. INTRODUÇÃO

As malformações arteriovenosas (MAV) cerebrais são uma causa de hemorragia intracraniana (Acidente Vascular Cerebral hemorrágico). Sua morfologia básica é um emaranhado de vasos anormais e dilatados, com tecido cerebral e gliose entre eles, chamado de nidus, que produz comunicações (shunt) entre a circulação arterial e venosa sem um verdadeiro leito capilar (40). A prevenção do sangramento ou do ressangramento de uma MAV é o objetivo do tratamento. A melhoria do conhecimento genético sobre as MAVs poderia auxiliar no desenvolvimento de novas formas de tratamento ou terapias preventivas.

Além disso, ao identificar milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (PNU), a tecnologia de genotipagem impulsionou dramaticamente o rendimento de estudos de associação genética. Traduzir esses dados em uma informação útil para a ciência da saúde depende em revisões sistemáticas e síntese do conhecimento (21).

A presente dissertação possui dois artigos. O primeiro é fruto de uma revisão sistemática da literatura, base teórica desse trabalho, que será apresentada inicialmente. O segundo foi elaborado a partir de um estudo experimental. O objetivo da revisão é explorar os dados disponíveis a respeito da análise de PNUs nas MAVs e sua implicação tanto para o desenvolvimento da malformação propriamente dita quanto para seu risco de sangramento.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MÉTODOS DA REVISÃO

Essa revisão da literatura foi realizada em método sistematizado utilizando o protocolo PRISMA (41) para sua elaboração e gerou um artigo original.

Uma pesquisa na base de dados PUBMED (de 1950 até o presente) foi realizada, utilizando uma combinação de um ou mais das seguintes palavras chave: arteriovenosa, genética, malformação vascular cerebral, polimorfismo, único nucleotídeo e patogênese. Uma pesquisa complementar foi feita no navegador HuGE (*A Navigator for Human Genome Epidemiology*)(60). Nós também revisamos as referências de todos os artigos a procura de outros estudos relevantes ou citações, incluindo aquelas cujo foco era a telangiectasia hemorrágica hereditária (THH). Não foram incluídas as publicações de THH na análise final. A última pesquisa foi realizada em 20 de Julho de 2012.

Os critérios de seleção dos estudos foram artigos originais sobre polimorfismos genéticos em MAVs. Somente artigos em Inglês foram selecionados. Trabalhos que estudavam a genética de cavernomas, anomalias venosas do desenvolvimento ou aneurismas foram excluídas. Artigos de revisão também foram excluídos para evitar dupla inclusão de dados.

Os artigos foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo estudou o impacto das PNUs no desenvolvimento da MAVs. O segundo avaliou os polimorfismos associados ao risco do sangramento de uma MAV.

Os dados extraídos dos artigos foram: frequências dos alelos entre os casos e controles, número de participantes, Risco Relativo (RR), Odds Ratio (OR) ou Hazard Ratio (HR) e seus intervalos de confiança para o risco de desenvolvimento de MAV ou de sangramento, desenho do estudo, desfechos, a lógica funcional para seleção de cada PNU e método de análise genética. Somente polimorfismos comuns foram incluídos (frequência do menor alelo maior do que 1%). Os dados fornecidos nos artigos não foram uniformes. Para comparar os riscos entre os diversos polimorfismos, realizamos uma tentativa de padronizar os cálculos. Um modelo dominante (29) para o menor alelo foi usado para calcular os novos ORs e intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Uma tentativa de análise conjunta dos dados foi tentada somente se dois ou mais estudos com o mesmo desfecho investigaram o mesmo PNU.

A análise estatística foi feita com o Qui-quadrado de Pearson. Quando as pressuposições distribucionais ou um valor esperado de menos de 5 observações em cada célula não foram obtidos, nós realizamos um teste de Fisher. O nível de significância desse estudo foi de 5%.

Gráficos de *Forest Plot* foram criados utilizando o programa de informática *Forest Plot Viewer* (5).

Devido à discrepância encontrada nos nomes e símbolos dos genes utilizados pelos diferentes autores, nós utilizamos o protocolo preconizado pelo comitê de nomenclatura genética da HUGO (51) para descrever tanto as abreviações, conhecidas como símbolo do gene, quanto os nomes descritivos. Nesse artigo, apresentaremos a nomenclatura em língua portuguesa e a nomenclatura padronizada em língua inglesa preconizada pelo referido comitê.

O nome utilizado para cada PNU foi padronizado pelo identificador de variação da sequência (de acordo com a HGVS – *Human Genome Variation Society*), utilizando o banco de dados de variações genéticas curtas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (52), *Ensembl Gene Browser* (11) e *1000 Genomes Project* (8). Nós apresentamos as variações com o identificador *dbSNP*. Em poucos casos, não foi possível encontrar o identificados *dbSNP*. Somente nesses casos o nome comum (sequência e nucleotídeo modificado) foi apresentado.

3.2 RESULTADOS DA REVISÃO

Utilizando as palavras chaves descritas previamente, 273 artigos foram encontrados no PubMed (mais 1 artigo encontrado na base de dados do *HuGE Navigator*). Desses, somente 38 estudos preencheram critérios de elegibilidade para análise do texto completo (figura 1). Desses, seis foram experimentos em animais, 4 séries de casos, 8 casos-controles analisando marcadores teciduais, 3 casos-controles estudando polimorfismos que aumento o risco de hemorragia, 3 estudos de coortes que avaliaram o risco de sangramento segundo perfis genéticos, 6 estudos de casos-controles populacionais que avaliaram PNUs e riscos de desenvolvimento de MAVs, 1 estudo de caso-controle desenhado para avaliar a associação de PNUs tanto com o desenvolvimento de MAVs quanto risco de hemorragia intracraniana e 7 revisões da literatura.

Treze estudos forneceram data a respeito dos riscos do desenvolvimento de MAVs ou de sangramento a malformação para 61 PNUs. A tabela 1 sumariza as PNUs, desenho do estudo, desfechos, lógica funcional e metodologia de análise genética. Ao todo, esses estudos relataram um total de 68 análises de associação. Sete delas apresentaram associação significativa com a presença de MAVs (Figura 2) e 6 PNUs foram associados com o risco de sangramento de uma malformação (Figura 3).

Infelizmente, não foi possível realizar a análise conjunta dos dados pois não havia PNUs comparáveis (estudos com mesmo desenho e mesmo desfecho).

Apresentamos OR não ajustado, calculado baseado nos dados disponíveis nos estudos selecionados. A maioria dos artigos calculou o OR controlado para a idade e sexo. A ancestralidade do indivíduo também foi incluída para ajuste em alguns poucos artigos. Nenhuma dessas análises multivariáveis demonstraram diferenças relevantes quando comparada com as análises não ajustadas. Alguns dados foram extraídos de estudos de coorte. Nesse tipo de desenho de estudo os autores forneceram HR e RR que possuem propriedades particulares, apresentadas e discutidas.

3.3 DISCUSSÃO DA REVISÃO

Tradicionalmente, as MAVs têm sido classificadas como lesões congênitas resultado de um desenvolvimento vascular anormal (40).

Entretanto, muitos autores têm sugerido que elas não são lesões congênitas estáticas, mas são dinâmicas, com a capacidade de crescer, progredir e até mesmo reaparecer como novas MAVs após a completa ressecção ou radiocirurgia(40). Existem até mesmo alguns relatos de MAVs sendo diagnosticadas em pacientes com ausência de malformações vasculares em exames prévios (40).

Eventos precipitantes incluiriam traumas subclínicos, hipóxia tecidual, infecção, inflamação, irradiação ou compressão, talvez envolvendo hipertensão venosa localizada como potente estímulo angiogênico para o crescimento ou mesmo origem de uma MAV (24).

Por outro lado, a associação de MAVs com desordens genéticas bem definidas, como a Síndrome Ataxia-Telangiectasia, Síndrome de Wyburn-Mason, doença de Osler-Weber-Rendu, Síndrome de Sturge-Weber e THH parecem dar suporte à importância de fatores genéticos na sua patogênese (10).

1. Genes relacionados à telangiectasia Hemorrágica Hereditária

A THH é uma desordem autossômica dominante com alta prevalência de MAVs que pode ser considerada um modelo natural para a doença esporádica (24). As MAVs herdadas na THH possuem alguns achados morfológicos distintos, mas são geralmente similares às lesões esporádicas e não podem

ser diferenciadas individualmente com base em sua arquitetura vascular (32, 37).

A maioria dos casos de THH envolve mutações com perda de função de dois genes originalmente implicados nas vias de sinalização do Fator Transformador de Crescimento – Beta (*Transforming Growth Factor Beta* - TGFB): (1) endoglina (*endoglin* - ENG), que codifica uma proteína assessória do complexo receptor TGFB; e (1) Quinase Tipo Receptor de Ativina 1 (*activin receptor-like kinase 1* – ACVRL1 ou ALK1) que codifica uma quinase transmembrana (47) .

1.1 Fator Transformador de Crescimento - Beta

O papel da família de fatores transformadores do crescimento no desenvolvimento vascular é complexo e multidimensional. Nos estágios iniciais, o TGFB inibe a proliferação vascular; em estágios mais tardios, ele promove a diferenciação do tecido mesenquimal circunjacente para pericitos e células musculares lisas (40).

O complexo receptor ligante do TGFB foi implicado na THH. A superfamília do TGFB engloba uma série de polipeptídeos reguladores do crescimento (17). As vias de sinalização do TGFB são complexas e interconectadas (56). Mutações com perda de função nos dois genes das vias dessa via de sinalização (ENG e ACVRL1) são implicadas nos dois principais subtipos da THH (35). Comparadas com as lesões esporádicas, a presença de uma

mutação nos genes da ENG ou ACVRL1 resultam, respectivamente, em aumento de 10000 e 1000 vezes o risco de desenvolvimento de MAV (24).

Um estudo de caso-controle recrutou 53 pacientes com MAVs e 120 controles sadios. Todos os participantes eram da etnia chinesa Han do sul daquele país. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na PNU rs1800469, envolvendo o TGFB1, entre pacientes com MAVs e controles ($\chi^2 = 2,380$; $P = 0,304$) e entre pacientes com e sem hemorragia ($\chi^2 = 1,330$; $P = 0,514$) pelos autores (20). Ao contrário dos autores, que utilizaram um modelo de genótipo completo, nós encontramos uma tendência para diferença significativa entre os pacientes com MAV e os controles, utilizando um modelo dominante (Figura 2).

1.2 Endoglia

A ENG aumenta a proliferação endotelial, ativa as células mesenquimais a se diferenciarem no interior da matriz para periquitos e células tronco; essas células migram e circulam os condutos endoteliais segundo a influência do fator transformador do crescimento alfa (*transforming growth factor alpha* – TGFA) (47). Camundongos *knockout* para ENG apresentam uma sequência completa para formação de MAVs, com remodelamento do plexo capilar retardado, aumento da proliferação de células endoteliais e MAVs localizadas. O revestimento muscular típico das comunicações arteriovenosas parece ser secundário à resposta do fluxo sanguíneo aumentado (33).

A análise comparativa de imuno-histoquímica das MAVs e de tecidos cerebrais normais demonstrou que a ENG é expressa em níveis similares nas camadas endoteliais e adventícias das artérias e arteríolas normais bem como artérias e veias arterializadas das MAVs esporádicas. Ao contrário dos achados dos pacientes com THH tipo 1, essas MAVS expressam níveis normais de ENG no endotélio (36).

Sete polimorfismos da ENG foram avaliados em 177 pacientes com MAV comparados com controles saudáveis. Dois polimorfismos, rs10987759 e rs11545664, demonstraram uma tendência de associação com presença de MAV em um modelo de genótipo completo que não alcançou significância estatística (44). Utilizando um modelo dominante, a frequência do alelo A da PNU rs11545664 foi diferente entre casos e controles (figura 2).

1.3 Quinase Tipo Receptor de Activina 1

A ablação específica do gene *ACVRL1* de células endoteliais de modelos murinos causam a formação de MAV durante o desenvolvimento, enquanto que camundongos que possuem um *knockout* específico to receptor de fator transformador de crescimento beta I (*transforming growth factor beta receptor I* - TGFBR1 - também conhecido como *ativin-like kinase receptor 5*) ou receptor do fator transformador de crescimento II (*transforming growth factor beta receptor II* - TGFBR2) demonstraram tanto a formação de MAV quanto outros distúrbios da morfogênese vascular (42).

Uma variação intrônica da ACVRL1, rs2071219, esteve presente em maior frequência em casos de MAV em comparação a controles saudáveis (Qualquer A contra GG, regressão logística univariável; OR = 2,47; IC 95%= 1,38-4,44; P = 0,002) (44). Nenhuma associação foi evidenciada em nossos cálculos no modelo dominante para o alelo menor G (figura 2).

Outro estudo que incluiu tanto MAV quanto fístulas arteriovenosas durais (FAVD) identificou uma diferença estatisticamente significativa na associação entre o polimorfismo da ACVRL1 IVS3 -35A>T e o desenvolvimento de MAVs e FAVDs (OR = 1,73; 95% CI = 1,19–2,51; P = 0,004 após ajustes para idade e gênero). Em contraste, nenhuma associação significativa foi encontrada para o PNU IVS9 +45C>T (54). Como os autores apresentaram os dados de MAVs e FAVDs agrupados, nos foi impossível realizar a análise apenas dos pacientes com MAVs.

2. Polimorfismos envolvendo outros genes

2.1 Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (APOE) funciona como um supressor importante da secreção por parte das células gliais do Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor* – TNF) (25). A APOE também promove o efluxo de lipídeos de astrócitos e neurônios (26). O genótipo da APOE tem sido implicado em diversos fenótipos de doenças humanas, incluindo o acidente vascular

encefálico hemorrágico e a hemorragia subaracnóide (28). A ordem de potência das isoformas da APOE como ligante de lipídeos é APOE $\epsilon 2 >$ APOE $\epsilon 3 =$ APOE $\epsilon 4$ em astrócitos e APOE $\epsilon 2 >$ APOE $\epsilon 3 >$ APOE $\epsilon 4$ em neurônios (38). Uma vez que a APOE $\epsilon 2$ liga-se com maior afinidade com lipídeos, essa isoforma pode não ser tão facilmente disponível para suprimir a secreção glial do TNF em MAVs quanto as demais isoformas. O genótipo $\epsilon 2$ podem ainda conferir uma atividade proteolítica aumentada, contribuindo para a patogênese da hemorragia da MAV (45).

Imagens cerebrais de 284 pacientes com MAV foram estudadas para novos sangramentos após o diagnóstico em outro estudo longitudinal. A APOE $\epsilon 2$ (HR = 8,71; IC 95% = 1,4–53,9; P = 0,020; modelo multivariável ajustado para a apresentação clínica), mas não o alelo $\epsilon 4$, esteve associado com novos eventos hemorrágicos no curso natural da doença (43). Não encontramos nenhuma associação entre o alelo $\epsilon 2$ da APOE e sangrento intracraniano na análise de OR (Figura 3).

Adicionalmente, uma coorte com 255 pacientes que foram submetidos a tratamento de MAV (embolização, ressecção cirúrgica, radiocirurgia ou uma combinação dessas) foi genotipada e longitudinalmente seguida (média de seguimento de 8 anos e distância interquartílica de 1,6 anos). Os autores sugeriram que o genótipo $\epsilon 2$ da APOE pode contribuir para aumentar o risco de sangramento após o paciente ter sido tratado (HR = 3,2; IC 95% = 1,0–97; P = 0.042) (1). Novamente, não encontramos diferença na análise por OR (Figura 3).

2.2 Metaloproteinases da Matriz

As metaloproteinases da Matriz (*Matrix metalloproteinases* - MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas que degradam a matriz proteica extracelular, moléculas da superfície celular e outras substâncias pericelulares (31). A degradação excessiva da matriz vascular pelas MMPs poderia resultar em uma desestabilização dos vasos, que potencialmente poderia levar ao enfraquecimento da parede dos vasos e dilatação passiva (12, 13). Esse é um passo crítico na angiogênese e remodelamento vascular (58). Entretanto, isso também parece ser importante para o fenótipo histológico das MAVs. Esse fenótipo é caracterizado por vasos que são estruturalmente incompletos, consistindo de artérias nutridoras alargadas, massas emaranhadas de vasos sanguíneos e veias arterializadas dilatadas (61).

A associação entre genótipos da MMP3 e risco de desenvolvimento de MAV foi avaliado em um estudo de casos e controles envolvendo uma população chinesa de 319 pacientes com MAV e 333 controles. Um total de cinco PNUs (rs569444, rs650108, rs522616, rs632478 e rs645419) nesse gene foi analisado. Esse trabalho observou que somente rs522616 foi associado com MAV esporádica (OR = 0,68, IC 95% = 0,49–0,94; P = 0,019 para AG + GG comparado com o genótipo AA; ajustado para idade e gênero) (61). Em nossa análise não foi encontrado essa associação (Figura 2).

2.3 Genes relacionados à angiogênese

As MAVs exibem ativação do processo de angiogênese, incluindo expressão aumentada de Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (*vascular endothelial growth factor A* - VEGFA) e outros fatores angiogênicos e aumento da proliferação de células endoteliais. Assim, é possível que as MAVs escapem de um processo de desligamento da angiogênese em adultos e que o crescimento das lesões ocorra por um processo de retroalimentação positiva autócrina (26).

A produção de fatores angiogênicos pelas MAVs pode também ter consequências adversas para outras células da unidade neurovascular (26). Por exemplo, secreção anormal de fatores de crescimento pela MAV pode causar uma estimulação inapropriada da proliferação neuronal ou glial (15). Além disso, o VEGFA e outros fatores angiogênicos aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica que poderia, por sua vez, predispor à ruptura da parede vascular (26).

2.3.1 Fator de crescimento endotelial vascular A

A vasculogênese cerebral ocorre fora do parênquima cerebral, com a formação de um plexo perineural. Os capilares espalham-se a partir do plexo e penetram no tubo neural (46). O crescimento subsequente da vasculatura cerebral ocorre inteiramente pela angiogênese, cuja primeira fase envolve a proliferação e migração das células endoteliais. Um mediador chave desse

processo é o VEGFA que é produzido pelas células neurectodérmicas em desenvolvimento e seus progenitores neurais e gliais, em resposta à hipóxia (14). O VEGFA também regula o aumento da permeabilidade capilar. Os capilares em desenvolvimento são caracterizados pela alta permeabilidade e baixos níveis de proteínas juncionais intercelulares (50, 57).

Foi demonstrado que os astrócitos podem secretar VEGFA quando expostos a um ambiente hipóxico. Esse ambiente hipóxico pode ser induzido pelas comunicações (shunts) arteriovenosas existentes na MAV (40).

Um estudo de caso-controle genotipou 319 pacientes com MAV e 333 controles. Esse estudo avaliou 9 PNUs do gene do VEGFA (rs1547651, rs2010963, rs1413711, rs833069, rs3024994, rs3025010, rs3025030, rs3025035, e rs3025039). Quatro dessas variantes e um haplótipo, ACT, foram implicados em uma possível associação com o risco de desenvolver MAV. Em uma regressão logística ajustada para idade e gênero, três PNUs em um modelo codominante (OR = 1,61; IC 95% = 1,01-2,56; P = 0,044 para rs2010963; OR = 1,68; IC 95% = 1,05-2,7; P = 0,031 para rs833069 e OR = 0,49; IC 95% = 0,27-0,91; P = 0,024 para rs3025010), duas PNUs em um modelo dominante (OR, 0,61; IC 95% = 0,4-0,93; P = 0,023 para rs1547651 e OR = 1,44; IC 95% = 1,02-2,02; P = 0,038 para rs833069) e uma PNU em um modelo recessivo (OR = 0,48; IC 95% = 0,26-0,88; P = 0,017 para rs3025010) tiveram associações significativas com o risco de MAV (6).

Nenhuma associação entre VEGFA rs699947 e apresentação hemorrágica em pacientes com MAV foi encontrada (P = 0,6) em um estudo caso-controle com 180 pacientes. Os autores não apresentaram o cálculo de

risco (45). Nós calculamos o risco em um modelo dominante para os genótipos AA e AC contra CC (Figura 3).

2.3.2 Angiopietina

Membros do grupo proteico das Angiopietinas ou Semelhantes à Angiopietina (*Angiopietins/angiopietin-like*, ANGPT/ANGPTL) e seus receptores, Tirosina Quinase Endotelial (*endothelial tyrosine kinase*, TEK), desempenham uma função crítica na angiogênese e na estabilidade vascular (18, 55). A ANGPT1, uma agonista dos receptores TEK, promove uma interação entre as células endoteliais e células de suporte periendoteliais para estabilizar vasos (9, 18, 55). A ANGPT2 é uma antagonista para o receptor TEK cuja ação desestabiliza essas ligações prevenindo a estimulação realizada pela ANGPT1 (18, 34). Os fenótipos vasculares observados pela expressão excessiva da ANGPT2 ou interrupção homozigótica do gene TEK são muito similares aos vasos da MAV (18). Eles apresentam vasos anormalmente dilatados que carecem de estrutura de suporte maduro periendotelial. Similarmente, mutações com perda de função dos genes da TEK são encontradas em pacientes com malformações venosas muco-cutâneas, uma lesão vascular que lembra MAV (18).

Uma correlação positiva entre ANGPT2 e níveis de VEGFA em espécimes cirúrgicos de MAV foi relatada (9, 34) e sugere que fatores angiogênicos podem contribuir para a instabilidade vascular que resulta no sangramento da MAV (19, 48, 49).

2.3.2.1 Proteína semelhante à angiopoietina 4

Enquanto a ANGPTL4, uma glicoproteína codificada pelo gene ANGPTL4, é conhecida pelo seu papel no metabolismo lipídico (27), bem como na mediação da angiogênese tanto com efeitos pró e antiangiogênicos (30). A ANGPTL4 foi descrita como tendo a capacidade de inibir a permeabilidade vascular, a mobilidade das células tumorais, invasividade, a disseminação e a formação de estruturas tubulares (39). Sobre condições de hipóxia, a ANGPTL4 está suprarregulada tanto ao nível proteico quanto ao nível de RNA (3, 39).

Comparando polimorfismos da ANGPTL4 em 216 pacientes com MAV e 246 controles, a presença do alelo menor A da rs11672433 foi associada com um risco aumentado da presença de MAV (OR = 1,56; IC 95% = 1,01–2,41; p = 0,046; ajustado para idade e sexo) mas não com a apresentação de hemorragia em casos de MAV. Outras PNUs também foram testadas (rs2278236, rs1044250 e rs1808536), demonstrando nenhuma associação (39). A distribuição completa do genótipo nos pacientes com e sem sangramento na apresentação no grupo com MAV não foi fornecida (Figura 2).

2.3.2.2 Receptor da eritropoietina produzida por hepatócitos B4

O Receptor de eritropoietina produzida por hepatócitos (*Erythropoietin-producing hepatocellular receptor B4* - EPHB4) está envolvido na diferenciação arteriovenosa durante a embriogênese. A sinalização alterada dessa via pode levar à instabilidade vascular, resultando em HIC (59).

Em um estudo com 3 etapas (a primeira um estudo transversal, seguido por uma coorte e um estudo de caso-controle), os autores incluíram 248 pacientes com MAVs (93 com HIC e 155 sem evento hemorrágico) e 225 controles saudáveis com ancestralidade auto relatada. As PNUs com alguma associação foram então genotipadas em 102 casos adicionais (fase II: 37 pacientes com ICH e 65 sem hemorragia) e os dados foram combinados para uma regressão logística multivariável. A última análise envolveu 225 controles saudáveis, investigando-se a etiologia da MAV. Os autores identificaram 2 PNUs localizadas na terminação 5' do EPHB4, rs314313 e rs314308, que foram associadas com um risco reduzido de apresentação hemorrágica em pacientes caucasianos com MAV, mas não com suscetibilidade à MAV (59). Quando todos os 248 casos de MAV (com e sem sangramento) foram comparados com controles em um modelo genético aditivo, ajustado para idade e sexo, as PNUs rs314308 (OR = 0,76; IC 95% = 0,58 a 0,99; P = 0,046) e rs314313 (OR = 0,76; IC 95% = 0,57 a 1,02; P = 0,066) estavam associadas marginalmente com um risco reduzido de MAV. Entretanto, a redução de risco global parece ter sido influenciada pela diferença entre os 93 casos de MAV rota e controles (rs314313: OR = 0,50; IC 95% = 0,33 a 0,77; P = 0,002; rs314308: OR = 0,48; CI 95% = 0,32 a 0,72; P = 0,001). As PNUs não foram associadas com susceptibilidade à MAV quando os 155 casos não rotos foram comparados com controles (rs314313: OR = 0,94; CI 95% = 0,67 a 1,32; P =

0,713; rs314308: OR = 0,95; IC 95% = 0,70 a 1,30; P = 0,746). Esses achados sugerem a associação específica para a apresentação com hemorragia e não ao risco de MAV (59).

2.4 Citocinas Inflamatórias

As MAVs são locais de inflamação ativa. Infiltração robusta de plasmócitos B e respostas imunológicas IgG oligoclonais foram demonstradas (53). Neutrófilos, macrófagos e marcadores inflamatórios são vistos em MAVs (7). Citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas (ILs), foram relatadas estar envolvidas na lesão cerebral isquêmica. Disponibilidade aumentada de ILs no cérebro tende a exacerbar o dano causado por um insulto isquêmico (4). Citocinas inflamatórias, incluindo o TNF e algumas ILs, são potentes estimuladores tanto da angiogênese quanto da quebra da barreira hematoencefálica e podem contribuir para progressão das lesões e ruptura das MAVs (26).

2.4.1 Fator de Necrose Tumoral - alfa

A citocina TNF é um polipeptídeo pleiotrópico, pró-inflamatório e imunomodulatório, implicado nas condições envolvendo processos proteolíticos (16).

A associação dos polimorfismos do TNF (rs361525 e rs1800629) com o risco de HIC foi longitudinalmente estudados em 280 pacientes com MAVs. A PNU rs361525 foi associada com um risco aumentado de novas HICs no curso natural da MAV (HR = 4,01; IC 95% = 1,31-12,29; P = 0,015, ajustado para idade, etnia e história de HIC) (2). Esses autores também publicaram outro trabalho, mostrando associação da rs361525 com risco de HIC (HR = 3,5; IC 95% = 1,3–9,8; P = 0,016) em pacientes que foram submetidos a alguma modalidade de tratamento (embolização, ressecção cirúrgica, radiocirurgia ou qualquer combinação dos anteriores) (1). Ver Figura 3 para análise de OR.

Um estudo enfocando a associação da rs1800629 e rs361525 com apresentação hemorrágica não alcançou significância estatística (valores não corrigidos de P = 0,055 e P = 0,59, respectivamente). Os autores descreveram que a frequência do Alelo menor (A) da rs1800629 foi menor em pacientes que tiveram apresentação hemorrágica do que em pacientes com MAVs não rotas. Frequências de 0,065 contra 0,13 e P = 0,07 foram apresentadas (45). O nível de significância adotado não foi especificado na metodologia do trabalho. Entretanto, considerando que os intervalos de confiança do artigo foram de 95%, não podemos concordar com os resultados apresentados acima como sendo positivos. Sendo assim, nós recalculamos o OR em um modelo dominante. Nenhuma diferença entre as MAVs rotas e não rotas foram encontradas.

2.4.2 Interleucina 1-Beta

Um grupo de 410 pacientes portadores de MAV foram genotipados para PNUs da IL1B, rs16944, rs1143627 e rs1143634. Uma análise de sobrevida até um evento hemorrágico subsequente foi realizada. Pacientes com o genótipo CC para rs1143627 (HR = 2,7; IC 95% = 1,1–6,6; P = 0,029) ou genótipo TT para rs16944 (HR = 2,6; IC 95% = 1,1–6,5; P = 0,039) tiveram um risco maior de um novo sangramento, ajustado para idade do diagnóstico, sexo, etnia e apresentação hemorrágica. Para determinar se os polimorfismos da IL1B estavam associados com suscetibilidade aumentada para MAV, uma análise caso-controle restrita aos caucasianos foi realizada. O risco de MAV foi maior em sujeitos com genótipo CC para rs1143627 (OR = 3,2; IC 95% = 1,7–6,1; P < 0,001), genótipo TT para rs16944 (OR = 3,4; IC 95% = 1,7–6,7; P < 0,001) e genótipo CC para rs1143634 (OR = 1,8; IC 95% = 1,2–2,7; P = 0,004) após ajuste para idade e sexo (23). Nós encontramos associação similar para o risco de MAV com rs1143627 e rs1143634 (Figuras 2 e 3).

2.4.3 Interleucina - 6

A Interleucina-6 (*Interleukin-6* - IL6), uma citocina inflamatória com um possível papel no remodelamento da parede vascular das MAVs, é liberada por

células endoteliais no interior do nidus da malformação. Ela pode contribuir para a instabilidade vascular, estimulando a liberação de MMP (40).

Casos de MAV e controles saudáveis auto identificados como etnia “Latina” (n=294) foram testados para 83 marcadores informativos de ancestralidade. O polimorfismo rs1800795 foi associado com risco aumentado de MAV (OR = 1,96, IC 95% = 1,03-3,72, P = 0,039, ajustado para idade, sexo e estimativas individuais de ancestralidade) (22).

Um estudo avaliou 180 pacientes com MAVs a respeito de sua apresentação clínica. A frequência do genótipo GG para rs1800795 no gene da IL6 foi significativamente maior nos pacientes cuja apresentação foi um evento hemorrágico do que nos pacientes com MAVs não rota (OR = 2,43; IC 95% = 1,04 – 5,68; P = 0,003, corrigido para idade, sexo e etnia). A associação das variantes do rs1800795 com características demográficas e da MAV também foram avaliadas. O tamanho da MAV (OR = 2,36; IC 95% = 1,12 to 4,96; P = 0,004) e drenagem venosa exclusiva (OR = 2,36; IC 95% = 1,12 to 4,96; P = 0,001) foram significativamente associadas com a apresentação hemorrágica em homozigotos GG para rs1800795 (45).

Em um modelo dominante, nós corroboramos todos os achados da IL6 em sua associação com suscetibilidade à MAV, exceto o PNU rs1800795 (Figura 2).

5.4 Interleucina 17A

Cinquenta e três pacientes com MAV e 120 controles foram recrutados em um estudo de caso-controle, todos os quais eram chineses da etnia Han, no sul daquele país. Não foi identificada diferença significativa no polimorfismo rs2275913 do gene da Interleucina 17A (*Interleukin 17A* – IL17A) entre os pacientes com MAV e os controles ($\chi^2 = 4.737$, $P = 0.094$), ou entre pacientes com e sem história de sangramento ($\chi^2 = 5.964$, $P = 0.051$). Todavia, a frequência do alelo G do rs2275913 em pacientes com hemorragia do que em pacientes sem história de sangramento (66.7% e 45.7%, respectivamente; $p < 0.05$) (20). Em nossa análise, nenhuma associação foi encontrada para os PNUs do gene da IL17A (Figura 3)

5.5 Receptor do Fator de Crescimento Tumoral Beta II

No mesmo estudo da população Han do sul da China discutido para IL17A, com 53 pacientes com MAV e 120 controles. Os autores diferencas significativas para o PNU rs3087465 do gene do TGFRB2 entre pacientes com MAV e controles ($\chi^2 = 16.256$, $p = 0.000$). Além disso, a frequência do alelo G foi significativamente maior nos pacientes com BAVM sem hemorragia na comparação com os pacientes sem história de sangramento (20). Nós não encontramos essa associação (Figura 2).

5.6 Outras PNUs

Hemorragia intracraniana e susceptibilidade à MAV não foram associadas com outras PNUs como: Interleucina 10 (*Interleukin 10* - IL10) rs1800896, tirosina quinase relacionada à fms (*fms-related tyrosine kinase 4* - FLT4) rs1130379 e rs448012, receptor do domínio de inserção da quinase (kinase insert domain receptor - KDR) rs1870377, TEK rs682632, rs3837240 e rs10967719 (20, 45).

3.4 CONCLUSÕES DA REVISÃO

A etiologia e biologia da MAV parecem ser reguladas por uma variedade de rotas genéticas. Diversas PNUs foram identificadas como tendo associação tanto com a incidência de MAV quanto com o risco de sangramento. A identificação de polimorfismos genéticos e haplótipos associados com o desenvolvimento de MAV, bem como com seu curso clínico, poderiam contribuir com a estratificação de risco bem como iluminar sua biologia subjacente. Mais investigações sobre esses fatores genéticos são necessários, incluindo grandes estudos de associação de genoma inteiro (*genome-wide association studies* – GWAS), estudos de replicação e grandes coortes cooperativas.

4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO

1. Achrol AS, Kim H, Pawlikowska L, Trudy Poon KY, McCulloch CE, Ko NU, Johnston SC, McDermott MW, Zaroff JG, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Association of tumor necrosis factor-alpha-238G>A and apolipoprotein E2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment. **Neurosurgery** 61:731-739; discussion 740, 2007.
2. Achrol AS, Pawlikowska L, McCulloch CE, Poon KY, Ha C, Zaroff JG, Johnston SC, Lee C, Lawton MT, Sidney S, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Tumor necrosis factor-alpha-238G>A promoter polymorphism is associated with increased risk of new hemorrhage in the natural course of patients with brain arteriovenous malformations. **Stroke** 37:231-234, 2006.
3. Belanger AJ, Lu H, Date T, Liu LX, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C: Hypoxia up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: role of hypoxia inducible factor 1alpha. **J Mol Cell Cardiol** 34:765-774, 2002.
4. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ: Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. **J Neurosci** 21:5528-5534, 2001.
5. Boyles AL, Harris SF, Rooney AA, Thayer KA: Forest Plot Viewer: a new graphing tool. **Epidemiology** 22:746-747, 2011.

6. Chen H, Gu Y, Wu W, Chen D, Li P, Fan W, Lu D, Zhao F, Qiao N, Qiu H, Fu C, Mao Y, Zhao Y: Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor A gene and susceptibility to sporadic brain arteriovenous malformation in a Chinese population. **J Clin Neurosci** 18:549-553, 2011.
7. Chen Y, Zhu W, Bollen AW, Lawton MT, Barbaro NM, Dowd CF, Hashimoto T, Yang GY, Young WL: Evidence of inflammatory cell involvement in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 62:1340-1349; discussion 1349-1350, 2008.
8. Clarke L, Zheng-Bradley X, Smith R, Kulesha E, Xiao C, Toneva I, Vaughan B, Preuss D, Leinonen R, Shumway M, Sherry S, Flicek P, Consortium TGP: The 1000 Genomes Project: data management and community access. **Nat Methods** 9:459-462, 2012.
9. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. **Cell** 87:1161-1169, 1996.
10. Duffy K: Genetics and syndromes associated with vascular malformations. **Pediatr Clin North Am** 57:1111-1120, 2010.
11. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, Gordon L, Hendrix M, Hourlier T, Johnson N, Kähäri AK, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Komorowska M, Koscielny G, Kulesha E, Larsson P, Longden I, McLaren W, Muffato M, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Riat HS, Ritchie GR,

- Ruffier M, Schuster M, Sobral D, Tang YA, Taylor K, Trevanion S, Vandrovcova J, White S, Wilson M, Wilder SP, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Durbin R, Fernández-Suarez XM, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJ, Parker A, Proctor G, Spudich G, Vogel J, Yates A, Zadissa A, Searle SM: Ensembl 2012. **Nucleic Acids Res** 40:D84-90, 2012.
12. Fujimura M, Watanabe M, Shimizu H, Tominaga T: Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cerebral cavernous malformations: immunohistochemical analysis of MMP-2, -9 and TIMP-2. **Acta Neurochir (Wien)** 149:179-183; discussion 183, 2007.
 13. Gaetani P, Rodriguez y Baena R, Tartara F, Messina AL, Tancioni F, Schiavo R, Grazioli V: Metalloproteases and intracranial vascular lesions. **Neurol Res** 21:385-390, 1999.
 14. Greenberg DA, Jin K: From angiogenesis to neuropathology. **Nature** 438:954-959, 2005.
 15. Ha Y, Kim TS, Yoon DH, Cho YE, Huh SG, Lee KC: Reinduced expression of developmental proteins (nestin, small heat shock protein) in and around cerebral arteriovenous malformations. **Clin Neuropathol** 22:252-261, 2003.
 16. Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med** 352:1685-1695, 2005.

17. Hartsough MT, Mulder KM: Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. **Pharmacol Ther** 75:21-41, 1997.
18. Hashimoto T, Lam T, Boudreau NJ, Bollen AW, Lawton MT, Young WL: Abnormal balance in the angiopoietin-tie2 system in human brain arteriovenous malformations. **Circ Res** 89:111-113, 2001.
19. Hashimoto T, Wu Y, Lawton MT, Yang GY, Barbaro NM, Young WL: Coexpression of angiogenic factors in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 56:1058-1065; discussion 1058-1065, 2005.
20. Jiang N, Li X, Qi T, Guo S, Liang F, Huang Z: Susceptible gene single nucleotide polymorphism and hemorrhage risk in patients with brain arteriovenous malformation. **J Clin Neurosci** 18:1279-1281, 2011.
21. Khoury MJ, Gwinn M, Yoon PW, Dowling N, Moore CA, Bradley L: The continuum of translation research in genomic medicine: how can we accelerate the appropriate integration of human genome discoveries into health care and disease prevention? **Genet Med** 9:665-674, 2007.
22. Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, Choudhry S, González Burchard E, Kwok PY, Sidney S, McCulloch CE, Young WL: Population stratification in a case-control study of brain arteriovenous malformation in Latinos. **Neuroepidemiology** 31:224-228, 2008.
23. Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, Poon A, Burchard EG, Zaroff JG, Sidney S, Ko NU, Achrol AS, Lawton MT, McCulloch CE, Kwok PY, Young WL: Common variants in interleukin-1-Beta gene are associated

- with intracranial hemorrhage and susceptibility to brain arteriovenous malformation. **Cerebrovasc Dis** 27:176-182, 2009.
24. Kim H, Pawlikowska L, Chen Y, Su H, Yang GY, Young WL: Brain arteriovenous malformation biology relevant to hemorrhage and implication for therapeutic development. **Stroke** 40:S95-97, 2009.
 25. Laskowitz DT, Goel S, Bennett ER, Matthew WD: Apolipoprotein E suppresses glial cell secretion of TNF alpha. **J Neuroimmunol** 76:70-74, 1997.
 26. Leblanc GG, Golanov E, Awad IA, Young WL, Collaborators BoVMotBNW: Biology of vascular malformations of the brain. **Stroke** 40:e694-702, 2009.
 27. Legry V, Bokor S, Cottel D, Beghin L, Catasta G, Nagy E, Gonzalez-Gross M, Spinneker A, Stehle P, Molnár D, Moreno LA, Amouyel P, Dallongeville J, Meirhaeghe A: Associations between common genetic polymorphisms in angiotensin-like proteins 3 and 4 and lipid metabolism and adiposity in European adolescents and adults. **J Clin Endocrinol Metab** 94:5070-5077, 2009.
 28. Leung CH, Poon WS, Yu LM, Wong GK, Ng HK: Apolipoprotein e genotype and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke** 33:548-552, 2002.
 29. Lewis CM: Genetic association studies: design, analysis and interpretation. **Brief Bioinform** 3:146-153, 2002.

30. Li C: Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4. **Curr Opin Lipidol** 17:152-156, 2006.
31. Luo J: The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. **Cerebellum** 4:239-245, 2005.
32. Maher CO, Piepgras DG, Brown RD, Friedman JA, Pollock BE: Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Stroke** 32:877-882, 2001.
33. Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, Fruttiger M, Arthur HM: Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. **Circ Res** 106:1425-1433, 2010.
34. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science** 277:55-60, 1997.
35. Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS: Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. **Hum Mol Genet** 12 Spec No 1:R97-112, 2003.
36. Matsubara S, Bourdeau A, terBrugge KG, Wallace C, Letarte M: Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. **Stroke** 31:2653-2660, 2000.
37. Matsubara S, Mandzia JL, ter Brugge K, Willinsky RA, Faughnan ME, Manzia JL: Angiographic and clinical characteristics of patients with

- cerebral arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. **AJNR Am J Neuroradiol** 21:1016-1020, 2000.
38. Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K: Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. **J Neurochem** 74:1008-1016, 2000.
39. Mikhak B, Weinsheimer S, Pawlikowska L, Poon A, Kwok PY, Lawton MT, Chen Y, Zaroff JG, Sidney S, McCulloch CE, Young WL, Kim H: Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) gene polymorphisms and risk of brain arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 31:338-345, 2011.
40. Moftakhar P, Hauptman JS, Malkasian D, Martin NA: Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: cellular and molecular biology. **Neurosurg Focus** 26:E10, 2009.
41. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P: Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **BMJ** 339:b2535, 2009.
42. Park SO, Lee YJ, Seki T, Hong KH, Fliess N, Jiang Z, Park A, Wu X, Kaartinen V, Roman BL, Oh SP: ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. **Blood** 111:633-642, 2008.
43. Pawlikowska L, Poon KY, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lum K, Zaroff JG, Ko NU, Johnston SC, Sidney S, Marchuk DA, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Apolipoprotein E epsilon 2 is associated with new

- hemorrhage risk in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 58:838-843; discussion 838-843, 2006.
44. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, Ha C, Burchard E, Choudhry S, Zaroff J, Lawton MT, Castro R, McCulloch CE, Marchuk D, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in transforming growth factor-beta-related genes ALK1 and ENG are associated with sporadic brain arteriovenous malformations. **Stroke** 36:2278-2280, 2005.
45. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lind DL, Hashimoto T, Zaroff J, Lawton MT, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations. **Stroke** 35:2294-2300, 2004.
46. Plate KH: Mechanisms of angiogenesis in the brain. **J Neuropathol Exp Neurol** 58:313-320, 1999.
47. Sabbà C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M, Dicuonzo F, Guant G: Hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical features in ENG and ALK1 mutation carriers. **J Thromb Haemost** 5:1149-1157, 2007.
48. Sandalcioglu IE, Asgari S, Wende D, van de Nes JA, Dumitru CA, Zhu Y, Gizewski ER, Stolke D, Sure U: Proliferation activity is significantly elevated in partially embolized cerebral arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 30:396-401, 2010.

49. Sandalcioglu IE, Wende D, Eggert A, Müller D, Roggenbuck U, Gasser T, Wiedemayer H, Stolke D: Vascular endothelial growth factor plasma levels are significantly elevated in patients with cerebral arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 21:154-158, 2006.
50. Saunders NR, Knott GW, Dziegielewska KM: Barriers in the immature brain. **Cell Mol Neurobiol** 20:29-40, 2000.
51. Seal RL, Gordon SM, Lush MJ, Wright MW, Bruford EA: genenames.org: the HGNC resources in 2011. **Nucleic Acids Res** 39:D514-519, 2011.
52. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Res** 29:308-311, 2001.
53. Shi C, Shenkar R, Batjer HH, Check IJ, Awad IA: Oligoclonal immune response in cerebral cavernous malformations. Laboratory investigation. **J Neurosurg** 107:1023-1026, 2007.
54. Simon M, Franke D, Ludwig M, Aliashkevich AF, Köster G, Oldenburg J, Boström A, Ziegler A, Schramm J: Association of a polymorphism of the ACVRL1 gene with sporadic arteriovenous malformations of the central nervous system. **J Neurosurg** 104:945-949, 2006.
55. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell** 87:1171-1180, 1996.

56. ten Dijke P, Arthur HM: Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:857-869, 2007.
57. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH, Tarnawski M: Immunogold study of interendothelial junction-associated and glucose transporter proteins during postnatal maturation of the mouse blood-brain barrier. **J Neurocytol** 30:705-716, 2001.
58. Vu TH, Werb Z: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev** 14:2123-2133, 2000.
59. Weinsheimer S, Kim H, Pawlikowska L, Chen Y, Lawton MT, Sidney S, Kwok PY, McCulloch CE, Young WL: EPHB4 gene polymorphisms and risk of intracranial hemorrhage in patients with brain arteriovenous malformations. **Circ Cardiovasc Genet** 2:476-482, 2009.
60. Yu W, Gwinn M, Clyne M, Yesupriya A, Khoury MJ: A navigator for human genome epidemiology. **Nat Genet** 40:124-125, 2008.
61. Zhao Y, Li P, Fan W, Chen D, Gu Y, Lu D, Zhao F, Hu J, Fu C, Chen X, Zhou L, Mao Y: The rs522616 polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) gene is associated with sporadic brain arteriovenous malformation in a Chinese population. **J Clin Neurosci** 17:1568-1572, 2010.

5. OBJETIVOS

O objetivo primário do presente trabalho é avaliar a associação entre a susceptibilidade à MAV e os polimorfismos dos genes: apolipoproteína E (APOE), fator de necrose tumoral alfa (TNF 238G>A - rs361525), interleucina 1 beta (IL1B 511C>T - rs16944 e IL1B -31T>C - rs1143627), quinase tipo receptor de ativina (ACVRL1 IVS3-35A>G - rs2071219), endoglina (ENG 207G>A - rs11545664) e interleucina 6 (IL6 174G>C - rs1800795).

O objetivo secundário é averiguar se os mesmos polimorfismos estão associados com evento hemorrágico na apresentação clínica dos pacientes com MAV.

6. ARTIGOS ORIGINAIS

**6.1 Artigo 1 em Inglês: SISTEMATIC REVIEW OF GENETIC
POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH BRAIN ARTERIOVENOUS
MALFORMATION**

André Cerutti Franciscatto, M.D.(1, 2)

Fernanda Sperb Ludwig, Biol., Ph.D. (1, 2)

Úrsula da Silveira Matte, Biol., Ph.D. (1, 2)

Simone Mota, R.N. (1)

Marco Antônio Stefani, M.D., Ph.D. (1, 2)

**1.Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculty of Medicine - Federal University of Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil**

2.Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding and reprint author: A.C. Franciscatto

**Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil**

Telephone: +55 51 3359 8520

FAX: +55 51 3359 8182

e-mail: andre@franciscatto.com

Conflicts of Interest: none

ABSTRACT

INTRODUCTION

Brain arteriovenous malformations (BAVM) are a cause of intracranial hemorrhage (ICH). Improving genetics knowledge of BAVMs could aid in developing new forms of treatments or future preventive therapies. The aim of this study was to explore the available data from single nucleotide polymorphism (SNP) analyses of BAVMs and the implications both on development of vascular malformation and the risk of ICH.

METHODS

A literature search in the PUBMED database and HuGE navigator (A Navigator for Human Genome Epidemiology) was performed using a combination of one or more of the following keywords: arteriovenous, genetic, cerebral vascular malformation, SNP and pathogenesis. The articles were divided into two groups. The first group examined the impact of SNPs on BAVM development. The second evaluated SNP associated with the risk for BAVM bleeding. Risks estimates of BAVM development and BAVM bleeding were accessed and calculated for each polymorphism.

RESULTS

We found 273 articles. Of those, only 38 reports met the initial eligibility criteria. Thirteen studies provided data on the risk of BAVM development or BAVM bleeding for 61 SNPs. Seven SNPs were found to show a significant

association with presence of BAVM, and 6 SNPs were associated with risk of BAVM bleeding.

CONCLUSIONS

BAVM etiology and biology appear to be regulated by a variety of gene pathways. Several SNPs were found to be associated with both BAVM incidence and ICH risk.

INTRODUCTION

Brain arteriovenous malformation (BAVM) is a cause of intracranial hemorrhage (ICH). The basic morphology of BAVM is a tangle of abnormal and dilated channels with an intervening gliosis, referred to as the nidus, that directly shunts blood between the arterial and venous circulation without a true capillary bed (40). Prevention of BAVM bleeding or rebleeding is the aim of treatment. Improving knowledge of the genetics of BAVM could aid in developing new forms of treatments or future preventive therapies.

By identifying millions of single nucleotide polymorphisms (SNPs), genotyping technology has dramatically boosted the yield of genetic association studies. However, translating these data into useful health-related information depends on systematic review and knowledge synthesis (21).

The aim of this study was to explore the available data from SNP analyses of BAVM and the implications of these data regarding both the development of vascular malformation and the risk of hemorrhage.

METHODS

This systematic review followed the PRISMA statement (41) in its elaboration.

A literature search in the PUBMED (from 1950 to the present) database was performed using a combination of one or more of the following keywords: arteriovenous, genetic, cerebral vascular malformation, single nucleotide, polymorphism and pathogenesis. A complementary search was conducted in HuGE Navigator (Navigator for Human Genome Epidemiology) (60). We also reviewed the references provided in all of the articles looking for other relevant studies or citations, including those focusing on hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). We did not include HHT in the final analysis. The last search was performed on July 20, 2012.

The eligibility criteria for including studies were as follows: original articles focusing on genetic polymorphisms in BAVM. Only articles in English were selected. Works studying the genetics of cavernous, venous or developmental venous anomalies or aneurysms were excluded. Reviews papers were also excluded to avoid double inclusion of data.

The articles were divided into two groups. The first group examined the impact of SNPs on BAVM development. The second evaluated polymorphisms associated with the risk of BAVM bleeding.

The data extracted from the articles were the frequencies of alleles between cases and controls, numbers of participants, the Relative Risk (RR), Odds Ratio (OR) or Hazard Ratio (HR) (and confidence intervals) of BAVM development and BAVM bleeding, the study design, outcomes, the functional rationale for each SNP and methods of genetic analysis. Only common polymorphisms were included (minor allele frequency greater than 1%). The data provided in the articles were not uniform. To compare the risks among several polymorphisms,

we attempted to standardize the risk calculations. The dominant model (29) for minor alleles was used to calculate new ORs and 95% confidence intervals (95% CI). A pooled analysis was attempted only if two or more studies with the same outcome investigated the same SNP.

Statistical analysis was conducted using the Pearson Chi-square statistic. When distributional assumptions were not met or the expected value of at least five observations in each cell was not achieved, we performed a Fisher test. The overall significance level for this study was 5%.

Forest Plot figures were created using Forest Plot Viewer software (5).

Due to discrepancies found in the gene names and symbols used by different authors, we employed the Guidelines of the HUGO Gene Nomenclature Committee (51) to describe both short-form abbreviations, or gene symbols, and the longer and more descriptive names.

The identifier used for each SNP was standardized to the sequence variation identifier (according to the HGVS - Human Genome Variation Society) using the Short Genetic Variation database of the National Center for Biotechnology Information (52), Ensembl Gene Browser (11) and 1000 Genomes Project (8). We present variations with dbSNP identifiers. In a few cases, it was not possible to find dbSNP ID, and only in these cases is the common name (nucleotide change) presented.

RESULTS

Using the keywords listed above, 273 articles were found in PubMed (in addition to 1 article found in the HuGE Navigator database). Among these studies, only 38 reports met the initial eligibility criteria for full-text evaluation (figure 1). Of these reports, six described animal experiments, 4 case series; 8 case-control analyses of tissue markers; 3 case-control studies of polymorphisms that increase the risk of hemorrhage; 3 cohort studies evaluating the risk of bleeding associated with genetic profiles; 6 population case-control studies evaluating SNPs and the risk for BAVM development; 1 a case-control study designed to evaluate the association of SNPs both with BAVM development and ICH risk; and 7 reviews of the literature.

Thirteen studies provided data on the risk of BAVM development or BAVM bleeding for 61 SNPs. Table 1 summarizes the SNPs, study design, outcomes, functional rationale and methods of genetic analysis. Together, these reports described a total of 68 association analyses. Seven of them were found to show a significant association with the presence of BAVM (Figure 2), and 6 SNPs were associated with the risk of BAVM bleeding (Figure 3).

Unfortunately, we were not able to perform a pooled analysis because there were no comparable SNPs identified (studies with a similar design and the same outcome).

We present the non-adjusted OR, calculated based on the available data from the selected studies. Most of studies calculated the OR adjusted for age and sex. Individual ancestry was also included for adjustment in a few articles. None of these multivariate analyses showed important differences when compared with non-adjusted analyses. Some data were extracted from cohort

studies. under this study design, the authors provided HRs and RRs, which have particular properties that are presented and discussed here.

DISCUSSION

Traditionally, BAVMs have being classified as congenital lesions resulting from abnormal vascular development (40).

However, many authors have suggested that they are not static congenital lesions but are dynamic with the ability to grow, regress, and even to reappear as de novo BAVMs after complete resection or radiosurgery. There are even some reports of BAVMs being diagnosed in patients in the absence of vascular malformations in previous exams (40).

Inciting events including subclinical trauma, tissue hypoxia, infection, inflammation, irradiation or compression, possibly involving localized venous hypertension, are being evaluated as potent angiogenic stimuli for BAVM growth, regrowth or even origination (24).

On the other hand, the association of BAVMs with well-defined genetic disorders, such as ataxia telangiectasia, Wyburn-Mason syndrome, Osler-Weber-Rendu disease, and Sturge-Weber syndrome, appears to support the importance of genetic contributors to their pathogenesis (10).

1. Genes related to Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia

HHT is an autosomal dominant disorder associated with a high prevalence of BAVM that may be considered a natural model for sporadic disease (24). As a class, the inherited BAVMs observed in HHT exhibit some distinguishing morphological features but are generally similar to sporadic lesions and cannot be differentiated individually on the basis of their angioarchitecture (32, 37).

The majority of HHT cases involve loss-of-function mutations in two genes that were originally implicated in Transforming Growth Factor – Beta (TGFB) signaling pathways: (1) endoglin (ENG), encoding an accessory protein of TGFB receptor complexes; and (2) activin receptor-like kinase 1 (ACVRL1 or ALK1), encoding a transmembrane kinase (47) .

1.1 Transforming Growth Factor - Beta

The roles of the TGF family in vascular development are complex and multidimensional. In the early stages of development, TGFB inhibits vascular endothelial proliferation; in later stages, it promotes the differentiation of surrounding mesenchymal cells into pericytes and smooth cells (40). The transforming growth factor-B ligand receptor complex has been implicated in HHT. The TGFB superfamily encompasses a number of highly conserved growth regulatory polypeptides (17). The pathways involved in TGFB signaling are complex and interconnected (56).

Loss of function mutations in two genes involved in TGFB signaling pathways (ENG and ACVRL1) have been implicated in the two main subtypes of HHT (35). Compared with sporadic lesions, the presence of an ENG or ACVRL1 mutation results in a 10,000- or 1,000-fold increase in the risk of developing BAVM, respectively (24).

One case-control study conducted in a Han Chinese population from South China recruited 53 patients with BAVM and 120 healthy controls. No significant differences were found in the TGFB1 rs1800469 SNP between patients with BAVM and controls ($\chi^2 = 2.380$, $P = 0.304$) or between patients with and without hemorrhage ($\chi^2 = 1.330$, $P = 0.514$) by the authors (20). Unlike these authors, who used a full genotype model, we observed a trend toward a significant difference between BAVM patients and healthy controls using a dominant model (Figure 2).

1.2 Endoglin

ENG increases endothelial proliferation and activates mesenchymal cells to differentiate into pericytes and stem cells within the intercellular matrix. These cells then migrate and encircle endothelial conduits secondary to the influence of transforming growth factor alpha (TGFA) (47). ENG knockout mice present a complete sequence of BAVM formation, with delayed remodeling of the capillary plexus, increased proliferation of endothelial cells and localized BAVMs. Muscularization of the resulting arteriovenous shunts appears to be a secondary response to the increased blood flow (33).

Immunohistochemical analysis of BAVM and normal brain tissue demonstrated that ENG is expressed at similar levels in the endothelial and adventitial layers of normal brain arteries and arterioles and in the endothelium and adventitium of arteries and arterialized veins in sporadic cerebral BAVMs. Contrary to the BAVMs found in HHT1 patients, these BAVMs express normal levels of ENG in their endothelium (36).

Seven ENG polymorphisms were evaluated in 177 patients with BAVM, compared with healthy controls. Two polymorphisms, rs10987759 and rs11545664, showed a trend toward an association with BAVM in a full-genotype model that did not reach statistical significance (44). Using a dominant model, the frequency of allele A of rs11545664 was found to be different between cases and controls (figure 2).

1.3 Activin-like kinase receptor 1

Endothelial cell-specific ablation of the murine ACVRL1 gene causes BAVM formation during development. In contrast, mice in which transforming growth factor beta receptor I (TGFB1, known as activin-like kinase receptor 5) or transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) is knocked out in an endothelial cell-specific manner show neither BAVM formation nor any other perturbation in vascular morphogenesis (42).

An intronic variant of ACVRL1, rs2071219, was found to be present at a higher frequency in BAVM cases compared to healthy controls (Any A versus

GG univariate logistic regression; OR = 2.47; 95% CI = 1.38-4.44; P = 0.002) (44). We found no association in a dominant model for the minor allele G (figure 2).

Another study including patients with both BAVM and dural arteriovenous fistulas (DAVFs) identified a statistically significant association between the IVS3 -35A>T polymorphism of ACVRL1 and the development of BAVMs and DAVFs (OR = 1.73; 95% CI = 1.19–2.51; P = 0.004 after adjustments for age and sex). In contrast, no significant association was found for the IVS9 +45C>T polymorphism (54). As the authors presented data from BAVM and DAVFs merged together, we were unable to perform risk analysis for BAVMs alone.

2. Polymorphisms involving other genes

2.1 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (APOE) functions as an important suppressor of the glial cell secretion of Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF) (25). APOE also promotes the efflux of lipids from astrocytes and neurons (26). The APOE genotype has been implicated in many human disease phenotypes, including ICH and subarachnoid hemorrhage (28). The potency order of the APOE isoforms as lipid acceptors is APOE ϵ 2 > APOE ϵ 3 = APOE ϵ 4 in astrocytes and APOE ϵ 2 > APOE ϵ 3 > APOE ϵ 4 in neurons (38). Because APOE ϵ 2 binds with the highest affinity as a lipid acceptor, this isoform may not be as readily

available to suppress the glial cell secretion of TNF in BAVMs as the APOE ϵ 3 and APOE ϵ 4 isoforms. The APOE ϵ 2 genotype may also confer enhanced proteolytic activity, contributing to the pathogenesis of BAVM hemorrhage (45).

The brains of 284 BAVM patients were studied regarding new ICH after diagnosis in another longitudinal cohort. The APOE ϵ 2 (HR = 8.71; 95% CI = 1.4–53.9; P = 0.020; multivariate model adjusting for clinical presentation), but not the APOE ϵ 4 allele was associated with new hemorrhage in the natural course of the disease (43). We found no association between the APOE ϵ 2 allele and ICH in our OR analysis (Figure 3).

Additionally, a cohort including 255 patients undergoing BAVM treatment (embolization, arteriovenous malformation resection, radiosurgery or any combination of these treatments) was genotyped and followed longitudinally (mean follow-up period of 1.9 years and interquartile range of 1.6 years). The authors suggested that the APOE ϵ 2 genotype may contribute to increasing the risk of a hemorrhagic outcome after treatment of BAVMs (HR = 3.2; 95% CI = 1.0–9.7; P = 0.042) (1). Again, no difference was found in our OR analysis (Figure 3).

2.2 Matrix Metalloproteinases

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of proteolytic enzymes that degrade extracellular matrix proteins, cell surface molecules, and other pericellular substances (31). Excessive degradation of the vascular matrix by

MMPs may result in destabilization of vessels, which potentially leads to weakening of the vessel wall and passive dilation (12,13). This is a critical step in angiogenesis and vascular remodeling (58). However, it also appears to be important for the histological phenotype of BAVM, which is characterized by vessels that are structurally incomplete, consisting of enlarged feeding arteries, tangled masses of blood vessels and dilated arterialized veins (61).

The association between MMP3 genotypes and the risk of developing BAVM was evaluated in a case-control study involving 319 Chinese patients with BAVM and 333 Chinese controls. A total of five SNPs (rs569444, rs650108, rs522616, rs632478 and rs645419) in this gene were analyzed. This study found that only rs522616 was associated with sporadic BAVM (OR = 0.68, 95% CI = 0.49–0.94; P = 0.019 for AG + GG compared with the AA genotype; adjusted for age and sex) (61). We did not find this association (Figure 2).

2.3 Angiogenic Genes

BAVMs are associated with activated angiogenesis, including upregulated expression of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and other angiogenic factors as well as increased endothelial cell proliferation. Thus, it is possible that BAVMs escape the normal down-regulation of angiogenesis that occurs in adulthood and that lesion growth occurs through an autocrine positive feedback loop (26).

The production of angiogenic factors by BAVMs could also have adverse consequences for other cells of the neurovascular unit (26). For example, abnormal growth factor secretion by BAVMs could cause inappropriate stimulation of neuronal or glial proliferation; indeed, there is evidence of the latter effect (15). In addition, VEGFA and other angiogenic factors increase blood-brain barrier permeability, which could, in turn, predispose vascular walls to rupture (26).

2.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor A

Vasculogenesis of the cerebral vasculature occurs outside the brain with the formation of the perineural plexus. Capillaries sprout from this plexus and penetrate the neural tube in a characteristic spatiotemporal pattern (46). Subsequent growth of the cerebral vasculature occurs entirely through angiogenesis, the first phase of which involves vascular endothelial cell proliferation and migration. A key mediator of these processes is VEGFA, which is produced by developing neuroectodermal cells and their neural and glial progeny in response to hypoxia (14). VEGFA also up-regulates capillary permeability, and developing capillaries are characterized by relatively high permeability and low levels of inter-endothelial junctional proteins (50,57).

Astrocytes have been shown to secrete VEGFA when exposed to a hypoxic environment. This hypoxic environment may be induced by arteriovenous shunting through a BAVM (40).

In a case-control study, 319 BAVM patients and 333 controls were genotyped. This study evaluated 9 VEGFA SNPs (rs1547651, rs2010963, rs1413711, rs833069, rs3024994, rs3025010, rs3025030, rs3025035, and rs3025039). Four of these variants and one haplotype, ACT, were found to present a possible association with the risk of developing BAVM. In a logistic regression analysis adjusted for age and sex, three SNPs in a codominant model (OR = 1.61; 95% CI = 1.01-2.56; P = 0.044 for rs2010963; OR = 1.68; 95% CI = 1.05-2.7; P = 0.031 for rs833069 and OR = 0.49; 95% CI = 0.27-0.91; P = 0.024 for rs3025010), two SNPs in a dominant model (OR, 0.61; 95% CI = 0.4-0.93; P = 0.023 for rs1547651 and OR = 1.44; 95% CI = 1.02-2.02; P = 0.038 for rs833069) and one SNP in a recessive model (OR = 0.48; 95% IC = 0.26-0.88; P = 0.017 for rs3025010) exhibited significant associations with the risk of BAVM (6).

No association between VEGFA rs699947 and hemorrhagic presentation in BAVM patients (P = 0.6) was found in a case-control study involving 180 patients. The authors did not present a risk calculation (45). We calculated the risk for the AA and AC versus CC alleles (Figure 3).

2.3.2 Angiopoietin

Members of the Angiopoietins/angiopoietin-like proteins (ANGPT/ANGPTL) proteins and their receptor, endothelial tyrosine kinase (TEK), play a critical role in angiogenesis and vascular stability (18, 55). ANGPT1, an agonist for the TEK receptor, promotes the interaction between

endothelial cells and peri-endothelial support cells to stabilize vessels (9, 18, 55). ANGPT2 is an antagonist for the TEK receptor that acts to destabilize these attachments by preventing ANGPT1 stimulation of TEK (18, 34). The vascular phenotypes observed following overexpression of ANGPT2 or homozygous disruption of the TEK gene show strikingly similarities to BAVM vessels (18). They display abnormally dilated vessels that lack a mature peri-endothelial support structure. Similarly, loss-of-function mutations in the TEK gene are found in patients with familial mucocutaneous venous malformations, which are vascular lesions resembling BAVMs (18).

A highly positive correlation between ANGPT2 and VEGFA levels in BAVM surgical specimens has been reported (9, 34), suggesting that angiogenic factors may contribute to vascular instability, resulting in BAVM hemorrhage (19, 48, 49).

2.3.2.1 Angiopoietin-Like 4

While ANGPTL4, a secreted glycoprotein encoded by the ANGPTL4 gene, is well known for its role in lipid metabolism (27), it is also thought to mediate angiogenesis, with both anti- and pro-angiogenic effects (30). ANGPTL4 has been reported to inhibit vascular permeability, tumor cell motility, invasiveness, sprouting, tubule-like structure formation, and vascular leakiness (39). Under hypoxic conditions, ANGPTL4 is up-regulated at both the protein and mRNA levels (3, 39).

When ANGPTL4 polymorphisms were compared in 216 BAVM cases and 246 healthy controls, the presence of the minor allele A of rs11672433 was associated with an increased risk of BAVM (OR = 1.56; 95% CI = 1.01–2.41; $p = 0.046$; adjusted for age and sex), but not with ICH presentation in BAVM cases. Other SNPs were also tested (rs2278236, rs1044250 and rs1808536) but showed no association (39). The full genotype distribution of patients with and without ICH presentation in the BAVM group was not provided (Figure 2).

2.3.2.2 Erythropoietin-producing hepatocellular receptor B4

Erythropoietin-producing hepatocellular receptor B4 (EPHB4) is involved in arterial-venous determination during embryogenesis; altered signaling could lead to vascular instability, resulting in ICH (59).

In a study involving 3 steps (first, a transectional study, then a cohort and a case-control study), the authors included 248 patients with BAVM (93 ICH and 155 non-ICH) and 225 healthy controls of self-reported ancestry. The associated SNPs were then genotyped in 102 additional cases (phase II: 37 ICH, 65 non-ICH), and the data were combined for multivariate logistic regression. The last analysis involved 225 healthy controls, searching for BAVM etiology. The authors identified 2 SNPs located at the 5' end of EPHB4, rs314313 and rs314308, that were associated with a reduced risk of hemorrhagic presentation in white patients with BAVM, but not with BAVM susceptibility (59). The authors used a multiplicative model. We have presented a dominant model in Figure 3. When all 248 BAVM cases (ICH and non-ICH

combined) were compared with controls in an additive genetic model adjusting for age and sex, the SNPs rs314308 (OR = 0.76; 95% CI = 0.58 to 0.99; P = 0.046) and rs314313 (OR = 0.76; 95% CI = 0.57 to 1.02; P = 0.066) were marginally associated with a reduced risk of BAVM. However, the overall risk reduction appeared to be driven by the difference between the 93 ruptured BAVM cases and controls (rs314313: OR = 0.50; 95% CI = 0.33 to 0.77; P = 0.002; rs314308: OR = 0.48; 95% CI = 0.32 to 0.72; P = 0.001). No SNPs were found to be associated with the risk of unruptured BAVM when 155 non-ICH cases were compared with controls (rs314313: OR = 0.94; 95% CI = 0.67 to 1.32; P = 0.713; rs314308: OR = 0.95; 95% CI = 0.70 to 1.30; P = 0.746). These findings suggest the SNP association results are specific to ICH presentation and not BAVM status (59).

2.4 Inflammatory cytokines

BAVMs are sites of active inflammation. Robust B and plasma cell infiltration and oligoclonal IgG immune responses have been demonstrated (53). Neutrophils, macrophages, and inflammatory markers are seen in BAVMs (7). Proinflammatory cytokines, including interleukins (ILs), have been reported to be involved in brain ischemic injury. Increased availability of ILs in the brain tends to exacerbate the damage from ischemic insult (4). Inflammatory cytokines including TNF and some ILs, are potent stimulators of both angiogenesis and blood-brain barrier breakdown and could contribute to the progression and rupture of lesions (26).

2.4.1 Tumor Necrosis Factor - alpha

The cytokine TNF is a proinflammatory and immunomodulatory pleiotropic polypeptide implicated in conditions involving proteolytic processes (16).

The associations of TNF polymorphisms (rs361525 and rs1800629) and the risk of ICH were longitudinally studied in 280 BAVM patients. The rs361525 SNP was associated with an increased risk of new ICH in the natural course of BAVM (HR = 4.01; 95% CI = 1.31-12.29; P = 0.015 adjusted for age, ethnicity and history of ICH) (2). Additionally, these authors published another work showing an association of rs361525 with ICH risk (HR = 3.5; 95% CI = 1.3–9.8; P = 0.016) in patients who underwent certain kinds of treatment (embolization, arteriovenous malformation resection, radiosurgery or any combination of these treatments) (1). See Figure 3 for the OR analysis.

A study focusing the association of rs1800629 and rs361525 with ICH presentation showed that this association not reach significance (uncorrected P = 0.055 and P = 0.59 respectively). The authors reported that the frequency of the rs1800629 minor allele (A) was lower in patients presenting with ICH than in patients with an unruptured BAVM. A frequency of 0.065 versus 0.13 (P = 0.07) was obtained (45). The adopted level of significance was not specified in the Methods section. However, considering that the CI presented throughout the article was 95%, we cannot assume that the above result represents a positive

finding. Therefore, we recalculated the OR in a dominant model. No difference between ruptured and unruptured BAVM patients was found.

2.4.2 Interleukin 1-Beta

Patients (n=410) harboring a BAVM were genotyped for the IL1B promoter SNPs rs16944, rs1143627 and rs1143634. A survival analysis of the time to subsequent ICH was performed. Patients with the rs1143627 CC genotype (HR = 2.7; 95% CI = 1.1–6.6; P = 0.029) or the rs16944 TT genotype (HR = 2.6; 95% CI = 1.1–6.5; P = 0.039) exhibited a greater risk of subsequent ICH, adjusted for age at diagnosis, gender, ethnicity and hemorrhagic presentation. To determine if IL1B SNPs were associated with BAVM susceptibility, a case-control analysis restricted to Caucasians was performed. The risk of BAVM was higher in subjects with an rs1143627 CC genotype (OR = 3.2; 95% CI = 1.7–6.1; P < 0.001), rs16944 TT genotype (OR = 3.4; 95% CI = 1.7-6.7; P < 0.001) or rs1143634 CC (OR = 1.8; 95% CI = 1.2-2.7; P = 0.004) after adjusting for age and sex (23). We found similar associations for BAVM risk with rs1143627 and rs1143634 (Figures 2 and 3).

2.4.3 Interleukin - 6

Interleukin-6 (IL6), an inflammatory cytokine with a possible role in the remodeling of the BAVM wall, is released by endothelial cells within the BAVM nidus. It may contribute to vascular wall instability by stimulating the release of MMP (40).

BAVM cases and healthy controls self-reporting Latino race/ethnicity (n = 294) were tested for 83 ancestry informative markers. The rs1800795 polymorphism was associated with an increased risk of BAVM (OR = 1.96, 95% IC = 1.03-3.72, P = 0.039, adjusted for age, sex and individual ancestry estimates) (22).

One study evaluated 180 BAVM patients regarding their clinical presentation. The frequency of the rs1800795 GG genotype of IL6 was significantly greater in patients presenting with hemorrhage than in patients with unruptured BAVM (OR = 2.43; CI = 1.04 to 5.68; P = 0.003 corrected for age, gender and ethnicity). The associations of the rs1800795 variant with demographic and BAVM characteristics were also evaluated. BAVM size (OR = 2.36; 95% CI = 1.12 to 4.96; P = 0.004) and exclusively deep venous drainage (OR = 2.36; 95% CI = 1.12 to 4.96; P = 0.001) were significantly associated with ICH presentation in rs1800795 GG homozygotes (45).

In a dominant model, we corroborated all of the results for rs1800795 regarding its association with ICH presentation, but not with BAVM risk (Figure 2).

2.4.4 Interleukin 17A

In a case-control study conducted in a Han Chinese population from South China, a total of 53 patients with BAVM and 120 healthy controls were recruited. There was no significant difference observed in the rs2275913 Interleukin 17A (IL17A) gene frequency between patients with BAVM and controls ($\chi^2 = 4.737$, $P = 0.094$) or between patients with and without ICH ($\chi^2 = 5.964$, $P = 0.051$). Nevertheless, the frequency of the G allele of rs2275913 in patients with ICH was significantly higher than in those without ICH (66.7% and 45.7%, respectively; $p < 0.05$) (20). In our analysis, no association was found for IL17A SNPs (Figure 3).

2.4.5 Tumor Growth Factor Beta Receptor II

A study conducted in a Han Chinese population recruited 53 patients with BAVM and 120 healthy controls. The authors found significant differences in the TGFRB2 rs3087465 gene frequency between patients with BAVM and controls ($\chi^2 = 16.256$, $p = 0.000$). Furthermore, the frequency of the G allele was significantly higher in patients with BAVM with hemorrhage than that in patients without hemorrhage (20). We did not find this last association (Figure 2).

2.5 Other SNPs

ICH and BAVM susceptibility was not found to be significantly associated with other SNPs such as Interleukin 10 (IL10) rs1800896, fms-related tyrosine kinase 4 (FLT4) rs1130379 and rs448012, kinase insert domain receptor (KDR) rs1870377, or TEK rs682632, rs3837240 and rs10967719 (20, 45).

CONCLUSIONS

BAVM etiology and biology appear to be regulated by a variety of gene pathways. Several SNPs were found to be associated with both BAVM incidence and ICH risk. The identification of genetic polymorphisms and haplotypes associated with the development and clinical course of BAVM would facilitate risk stratification as well as illuminate the underlying biology of this condition. Additional investigations addressing these genetic factors (including large genome-wide association studies) are in need of replication, and large cooperative studies will be necessary.

FUNDING

The authors declare no conflicts of interest. There was no funding source for this study.

REFERENCES

1. Achrol AS, Kim H, Pawlikowska L, Trudy Poon KY, McCulloch CE, Ko NU, Johnston SC, McDermott MW, Zaroff JG, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Association of tumor necrosis factor-alpha-238G>A and apolipoprotein E2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment. **Neurosurgery** 61:731-739; discussion 740, 2007.
2. Achrol AS, Pawlikowska L, McCulloch CE, Poon KY, Ha C, Zaroff JG, Johnston SC, Lee C, Lawton MT, Sidney S, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Tumor necrosis factor-alpha-238G>A promoter polymorphism is associated with increased risk of new hemorrhage in the natural course of patients with brain arteriovenous malformations. **Stroke** 37:231-234, 2006.
3. Belanger AJ, Lu H, Date T, Liu LX, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C: Hypoxia up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: role of hypoxia inducible factor 1alpha. **J Mol Cell Cardiol** 34:765-774, 2002.
4. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ: Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. **J Neurosci** 21:5528-5534, 2001.

5. Boyles AL, Harris SF, Rooney AA, Thayer KA: Forest Plot Viewer: a new graphing tool. **Epidemiology** 22:746-747, 2011.
6. Chen H, Gu Y, Wu W, Chen D, Li P, Fan W, Lu D, Zhao F, Qiao N, Qiu H, Fu C, Mao Y, Zhao Y: Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor A gene and susceptibility to sporadic brain arteriovenous malformation in a Chinese population. **J Clin Neurosci** 18:549-553, 2011.
7. Chen Y, Zhu W, Bollen AW, Lawton MT, Barbaro NM, Dowd CF, Hashimoto T, Yang GY, Young WL: Evidence of inflammatory cell involvement in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 62:1340-1349; discussion 1349-1350, 2008.
8. Clarke L, Zheng-Bradley X, Smith R, Kulesha E, Xiao C, Toneva I, Vaughan B, Preuss D, Leinonen R, Shumway M, Sherry S, Flicek P, Consortium TGP: The 1000 Genomes Project: data management and community access. **Nat Methods** 9:459-462, 2012.
9. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. **Cell** 87:1161-1169, 1996.
10. Duffy K: Genetics and syndromes associated with vascular malformations. **Pediatr Clin North Am** 57:1111-1120, 2010.
11. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, Gordon L, Hendrix

- M, Hourlier T, Johnson N, Kähäri AK, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Komorowska M, Koscielny G, Kulesha E, Larsson P, Longden I, McLaren W, Muffato M, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Riat HS, Ritchie GR, Ruffier M, Schuster M, Sobral D, Tang YA, Taylor K, Trevanion S, Vandrovcova J, White S, Wilson M, Wilder SP, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Durbin R, Fernández-Suarez XM, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJ, Parker A, Proctor G, Spudich G, Vogel J, Yates A, Zadissa A, Searle SM: Ensembl 2012. **Nucleic Acids Res** 40:D84-90, 2012.
12. Fujimura M, Watanabe M, Shimizu H, Tominaga T: Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cerebral cavernous malformations: immunohistochemical analysis of MMP-2, -9 and TIMP-2. **Acta Neurochir (Wien)** 149:179-183; discussion 183, 2007.
13. Gaetani P, Rodriguez y Baena R, Tartara F, Messina AL, Tancioni F, Schiavo R, Grazioli V: Metalloproteases and intracranial vascular lesions. **Neurol Res** 21:385-390, 1999.
14. Greenberg DA, Jin K: From angiogenesis to neuropathology. **Nature** 438:954-959, 2005.
15. Ha Y, Kim TS, Yoon DH, Cho YE, Huh SG, Lee KC: Reinduced expression of developmental proteins (nestin, small heat shock protein) in and around cerebral arteriovenous malformations. **Clin Neuropathol** 22:252-261, 2003.

16. Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med** 352:1685-1695, 2005.
17. Hartsough MT, Mulder KM: Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. **Pharmacol Ther** 75:21-41, 1997.
18. Hashimoto T, Lam T, Boudreau NJ, Bollen AW, Lawton MT, Young WL: Abnormal balance in the angiopoietin-tie2 system in human brain arteriovenous malformations. **Circ Res** 89:111-113, 2001.
19. Hashimoto T, Wu Y, Lawton MT, Yang GY, Barbaro NM, Young WL: Coexpression of angiogenic factors in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 56:1058-1065; discussion 1058-1065, 2005.
20. Jiang N, Li X, Qi T, Guo S, Liang F, Huang Z: Susceptible gene single nucleotide polymorphism and hemorrhage risk in patients with brain arteriovenous malformation. **J Clin Neurosci** 18:1279-1281, 2011.
21. Khoury MJ, Gwinn M, Yoon PW, Dowling N, Moore CA, Bradley L: The continuum of translation research in genomic medicine: how can we accelerate the appropriate integration of human genome discoveries into health care and disease prevention? **Genet Med** 9:665-674, 2007.
22. Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, Choudhry S, González Burchard E, Kwok PY, Sidney S, McCulloch CE, Young WL: Population stratification in a case-control study of brain arteriovenous malformation in Latinos. **Neuroepidemiology** 31:224-228, 2008.
23. Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, Poon A, Burchard EG, Zaroff JG, Sidney S, Ko NU, Achrol AS, Lawton MT, McCulloch CE, Kwok PY,

- Young WL: Common variants in interleukin-1-Beta gene are associated with intracranial hemorrhage and susceptibility to brain arteriovenous malformation. **Cerebrovasc Dis** 27:176-182, 2009.
24. Kim H, Pawlikowska L, Chen Y, Su H, Yang GY, Young WL: Brain arteriovenous malformation biology relevant to hemorrhage and implication for therapeutic development. **Stroke** 40:S95-97, 2009.
25. Laskowitz DT, Goel S, Bennett ER, Matthew WD: Apolipoprotein E suppresses glial cell secretion of TNF alpha. **J Neuroimmunol** 76:70-74, 1997.
26. Leblanc GG, Golanov E, Awad IA, Young WL, Collaborators BoVMotBNW: Biology of vascular malformations of the brain. **Stroke** 40:e694-702, 2009.
27. Legry V, Bokor S, Cottel D, Beghin L, Catasta G, Nagy E, Gonzalez-Gross M, Spinneker A, Stehle P, Molnár D, Moreno LA, Amouyel P, Dallongeville J, Meirhaeghe A: Associations between common genetic polymorphisms in angiopoietin-like proteins 3 and 4 and lipid metabolism and adiposity in European adolescents and adults. **J Clin Endocrinol Metab** 94:5070-5077, 2009.
28. Leung CH, Poon WS, Yu LM, Wong GK, Ng HK: Apolipoprotein e genotype and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke** 33:548-552, 2002.
29. Lewis CM: Genetic association studies: design, analysis and interpretation. **Brief Bioinform** 3:146-153, 2002.

30. Li C: Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4. **Curr Opin Lipidol** 17:152-156, 2006.
31. Luo J: The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. **Cerebellum** 4:239-245, 2005.
32. Maher CO, Piepgras DG, Brown RD, Friedman JA, Pollock BE: Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Stroke** 32:877-882, 2001.
33. Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, Fruttiger M, Arthur HM: Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. **Circ Res** 106:1425-1433, 2010.
34. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science** 277:55-60, 1997.
35. Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS: Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. **Hum Mol Genet** 12 Spec No 1:R97-112, 2003.
36. Matsubara S, Bourdeau A, terBrugge KG, Wallace C, Letarte M: Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. **Stroke** 31:2653-2660, 2000.
37. Matsubara S, Mandzia JL, ter Brugge K, Willinsky RA, Faughnan ME, Manzia JL: Angiographic and clinical characteristics of patients with

- cerebral arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. **AJNR Am J Neuroradiol** 21:1016-1020, 2000.
38. Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K: Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. **J Neurochem** 74:1008-1016, 2000.
39. Mikhak B, Weinsheimer S, Pawlikowska L, Poon A, Kwok PY, Lawton MT, Chen Y, Zaroff JG, Sidney S, McCulloch CE, Young WL, Kim H: Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) gene polymorphisms and risk of brain arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 31:338-345, 2011.
40. Moftakhar P, Hauptman JS, Malkasian D, Martin NA: Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: cellular and molecular biology. **Neurosurg Focus** 26:E10, 2009.
41. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P: Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **BMJ** 339:b2535, 2009.
42. Park SO, Lee YJ, Seki T, Hong KH, Fliess N, Jiang Z, Park A, Wu X, Kaartinen V, Roman BL, Oh SP: ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. **Blood** 111:633-642, 2008.
43. Pawlikowska L, Poon KY, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lum K, Zaroff JG, Ko NU, Johnston SC, Sidney S, Marchuk DA, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Apolipoprotein E epsilon 2 is associated with new

- hemorrhage risk in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 58:838-843; discussion 838-843, 2006.
44. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, Ha C, Burchard E, Choudhry S, Zaroff J, Lawton MT, Castro R, McCulloch CE, Marchuk D, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in transforming growth factor-beta-related genes ALK1 and ENG are associated with sporadic brain arteriovenous malformations. **Stroke** 36:2278-2280, 2005.
45. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lind DL, Hashimoto T, Zaroff J, Lawton MT, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations. **Stroke** 35:2294-2300, 2004.
46. Plate KH: Mechanisms of angiogenesis in the brain. **J Neuropathol Exp Neurol** 58:313-320, 1999.
47. Sabbà C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M, Dicuonzo F, Guant G: Hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical features in ENG and ALK1 mutation carriers. **J Thromb Haemost** 5:1149-1157, 2007.
48. Sandalcioglu IE, Asgari S, Wende D, van de Nes JA, Dumitru CA, Zhu Y, Gizewski ER, Stolke D, Sure U: Proliferation activity is significantly elevated in partially embolized cerebral arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 30:396-401, 2010.

49. Sandalcioglu IE, Wende D, Eggert A, Müller D, Roggenbuck U, Gasser T, Wiedemayer H, Stolke D: Vascular endothelial growth factor plasma levels are significantly elevated in patients with cerebral arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 21:154-158, 2006.
50. Saunders NR, Knott GW, Dziegielewska KM: Barriers in the immature brain. **Cell Mol Neurobiol** 20:29-40, 2000.
51. Seal RL, Gordon SM, Lush MJ, Wright MW, Bruford EA: genenames.org: the HGNC resources in 2011. **Nucleic Acids Res** 39:D514-519, 2011.
52. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Res** 29:308-311, 2001.
53. Shi C, Shenkar R, Batjer HH, Check IJ, Awad IA: Oligoclonal immune response in cerebral cavernous malformations. Laboratory investigation. **J Neurosurg** 107:1023-1026, 2007.
54. Simon M, Franke D, Ludwig M, Aliashkevich AF, Köster G, Oldenburg J, Boström A, Ziegler A, Schramm J: Association of a polymorphism of the ACVRL1 gene with sporadic arteriovenous malformations of the central nervous system. **J Neurosurg** 104:945-949, 2006.
55. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell** 87:1171-1180, 1996.

56. ten Dijke P, Arthur HM: Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:857-869, 2007.
57. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH, Tarnawski M: Immunogold study of interendothelial junction-associated and glucose transporter proteins during postnatal maturation of the mouse blood-brain barrier. **J Neurocytol** 30:705-716, 2001.
58. Vu TH, Werb Z: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev** 14:2123-2133, 2000.
59. Weinsheimer S, Kim H, Pawlikowska L, Chen Y, Lawton MT, Sidney S, Kwok PY, McCulloch CE, Young WL: EPHB4 gene polymorphisms and risk of intracranial hemorrhage in patients with brain arteriovenous malformations. **Circ Cardiovasc Genet** 2:476-482, 2009.
60. Yu W, Gwinn M, Clyne M, Yesupriya A, Khoury MJ: A navigator for human genome epidemiology. **Nat Genet** 40:124-125, 2008.
61. Zhao Y, Li P, Fan W, Chen D, Gu Y, Lu D, Zhao F, Hu J, Fu C, Chen X, Zhou L, Mao Y: The rs522616 polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) gene is associated with sporadic brain arteriovenous malformation in a Chinese population. **J Clin Neurosci** 17:1568-1572, 2010.

6.2 Artigo 1 em Português: REVISÃO SISTEMÁTICA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS COM MALFORMAÇÃO ARTÉRIOVENOSA CEREBRAL

André Cerutti Franciscatto, M.D.(1, 2)

Fernanda Sperb Ludwig, Biol., Dra. (1, 2)

Úrsula da Silveira Matte, Biol., Dra. (1, 2)

Simone Mota, R.N. (1)

Marco Antônio Stefani, M.D., Dr. (1, 2)

1. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Autor Correspondente: A.C. Franciscatto

Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Telephone: +55 51 3359 8520

FAX: +55 51 3359 8182

e-mail: andre@franciscatto.com

Conflitos de interesse: nenhum

RESUMO

INTRODUÇÃO

A Malformação artério-venosa (MAV) cerebral é uma causa de hemorragia intracraniana (HIC). O aumento do conhecimentos genético sobre as MAVs podem auxiliar no desenvolvimento de novas formas de tratamento ou terapias alternativas no futuro. O objetivo desse estudo foi explorar os dados disponíveis sobre análise de polimorfismos de único nucleotídeo (PNU) na MAV e suas implicações tanto no desenvolvimento da malformação vascular quanto no risco de HIC.

MÉTODOS

Uma pesquisa na literatura disponível no PUBMED e no navegador HuGE(*A Navigator fo Human Genome Epidemiology*) foi realizada utilizando uma combinação de uma ou mais das seguintes palavras chaves: artério-venosa, genética, malformação vascular cerebral, PNU e patogênese. Os artigos foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo examinou o impacto das PNUs no desenvolvimento de MAV. O segundo avaliou as PNUs associadas com risco de sangramento da MAV. As estimativas de risco do desenvolvimento de MAV ou de sangramento foram estimados e calculados para cada polimorfismo.

RESULTADO

Nós encontramos 273 artigos. Desses, somente 38 relatos preencheram os critérios de elegibilidade. Treze forneceram dados sobre o risco de desenvolvimento de MAV ou de sangramento para 61 PNUs. Sete PNUs

demonstraram associação significativa com a presença de MAV e 6 PNUs foram associadas com o risco de hemorragia.

CONCLUSÃO

A etiologia e biologia da MAV parece ser regulada por uma variedade de rotas genéticas. Diversas PNUs foram associadas tanto com a incidência de MAV e risco de HIC.

INTRODUÇÃO

As malformações arteriovenosas (MAV) cerebrais são uma causa de hemorragia intracraniana (Acidente Vascular Cerebral hemorrágico). Sua morfologia básica é um emaranhado de vasos anormais e dilatados, com tecido cerebral e gliose entre eles, chamado de *nidus*, que produz comunicações (*shunt*) entre a circulação arterial e venosa sem um verdadeiro leito capilar (40). A prevenção do sangramento ou do ressangramento de uma MAV é o objetivo do tratamento. A melhoria do conhecimento genético sobre as MAVs poderia auxiliar no desenvolvimento de novas formas de tratamento ou terapias preventivas.

Além disso, ao identificar milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (PNU), a tecnologia de genotipagem impulsionou dramaticamente o rendimento de estudos de associação genética. Traduzir esses dados em uma informação útil para a ciência da saúde depende em revisões sistemáticas e síntese do conhecimento (21).

O objetivo desse estudo é explorar os dados disponíveis a respeito da análise de PNUs nas MAVs e sua implicação tanto para o desenvolvimento da malformação propriamente dita quanto para seu risco de sangramento.

MÉTODOS

Essa revisão sistemática utilizou o protocolo PRISMA (41) para sua elaboração.

Uma pesquisa na base de dados PUBMED (de 1950 até o presente) foi realizada, utilizando uma combinação de um ou mais das seguintes palavras chave: arteriovenosa, genética, malformação vascular cerebral, polimorfismo, único nucleotídeo e patogênese. Uma pesquisa complementar foi feita no navegador HuGE (*A Navigator for Human Genome Epidemiology*)(60). Nós também revisamos as referências de todos os artigos a procura de outros estudos relevantes ou citações, incluindo aquelas cujo foco era a telangiectasia hemorrágica hereditária (THH). Não foram incluídas as publicações de THH na análise final. A última pesquisa foi realizada em 20 de Julho de 2012.

Os critérios de seleção dos estudos foram artigos originais sobre polimorfismos genéticos em MAVs. Somente artigos em Inglês foram selecionados. Trabalhos que estudavam a genética de cavernomas, anomalias venosas do desenvolvimento ou aneurismas foram excluídas. Artigos de revisão também foram excluídos para evitar dupla inclusão de dados.

Os artigos foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo estudou o impacto das PNUs no desenvolvimento da MAVs. O segundo avaliou os polimorfismos associados ao risco do sangramento de uma MAV.

Os dados extraídos dos artigos foram: frequências dos alelos entre os casos e controles, número de participantes, Risco Relativo (RR), Odds Ratio (OR) ou Hazard Ratio (HR) e seus intervalos de confiança para o risco de desenvolvimento de MAV ou de sangramento, desenho do estudo, desfechos, a lógica funcional para seleção de cada PNU e método de análise genética. Somente polimorfismos comuns foram incluídos (frequência do menor alelo maior do que 1%). Os dados fornecidos nos artigos não foram uniformes. Para

comparar os riscos entre os diversos polimorfismos, realizamos uma tentativa de padronizar os cálculos. Um modelo dominante (29) para o menor alelo foi usado para calcular os novos ORs e intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Uma tentativa de análise conjunta dos dados foi tentada somente se dois ou mais estudos com o mesmo desfecho investigaram o mesmo PNU.

A análise estatística foi feita com o Qui-quadrado de Pearson. Quando as pressuposições distribucionais ou um valor esperado de menos de 5 observações em cada célula não foram obtidos, nós realizamos um teste de Fisher. O nível de significância desse estudo foi de 5%.

Gráficos de *Forest Plot* foram criados utilizando o programa de informática *Forest Plot Viewer* (5).

Devido à discrepância encontrada nos nomes e símbolos dos genes utilizados pelos diferentes autores, nós utilizamos o protocolo preconizado pelo comitê de nomenclatura genética da HUGO (51) para descrever tanto as abreviações, conhecidas como símbolo do gene, quanto os nomes descritivos. Nesse artigo, apresentaremos a nomenclatura em língua portuguesa e a nomenclatura padronizada em língua inglesa preconizada pelo referido comitê.

O nome utilizado para cada PNU foi padronizado pelo identificador de variação da sequência (de acordo com a HGVS – *Human Genome Variation Society*), utilizando o banco de dados de variações genéticas curtas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (52), *Ensembl Gene Browser* (11) e *1000 Genomes Project* (8). Nós apresentamos as variações com o identificador *dbSNP*. Em poucos casos, não foi possível encontrar o

identificados *dbSNP*. Somente nesses casos o nome comum (sequência e nucleotídeo modificado) foi apresentado.

RESULTADOS

Utilizando as palavras chaves descritas previamente, 273 artigos foram encontrados no PubMed (mais 1 artigo encontrado na base de dados do *HuGE Navigator*). Desses, somente 38 estudos preencheram critérios de elegibilidade para análise do texto completo (figura 1). Desses, seis foram experimentos em animais, 4 séries de casos, 8 casos-controles analisando marcadores teciduais, 3 casos-controles estudando polimorfismos que aumento o risco de hemorragia, 3 estudos de coortes que avaliaram o risco de sangramento segundo perfis genéticos, 6 estudos de casos-controles populacionais que avaliaram PNUs e riscos de desenvolvimento de MAVs, 1 estudo de caso-controle desenhado para avaliar a associação de PNUs tanto com o desenvolvimento de MAVs quanto risco de hemorragia intracraniana e 7 revisões da literatura.

Treze estudos forneceram data a respeito dos riscos do desenvolvimento de MAVs ou de sangramento a malformação para 61 PNUs. A tabela 1 sumariza as PNUs, desenho do estudo, desfechos, lógica funcional e metodologia de análise genética. Ao todo, esses estudos relataram um total de 68 análises de associação. Sete delas apresentaram associação significativa com a presença de MAVs (Figura2) e 6 PNUs foram associados com o risco de sangramento de uma malformação (Figura 3).

Infelizmente, não foi possível realizar a análise conjunta dos dados pois não havia PNUs comparáveis (estudos com mesmo desenho e mesmo desfecho).

Apresentamos OR não ajustado, calculado baseado nos dados disponíveis nos estudos selecionados. A maioria dos artigos calculou o OR controlado para a idade e sexo. A ancestralidade do indivíduo também foi incluída para ajuste em alguns poucos artigos. Nenhuma dessas análises multivariáveis demonstraram diferenças relevantes quando comparada com as análises não ajustadas. Alguns dados foram extraídos de estudos de coorte. Nesse tipo de desenho de estudo os autores forneceram HR e RR que possuem propriedades particulares, apresentadas e discutidas.

DISCUSSÃO

Tradicionalmente, as MAVs têm sido classificadas como lesões congênitas resultado de um desenvolvimento vascular anormal (40).

Entretanto, muitos autores têm sugerido que elas não são lesões congênitas estáticas, mas são dinâmicas, com a capacidade de crescer, progredir e até mesmo reaparecer como novas MAVs após a completa ressecção ou radiocirurgia(40). Existem até mesmo alguns relatos de MAVs sendo diagnosticadas em pacientes com ausência de malformações vasculares em exames prévios (40).

Eventos precipitantes incluiriam traumas subclínicos, hipóxia tecidual, infecção, inflamação, irradiação ou compressão, talvez envolvendo hipertensão venosa localizada como potente estímulo angiogênico para o crescimento ou mesmo origem de uma MAV (24).

Por outro lado, a associação de MAVs com desordens genéticas bem definidas, como a Síndrome Ataxia-Telangiectasia, Síndrome de Wyburn-Mason, doença de Osler-Weber-Rendu, Síndrome de Sturge-Weber e THH parecem dar suporte à importância de fatores genéticos na sua patogênese (10).

1. Genes relacionados à telangiectasia Hemorrágica Hereditária

A THH é uma desordem autossômica dominante com alta prevalência de MAVs que pode ser considerada um modelo natural para a doença esporádica (24). As MAVs herdadas na THH possuem alguns achados morfológicos distintos, mas são geralmente similares às lesões esporádicas e não podem ser diferenciadas individualmente com base em sua arquitetura vascular (32, 37).

A maioria dos casos de THH envolve mutações com perda de função de dois genes originalmente implicados nas vias de sinalização do Fator Transformador de Crescimento – Beta (*Transforming Growth Factor Beta* - TGFB): (1) endogлина (*endoglin* - ENG), que codifica uma proteína acessória do complexo receptor TGFB; e (1) Quinase Tipo Receptor de Ativina 1 (*activin*

receptor-like kinase 1 – ACVRL1 ou ALK1) que codifica uma quinase transmembrana (47) .

1.1 Fator Transformador de Crescimento - Beta

O papel da família de fatores transformadores do crescimento no desenvolvimento vascular é complexo e multidimensional. Nos estágios iniciais, o TGFB inibe a proliferação vascular; em estágios mais tardios, ele promove a diferenciação do tecido mesenquimal circunjacente para pericitos e células musculares lisas (40).

O complexo receptor ligante do TGFB foi implicado na THH. A superfamília do TGFB engloba uma série de polipeptídeos reguladores do crescimento (17). As vias de sinalização do TGFB são complexas e interconectadas (56). Mutações com perda de função nos dois genes das vias dessa via de sinalização (ENG e ACVRL1) são implicadas nos dois principais subtipos da THH (35). Comparadas com as lesões esporádicas, a presença de uma mutação nos genes da ENG ou ACVRL1 resultam, respectivamente, em aumento de 10000 e 1000 vezes o risco de desenvolvimento de MAV (24).

Um estudo de caso-controle recrutou 53 pacientes com MAVs e 120 controles sadios. Todos os participantes eram da etnia chinesa Han do sul daquele país. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na PNU rs1800469, envolvendo o TGFB1, entre pacientes com MAVs e controles ($\chi^2 = 2,380$; $P = 0,304$) e entre pacientes com e sem hemorragia ($\chi^2 = 1,330$; $P =$

0,514) pelos autores (20). Ao contrário dos autores, que utilizaram um modelo de genótipo completo, nós encontramos uma tendência para diferença significativa entre os pacientes com MAV e os controles, utilizando um modelo dominante (Figura 2).

1.2 Endoglin

A ENG aumenta a proliferação endotelial, ativa as células mesenquimais a se diferenciarem no interior da matriz para periquitos e células tronco; essas células migram e circulam os condutos endoteliais segundo a influência do fator transformador do crescimento alfa (*transforming growth factor alpha* – TGFA) (47). Camundongos *knockout* para ENG apresentam uma sequência completa para formação de MAVs, com remodelamento do plexo capilar retardado, aumento da proliferação de células endoteliais e MAVs localizadas. O revestimento muscular típico das comunicações arteriovenosas parece ser secundário à resposta do fluxo sanguíneo aumentado (33).

A análise comparativa de imuno-histoquímica das MAVs e de tecidos cerebrais normais demonstrou que a ENG é expressa em níveis similares nas camadas endoteliais e adventícias das artérias e arteríolas normais bem como artérias e veias arterializadas das MAVs esporádicas. Ao contrário dos achados dos pacientes com THH tipo 1, essas MAVS expressam níveis normais de ENG no endotélio (36).

Sete polimorfismos da ENG foram avaliados em 177 pacientes com MAV comparados com controles saudáveis. Dois polimorfismos, rs10987759 e rs11545664, demonstraram uma tendência de associação com presença de MAV em um modelo de genótipo completo que não alcançou significância estatística (44). Utilizando um modelo dominante, a frequência do alelo A da PNU rs11545664 foi diferente entre casos e controles (figura 2).

1.3 Quinase Tipo Receptor de Activina 1

A ablação específica do gene ACVRL1 de células endoteliais de modelos murinos causam a formação de MAV durante o desenvolvimento, enquanto que camundongos que possuem um *knockout* específico to receptor de fator transformador de crescimento beta I (*transforming growth factor beta receptor I* - TGFBR1 - também conhecido como *ativin-like kinase receptor 5*) ou receptor do fator transformador de crescimento II (*transforming growth factor beta receptor II* - TGFBR2) demonstraram tanto a formação de MAV quanto outros distúrbios da morfogênese vascular (42).

Uma variação intrônica da ACVRL1, rs2071219, esteve presente em maior frequência em casos de MAV em comparação a controles saudáveis (Qualquer A contra GG, regressão logística univariável; OR = 2,47; IC 95%= 1,38-4,44; P = 0,002) (44). Nenhuma associação foi evidenciada em nossos cálculos no modelo dominante para o alelo menor G (figura 2).

Outro estudo que incluiu tanto MAV quanto fístulas arteriovenosas durais (FAVD) identificou uma diferença estatisticamente significativa na associação entre o polimorfismo da ACVRL1 IVS3 -35A>T e o desenvolvimento de MAVs e FAVDs (OR = 1,73; 95% CI = 1,19–2,51; P = 0,004 após ajustes para idade e gênero). Em contraste, nenhuma associação significativa foi encontrada para o PNU IVS9 +45C>T (54). Como os autores apresentaram os dados de MAVs e FAVDs agrupados, nos foi impossível realizar a análise apenas dos pacientes com MAVs.

2. Polimorfismos envolvendo outros genes

2.1 Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (APOE) funciona como um supressor importante da secreção por parte das células gliais do Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor* – TNF) (25). A APOE também promove o efluxo de lipídeos de astrócitos e neurônios (26). O genótipo da APOE tem sido implicado em diversos fenótipos de doenças humanas, incluindo o acidente vascular encefálico hemorrágico e a hemorragia subaracnóide (28). A ordem de potência das isoformas da APOE como ligante de lipídeos é APOE ϵ 2 > APOE ϵ 3 = APOE ϵ 4 em astrócitos e APOE ϵ 2 > APOE ϵ 3 > APOE ϵ 4 em neurônios (38). Uma vez que a APOE ϵ 2 liga-se com maior afinidade com lipídeos, essa isoforma pode não ser tão facilmente disponível para suprimir a secreção glial

do TNF em MAVs quanto as demais isoformas. O genótipo $\epsilon 2$ podem ainda conferir uma atividade proteolítica aumentada, contribuindo para a patogênese da hemorragia da MAV (45).

Imagens cerebrais de 284 pacientes com MAV foram estudadas para novos sangramentos após o diagnóstico em outro estudo longitudinal. A APOE $\epsilon 2$ (HR = 8,71; IC 95% = 1,4–53,9; P = 0,020; modelo multivariável ajustado para a apresentação clínica), mas não o alelo $\epsilon 4$, esteve associado com novos eventos hemorrágicos no curso natural da doença (43). Não encontramos nenhuma associação entre o alelo $\epsilon 2$ da APOE e sangrento intracraniano na análise de OR (Figura 3).

Adicionalmente, uma coorte com 255 pacientes que foram submetidos a tratamento de MAV (embolização, ressecção cirúrgica, radiocirurgia ou uma combinação dessas) foi genotipada e longitudinalmente seguida (média de seguimento de 8 anos e distância interquartílica de 1,6 anos). Os autores sugeriram que o genótipo $\epsilon 2$ da APOE pode contribuir para aumentar o risco de sangramento após o paciente ter sido tratado (HR = 3,2; IC 95% = 1,0–97; P = 0.042) (1). Novamente, não encontramos diferença na análise por OR (Figura 3).

2.2 Metaloproteinases da Matriz

As metaloproteinases da Matriz (*Matrix metalloproteinases* - MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas que degradam a matriz proteica

extracelular, moléculas da superfície celular e outras substâncias pericelulares (31). A degradação excessiva da matriz vascular pelas MMPs poderia resultar em uma desestabilização dos vasos, que potencialmente poderia levar ao enfraquecimento da parede dos vasos e dilatação passiva (12, 13). Esse é um passo crítico na angiogênese e remodelamento vascular (58). Entretanto, isso também parece ser importante para o fenótipo histológico das MAVs. Esse fenótipo é caracterizado por vasos que são estruturalmente incompletos, consistindo de artérias nutridoras alargadas, massas emaranhadas de vasos sanguíneos e veias arterializadas dilatadas (61).

A associação entre genótipos da MMP3 e risco de desenvolvimento de MAV foi avaliado em um estudo de casos e controles envolvendo uma população chinesa de 319 pacientes com MAV e 333 controles. Um total de cinco PNUs (rs569444, rs650108, rs522616, rs632478 e rs645419) nesse gene foi analisado. Esse trabalho observou que somente rs522616 foi associado com MAV esporádica (OR = 0,68, IC 95% = 0,49–0,94; P = 0,019 para AG + GG comparado com o genótipo AA; ajustado para idade e gênero) (61). Em nossa análise não foi encontrado essa associação (Figura 2).

2.3 Genes relacionados à angiogênese

As MAVs exibem ativação do processo de angiogênese, incluindo expressão aumentada de Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (*vascular endothelial growth factor A* - VEGFA) e outros fatores angiogênicos e aumento da proliferação de células endoteliais. Assim, é possível que as MAVs escapem

de um processo de desligamento da angiogênese em adultos e que o crescimento das lesões ocorra por um processo de retroalimentação positiva autócrina (26).

A produção de fatores angiogênicos pelas MAVs pode também ter consequências adversas para outras células da unidade neurovascular (26). Por exemplo, secreção anormal de fatores de crescimento pela MAV pode causar uma estimulação inapropriada da proliferação neuronal ou glial (15). Além disso, o VEGFA e outros fatores angiogênicos aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica que poderia, por sua vez, predispor à ruptura da parede vascular (26).

2.3.1 Fator de crescimento endotelial vascular A

A vasculogênese cerebral ocorre fora do parênquima cerebral, com a formação de um plexo perineural. Os capilares espalham-se a partir do plexo e penetram no tubo neural (46). O crescimento subsequente da vasculatura cerebral ocorre inteiramente pela angiogênese, cuja primeira fase envolve a proliferação e migração das células endoteliais. Um mediador chave desse processo é o VEGFA que é produzido pelas células neurectodérmicas em desenvolvimento e seus progenitores neurais e gliais, em resposta à hipóxia (14). O VEGFA também regula o aumento da permeabilidade capilar. Os capilares em desenvolvimento são caracterizados pela alta permeabilidade e baixos níveis de proteínas juncionais intercelulares (50, 57).

Foi demonstrado que os astrócitos podem secretar VEGFA quando expostos a um ambiente hipóxico. Esse ambiente hipóxico pode ser induzido pelas comunicações (shunts) arteriovenosas existentes na MAV (40).

Um estudo de caso-controle genotipou 319 pacientes com MAV e 333 controles. Esse estudo avaliou 9 PNUs do gene do VEGFA (rs1547651, rs2010963, rs1413711, rs833069, rs3024994, rs3025010, rs3025030, rs3025035, e rs3025039). Quatro dessas variantes e um haplótipo, ACT, foram implicados em uma possível associação com o risco de desenvolver MAV. Em uma regressão logística ajustada para idade e gênero, três PNUs em um modelo codominante (OR = 1,61; IC 95% = 1,01-2,56; P = 0,044 para rs2010963; OR = 1,68; IC 95% = 1,05-2,7; P = 0,031 para rs833069 e OR = 0,49; IC 95% = 0,27-0,91; P = 0,024 para rs3025010), duas PNUs em um modelo dominante (OR, 0,61; IC 95% = 0,4-0,93; P = 0,023 para rs1547651 e OR = 1,44; IC 95% = 1,02-2,02; P = 0,038 para rs833069) e uma PNU em um modelo recessivo (OR = 0,48; IC 95% = 0,26-0,88; P = 0,017 para rs3025010) tiveram associações significativas com o risco de MAV (6).

Nenhuma associação entre VEGFA rs699947 e apresentação hemorrágica em pacientes com MAV foi encontrada (P = 0,6) em um estudo caso-controle com 180 pacientes. Os autores não apresentaram o cálculo de risco (45). Nós calculamos o risco em um modelo dominante para os genótipos AA e AC contra CC (Figura 3).

2.3.2 Angiopietina

Membros do grupo proteico das Angiopoietinas ou Semelhantes à Angiopoietina (*Angiopoietins/angiopoietin-like*, ANGPT/ANGPTL) e seus receptores, Tirosina Quinase Endotelial (*endothelial tyrosine kinase*, TEK), desempenham uma função crítica na angiogênese e na estabilidade vascular (18, 55). A ANGPT1, uma agonista dos receptores TEK, promove uma interação entre as células endoteliais e células de suporte periendoteliais para estabilizar vasos (9, 18, 55). A ANGPT2 é uma antagonista para o receptor TEK cuja ação desestabiliza essas ligações prevenindo a estimulação realizada pela ANGPT1 (18, 34). Os fenótipos vasculares observados pela expressão excessiva da ANGPT2 ou interrupção homozigótica do gene TEK são muito similares aos vasos da MAV (18). Eles apresentam vasos anormalmente dilatados que carecem de estrutura de suporte maduro periendotelial. Similarmente, mutações com perda de função dos genes da TEK são encontradas em pacientes com malformações venosas muco-cutâneas, uma lesão vascular que lembra MAV (18).

Uma correlação positiva entre ANGPT2 e níveis de VEGFA em espécimes cirúrgicos de MAV foi relatada (9, 34) e sugere que fatores angiogênicos podem contribuir para a instabilidade vascular que resulta no sangramento da MAV (19, 48, 49).

2.3.2.1 Proteína semelhante à angiopoietina 4

Enquanto a ANGPTL4, uma glicoproteína codificada pelo gene ANGPTL4, é conhecida pelo seu papel no metabolismo lipídico (27), bem

como na mediação da angiogênese tanto com efeitos pró e antiangiogênicos (30). A ANGPTL4 foi descrita como tendo a capacidade de inibir a permeabilidade vascular, a mobilidade das células tumorais, invasividade, a disseminação e a formação de estruturas tubulares (39). Sobre condições de hipóxia, a ANGPTL4 está suprarregulada tanto ao nível proteico quanto ao nível de RNAm (3, 39).

Comparando polimorfismos da ANGPTL4 em 216 pacientes com MAV e 246 controles, a presença do alelo menor A da rs11672433 foi associada com um risco aumentado da presença de MAV (OR = 1,56; IC 95% = 1,01–2,41; p = 0,046; ajustado para idade e sexo) mas não com a apresentação de hemorragia em casos de MAV. Outras PNUs também foram testadas (rs2278236, rs1044250 e rs1808536), demonstrando nenhuma associação (39). A distribuição completa do genótipo nos pacientes com e sem sangramento na apresentação no grupo com MAV não foi fornecida (Figura 2).

2.3.2.2 Receptor da eritropoietina produzida por hepatócitos B4

O Receptor de eritropoietina produzida por hepatócitos (*Erythropoietin-producing hepatocellular receptor B4* - EPHB4) está envolvido na diferenciação arteriovenosa durante a embriogênese. A sinalização alterada dessa via pode levar à instabilidade vascular, resultando em HIC (59).

Em um estudo com 3 etapas (a primeira um estudo transversal, seguido por uma coorte e um estudo de caso-controle), os autores incluíram 248

pacientes com MAVs (93 com HIC e 155 sem evento hemorrágico) e 225 controles saudáveis com ancestralidade auto relatada. As PNUs com alguma associação foram então genotipadas em 102 casos adicionais (fase II: 37 pacientes com ICH e 65 sem hemorragia) e os dados foram combinados para uma regressão logística multivariável. A última análise envolveu 225 controles saudáveis, investigando-se a etiologia da MAV. Os autores identificaram 2 PNUs localizadas na terminação 5' do EPHB4, rs314313 e rs314308, que foram associadas com um risco reduzido de apresentação hemorrágica em pacientes caucasianos com MAV, mas não com suscetibilidade à MAV (59). Quando todos os 248 casos de MAV (com e sem sangramento) foram comparados com controles em um modelo genético aditivo, ajustado para idade e sexo, as PNUs rs314308 (OR = 0,76; IC 95% = 0,58 a 0,99; P = 0,046) e rs314313 (OR = 0,76; IC 95% = 0,57 a 1,02; P = 0,066) estavam associadas marginalmente com um risco reduzido de MAV. Entretanto, a redução de risco global parece ter sido influenciada pela diferença entre os 93 casos de MAV rota e controles (rs314313: OR = 0,50; IC 95% = 0,33 a 0,77; P = 0,002; rs314308: OR = 0,48; CI 95% = 0,32 a 0,72; P = 0,001). As PNUs não foram associadas com susceptibilidade à MAV quando os 155 casos não rotos foram comparados com controles (rs314313: OR = 0,94; CI 95% = 0,67 a 1,32; P = 0,713; rs314308: OR = 0,95; IC 95% = 0,70 a 1,30; P = 0,746). Esses achados sugerem a associação específica para a apresentação com hemorragia e não ao risco de MAV (59).

2.4 Citocinas Inflamatórias

As MAVs são locais de inflamação ativa. Infiltração robusta de plasmócitos B e respostas imunológicas IgG oligoclonais foram demonstradas (53). Neutrófilos, macrófagos e marcadores inflamatórios são vistos em MAVs (7). Citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas (ILs), foram relatadas estar envolvidas na lesão cerebral isquêmica. Disponibilidade aumentada de ILs no cérebro tende a exacerbar o dano causado por um insulto isquêmico (4). Citocinas inflamatórias, incluindo o TNF e algumas ILs, são potentes estimuladores tanto da angiogênese quanto da quebra da barreira hematoencefálica e podem contribuir para progressão das lesões e ruptura das MAVs (26).

2.4.1 Fator de Necrose Tumoral - alfa

A citocina TNF é um polipeptídeo pleiotrópico, pró-inflamatório e imunomodulatório, implicado nas condições envolvendo processos proteolíticos (16).

A associação dos polimorfismos do TNF (rs361525 e rs1800629) com o risco de HIC foi longitudinalmente estudados em 280 pacientes com MAVs. A PNU rs361525 foi associada com um risco aumentado de novas HICs no curso natural da MAV (HR = 4,01; IC 95% = 1,31-12,29; P = 0,015, ajustado para idade, etnia e história de HIC) (2). Esses autores também publicaram outro

trabalho, mostrando associação da rs361525 com risco de HIC (HR = 3,5; IC 95% = 1,3–9,8; P = 0,016) em pacientes que foram submetidos a alguma modalidade de tratamento (embolização, ressecção cirúrgica, radiocirurgia ou qualquer combinação dos anteriores) (1). Ver Figura 3 para análise de OR.

Um estudo enfocando a associação da rs1800629 e rs361525 com apresentação hemorrágica não alcançou significância estatística (valores não corrigidos de P = 0,055 e P = 0,59, respectivamente). Os autores descreveram que a frequência do Alelo menor (A) da rs1800629 foi menor em pacientes que tiveram apresentação hemorrágica do que em pacientes com MAVs não rotas. Frequências de 0,065 contra 0,13 e P = 0,07 foram apresentadas (45). O nível de significância adotado não foi especificado na metodologia do trabalho. Entretanto, considerando que os intervalos de confiança do artigo foram de 95%, não podemos concordar com os resultados apresentados acima como sendo positivos. Sendo assim, nós recalculamos o OR em um modelo dominante. Nenhuma diferença entre as MAVs rotas e não rotas foram encontradas.

2.4.2 Interleucina 1-Beta

Um grupo de 410 pacientes portadores de MAV foram genotipados para PNUs da IL1B, rs16944, rs1143627 e rs1143634. Uma análise de sobrevida até um evento hemorrágico subsequente foi realizada. Pacientes com o genótipo CC para rs1143627 (HR = 2,7; IC 95% = 1,1–6,6; P = 0,029) ou genótipo TT para rs16944 (HR = 2,6; IC 95% = 1,1–6,5; P = 0,039) tiveram um risco maior

de um novo sangramento, ajustado para idade do diagnóstico, sexo, etnia e apresentação hemorrágica. Para determinar se os polimorfismos da IL1B estavam associados com suscetibilidade aumentada para MAV, uma análise caso-controle restrita aos caucasianos foi realizada. O risco de MAV foi maior em sujeitos com genótipo CC para rs1143627 (OR = 3,2; IC 95% = 1,7-6,1; P < 0,001), genótipo TT para rs16944 (OR = 3,4; IC 95% = 1,7-6,7; P < 0,001) e genótipo CC para rs1143634 (OR = 1,8; IC 95% = 1,2-2,7; P = 0,004) após ajuste para idade e sexo (23). Nós encontramos associação similar para o risco de MAV com rs1143627 e rs1143634 (Figuras 2 e 3).

2.4.3 Interleucina - 6

A Interleucina-6 (*Interleukin-6* - IL6), uma citocina inflamatória com um possível papel no remodelamento da parede vascular das MAVs, é liberada por células endoteliais no interior do nidus da malformação. Ela pode contribuir para a instabilidade vascular, estimulando a liberação de MMP (40).

Casos de MAV e controles saudáveis auto identificados como etnia "Latina" (n=294) foram testados para 83 marcadores informativos de ancestralidade. O polimorfismo rs1800795 foi associado com risco aumentado de MAV (OR = 1,96, IC 95% = 1,03-3,72, P = 0,039, ajustado para idade, sexo e estimativas individuais de ancestralidade) (22).

Um estudo avaliou 180 pacientes com MAVs a respeito de sua apresentação clínica. A frequência do genótipo GG para rs1800795 no gene da

IL6 foi significativamente maior nos pacientes cuja apresentação foi um evento hemorrágico do que nos pacientes com MAVs não rota (OR = 2,43; IC 95% = 1,04 – 5,68; P = 0,003, corrigido para idade, sexo e etnia). A associação das variantes do rs1800795 com características demográficas e da MAV também foram avaliadas. O tamanho da MAV (OR = 2,36; IC 95% = 1,12 to 4,96; P = 0,004) e drenagem venosa exclusiva (OR = 2,36; IC 95% = 1,12 to 4,96; P = 0,001) foram significativamente associadas com a apresentação hemorrágica em homozigotos GG para rs1800795 (45).

Em um modelo dominante, nós corroboramos todos os achados da IL6 em sua associação com suscetibilidade à MAV, exceto o PNU rs1800795 (Figura 2).

5.4 Interleucina 17A

Cinquenta e três pacientes com MAV e 120 controles foram recrutados em um estudo de caso-controle, todos os quais eram chineses da etnia Han, no sul daquele país. Não foi identificada diferença significativa no polimorfismo rs2275913 do gene da Interleucina 17A (*Interleukin* 17A – IL17A) entre os pacientes com MAV e os controles ($\chi^2 = 4.737$, P = 0.094), ou entre pacientes com e sem história de sangramento ($\chi^2 = 5.964$, P = 0.051). Todavia, a frequência do alelo G do rs2275913 em pacientes com hemorragia do que em pacientes sem história de sangramento (66.7% e 45.7%, respectivamente; p < 0.05) (20). Em nossa análise, nenhuma associação foi encontrada para os PNUs do gene da IL17A (Figura 3)

5.5 Receptor do Fator de Crescimento Tumoral Beta II

No mesmo estudo da população Han do sul da China discutido para IL17A, com 53 pacientes com MAV e 120 controles. Os autores diferencas significativas para o PNU rs3087465 do gene do TGFRB2 entre pacientes com MAV e controles ($\chi^2 = 16.256$, $p = 0.000$). Além disso, a frequência do alelo G foi significativamente maior nos pacientes com BAVM sem hemorragia na comparação com os pacientes sem história de sangramento (20). Nós não encontramos essa associação (Figura 2).

5.6 Outras PNUs

Hemorragia intracraniana e susceptibilidade à MAV não foram associadas com outras PNUs como: Interleucina 10 (*Interleukin 10* - IL10) rs1800896, tirosina quinase relacionada à *fms* (*fms-related tyrosine kinase 4* - FLT4) rs1130379 e rs448012, receptor do domínio de inserção da quinase (kinase insert domain receptor - KDR) rs1870377, TEK rs682632, rs3837240 e rs10967719 (20, 45).

CONCLUSÕES

A etiologia e biologia da MAV parecem ser reguladas por uma variedade de rotas genéticas. Diversas PNUs foram identificadas como tendo associação tanto com a incidência de MAV quanto com o risco de sangramento. A identificação de polimorfismos genéticos e haplótipos associados com o desenvolvimento de MAV, bem como com seu curso clínico, poderiam contribuir com a estratificação de risco bem como iluminar sua biologia subjacente. Mais investigações sobre esses fatores genéticos são necessários, incluindo grandes estudos de associação de genoma inteiro (*genome-wide association studies* – GWAS), estudos de replicação e grandes coortes cooperativas.

FINANCIAMENTO

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesses. Não houve nenhuma fonte financiadora para o presente estudo.

REFERÊNCIAS

1. Achrol AS, Kim H, Pawlikowska L, Trudy Poon KY, McCulloch CE, Ko NU, Johnston SC, McDermott MW, Zaroff JG, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Association of tumor necrosis factor-alpha-238G>A and apolipoprotein E2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment. **Neurosurgery** 61:731-739; discussion 740, 2007.
2. Achrol AS, Pawlikowska L, McCulloch CE, Poon KY, Ha C, Zaroff JG, Johnston SC, Lee C, Lawton MT, Sidney S, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Tumor necrosis factor-alpha-238G>A promoter polymorphism is associated with increased risk of new hemorrhage in the natural course of patients with brain arteriovenous malformations. **Stroke** 37:231-234, 2006.
3. Belanger AJ, Lu H, Date T, Liu LX, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C: Hypoxia up-regulates expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: role of hypoxia inducible factor 1alpha. **J Mol Cell Cardiol** 34:765-774, 2002.
4. Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ: Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. **J Neurosci** 21:5528-5534, 2001.
5. Boyles AL, Harris SF, Rooney AA, Thayer KA: Forest Plot Viewer: a new graphing tool. **Epidemiology** 22:746-747, 2011.

6. Chen H, Gu Y, Wu W, Chen D, Li P, Fan W, Lu D, Zhao F, Qiao N, Qiu H, Fu C, Mao Y, Zhao Y: Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor A gene and susceptibility to sporadic brain arteriovenous malformation in a Chinese population. **J Clin Neurosci** 18:549-553, 2011.
7. Chen Y, Zhu W, Bollen AW, Lawton MT, Barbaro NM, Dowd CF, Hashimoto T, Yang GY, Young WL: Evidence of inflammatory cell involvement in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 62:1340-1349; discussion 1349-1350, 2008.
8. Clarke L, Zheng-Bradley X, Smith R, Kulesha E, Xiao C, Toneva I, Vaughan B, Preuss D, Leinonen R, Shumway M, Sherry S, Flicek P, Consortium TGP: The 1000 Genomes Project: data management and community access. **Nat Methods** 9:459-462, 2012.
9. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. **Cell** 87:1161-1169, 1996.
10. Duffy K: Genetics and syndromes associated with vascular malformations. **Pediatr Clin North Am** 57:1111-1120, 2010.
11. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gil L, Gordon L, Hendrix M, Hourlier T, Johnson N, Kähäri AK, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Komorowska M, Koscielny G, Kulesha E, Larsson P, Longden I, McLaren W, Muffato M, Overduin B, Pignatelli M, Pritchard B, Riat HS, Ritchie GR,

- Ruffier M, Schuster M, Sobral D, Tang YA, Taylor K, Trevanion S, Vandrovcova J, White S, Wilson M, Wilder SP, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Durbin R, Fernández-Suarez XM, Harrow J, Herrero J, Hubbard TJ, Parker A, Proctor G, Spudich G, Vogel J, Yates A, Zadissa A, Searle SM: Ensembl 2012. **Nucleic Acids Res** 40:D84-90, 2012.
12. Fujimura M, Watanabe M, Shimizu H, Tominaga T: Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cerebral cavernous malformations: immunohistochemical analysis of MMP-2, -9 and TIMP-2. **Acta Neurochir (Wien)** 149:179-183; discussion 183, 2007.
 13. Gaetani P, Rodriguez y Baena R, Tartara F, Messina AL, Tancioni F, Schiavo R, Grazioli V: Metalloproteases and intracranial vascular lesions. **Neurol Res** 21:385-390, 1999.
 14. Greenberg DA, Jin K: From angiogenesis to neuropathology. **Nature** 438:954-959, 2005.
 15. Ha Y, Kim TS, Yoon DH, Cho YE, Huh SG, Lee KC: Reinduced expression of developmental proteins (nestin, small heat shock protein) in and around cerebral arteriovenous malformations. **Clin Neuropathol** 22:252-261, 2003.
 16. Hansson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med** 352:1685-1695, 2005.

17. Hartsough MT, Mulder KM: Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. **Pharmacol Ther** 75:21-41, 1997.
18. Hashimoto T, Lam T, Boudreau NJ, Bollen AW, Lawton MT, Young WL: Abnormal balance in the angiopoietin-tie2 system in human brain arteriovenous malformations. **Circ Res** 89:111-113, 2001.
19. Hashimoto T, Wu Y, Lawton MT, Yang GY, Barbaro NM, Young WL: Coexpression of angiogenic factors in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 56:1058-1065; discussion 1058-1065, 2005.
20. Jiang N, Li X, Qi T, Guo S, Liang F, Huang Z: Susceptible gene single nucleotide polymorphism and hemorrhage risk in patients with brain arteriovenous malformation. **J Clin Neurosci** 18:1279-1281, 2011.
21. Khoury MJ, Gwinn M, Yoon PW, Dowling N, Moore CA, Bradley L: The continuum of translation research in genomic medicine: how can we accelerate the appropriate integration of human genome discoveries into health care and disease prevention? **Genet Med** 9:665-674, 2007.
22. Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, Choudhry S, González Burchard E, Kwok PY, Sidney S, McCulloch CE, Young WL: Population stratification in a case-control study of brain arteriovenous malformation in Latinos. **Neuroepidemiology** 31:224-228, 2008.
23. Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, Poon A, Burchard EG, Zaroff JG, Sidney S, Ko NU, Achrol AS, Lawton MT, McCulloch CE, Kwok PY, Young WL: Common variants in interleukin-1-Beta gene are associated

- with intracranial hemorrhage and susceptibility to brain arteriovenous malformation. **Cerebrovasc Dis** 27:176-182, 2009.
24. Kim H, Pawlikowska L, Chen Y, Su H, Yang GY, Young WL: Brain arteriovenous malformation biology relevant to hemorrhage and implication for therapeutic development. **Stroke** 40:S95-97, 2009.
 25. Laskowitz DT, Goel S, Bennett ER, Matthew WD: Apolipoprotein E suppresses glial cell secretion of TNF alpha. **J Neuroimmunol** 76:70-74, 1997.
 26. Leblanc GG, Golanov E, Awad IA, Young WL, Collaborators BoVMotBNW: Biology of vascular malformations of the brain. **Stroke** 40:e694-702, 2009.
 27. Legry V, Bokor S, Cottel D, Beghin L, Catasta G, Nagy E, Gonzalez-Gross M, Spinneker A, Stehle P, Molnár D, Moreno LA, Amouyel P, Dallongeville J, Meirhaeghe A: Associations between common genetic polymorphisms in angiotensin-like proteins 3 and 4 and lipid metabolism and adiposity in European adolescents and adults. **J Clin Endocrinol Metab** 94:5070-5077, 2009.
 28. Leung CH, Poon WS, Yu LM, Wong GK, Ng HK: Apolipoprotein e genotype and outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke** 33:548-552, 2002.
 29. Lewis CM: Genetic association studies: design, analysis and interpretation. **Brief Bioinform** 3:146-153, 2002.

30. Li C: Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4. **Curr Opin Lipidol** 17:152-156, 2006.
31. Luo J: The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. **Cerebellum** 4:239-245, 2005.
32. Maher CO, Piepgras DG, Brown RD, Friedman JA, Pollock BE: Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Stroke** 32:877-882, 2001.
33. Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, Fruttiger M, Arthur HM: Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. **Circ Res** 106:1425-1433, 2010.
34. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science** 277:55-60, 1997.
35. Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS: Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. **Hum Mol Genet** 12 Spec No 1:R97-112, 2003.
36. Matsubara S, Bourdeau A, terBrugge KG, Wallace C, Letarte M: Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. **Stroke** 31:2653-2660, 2000.
37. Matsubara S, Mandzia JL, ter Brugge K, Willinsky RA, Faughnan ME, Manzia JL: Angiographic and clinical characteristics of patients with

- cerebral arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. **AJNR Am J Neuroradiol** 21:1016-1020, 2000.
38. Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K: Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. **J Neurochem** 74:1008-1016, 2000.
39. Mikhak B, Weinsheimer S, Pawlikowska L, Poon A, Kwok PY, Lawton MT, Chen Y, Zaroff JG, Sidney S, McCulloch CE, Young WL, Kim H: Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) gene polymorphisms and risk of brain arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 31:338-345, 2011.
40. Moftakhar P, Hauptman JS, Malkasian D, Martin NA: Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: cellular and molecular biology. **Neurosurg Focus** 26:E10, 2009.
41. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P: Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **BMJ** 339:b2535, 2009.
42. Park SO, Lee YJ, Seki T, Hong KH, Fliess N, Jiang Z, Park A, Wu X, Kaartinen V, Roman BL, Oh SP: ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. **Blood** 111:633-642, 2008.
43. Pawlikowska L, Poon KY, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lum K, Zaroff JG, Ko NU, Johnston SC, Sidney S, Marchuk DA, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Apolipoprotein E epsilon 2 is associated with new

- hemorrhage risk in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 58:838-843; discussion 838-843, 2006.
44. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, Ha C, Burchard E, Choudhry S, Zaroff J, Lawton MT, Castro R, McCulloch CE, Marchuk D, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in transforming growth factor-beta-related genes ALK1 and ENG are associated with sporadic brain arteriovenous malformations. **Stroke** 36:2278-2280, 2005.
45. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lind DL, Hashimoto T, Zaroff J, Lawton MT, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations. **Stroke** 35:2294-2300, 2004.
46. Plate KH: Mechanisms of angiogenesis in the brain. **J Neuropathol Exp Neurol** 58:313-320, 1999.
47. Sabbà C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M, Dicuonzo F, Guant G: Hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical features in ENG and ALK1 mutation carriers. **J Thromb Haemost** 5:1149-1157, 2007.
48. Sandalcioglu IE, Asgari S, Wende D, van de Nes JA, Dumitru CA, Zhu Y, Gizewski ER, Stolke D, Sure U: Proliferation activity is significantly elevated in partially embolized cerebral arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 30:396-401, 2010.

49. Sandalcioglu IE, Wende D, Eggert A, Müller D, Roggenbuck U, Gasser T, Wiedemayer H, Stolke D: Vascular endothelial growth factor plasma levels are significantly elevated in patients with cerebral arteriovenous malformations. **Cerebrovasc Dis** 21:154-158, 2006.
50. Saunders NR, Knott GW, Dziegielewska KM: Barriers in the immature brain. **Cell Mol Neurobiol** 20:29-40, 2000.
51. Seal RL, Gordon SM, Lush MJ, Wright MW, Bruford EA: genenames.org: the HGNC resources in 2011. **Nucleic Acids Res** 39:D514-519, 2011.
52. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K: dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Res** 29:308-311, 2001.
53. Shi C, Shenkar R, Batjer HH, Check IJ, Awad IA: Oligoclonal immune response in cerebral cavernous malformations. Laboratory investigation. **J Neurosurg** 107:1023-1026, 2007.
54. Simon M, Franke D, Ludwig M, Aliashkevich AF, Köster G, Oldenburg J, Boström A, Ziegler A, Schramm J: Association of a polymorphism of the ACVRL1 gene with sporadic arteriovenous malformations of the central nervous system. **J Neurosurg** 104:945-949, 2006.
55. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell** 87:1171-1180, 1996.

56. ten Dijke P, Arthur HM: Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:857-869, 2007.
57. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH, Tarnawski M: Immunogold study of interendothelial junction-associated and glucose transporter proteins during postnatal maturation of the mouse blood-brain barrier. **J Neurocytol** 30:705-716, 2001.
58. Vu TH, Werb Z: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev** 14:2123-2133, 2000.
59. Weinsheimer S, Kim H, Pawlikowska L, Chen Y, Lawton MT, Sidney S, Kwok PY, McCulloch CE, Young WL: EPHB4 gene polymorphisms and risk of intracranial hemorrhage in patients with brain arteriovenous malformations. **Circ Cardiovasc Genet** 2:476-482, 2009.
60. Yu W, Gwinn M, Clyne M, Yesupriya A, Khoury MJ: A navigator for human genome epidemiology. **Nat Genet** 40:124-125, 2008.
61. Zhao Y, Li P, Fan W, Chen D, Gu Y, Lu D, Zhao F, Hu J, Fu C, Chen X, Zhou L, Mao Y: The rs522616 polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) gene is associated with sporadic brain arteriovenous malformation in a Chinese population. **J Clin Neurosci** 17:1568-1572, 2010.

6.3 ARTIGO 2 EM INGLÊS: POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH SPORADIC BRAIN ARTERIOVENOUS MALFORMATION ARE NOT REPLICATED IN A POPULATION FROM SOUTH BRAZIL

André Cerutti Franciscatto, M.D.(1, 2)

Fernanda Sperb Ludwig, Biol., Ph.D. (1, 2)

Úrsula da Silveira Matte, Biol., Ph.D. (1, 2)

Simone Mota, R.N. (1)

Marco Antônio Stefani, M.D., Ph.D. (1, 2)

1.Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculty of Medicine - Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

2.Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding and reprint author: A.C. Franciscatto

Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Telephone: +55 51 3359 8520

FAX: +55 51 3359 8182

e-mail: andre@franciscatto.com

Conflicts of Interest: none

ABSTRACT

INTRODUCTION

Brain arteriovenous malformations (BAVM) are a cause of intracranial hemorrhage (ICH). We genotyped 7 polymorphisms in genes associated with the inflammatory response and angiogenic pathways based on our biological hypothesis and previous results. The aim of this study was to reproducibly determine if any of the polymorphisms were associated with the susceptibility to BAVM or the risk of ICH presentation.

METHODS

A total of 63 BAVM patients and 96 healthy controls were recruited. The polymorphisms selected for evaluation were apolipoprotein E (APOE), tumor necrosis factor alpha (TNF 238G>A - rs361525), interleukin 1 beta (IL1B IL1B 511C>T - rs16944 and IL1B -31T>C - rs1143627), activin-like kinase 1 (ACVRL1 IVS3-35A>G - rs2071219), endoglin (ENG 207G>A - rs11545664) and interleukin 6 (IL6 174G>C - rs1800795). We used both dominant and multiplicative models for the minor allele to calculate the risks of both BAVM and ICH presentation. A multivariate regression model was performed to control for gender, age and ethnicity (self-reported) for the risk of BAVM. We used the Spetzler-Martin grade in multivariable analysis to determine the risk of ICH presentation.

RESULTS

In the single analysis, we observed statistically significant differences in the allele distributions for IL1B -31T>C (rs1143627) between the BAVM patients and control subjects (P=0.02). There was a trend toward significance for the association between the IL1B 511C>T (rs16944) allele and BAVM risk (p = 0.07). In further logistic regression analysis, no polymorphism was significantly associated with the risk of BAVM. No polymorphisms were associated with hemorrhage presentation according to both single and multivariable analysis.

CONCLUSION

In this population, the risks of BAVM and ICH presentation were not associated with any of the selected polymorphisms.

INTRODUCTION

Brain arteriovenous malformations (BAVM) are a cause of intracranial hemorrhage (ICH). The basic morphology of BAVM consists of a tangle of abnormal and dilated channels with intervening gliosis, called the nidus, that directly shunts blood circulation between the arteries and veins without a true capillary bed (1). The prevention of BAVM bleeding or rebleeding is the aim of treatment. Improving the genetic knowledge of BAVMs could lead to the development of new forms of treatments and future prevention therapies (2).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are common in the human genome, have been shown to play an important role in the prediction and diagnosis of diseases (3). In a previous meta-analysis, several SNPs were associated with the clinicopathology of BAVM; however some discrepant results were found (2), and these studies lacked replication.

We genotyped 7 polymorphisms in genes associated with the inflammatory response and angiogenic pathways based on our biological hypothesis and previous results. The aim of this study was to reproducibly determine if any of the polymorphisms were associated with the susceptibility to BAVM or the risk of hemorrhagic presentation.

METHODS

This case-control study on genetic association used the STREGA statement for elaborating, conducting and reporting research (4).

A total of 63 patients with BAVM were recruited (convenience sampling) from the Department of Neurosurgery of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA), Brazil, as a part of our larger HCPA BAVM registry.

In addition, 96 healthy volunteers served as the controls. The inclusion criteria for the controls were as follows: (I) aged 18 years to 65 years; (II) the absence of a history of severe brain trauma; and (III) the absence of a family history of cerebrovascular diseases or intracranial tumors. All of the patients and controls were assessed for age, sex and ethnicity (self-reported). BAVM patients were evaluated for the Spetzler-Martin Grade and clinical presentation. Intracranial blood on previous computed tomography or magnetic resonance imaging and a history of intracranial hemorrhage (ICH) were used to define BAVM presentation, and these patients were grouped as 'ruptured'. The patients who did not contain evidence of bleeding but presented with seizure, focal ischemic deficit, headache and apparently unrelated symptoms or were asymptomatic were grouped as 'unruptured'.

Each participant provided informed consent, and the study was approved by the Human Subjects Review Committee of HCPA.

The genes selected for evaluation were apolipoprotein E (APOE), tumor necrosis factor alpha (TNF), interleukin 1 beta (IL1B), activin-like kinase 1 (ACVRL1), endoglin (ENG), and interleukin 6 (IL6).

Fasting venous blood was collected, and deoxyribonucleic acid was harvested as previously described (5). The blood samples were stored at -80°C until use. TaqMan® SNP Genotyping (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used to study the SNPs TNF 238G>A (rs361525), IL1B 511C>T (rs16944),

IL1B -31T>C (rs1143627), ACVRL1 IVS3-35A>G (rs2071219), ENG 207G>A (rs11545664), and IL6 174G>C (rs1800795), and direct Sanger sequencing was used for genotyping APOE.

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences version 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested with the Pearson’s chi-squared (χ^2) test. If HWE was present in the controls, we used both the dominant and multiplicative models for the minor allele to calculate the Odds Ratio (OR) and 95% confidence intervals (95%CI) for BAVM risk. If HWE was not present in the control group, we calculated OR based only on a dominant model for the minor allele.

The categorical data and rates were compared with the χ^2 -test. The Fisher’s exact probability test was used if the distributional assumptions or an expected value of at least 5 observations in each cell were not achieved. Continuous variables (e.g., age at presentation) were analyzed with a T-test. The Mann-Whitney test was used if a non-normal distribution was present.

A multivariate regression model was performed to control for gender, age and ethnicity for BAVM risk. We used the Spetzler-Martin grade in multivariable analysis for the risk of hemorrhage presentation.

The overall value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The demographics of the groups are shown in Table 1. There were no significant differences in age, ethnicity or gender between the patients with BAVM and the controls. Aside from gender frequency, we found no differences in demographic or BAVM characteristics between the patients with or without ICH presentation (Table 2).

The genotype frequency distributions of all seven polymorphisms were consistent with HWE both in the cases and controls (Table 3). All SNPs in our study population had a minor allele frequency greater than 5%.

In the single analysis, we observed statistically significant differences in the allele distributions for IL1B -31T>C (rs1143627) between the BAVM patients and control subjects ($P=0.02$). There was a trend towards significance for the association of IL1B 511C>T (rs16944) with BAVM risk ($p = 0.07$). In a logistic regression analysis that was adjusted for the Caucasian ethnicity, age and the male gender, there were no significant associations between the polymorphisms and the risk of BAVM (Table 3).

Single and multivariable analysis displayed no association between the polymorphisms and hemorrhage presentation (Table 4).

DISCUSSION

In this case-control study, we investigated the potential associations between polymorphisms in TNF (238G>A (rs361525)), IL1B (511C>T (rs16944)), IL1B (-31T>C (rs1143627)), ACVRL1 (IVS3-35A>G (rs2071219)),

ENG (207G>A (rs11545664)), IL6 (174G>C (rs1800795)) and APOE with the risks of developing BAVM and ICH. A trend towards an association was found between IL1B polymorphisms (rs16944 and rs1143627) and BAVM risk. These findings were not supported by a multivariable analysis. No associations were found for hemorrhage presentation.

The association between BAVMs and well-defined genetic disorders, such as Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT), highlights the importance of genetic contributions to pathogenesis (6). The majority of HHT cases involve loss-of-function mutations in two genes originally implicated in transforming growth factor – beta (TGFB) signaling pathways: (1) ENG, encoding an accessory protein of TGFB receptor complexes; and (2) ACVRL1, encoding a transmembrane kinase (7).

In a study performed by Pawlikowska et al. (8), 7 SNPs in ENG were analyzed in 177 BAVM patients. Two of the SNPs (rs10987759 and rs11545664) showed only a trend towards an association with BAVM in a full genotype model that did not reach statistical significance.

The same study reported that an intronic variant of ACVRL1, rs2071219, was present at a higher frequency in BAVM cases compared to healthy controls (Any A versus GG univariable logistic regression; OR = 2.47; 95% CI = 1.38-4.44; P = 0.002) (8).

APOE is an important suppressor of TNF secretion from glial cells. The APOE ε2 genotype is implicated in the pathogenesis of BAVM (5). Longitudinal imaging studies performed on 284 BAVM patients were evaluated to determine if additional intracranial hemorrhaging occurred after diagnosis. The APOE ε2

allele (HR = 8.71; 95% CI = 1.4–53.9; P = 0.020; multivariate model adjusting for clinical presentation), but not the APOE ϵ 4 allele, was associated with hemorrhaging in the natural course (9). Additionally, another cohort consisting of 255 patients undergoing BAVM treatment (embolization, arteriovenous malformation resection, radiosurgery or any combination of these treatments) was genotyped and longitudinally followed (mean follow-up period of 1.9 years, and an interquartile range of 1.6 year). The authors suggested that the APOE genotype ϵ 2 may contribute to an increased risk of a hemorrhage after BAVM treatment (HR = 3.2; 95% CI = 1.0–9.7; P = 0.042) (10).

BAVMs are sites of active inflammation. Inflammatory cytokines, including TNF and some interleukins, are potent stimulators of both angiogenesis and blood-brain barrier breakdown and could contribute to the progression and rupture of lesions (11).

The association between TNF polymorphisms (rs361525 and rs1800629) and the risk of ICH was longitudinally studied in 280 BAVM patients by Achrol et al. (12). The rs361525 SNP was associated with an increased risk of intracranial hemorrhaging during the natural course of BAVM (HR = 4.01; 95% CI = 1.31-12.29; P = 0.015 adjusted for age, ethnicity and history of ICH). The same authors also published another prospective study reporting an association between the rs361525 allele and ICH risk (HR = 3.5; 95% CI = 1.3–9.8; P = 0.016) in patients who underwent some type of treatment (embolization, surgical resection, radiosurgery or any combination) (10). However, a case-control study focusing on the association between the rs1800629 and rs361525 alleles and ICH presentation did not reach significance (uncorrected P = 0.055 and P = 0.59, respectively) (5).

Patients (n=410) with BAVM were genotyped for SNPs in the IL1B promoter (rs16944, rs1143627 and rs1143634). A survival analysis of the time to ICH was performed. Patients with the rs1143627 CC genotype (HR = 2.7; 95% CI = 1.1–6.6; P = 0.029) or the rs16944 TT genotype (HR = 2.6; 95% CI = 1.1–6.5; P = 0.039) had a greater risk of ICH. These results were adjusted for the age at diagnosis, gender, ethnicity and hemorrhagic presentation. To determine if IL1B SNPs were associated with BAVM susceptibility, a subsequent case-control analysis restricted to Caucasians was performed. The risk of BAVM was higher in subjects with the rs1143627 CC (OR = 3.2; 95% CI = 1.7–6.1; P < 0.001), rs16944 TT (OR = 3.4; 95% CI = 1.7-6.7; P < 0.001) and rs1143634 CC (OR = 1.8; 95% CI = 1.2-2.7; P = 0.004) genotypes after adjusting for age and sex (5).

The IL1B polymorphism rs16944 was analyzed in 101 unrelated BAVM patients and in 210 healthy subjects. No significant differences were found in the distribution of either genotypic or allelic frequency between the cases and controls. A Kaplan-Meier analysis (mean of follow-up was 7.74 ± 2.58 years) revealed that BAVM patients carrying 1 or 2 copies of the T allele for rs16944 show a trend towards a higher risk of rebleeding compared to the other patients (CT + TT vs CC, $\chi^2 = 3.678$, P = .055) (13).

BAVM cases and healthy controls of self-reported Latino ethnicity (n = 294) were tested for 83 ancestry informative markers. The GG genotype of the rs1800795 polymorphism for IL6 was associated with an increased risk of BAVM (OR = 1.96, 95% IC = 1.03-3.72, P = 0.039, adjusted for age, sex and individual ancestry estimates) (14).

Another study evaluated the clinical presentation of 180 BAVM patients. The frequency of the rs1800795 GG genotype for IL6 was significantly greater in hemorrhagic patients than in patients with unruptured BAVM (OR = 2.43; CI = 1.04 to 5.68; P = 0.003 corrected for age, gender and ethnicity). In this study, BAVM size (OR = 2.36; 95% CI = 1.12 to 4.96; P = 0.004) and exclusively deep venous drainage (OR = 2.36; 95% CI = 1.12 to 4.96; P = 0.001) were significantly associated with ICH presentation in rs1800795 GG homozygotes (5).

Several limitations of our study need to be addressed. The sample size may not have been large enough to detect small effects from SNPs of low penetrance. Case-control studies in admixed populations, like ours, are susceptible to genetic confounding. A large sample size with replicative studies and the control for genetic ancestry informative markers could overcome these limitations. False positives (type I error) for the IL1B -31T>C allele (rs1143627) in a single analysis may have occurred after multiple testing. The Bonferroni correction was not applied because significance was not maintained in the logistic regression.

It should be noted that genome-wide association studies (GWAS) are important to perform in addition to candidate gene studies. These studies permit the analysis of the entire human genome while being unconstrained by prior hypotheses, provide important clues to genomic functional and pathophysiologic mechanisms, demonstrate gene-gene interactions and detect high-risk haplotypes.

However, GWAS can also be problematic because the large number of statistical tests that are performed can lead to false-positive results (spurious association) requiring the replication of the findings (15) or false-negative results (Bonferroni overcorrection). Furthermore, because BAVM is a rare disease, a significant international collaboration is needed to assemble a cohort large enough to study the genetics of BAVM and the risks of rupture.

CONCLUSION

In this population, the risks of BAVM and ICH presentation were not associated with the following selected polymorphisms: TNF 238G>A (rs361525), IL1B 511C>T (rs16944), IL1B -31T>C (rs1143627), ACVRL1 IVS3-35A>G (rs2071219), ENG 207G>A (rs11545664), IL6 174G>C (rs1800795) and ApoE. The role of these polymorphisms in the pathogenesis of BAVM and the risk of rupture warrants larger replicative studies with an ethnically diverse population, including large GWAS.

DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest. The Research Foundation of the State of Rio Grande do Sul (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul* – FAPERGS) was the only founding source of this research.

REFERENCES

1. Moftakhar P, Hauptman JS, Malkasian D, Martin NA: Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: Cellular and molecular biology. **Neurosurg Focus** 26:E10, 2009 .
2. Franciscatto AC, Ludwig FS, Matte ÚdS, Mota S, Stefani MA: Sistematic review of genetic polymorphisms associated with brain arteriovenous malformation. **In press**, 2013.
3. Jiang N, Li X, Qi T, Guo S, Liang F, Huang Z: Susceptible gene single nucleotide polymorphism and hemorrhage risk in patients with brain arteriovenous malformation. **J Clin Neurosci** 18:1279-1281, 2011.
4. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou GY, Hutchings K, Johnson CY, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A, Birkett N: Strengthening the reporting of genetic association studies (strega)--an extension of the strobe statement. **Eur J Clin Invest** 39:247-266. 2009.
5. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lind DL, Hashimoto T, Zaroff J, Lawton MT, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations. **Stroke** 35:2294-2300, 2004.
6. Duffy K: Genetics and syndromes associated with vascular malformations. **Pediatr Clin North Am** 57:1111-1120, 2010.

7. Sabbà C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M, Dicuonzo F, Guant G: Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Clinical features in eng and alk1 mutation carriers. **J Thromb Haemost** 5:1149-1157, 2007.
8. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, Ha C, Burchard E, Choudhry S, Zaroff J, Lawton MT, Castro R, McCulloch CE, Marchuk D, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in transforming growth factor-beta-related genes alk1 and eng are associated with sporadic brain arteriovenous malformations. **Stroke** 36:2278-2280, 2005.
9. Pawlikowska L, Poon KY, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lum K, Zaroff JG, Ko NU, Johnston SC, Sidney S, Marchuk DA, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Apolipoprotein e epsilon 2 is associated with new hemorrhage risk in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 58:838-843, 2006.
10. Achrol AS, Kim H, Pawlikowska L, Trudy Poon KY, McCulloch CE, Ko NU, Johnston SC, McDermott MW, Zaroff JG, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Association of tumor necrosis factor-alpha-238g>a and apolipoprotein e2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment. **Neurosurgery** 61:731-739, 2007.
11. Leblanc GG, Golanov E, Awad IA, Young WL, Collaborators BoVMotBNW: Biology of vascular malformations of the brain. **Stroke** 40:e694-702, 2009.
12. Achrol AS, Pawlikowska L, McCulloch CE, Poon KY, Ha C, Zaroff JG, Johnston SC, Lee C, Lawton MT, Sidney S, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Tumor necrosis factor-alpha-238g>a promoter

polymorphism is associated with increased risk of new hemorrhage in the natural course of patients with brain arteriovenous malformations. **Stroke** 37:231-234, 2006.

13. Fontanella M, Rubino E, Crobeddu E, Gallone S, Gentile S, Garbossa D, Ducati A, Pinessi L, Rainero I: Brain arteriovenous malformations are associated with interleukin-1 cluster gene polymorphisms. **Neurosurgery** 70:12-17, 2012.
14. Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, Choudhry S, González Burchard E, Kwok PY, Sidney S, McCulloch CE, Young WL: Population stratification in a case-control study of brain arteriovenous malformation in latinos. **Neuroepidemiology** 31:224-228, 2008.
15. Pearson TA, Manolio TA: How to interpret a genome-wide association study. **JAMA** 299:1335-1344, 2008.

6.4 artigo 2 em Português: ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS COM MALFORMAÇÃO ARTÉRIOVENOSA CEREBRAL ESPORÁDICA NÃO FOI REPLICADA EM UMA POPULAÇÃO DO SUL DO BRASIL.

André Cerutti Franciscatto, M.D.(1, 2)

Fernanda Sperb Ludwig, Biol., Ph.D. (1, 2)

Úrsula da Silveira Matte, Biol., Ph.D. (1, 2)

Simone Mota, R.N. (1)

Marco Antônio Stefani, M.D., Ph.D. (1, 2)

1.Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

2.Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Autor Correspondente: A.C. Franciscatto

Serviço de Neurologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Telephone: +55 51 3359 8520

FAX: +55 51 3359 8182

e-mail: andre@franciscatto.com

Conflitos de Interesse: nenhum.

RESUMO

INTRODUÇÃO

A malformação arteriovenosa (MAV) cerebral é uma causa de hemorragia intracraniana (HIC). Foi realizado a genotipagem de 7 polimorfismos em genes associados com a resposta inflamatória e vias angiogênicas, baseados em hipótese biológica e resultados prévios. O objetivo desse estudo é replicar e avaliar a associação de cada polimorfismo com a suscetibilidade do paciente à MAV e ao risco de apresentação hemorrágica.

MÉTODO

Um total de 63 pacientes com MAV e 96 indivíduos saudáveis foram recrutados. Os polimorfismos selecionados para avaliação foram: apolipoproteína E (APOE), fator de necrose tumoral alfa (TNF 238G>A - rs361525), Interleucina 1 beta (IL1B 511C>T - rs16944 e IL1B -31T>C - rs1143627), quinase tipo receptor de ativina (ACVRL1 IVS3-35A>G - rs2071219), endogлина (ENG 207G>A - rs11545664) e interleucina 6 (IL6 174G>C - rs1800795). Os modelos dominante e multiplicativo foram utilizados para calcular tanto o risco de MAV quanto de apresentação com hemorragia. Um modelo de regressão multivariável foi realizado para controle para sexo, idade, etnia (autoclassificação) para risco de MAV. A escala de Spetzler-Martin foi utilizada para análise multivariável para risco de apresentação com HIC.

RESULTADOS

Na análise univariável, foi observado diferença estatisticamente significativa entre pacientes com MAV e indivíduos controles para a distribuição alélica da IL1B -31T>C (rs1143627) (P=0,02). A IL1B 511C>T (rs16944) demonstrou uma tendência à associação com susceptibilidade à MAV (P=0,07). Na análise de regressão logística não houve associação com risco de MAV. Nenhum polimorfismo demonstrou associação com apresentação hemorrágica tanto na análise uni quanto multivariável.

CONCLUSÃO

Nessa população, a suscetibilidade à MAV e o risco de apresentação hemorrágica não foram associados com os polimorfismos selecionados.

INTRODUÇÃO

As malformações arteriovenosas (MAV) cerebrais são uma causa de hemorragia intracraniana (HIC). Sua morfologia básica é um emaranhado de vasos anormais e dilatados, com tecido cerebral e gliose entre eles, chamado de *nidus*, que produz comunicações (*shunt*) entre a circulação arterial e venosa sem um verdadeiro leito capilar (1). A prevenção do sangramento ou ruptura da MAV, bem como do ressangramento, são os objetivos do tratamento (2).

O polimorfismo de nucleotídeo único (PNU), que é comum no genoma humano, tem demonstrado papel importante na predição e diagnóstico de doenças (3). Em uma metanálise prévia, diversas PNUs foram associadas com aspectos clínicos e patológicos da MAV. Mas alguns resultados discrepantes foram encontrados (2). Além disso, esses PNUs carecem de estudos de replicativos.

Nós realizamos a genotipagem de sete polimorfismos em genes associados com a resposta inflamatória e vias angiogênicas, baseados em hipótese biológica e resultados prévios. O objetivo desse estudo é replicar e explorar a associação de cada genótipo com a susceptibilidade dos pacientes à MAV e o risco de apresentação hemorrágica.

MÉTODOS

Esse estudo de caso-controle de associação genética utilizou as recomendações do protocolo STREGA para a elaboração, condução e publicação (4).

Um total de 63 pacientes com MAV foram recrutados (amostragem por conveniência) no Departamento de Neurocirurgia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brasil, como parte de uma coorte maior de pacientes.

Somado a esses, noventa e seis voluntários saudáveis serviram como controles. Os critérios de inclusão dos controles foram: (I) idade entre 18 e 65 anos; (II) ausência de uma história de traumatismo craniano grave; (III) ausência de história familiar de doença cérebro vascular ou tumor intracraniano. Todos os pacientes e controles foram avaliados quanto a idade, sexo e etnia (autoclassificação). O grupo de pacientes com MAV foram avaliados quanto a classificação de Spetzler-Martin e apresentação clínica. Evidência de sangramento intracraniano em imagens prévias de tomografias computadorizadas ou ressonância magnética e história de hemorragia intracraniana (HIC) foram usadas para definir a apresentação clínica da MAV como “rota”. Casos sem evidência de sangramento e apresentação por convulsão, déficit isquêmico focal, cefaléia, sintomas aparentemente não correlacionados ou assintomáticos foram classificados como “não rotas”.

Todos os participantes forneceram consentimento informado e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA.

Os genes selecionados para avaliação foram a Apolipoproteína E (APOE), Fator de Necrose Tumoral Alfa (Tumor necrosis factor alpha – TNF),

Interleucina 1 Beta (IL1B), Quinase Tipo Receptor de Ativina (Activine-like Kinase 1 – ACVRL1), Endoglina (ENG) e Interleucina 6 (IL6).

Sangue venoso foi coletado e armazenado como descrito previamente (5). Então, as amostras de sangue foram preservadas a -80°C . O sistema TaqMan® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de genotipagem de PNU foi utilizado para as seguintes PNUs: TNF 238G>A (rs361525), IL1B 511C>T (rs16944), IL1B -31T>C (rs1143627), ACVRL1 IVS3-35A:G (rs2071219), ENG 207G>A (rs11545664) e IL6 174G>C (rs1800795). O sequenciamento direto com técnica Sanger foi utilizado para genotipar as variantes da APOE.

A análise estatística foi realizada com o *Statistical Package for the Social Sciences version 20.0* (SPSS, Chicago, IL, EUA).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testado com teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2). Quando o EHW fazia-se presente nos controles, nós utilizamos tanto o modelo dominante quanto o multiplicativo para o menor alelo a fim de calcular o Odds Ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (95% IC) para o risco de MAV. Se o EHW não era observado, o cálculo do risco foi baseado apenas em um modelo dominante para o menor alelo.

Variáveis categóricas foram comparados com o teste χ^2 . Teste exato de Fisher foi usado se as suposições distribucionais ou um valor esperado de pelo menos 5 observações em cada célula não foi obtida. Variáveis contínuas (por exemplo, idade de apresentação) foram analisadas com teste T. O teste de Mann-Whitney foi utilizado se uma distribuição não normal foi encontrada.

Um modelo de regressão multivariável foi realizado para controlar para sexo, idade e etnia no cálculo do risco de MAV. Nós adicionamos a

classificação de Spetzler-Martin na análise multivariável para o risco de apresentação com hemorragia.

O P valor menor de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

A comparação das características demográficas entre os grupos está demonstrada na tabela 1. Não houve diferença significativa quanto ao sexo, idade e etnia entre os pacientes com MAV e os controles. Exceto para frequência dos sexos, não foram encontradas diferenças nas variáveis demográficas e características das MAVs comparando pacientes com e sem apresentação hemorrágica (Tabela 2).

As frequências de distribuição dos genótipos de todos os 7 polimorfismos foram compatíveis com aquelas esperadas baseadas no EHW tanto nos casos quanto nos controles (Tabela 3). Todas as PNUs em nossa população estudada tiveram uma frequência do menor alelo maior do que 5%.

Na análise univariável, nós observamos diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles para as distribuições dos alelos da IL1B -31T>C (rs1143627) (P = 0,02). O polimorfismo IL1B 511C>T (rs16944) apresentou uma tendência para associação com risco de MAV (P = 0,07). Entretanto, na análise de regressão logística ajustado para etnia (caucasiana), idade e sexo (masculino) todos os polimorfismos não demonstraram associação com risco de MAV (Tabela 3).

Nenhum polimorfismo demonstrou associação com apresentação hemorrágica tanto na análise univariável quanto na análise multivariável (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Nesse estudo de caso-controle, nós investigamos a potencial associação entre os polimorfismos ACVRL1 IVS3-35A>G (rs2071219), ENG 207G>A (rs11545664), TNF 238G>A (rs361525), IL1B 511C>T (rs16944), IL1B -31T>C (rs1143627), IL6 174G>C (rs1800795) e APOE com a susceptibilidade à MAV e risco de apresentação hemorrágica. Uma tendência à associação foi encontrada entre os PNUs da IL1B (rs16944 e rs1143627) e risco de MAV. Esses achados não persistiram após a análise multivariável. Nenhuma associação foi encontrada para risco de apresentação hemorrágica.

A associação de MAVs com desordens genéticas bem definidas como a telangiectasia hemorrágica hereditária (THH) parece dar suporte à importância da contribuição genética na sua patogênese (6). A maioria dos casos de THH envolve a mutação com perda de função em dois genes originalmente implicados na via de sinalização do Fator Transformador de Crescimento Beta (*Transforming Growth Factor Beta* - TGFB): a ENG, codificadora de uma proteína acessória do complexo receptor TGFB, e a ACVRL1, codificadora de uma quinase transmembrana (7).

Analisando 7 PNUs da ENG em 177 pacientes com MAV, Pawlikowska e col. (8) demonstraram uma tendência à associação de duas PNUs (rs10987759 e rs11545664) em um modelo de genótipo completo que, porém, não atingiram significância estatística.

Outro estudo demonstrou que uma variante intrônica da ACVRL1, rs2071219, estava presente em uma frequência maior entre pacientes com MAV do que entre indivíduos saudáveis (AA e AG combinados versus GG em uma análise univariável; OR = 2,47; CI 95% = 1,38 – 4,44; P = 0,002) (8).

A APOE funciona como um importante supressor das células gliais da secreção de TNF. O genótipo ϵ 2 da APOE foi implicado na patogênese da MAV (5). Estudo de imagens de 284 pacientes com MAV foram avaliados para novos eventos hemorrágicos após o diagnóstico, em uma coorte longitudinal. A APOE ϵ 2 (HR = 8,71; CI 95% = 1,4 – 53,9; P = 0,020; em um modelo multivariável ajustado para apresentação clínica), mas não o alelo APOE ϵ 4, foi associado com novo evento hemorrágico no curso natural da doença [16639317]. Adicionalmente, outra coorte com 255 pacientes que foram submetidos a alguma forma de tratamento da MAV (embolização, ressecção cirúrgica, radiocirurgia ou quaisquer combinações desses) foram genotipados e seguidos longitudinalmente (mediana de seguimento de 1,9 ano e distância interquartil de 1,6 anos). Os autores sugerem que o genótipo ϵ 2 da APOE pode contribuir para o risco aumentado de desfecho hemorrágico após o tratamento da MAV (HR = 3,2; CI 95% = 1,0 – 9,7; P = 0,042) (10).

As MAVs são locais de inflamação ativa. Citocinas inflamatórias, incluindo o TNF e algumas interleucinas, são potentes estimuladores tanto da

angiogênese quanto da quebra da barreira hematoencefálica. Elas podem contribuir para a progressão da lesão e para ruptura (11).

A associação dos polimorfismos do TNF (rs361525 e rs1800629) com o risco de HIC foram estudados longitudinalmente em 280 pacientes com MAV por Achrol e col. (12). A PNU rs361525 foi associada com aumento do risco de nova HIC no curso natural da MAV (HR = 4,01; CI 95% = 1,31 – 12,29; P = 0,015 ajustado para idade, etnia e história de HIC). Esses mesmos autores também publicaram outro estudo prospectivo, demonstrando associação da rs361525 com risco de HIC (HR = 3,05; CI 95% = 1,3–9,8; P = 0,016) em pacientes que foram submetidos a alguma modalidade de tratamento (embolização, ressecção cirúrgica, radiocirurgia ou uma combinação de quaisquer dessas) (10). Por outro lado, um estudo de caso-controle avaliando a associação do rs1800629 e rs361526 com apresentação hemorrágica não alcançou significância (P não corrigido = 0,055 e P = 0,59 respectivamente) [15331795].

Um total de 410 pacientes portadores de MAV foram genotipados para o promotor da IL1B: rs16944, rs1143627 e rs1143634. Uma análise de sobrevivência para HIC subsequente foi realizada. Os pacientes com o genótipo CC para rs1143627 (HR = 2,7; CI 95% = 1,1 – 6,6; P = 0,029) ou o genótipo TT para rs16944 (HR = 2,6; CI 95% = 1,1 – 6,5; P = 0,039) tiveram um aumento no risco de nova HIC, ajustada para idade no momento do diagnóstico, sexo, etnia e apresentação hemorrágica. Para determinar se as PNUs da IL1B estavam associadas com susceptibilidade à MAV, uma análise subsequente de caso-controle restrita a caucasianos foi realizada. O risco de MAV foi maior em indivíduos com genótipo CC para rs1143627 (OR = 3,2; CI 95% = 1,7 – 6,1; P <

0,001), genótipo TT para rs16944 (OR = 3,4; CI 95% = 1,7 – 6,7; P < 0,001) e CC para rs1143634 (OR = 1,8; CI 95% = 1,2 – 2,7; P = 0,004) após ajuste para idade e sexo [19092239].

O polimorfismo rs16944 da IL1 foi analisado em 101 pacientes com MAV sem parentesco entre si e 210 indivíduos saudáveis. Nenhuma diferença foi encontrada na distribuição tanto genotípica quanto alélica entre os casos e controles. Uma análise de Kaplan-Meier (média de seguimento de $7,74 \pm 2,58$ anos) demonstrou que os pacientes com MAV que possuíam 1 ou 2 cópias do alelo T para rs16944 tinham um tendência a risco aumentado de ressangramento em comparação com os indivíduos remanescentes (CT + TT versus CC, $\chi^2 = 3,678$; P = 0,055) (13).

Pacientes com MAV e indivíduos controles, autoclassificados com etnia latina (n=294), foram testados para 83 marcadores informativos de ancestralidade. O genótipo GG a PNU rs1800795 da IL6 foi associada com risco aumentado para MAV (OR = 1,96; IC 95% = 1,03 – 3,72; P = 0,039; ajustado para idade, sexo e ancestralidade individual) (14).

Em um estudo que avaliou 180 pacientes com MAV a respeito de sua apresentação clínica, a frequência do genótipo GG para rs1800795 da IL6 foi significativamente maior em pacientes que se apresentaram com hemorragia do que em pacientes com MAV não rota (OR = 2,43; CI 95% = 1,04 to 5,68; P = 0,003; corrigido para idade, sexo e etnia). Nesse estudo, o tamanho da MAV (OR = 2.36; 95% CI = 1.12 to 4.96; P = 0.004) e a presença de drenagem venosa profunda exclusiva (OR = 2.36; 95% CI = 1.12 to 4.96; P = 0.001) foram

significativamente associadas com a apresentação hemorrágica em homocigotos GG para rs1800795 [15331795].

Algumas limitações do nosso estudo necessitam ser apontadas. O tamanho da amostra pode não ter sido grande o suficiente para detectar pequenos efeitos de PNUs com baixa penetrância. Estudos de casos-controles com populações miscigenadas, como a nossa, são suscetíveis a fatores de confusão genéticos. Uma amostra maior, estudos replicativos e controle para marcadores genéticos informativos de ancestralidade poderiam superar essas limitações. Achados falso-positivos (erro tipo I) para a IL1B -31T>C (rs1143627) na análise univariável pode ter ocorrido após múltiplos testes. Ainda assim, a correção de Bonferroni não foi aplicada porque, de qualquer forma, esse resultado não se manteve após a regressão logística.

Estudos de associação de inteiro genoma (*genome-wide association studies* – GWAS) representará um passo adiante aos estudos de gene candidatos. Ele permitirá a investigação de todo o genoma humano, não ficando restrito a uma hipótese à priori, fornecerá importantes pistas do funcionamento genômico e dos mecanismos fisiopatológicos, demonstrará interações entre os genes e será capaz de detectar haplótipos de alto risco.

Entretanto, a abordagem do GWAS pode também ser problemática, uma vez que o número massivo de testes estatísticos pode levar a resultados falso-positivos (associação espúria), requerendo replicação dos achados (15) ou resultados falso-negativos (supercorreção causada pelo método de ajuste de Bonferroni). Além disso, uma vez que a MAV é uma doença rara, um estudo colaborativo internacional será necessário para montagem de uma coorte

suficientemente grande para estudar as genéticas da MAV e seu risco de ruptura.

CONCLUSÃO

Na amostra da nossa população, o risco de MAV ou de apresentação hemorrágica não foram associadas com os polimorfismos selecionados: ACVRL1 IVS3-35A>G (rs2071219), ENG 207G>A (rs11545664), TNF 238G>A (rs361525), IL1B 511C>T (rs16944), IL1B -31T>C (rs1143627), IL6 174G>C (rs1800795) e APOE. O papel desses polimorfismos na patogênese da MAV e de sua ruptura merecem estudos replicativos maiores com populações étnicas diversas, incluindo GWAS com tamanho grande de amostra.

DECLARAÇÃO

Os autores declaram não possuírem nenhum conflito de interesse. A única fonte de financiamento desse estudo foi a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

1. Moftakhar P, Hauptman JS, Malkasian D, Martin NA: Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: Cellular and molecular biology. **Neurosurg Focus** 26:E10, 2009 .
2. Franciscatto AC, Ludwig FS, Matte ÚdS, Mota S, Stefani MA: Systematic review of genetic polymorphisms associated with brain arteriovenous malformation. **In press**, 2013.
3. Jiang N, Li X, Qi T, Guo S, Liang F, Huang Z: Susceptible gene single nucleotide polymorphism and hemorrhage risk in patients with brain arteriovenous malformation. **J Clin Neurosci** 18:1279-1281, 2011.
4. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou GY, Hutchings K, Johnson CY, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A, Birkett N: Strengthening the reporting of genetic association studies (strega)--an extension of the strobe statement. **Eur J Clin Invest** 39:247-266. 2009.
5. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lind DL, Hashimoto T, Zaroff J, Lawton MT, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations. **Stroke** 35:2294-2300, 2004.
6. Duffy K: Genetics and syndromes associated with vascular malformations. **Pediatr Clin North Am** 57:1111-1120, 2010.

7. Sabbà C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M, Dicuonzo F, Guant G: Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Clinical features in eng and alk1 mutation carriers. **J Thromb Haemost** 5:1149-1157, 2007.
8. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, Ha C, Burchard E, Choudhry S, Zaroff J, Lawton MT, Castro R, McCulloch CE, Marchuk D, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Polymorphisms in transforming growth factor-beta-related genes alk1 and eng are associated with sporadic brain arteriovenous malformations. **Stroke** 36:2278-2280, 2005.
9. Pawlikowska L, Poon KY, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lum K, Zaroff JG, Ko NU, Johnston SC, Sidney S, Marchuk DA, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Apolipoprotein e epsilon 2 is associated with new hemorrhage risk in brain arteriovenous malformations. **Neurosurgery** 58:838-843, 2006.
10. Achrol AS, Kim H, Pawlikowska L, Trudy Poon KY, McCulloch CE, Ko NU, Johnston SC, McDermott MW, Zaroff JG, Lawton MT, Kwok PY, Young WL: Association of tumor necrosis factor-alpha-238g>a and apolipoprotein e2 polymorphisms with intracranial hemorrhage after brain arteriovenous malformation treatment. **Neurosurgery** 61:731-739, 2007.
11. Leblanc GG, Golanov E, Awad IA, Young WL, Collaborators BoVMotBNW: Biology of vascular malformations of the brain. **Stroke** 40:e694-702, 2009.
12. Achrol AS, Pawlikowska L, McCulloch CE, Poon KY, Ha C, Zaroff JG, Johnston SC, Lee C, Lawton MT, Sidney S, Marchuk DA, Kwok PY, Young WL, Project UBS: Tumor necrosis factor-alpha-238g>a promoter

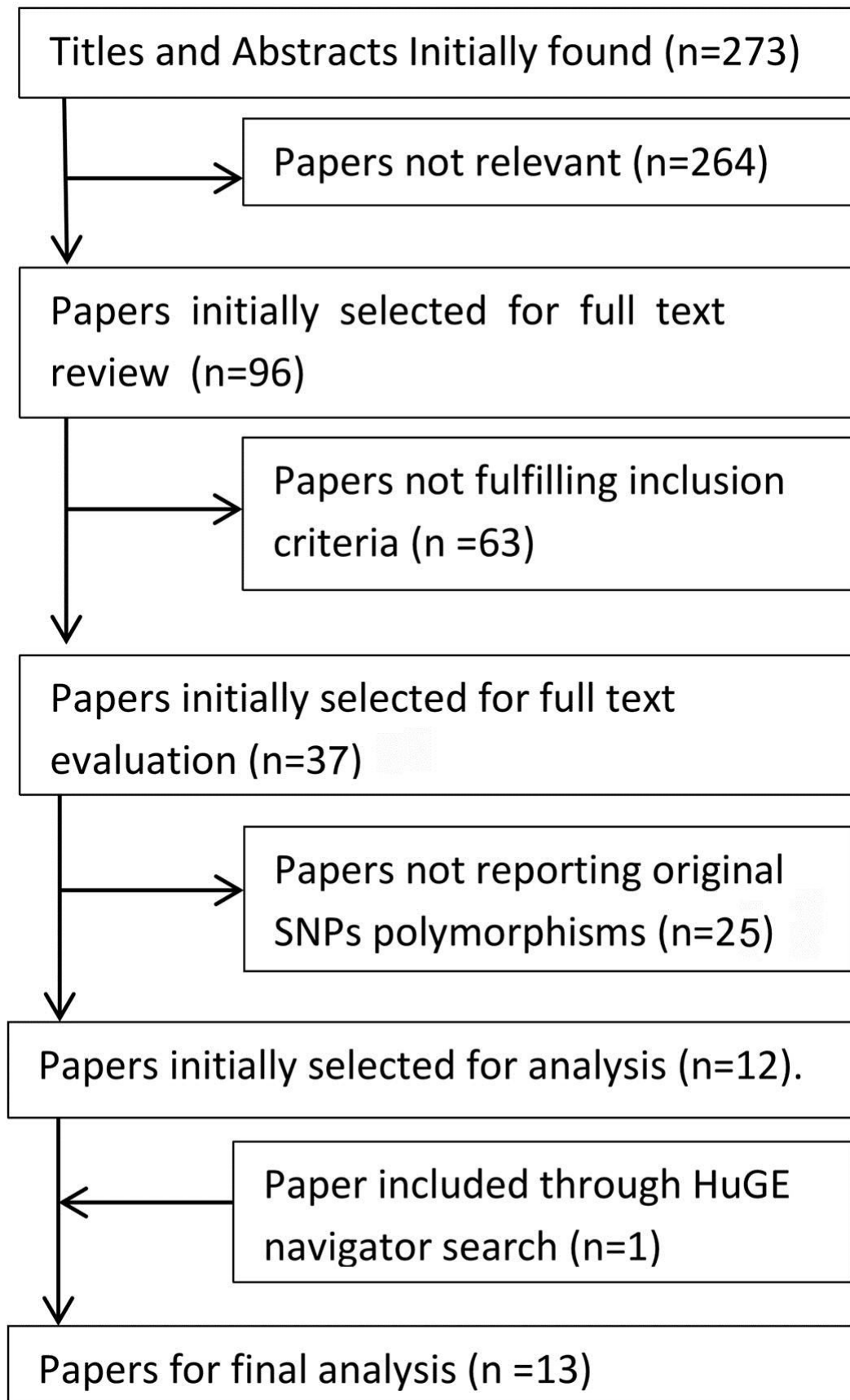
polymorphism is associated with increased risk of new hemorrhage in the natural course of patients with brain arteriovenous malformations. **Stroke** 37:231-234, 2006.

13. Fontanella M, Rubino E, Crobeddu E, Gallone S, Gentile S, Garbossa D, Ducati A, Pinessi L, Rainero I: Brain arteriovenous malformations are associated with interleukin-1 cluster gene polymorphisms. **Neurosurgery** 70:12-17, 2012.
14. Kim H, Hysi PG, Pawlikowska L, Choudhry S, González Burchard E, Kwok PY, Sidney S, McCulloch CE, Young WL: Population stratification in a case-control study of brain arteriovenous malformation in latinos. **Neuroepidemiology** 31:224-228, 2008.
15. Pearson TA, Manolio TA: How to interpret a genome-wide association study. **JAMA** 299:1335-1344, 2008.

7. ANEXOS

7.1 Figuras Artigo 1 em Inglês

7.1.1 Figure 1

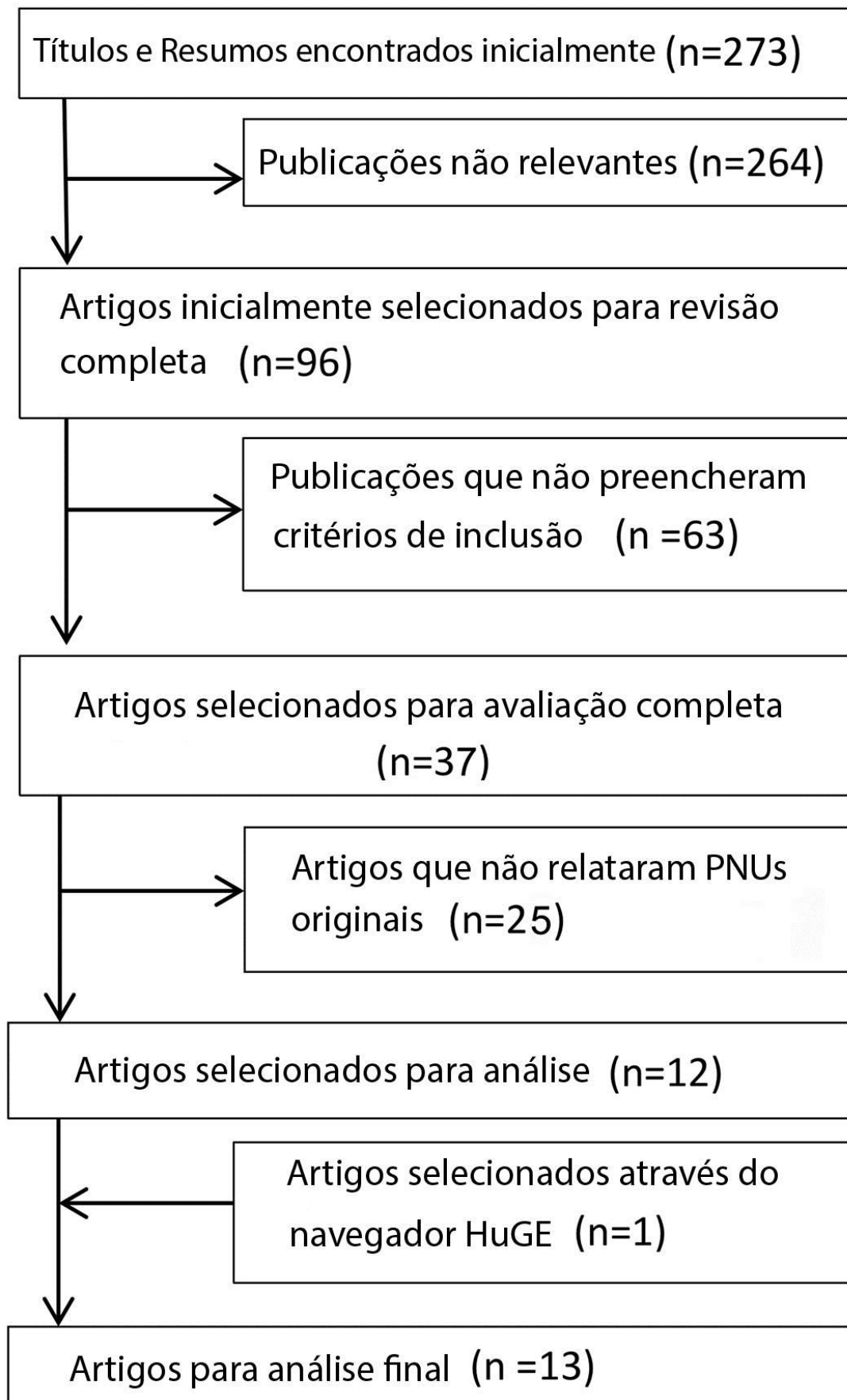


7.1.2 Figure 2

7.1.3 Figure 3

7.2 Figuras Artigo 1 em Português e da Revisão da Literatura

7.2.1 Figura 1



7.2.2 Figura 2

7.2.3 Figura 3

7.3 Tabelas Artigo 1 em Inglês

Gene	Polymorphism	Functional Rationale	Reference	Study Design	Outcome	Methods of Genetic Analysis
TGFB	rs1800469		20	Case-Control	BAVM and history of ICH	PCR-RFLP assay
	rs3087465	PV	20	Case-Control	BAVM and history of ICH	PCR-RFLP assay
ENG	rs10987759	PV, alters predicted CCAAT-binding factor site	44	Case-Control	BAVM	TDDT incorporation assay with FPD
	(-)-11472A>C	PV, creates predicted Isl-1 binding site.	44	Case-Control	BAVM	TDDT incorporation assay with FPD
	(-)-950 G>C	PV, alters predicted AP-1 binding site.	44	Case-Control	BAVM	TDDT incorporation assay with FPD
	rs35400405	Amino acid substitution.	44	Case-Control	BAVM	TDDT incorporation assay with FPD
ACVRL1	rs11545664	Reduces predicted binding score for splicing factor SRp40	44	Case-Control	BAVM	TDDT incorporation assay with FPD
	rs2071219	Intron 3	44	Case-Control	BAVM	TDDT incorporation assay with FPD
MIMP3	rs2071219	Intron 3	54	Case-Control	BAVM	PCR-RFLP assay
	IVS9+45		54	Case-Control	BAVM	PCR-RFLP assay
			1	Cohort	New ICH before some treatment.	TDDT incorporation assay with FPD
APOE			43	Cohort	New ICH	TDDT incorporation assay with FPD
	rs522616	Tagging SNP	61	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
VEGFA	rs569444	Tagging SNP	61	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs650108	Tagging SNP	61	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs632478	PV, modulates transcription	61	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs655419	PV, modulates transcription	61	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs15476151	PV	6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs2010963		6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
ANGPT2	rs1413711		6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs833069		6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs3025010	Intron 5	6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs3024994		6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs3025030		6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs3025035		6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
ANGPTL4	rs3025039		6	Case-Control	BAVM	MassARRAY SNP genotyping platform
	rs699947	PV, modulates transcription	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
ANGPT1	rs3020221	Silent mutation. May influence protein expression.	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs11677433		39	Case-Control	BAVM	TDDT incorporation assay with FPD
ANGPT2	rs2278236		39	Case-Control	BAVM	Beckman Coulter SNPstream 48plex
	rs1044250		39	Case-Control	BAVM	Beckman Coulter SNPstream 48plex
ANGPT1	rs1808536		39	Case-Control	BAVM	TDDT incorporation assay with FPD

EPHB4	rs314346	59	Case-Control	ICH Presentation	BC SNPstream 48plex or TD primer extension with FPD
	rs314353	59	Case-Control	ICH Presentation	BC SNPstream 48plex or TD primer extension with FPD
	rs2230585	59	Case-Control	ICH Presentation	BC SNPstream 48plex or TD primer extension with FPD
	rs144173	59	Case-Control	ICH Presentation	BC SNPstream 48plex or TD primer extension with FPD
	rs314308	59	Case-Control	ICH Presentation	BC SNPstream 48plex or TD primer extension with FPD
	rs2250818	59	Case-Control	ICH Presentation	BC SNPstream 48plex or TD primer extension with FPD
	rs314313	59	Case-Control	ICH Presentation	BC SNPstream 48plex or TD primer extension with FPD
	rs2247445	59	Case-Control	ICH Presentation	BC SNPstream 48plex or TD primer extension with FPD
	rs361525	2	Cohort	New ICH	TDDT incorporation assay with FPD
	rs361525	1	Cohort	New ICH before some treatment.	TDDT incorporation assay with FPD
TNF	rs361525	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1800629	2	Cohort	New ICH	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1800629	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1143627	23	Case-Control and Cohort	BAVM and new ICH	TDDT incorporation assay with FPD
	rs16944	23	Case-Control and Cohort	BAVM and new ICH	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1143634	23	Case-Control and Cohort	BAVM and new ICH	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1800795	22	Case-Control	BAVM	BC SNPstream 48plex
	rs1800795	2	Cohort	New ICH	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1800795	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1800796	2	Cohort	New ICH	TDDT incorporation assay with FPD
IL10	rs1800796	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1800896	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs2275913	20	Case-Control	BAVM and history of ICH	PCR-RFLP assay
	rs1130379	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs448012	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs1870377	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs682632	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs3837240	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
	rs10967719	45	Case-Control	ICH Presentation	TDDT incorporation assay with FPD
IL17A					
FLT4					
KDR					
TEK					

BAVM, brain arteriovenous malformation; BC Beckman-Coulter; FPD, fluorescence-polarization detection; ICH, Intracranial Hemorrhage; PCR-RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain reaction; PV, promoter variant; SNP, single nucleotide polymorphism; TDDT, template-directed dye-terminator.

7.4 Tabelas Artigo 1 em Português e da Revisão da Literatura

Gene	Polimorfismo	Lógica Funcional	Referência	Desenho do Estudo	Desfecho	Método de Análise Genética
TGFB	rs1800469		20	Caso-controle	MAV e história de HIC	Ensaio PCR-RFLP
TGFB	rs3087465	VP	20	Caso-controle	MAV e história de HIC	Ensaio PCR-RFLP
ENG	rs10987759	VP, altera o local predito CCAAT	44	Caso-controle	MAV	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	(-)1472A>C	VP, cria o sítio predito Isl-1	44	Caso-controle	MAV	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	(-)950 G>C	VP, altera o sítio predito Isl-1.	44	Caso-controle	MAV	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs35400405	Substituição de amino-ácido	44	Caso-controle	MAV	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs11545664	reduz o escore de ligação predito para o fator SRp40	44	Caso-controle	MAV	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
ACVRL1	rs2071219	Intron 3	44	Caso-controle	MAV	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs2071219	Intron 3	54	Caso-controle	MAV	Ensaio PCR-RFLP
	IVS9+45		54	Caso-controle	MAV	Ensaio PCR-RFLP
APOE			1	Coorte	Nova HIC após tratamento	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
			43	Coorte	Nova HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
MIMP3	rs522616	Tagging PNU	61	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs569444	Tagging PNU	61	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs650108	Tagging PNU	61	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs632478	VP, modula a transcrição	61	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs655419	VP, modula a transcrição	61	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
VEGFA	rs15476151	VP	6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs2010963		6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs1413711		6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs833069		6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs3025010	Intron 5	6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs3024994		6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs3025030		6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs3025035		6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs3025039		6	Caso-controle	MAV	Plataforma de genotipagem MassARRAY
	rs699947	VP, modula a transcrição	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
ANGPT2	rs3020221	Mutação silenciosa. Pode influenciar a expressão protéica.	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
ANGPT4	rs11677433		39	Caso-controle	MAV	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs2278236		39	Caso-controle	MAV	BC PNUstream 48plex
	rs1044250		39	Caso-controle	MAV	BC PNUstream 48plex
	rs1808536		39	Caso-controle	MAV	Ensaio de incorporação TDDT com DPF

EPH4	rs314346	59	Caso-controle	Apresentação com HIC	BC PNUstream 48plex or TD extensão do primer com DPF
	rs314353	59	Caso-controle	Apresentação com HIC	BC PNUstream 48plex or TD extensão do primer com DPF
	rs2230585	59	Caso-controle	Apresentação com HIC	BC PNUstream 48plex or TD extensão do primer com DPF
	rs144173	59	Caso-controle	Apresentação com HIC	BC PNUstream 48plex or TD extensão do primer com DPF
	rs314308	59	Caso-controle	Apresentação com HIC	BC PNUstream 48plex or TD extensão do primer com DPF
	rs2250818	59	Caso-controle	Apresentação com HIC	BC PNUstream 48plex or TD extensão do primer com DPF
	rs314313	59	Caso-controle	Apresentação com HIC	BC PNUstream 48plex or TD extensão do primer com DPF
	rs2247445	59	Caso-controle	Apresentação com HIC	BC PNUstream 48plex or TD extensão do primer com DPF
	rs361525	2	Coorte	Nova HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs361525	1	Coorte	Nova HIC before some treatment.	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
TNF	rs361525	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1800629	2	Coorte	Nova HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1800629	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1143627	23	Caso-controle and Coorte	MAV e nova HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs16944	23	Caso-controle and Coorte	MAV e nova HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1143634	23	Caso-controle and Coorte	MAV e nova HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1800795	22	Caso-controle	MAV	BC PNUstream 48plex
	rs1800795	2	Coorte	Nova HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1800795	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1800796	2	Coorte	Nova HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
IL10	rs1800796	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1800896	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs2275913	20	Caso-controle	MAV e história de HIC	Ensaio PCR-RFLP
	rs1130379	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs448012	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs1870377	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs682632	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs3837240	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs10967719	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF
	rs10967719	45	Caso-controle	Apresentação com HIC	Ensaio de incorporação TDDT com DPF

MAV, Malformação artério-venosa cerebral; BC Beckman-Coulter; DPF, detecção de polarização fluorescente; HIC, Hemorragia Intracraniana; PCR-RFLP, Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain reaction; VP, variante promotor; PNU, polimorfismo de nucleotídeo único; TDDT, template-directed dye-terminator.

7.5 Legendas Artigo 1 em Inglês

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Flow of papers through this review.

Figure 2. Effect of SNPs on the susceptibility to sporadic BAVM; mm – minor allele homozygous; Mm – heterozygous; MM – major allele homozygous; * the authors did not present full genotype frequencies.

Figure 3. Effect of SNPs on ICH risk; mm, minor allele homozygous; Mm – heterozygous; MM – major allele homozygous; * the SNPs were not in Hardy-Weinberg Equilibrium, so calculations were performed using a dominant model for minor alleles; # the authors did not present full genotype frequencies; a – risk for a history of BAVM bleeding; b – risk of ICH in patients who underwent certain kinds of treatment (embolization, arteriovenous malformation resection, radiosurgery or any combination of these treatments); c – risk calculated for new ICH; d – risk of clinical presentation with ICH (any symptoms or evidence of hemorrhage observed via computed tomography or magnetic resonance imaging).

Table 1. Description of the reviewed studies and single nucleotide polymorphisms associated with brain arteriovenous malformation.

7.6 Legendas Artigo 1 em Português e da Revisão da Literatura

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Fluxograma dos artigos publicados na literatura ao longo desse estudo.

Figura 2. Efeito das PNUs sobre a susceptibilidade para MAV esporádica; mm – menor alelo homozigoto; Mm – heterozigoto; MM – maior alelo homozigoto; * os autores não apresentaram a frequência completa dos genótipos.

Figura 3. Efeito das PNUs no risco de ruptura de uma MAV; mm, menor alelo homozigoto; Mm – heterozigoto; MM – maior alelo homozigoto; * os alelos da PNU não se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, portanto os cálculos foram realizados utilizando o modelo dominante para o menor alelo; # os autores não apresentaram a frequência completa dos genótipos; a – risco para história de sangramento de MAV; b – risco de hemorragia em pacientes que foram submetidos a alguma forma de tratamento (embolização, ressecção cirúrgica de malformação arteriovenosa, radiocirurgia ou qualquer combinação desses tratamentos); c – risco calculado para novo sangramento; d – risco de apresentação clínica com evento hemorrágico (quaisquer sintomas ou evidência de hemorragia, observados através de exame de imagem por tomografia computadorizada ou ressonância magnética).

Tabela 1. Descrição dos estudos revisados e dos polimorfismos de nucleotídeo único associado com malformação arteriovenosa cerebral.

7.7 Tabelas Artigo 2 em Inglês

7.7.1 Table 1

Group	BAVM cases (n=62)	Controls (n=96)	P-Value
Gender			0.18
Male (%)	30 (48)	57 (59)	
Female (%)	32 (52)	39 (41)	
Age (Years)			0.27
Mean±SD	41.4 ± 18.2	37.1 ± 12.5	
Ethnicity			0.75
Caucasian (%)	50 (80.6)	82 (85.4)	
Afro Brazilians (%)	4 (6.5)	6 (6.3)	
Admixed (%)	8 (12.9)	8 (8.3)	
APOE			0.22
E2 +	6 (9.7)	16 (16.7)	
E2 -	56 (90.3)	80 (83.3)	
TNF (rs361525)			0.63
AA	0 (0)	0 (0)	
AG	8 (12.9)	10 (10.4)	
GG	54 (87.1)	86 (89.6)	
IL1B (rs16944)			0.11
AA	4 (6.5)	17 (17.7)	
AG	32 (51.6)	47 (49)	
GG	26 (41.9)	32 (33.3)	
IL1B (rs1143627)			0.07
GG	10 (16.1)	23 (24)	
AG	26 (41.9)	49 (51)	
AA	26 (41.9)	24 (25)	
ACVRL1 (rs2071219)			0.66
GG	8 (12.9)	11 (11.5)	
AG	31 (50.0)	55 (57.2)	
AA	23 (37.1)	30 (31.3)	
ENG (rs11545664)			0.35
TT	0 (0)	3 (3.1)	
CT	13 (21)	21 (21.9)	
CC	49 (79)	72 (75)	
IL6 (rs1800795)			0.97
CC	6 (9.7)	10 (10.4)	
CG	25 (40.3)	37 (38.5)	
GG	31 (50.0)	49 (51)	

BAVM, brain arteriovenous malformation; SD, standard deviation. Gender, ethnicity and full genotype frequencies in patients and controls were compared using a 2-sided χ^2 -test. The ages (at research entry) of the patients and controls were compared using a t-test.

7.7.2 Table 2

	ICH (n=38)	Unruptured (n=24)	Total (n=62)	P
Gender				0.02
Male (%)	14 (36.8)	16 (66.67)	30 (48)	
Female (%)	24 (63.2)	8 (33.33)	32 (52)	
Age at diagnosis (Year)				0.3
Mean age±SD	32.7 ± 18	40.2 ± 15.8		
Ethnicity				0.84
Caucasian (%)	30 (78.9)	20 (83.3)	50 (80.6)	
Afro Brazilians (%)	3 (7.9)	1 (4.2)	4 (6.5)	
Admixed (%)	5 (13.2)	3 (12.5)	8 (12.9)	
Spetzler-Martin Grade				0.19
I	3	6	9	
II	8	7	15	
III	18	9	27	
IV	7	1	8	
V	2	1	3	

ICH, Intracranial Hemorrhage; SD, standard deviation; Gender and ethnicity frequencies in the patients and controls were compared using a 2-sided χ^2 -test. The age at diagnosis in patients with and without ICH was compared using a t-test.

7.7.3 Table 3

Risk Factor	Single Analysis			Multivariable Analysis		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
APOE						
E2 carriers	0.54	0.2-1.45	0.22	0.93	0.3-2.89	0.89
ACVRL1 (rs2071219)						
Any G vs AA	0.77	0.39-1.51	0.45	0.99	0.4-2.44	0.98
G vs A	0.91	0.57-1.45	0.69	1.18	0.62-2.27	0.62
ENG (rs11545664)						
Any T vs CC	0.8	0.37-1.71	0.56	0.42	0.12-1.47	0.18
T vs C	0.72	0.35-1.45	0.35	0.37	0.11-1.23	0.1
TNF (rs361525)						
Any A vs GG	1.27	0.47-3.43	0.63	2.41	0.71-8.23	0.16
A vs G	1.26	0.48-3.27	0.64	2.6	0.8-8.55	0.12
IL1B (rs16944)						
Any A vs GG	0.69	0.36-1.34	0.27	3.35	0.37-30.56	0.29
A vs G	0.65	0.41-1.04	0.07	1.24	0.40-3.79	0.71
IL1B (rs1143627)						
Any G vs AA	0.44	0.22-0.89	0.02	0.13	0.01-1.26	0.08
G vs A	0.58	0.36-0.91	0.02	0.42	0.14-1.27	0.13
IL6 (rs1800795)						
Any C vs GG	1.04	0.55-1.98	0.9	1.14	0.48-2.69	0.77
C vs G	1	0.61-1.65	0.97	1.2	0.61-2.36	0.59

OR, odds ratio calculated both in dominant and multiplicative models for the minor allele; CI, confidence interval; The single analysis calculated P values were based on 2-sided χ^2 -tests. Logistic regression was used for multivariable analysis controlling for Caucasian ethnicity, age and male sex.

7.7.4 Table 4

Risk Factor	Single Analysis			Multivariable Analysis		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
APOE						
E2 carriers	1.38	0.21-9.01	1 *	0.54	0.05-6.32	0.63
ACVRL1 (rs2071219)						
Any G vs AA	1.69	0.55-5.26	0.36	2.46	0.44-13.94	0.31
G vs A	1.27	0.57-2.87	0.56	1.69	0.51-5.6	0.39
ENG (rs11545664)						
Any T vs CC	1.33	0.36-4.92	0.67	0.74	0.06-8.63	0.81
T vs C	1.28	0.38-4.34	0.69	0.9	0.1-8.07	0.93
TNF (rs361525)						
Any A vs GG	0.88	0.16-4.81	1 *	0.2	0.02-2.83	0.24
A vs G	0.88	0.17-4.59	1 *	0.26	0.03-2.39	0.23
IL1B (rs16944)						
Any A vs GG	0.75	0.24-2.3	0.62	1.35	0.18-9.96	0.77
A vs G	1.19	0.52-2.73	0.67	1.42	0.45-4.51	0.56
IL1B (rs1143627)						
Any G vs AA	0.76	0.45-1.71	0.3	1.45	0.27-7.46	0.71
G vs A	0.9	0.4-2	0.79	1.02	0.33-3.12	0.98
IL6 (rs1800795)						
Any C vs GG	1.08	0.36-3.24	0.89	0.49	0.07-3.26	0.46
C vs G	0.84	0.36-1.95	0.69	0.44	0.11-1.74	0.24

OR, odds ratio calculated both in dominant and multiplicative models for the minor allele; CI, confidence interval; The single analysis calculated P values were based on 2-sided χ^2 -tests; * Fisher test; Logistic regression was used for multivariable analysis controlling for Caucasian ethnicity, age, male gender and a Spetzler-Martin Grade III or higher.

7.8 Tabelas Artigo 2 em Português

7.8.1 Tabela 1

Grupo	Casos de MAV (n=62)	Controles (n=96)	P-Valor
Sexo			0,18
Masculino (%)	30 (48)	57 (59)	
Feminino (%)	32 (52)	39 (41)	
Idade (anos)			0,27
Média±DP	41,4 ± 18,2	37,1 ± 12,5	
Etnia			0,75
Caucasianos (%)	50 (80,6)	82 (85,4)	
Afro-brasileiros (%)	4 (6,5)	6 (6,3)	
Miscigenados (%)	8 (12,9)	8 (8,3)	
APOE			0,22
E2 +	6 (9,7)	16 (16,7)	
E2 -	56 (90,3)	80 (83,3)	
TNF (rs361525)			0,63
AA	0 (0)	0 (0)	
AG	8 (12,9)	10 (10,4)	
GG	54 (87,1)	86 (89,6)	
IL1B (rs16944)			0,11
AA	4 (6,5)	17 (17,7)	
AG	32 (51,6)	47 (49)	
GG	26 (41,9)	32 (33,3)	
IL1B (rs1143627)			0,07
GG	10 (16,1)	23 (24)	
AG	26 (41,9)	49 (51)	
AA	26 (41,9)	24 (25)	
ACVRL1 (rs2071219)			0,66
GG	8 (12,9)	11 (11,5)	
AG	31 (50,0)	55 (57,2)	
AA	23 (37,1)	30 (31,3)	
ENG (rs11545664)			0,35
TT	0 (0)	3 (3,1)	
CT	13 (21)	21 (21,9)	
CC	49 (79)	72 (75)	
IL6 (rs1800795)			0,97
CC	6 (9,7)	10 (10,4)	
CG	25 (40,3)	37 (38,5)	
GG	31 (50,0)	49 (51)	

MAV, malformação arteriovenosa cerebral; DP, desvio padrão. Sexo, etnia e frequência dos genótipos nos pacientes e controles foram comparados usando um teste χ^2 bicaudal. Idade (na entrada do estudo) em paciente e controles foram comparadas utilizando um teste t.

7.8.2 Tabela 2

	HIC (n=38)	Sem (n=24)	sangramento	Total (n=62)	P
Sexo					0.02
Masculino (%)	14 (36.8)	16 (66.67)		30 (48)	
Feminino (%)	24 (63.2)	8 (33.33)		32 (52)	
Idade no diagnóstico (anos)					0.3
Média de idade±DP	32.7 ± 18	40.2 ± 15.8			
Etnia					0.84
Caucasianos (%)	30 (78.9)	20 (83.3)		50 (80.6)	
Afro-brasileiros (%)	3 (7.9)	1 (4.2)		4 (6.5)	
Miscigenados (%)	5 (13.2)	3 (12.5)		8 (12.9)	
Escala de Spetzler- Martin					0.19
I	3	6		9	
II	8	7		15	
III	18	9		27	
IV	7	1		8	
V	2	1		3	

HIC, Hemorragia intracraniana; DP, desvio padrão; Frequências de sexo, etnia em pacientes e controles foram comparados utilizando um teste χ^2 bicaudal. Idade no diagnóstico em pacientes com e sem HIC foi comparada usando um teste t.

7.8.3 Tabela 3

Polimorfismos	Análise Univariável			Análise Multivariável		
	OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	P
APOE						
Portadores E2	0.54	0.2-1.45	0.22	0.93	0.3-2.89	0.89
ACVRL1 (rs2071219)						
GG ou GA vs AA	0.77	0.39-1.51	0.45	0.99	0.4-2.44	0.98
G vs A	0.91	0.57-1.45	0.69	1.18	0.62-2.27	0.62
ENG (rs11545664)						
TT ou TC vs CC	0.8	0.37-1.71	0.56	0.42	0.12-1.47	0.18
T vs C	0.72	0.35-1.45	0.35	0.37	0.11-1.23	0.1
TNF (rs361525)						
AA ou AG vs GG	1.27	0.47-3.43	0.63	2.41	0.71-8.23	0.16
A vs G	1.26	0.48-3.27	0.64	2.6	0.8-8.55	0.12
IL1B (rs16944)						
AA ou AG vs GG	0.69	0.36-1.34	0.27	3.35	0.37-30.56	0.29
A vs G	0.65	0.41-1.04	0.07	1.24	0.40-3.79	0.71
IL1B (rs1143627)						
GG ou GA vs AA	0.44	0.22-0.89	0.02	0.13	0.01-1.26	0.08
G vs A	0.58	0.36-0.91	0.02	0.42	0.14-1.27	0.13
IL6 (rs1800795)						
CC ou CG vs GG	1.04	0.55-1.98	0.9	1.14	0.48-2.69	0.77
C vs G	1	0.61-1.65	0.97	1.2	0.61-2.36	0.59

OR, odds ratio calculado tanto em um modelo dominante quanto multiplicativo para o menor alelo; IC, intervalo de confiança; Análise univariável baseado em um teste χ^2 bicaudal. Regressão logística foi utilizada para análise multivariável, controlando para etnia caucasiana, idade e sexo.

7.8.4 Tabela 4

Polimorfismos	Análise Univariável			Análise Multivariável		
	OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	P
APOE						
Portadores E2	1.38	0.21-9.01	1 *	0.54	0.05-6.32	0.63
ACVRL1 (rs2071219)						
GG ou GA vs AA	1.69	0.55-5.26	0.36	2.46	0.44-13.94	0.31
G vs A	1.27	0.57-2.87	0.56	1.69	0.51-5.6	0.39
ENG (rs11545664)						
TT ou TC vs CC	1.33	0.36-4.92	0.67	0.74	0.06-8.63	0.81
T vs C	1.28	0.38-4.34	0.69	0.9	0.1-8.07	0.93
TNF (rs361525)						
AA ou AG vs GG	0.88	0.16-4.81	1 *	0.2	0.02-2.83	0.24
A vs G	0.88	0.17-4.59	1 *	0.26	0.03-2.39	0.23
IL1B (rs16944)						
AA ou AG vs GG	0.75	0.24-2.3	0.62	1.35	0.18-9.96	0.77
A vs G	1.19	0.52-2.73	0.67	1.42	0.45-4.51	0.56
IL1B (rs1143627)						
GG ou GA vs AA	0.76	0.45-1.71	0.3	1.45	0.27-7.46	0.71
G vs A	0.9	0.4-2	0.79	1.02	0.33-3.12	0.98
IL6 (rs1800795)						
CC ou CG vs GG	1.08	0.36-3.24	0.89	0.49	0.07-3.26	0.46
C vs G	0.84	0.36-1.95	0.69	0.44	0.11-1.74	0.24

OR, odds ratio calculado tanto em um modelo dominante quanto multiplicativo para o menor alelo; IC, interval de confiança; Análise univariável baseado em um teste χ^2 bicaudal; * Teste de Fisher; Regressão logística foi utilizada para análise multivariável, controlando para etnia caucasiana, idade, sexo masculino e Classificação de Spetzler-Martin maior ou igual a III.

7.9 Legendas Artigo 2 em Inglês

FIGURE LEGENDS

Table 1. Demographics of the subjects and genotypes of apolipoprotein E (APOE), tumor necrosis factor alpha (TNF), interleukin 1 beta (IL1B), activin-like kinase 1 (ACVRL1), endoglin (ENG) and interleukin 6 (IL6).

Table 2. Demographic and BAVM characteristics in ruptured and unruptured BAVM patients.

Table 3. The association of polymorphisms in apolipoprotein E (APOE), tumor necrosis factor alpha (TNF), interleukin 1 beta (IL1B), activin-like kinase 1 (ACVRL1), endoglin (ENG) and interleukin 6 (IL6) with brain arteriovenous malformation.

Table 4. The association of polymorphisms in apolipoprotein E (APOE), tumor necrosis factor alpha (TNF) interleukin 1 beta (IL1B), activin-like kinase 1 (ACVRL1), endoglin (ENG) and interleukin 6 (IL6) with the clinical presentation of intracerebral hemorrhage in patients harboring brain arteriovenous malformation.

7.10 Legendas Artigo 2 em Português

LEGENDA DAS FIGURAS

Tabela 1. Características demográficas dos indivíduos e genótipos da apolipoproteína E (APOE), fator de necrose tumoral alfa (TNF), Interleucina 1 beta (IL1B), quinase tipo receptor de ativina (ACVRL1), endoglina (ENG) e interleucina 6 (IL6).

Tabela 2. Características demográficas e angiográficas dos pacientes com MAV com e sem apresentação hemorrágica.

Tabela 3. Associação dos polimorfismos da apolipoproteína E (APOE), fator de necrose tumoral alfa (TNF), Interleucina 1 beta (IL1B), quinase tipo receptor de ativina (ACVRL1), endoglina (ENG) e interleucina 6 (IL6) com malformação artériovenosa cerebral.

Tabela 4. Associação dos polimorfismos da apolipoproteína E (APOE), fator de necrose tumoral alfa (TNF), Interleucina 1 beta (IL1B), quinase tipo receptor de ativina (ACVRL1), endoglina (ENG) e interleucina 6 (IL6) com apresentação hemorrágica em pacientes com malformação arteriovenosa cerebral.

