

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO 4G/5G DO PAI-1 EM PACIENTES COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO E SEUS SUBTIPOS

Bryelle Eccard 1 ; Cristina Carvalho 1 ; Isabela Lemos 1 ; Carolina Andrade 1 ; Camila Maria Alves Fernandes 1 ;

Karina Braga Gomes 2 ; Níbia Eleutério 1 ; Paulo P. Christo 1 ; Valéria Sandrim 1

1 Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa - Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil

2 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Resumo: O PAI-1 (Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1) é uma glicoproteína pertencente à família das serpinas, que é o principal inibidor dos ativadores do plasminogênio do tipo tecidual (tPA) e do tipo uroquinase (uPA). O aumento dos níveis de PAI-1 afeta o sistema fibrinolítico e influencia o coágulo de fibrina e pode estar associado ao desenvolvimento de doenças tromboembólicas, como infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico, no entanto, sua ação neste último ainda é controversa. O gene PAI-1 possui vários locus polimórficos, incluindo uma inserção / deleção 4G / 5G a 675 pb a partir do início do promotor. Tem sido relatado que indivíduos com genótipo 4G / 4G têm níveis plasmáticos de PAI-1 significativamente mais elevados (cerca de 25%) do que indivíduos com outros genótipos (4G / 5G e 5G / 5G). Devido a poucos estudos correlacionando o polimorfismo do gene PAI-1 com a susceptibilidade e a etiologia do AVE, foi comparado o genótipo da distribuição do polimorfismo 4G / 5G nos diferentes subtipos de AVE. Uma coleta de sangue venoso de pacientes admitidos para acompanhamento pós-AVE no Serviço de Neurologia da Santa Casa de Belo Horizonte (Total n = 144; 43 aterotrombóticos, 39 cardioembólicos, 40 lacunares e 22 criptogênicos) e a coleta de sangue venoso dos controles (n = 112) foram realizadas nas especialidades médicas da Santa Casa. O grupo controle e os pacientes foram ajustados por idade, sexo, hipertensão, diabetes e tabagismo. A análise do polimorfismo foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A análise estatística foi realizada para comparação entre os grupos. Diferença significativa entre os grupos foi considerada para $p < 0,05$. Correlacionamos o polimorfismo entre pacientes / controles e com suscetibilidade a diferentes etiologias do AVE e não foram encontradas diferenças significativas em ambos ($p > 0,05$). Esses resultados sugerem que o polimorfismo PAI-1 não está relacionado ao risco de AVE, bem como a suscetibilidade a qualquer um dos subtipos. Estes resultados são suportados por outros estudos.

Palavras-chave: polimorfismo PAI-1, Acidente vascular encefálico isquêmico, subtipos.

EVALUTION OF THE 4G / 5G PAI-1 POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE AND ITS SUBTITLES

Abstract: PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) is a glycoprotein that belongs to the serpin family that are the main inhibitor of plasminogen activators of the tissue type (tPA) and urokinase type (uPA). Increased levels of PAI-1 affects the fibrinolytic system and influences the fibrin clot and may be associated with the development of thromboembolic diseases such as myocardial infarction and stroke, however its action in this last is still controversial. The PAI-1 gene has several polymorphic loci, including a 4G/5G insertion/deletion at 675 bp from the start of the promoter. It has been reported that individuals with 4G/4G genotype have significantly higher plasma PAI-1 levels (about 25% higher) than individuals with others genotypes (4G/5G and 5G/5G). Due to few studies correlating the polymorphism of the PAI-1 gene with the susceptibility and the etiology of stroke, we compared the genotype of 4G/5G polymorphism distribution in the different stroke subtypes. We conducted venous blood collection of patients admitted for follow-up post-stroke at the Neurology Service of Santa Casa de Belo Horizonte (All n=144; 43 atherothrombotic, 39 cardioembolic, 40 lacunar and 22 cryptogenic) and the venous blood collection of controls (n=112) was performed in the medical specialties of the Santa Casa. The control group and patients were adjusted for age, gender, hypertension, diabetes, and smoking. The polymorphism analysis were performed by polymerase chain reaction (PCR). Statistical analysis was performed for comparison between groups. Significant difference between groups will be considered for $p < 0.05$. We correlate the polymorphism between patients/controls and with susceptibility to different stroke etiologies and were not found significant differences in both ($p > 0.05$). These results suggest that the PAI-1 polymorphism unrelated to the risk of stroke as well as the susceptibility to any of the subtypes. These results are supported by other studies.

Keywords: PAI-1 polymorphism, Ischemic stroke, subtypes.

INTRODUÇÃO

1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma das principais causas de morte no mundo, com estudos relatando uma taxa de mortalidade ao ano entre 20 a 40%, esta doença perde apenas para as doenças coronarianas e o câncer (SAPOSNIK et al., 2011). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 15 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por acidentes vasculares encefálicos todos os anos. Destas, 5 milhões morrem e 5 milhões ficam permanentemente incapacitadas.

Entre as doenças cardiovasculares, o acidente vascular encefálico é uma patologia com profundas implicações para a saúde pública, atualmente a segunda

maior causa de morte no Brasil e a primeira causa de incapacidade em adultos (CURIONI et al., 2009), gerando grande impacto econômico e social. Segundo Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) no ano de 2011 (dados nacional) o total de óbitos foi de aproximadamente 1700, com uma taxa de mortalidade de cerca de 18% e o valor total gasto de R\$ 10.000.000 com internações. Estudos mostram que a mortalidade por AVE é maior nas regiões mais pobres do Brasil, como o Nordeste, e, em muitos casos, essa alta morbi-mortalidade é atribuída a fatores sociais desfavoráveis (CAVALCANTE et al., 2010).

O AVE pode ser definido como uma síndrome clínica caracterizada pelo rápido início de sinais neurológicos focais secundários a hemorragia ou, mais comum, a interrupção do fornecimento de sangue a uma área do cérebro. É um termo abrangente que engloba diversas síndromes clínicas com etiologia variada. Dura mais de 24 horas ou pode levar à morte, como possível causa vascular. (MARKUS, 2012; MONTAGU; RECKLESS; BUCHAN, 2012). Dentre os principais fatores de risco estão: sexo (AVE é considerado uma doença com alta prevalência em homens), idade [após os 55 anos o risco para AVE duplica a cada década (PIERI et al., 2008)], diabetes, dislipidemia, tabagismo, hipertensão e fibrilação atrial. Estudos epidemiológicos sugerem que alterações em uma variedade de genes candidatos (influência poligênica) são importantes na patogênese do AVEi, além disso esta doença compreende diferentes fenótipos (CASAS et al., 2004). Em combinação com fatores de risco adquirida, a presença de um ou de vários genes de predisposição pode favorecer a ocorrência de AVE (WARDEN; REFSUM, 2005).

Entre os AVEs, os isquêmicos constituem aproximadamente de 87% do total dos casos (ROGER et al., 2011), sendo este o foco do presente estudo.

1.1 Subtipos

O AVE isquêmico (AVEi) é uma súbita instalação de um déficit neurológico focal persistente, como consequência a uma isquemia (fluxo sanguíneo insuficiente) seguida de um infarto no parênquima encefálico decorrente da oclusão aguda do lúmen de uma artéria (MERRIT, 2007).

Os subtipos de AVEi foram identificados de acordo com a classificação de TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*), uma classificação diagnóstica

largamente utilizada que distingue com base na etiologia de cinco subtipos diferentes de AVE isquêmico: 1) aterosclerose das grandes artérias, 2) cardioembólico, 3) oclusão de pequenos vasos (lacunar), 4) outra etiologia determinada e 5) etiologia indeterminada (criptogênico) (ADAMS et al., 1993).

Embora a abordagem inicial de um AVEi não dependa da sua etiologia, estabelecer uma causa é essencial para reduzir o risco de recorrências, e afeta o prognóstico e as opções de tratamento. Geralmente, a apresentação clínica e os achados no exame físico permitem estabelecer a causa ou pelo menos, reduzir as possibilidades. Em aproximadamente 35% dos AVEi não é possível determinar uma causa (MONTANER et al., 2008) ou são atribuíveis a outras condições médicas raras, sendo designadas criptogênicos ou de causa indeterminada. Nos 65% restantes em que é possível identificar uma etiologia, 25% corresponde aos lacunares. Cardioembólicos e aterotrombóticos, ambos correspondendo a 20% (ALBERS et al., 2002).

1.1.1 AVEi Aterotrombótico

Ligado a fatores de risco para formação de placa aterosclerótica em qualquer ponto ao longo da artéria carótida e do sistema vertebrobasilar. Os locais mais comuns são a bifurcação da artéria carótida comum e a região proximal da carótida interna que acarreta uma estenose progressiva, com oclusão final de grandes artérias (MERRITT, 2007).

1.1.2 AVEi Embólico

Pode ser de origem vascular quando os êmbolos se originam em artérias afetadas por lesões ateromatosas como estenose ou úlceras (MOHR et al., 1997). Porém a de origem cardíaca é a principal causa por embolia. Uma pequena partícula de trombo se desprende da fonte e é levada pela corrente sanguínea até se alojar numa artéria pequena demais para passar (MERRITT, 2007). As fontes mais comuns de embolias cardíacas são: valvulopatias cardíacas, trombos intracardíacos (após um Infarto do miocárdio ou fibrilação atrial e forame oval patente) (MOHR et al., 1997). Alguns tipos de êmbolos podem conter bactérias como no caso de embolias que se originam de uma endocardite bacteriana subaguda ou aguda (MERRITT, 2007).

1.1.3 AVEi Lacunar

Ocorre apenas uma pequena zona de isquemia limitada ao território de um pequeno vaso, microvaso. As lesões arteriais são geralmente consequentes a hipertensão arterial de evolução longa ou a diabetes mellitus (MERRITT, 2007). Microateroma pode ser a patologia de base mais frequente de infartos lacunares, assim como a lipohialinose¹ (MOHR et al., 1997).

1.1.4 AVEi Criptogênico

Apesar de esforços para se chegar a um diagnóstico, a causa do um infarto pode permanecer indeterminada. Conforme Rao e colaboradores os subtipos cardioembólico e aterotrombótico são considerados etiologias de grandes vasos, incluindo pacientes com clínica (comprometimento cortical ou tronco cerebral ou disfunção cerebelar) e achados de imagem cerebral com infartos > 1,5 cm e o lacunar em pequenos vasos e com lesões com diâmetro <1,5 cm (MONTANER et al., 2008).

1.2 Fisiopatologia

O cérebro adulto requer suprimento ininterrupto de cerca de 150g de glicose e 72L de oxigênio a cada 24h. Como o cérebro armazena pouca dessas substâncias, precisa de um fluxo contínuo e bem regulado para satisfazer suas necessidades de energia. Ocorre disfunção cerebral ou neural após alguns minutos com o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) abaixo de 50 mg/dL e lesão neural irreversível (isquemia prolongada ou grave) em níveis abaixo de 30 mg/dL (MERRETTI, 2007; CECIL, 2005). Em resposta à isquemia, o mecanismo de auto-regulação cerebral, através da vasodilatação local, aumenta o FSC (abertura da circulação colateral) e consequentemente aumenta a extração de oxigênio e glicose do sangue (DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE, 2009). Este processo mantém o FSC em um nível constante, fazendo com que as artérias cerebrais respondam as alterações nos níveis de pressão parcial de CO₂ (dióxido de carbono – aumento da pressão parcial, faz com que ocorra dilatação das arteríolas e aumento do FSC) e O₂ (oxigênio – apresenta

¹ Lipohialinose – ou desorganização segmentar de pequenas artérias, são oclusões penetrantes de pequenas artérias (< 0,5mm) na qual suas camadas ficam impregnadas com um material hialino-lipídico, geralmente em consequência de aterosclerose relacionada com a hipertensão (MOHR et al., 1997; ROPPER et al., 2005).

efeito contráio), porém este mecanismo pode estar falho em pacientes com doença vascular encefálica (MERRETTI, 2007).

Experimentos com animais, e supostamente em humanos, demonstraram que uma interrupção do fluxo sanguíneo por mais de 5 minutos produz danos irreversíveis (ROPPER et al., 2005), estas regiões do cérebro são referidas como núcleo isquêmico (core). Células no núcleo são mortas rapidamente por lipólise, proteólise, a desagregação dos microtúbulos, insuficiência bioenergética total e quebra da homeostase (BROUNS; DE DEYN, 2009).

Entre o núcleo letalmente danificado e a área perfundida normal, existe uma região funcionalmente prejudicada (metabolismo energético parcialmente preservados), mas o tecido encontra-se estruturalmente intacto, neste local a circulação colateral pode desenvolver-se brevemente deixando uma área periférica com um declínio gradual do fluxo de sangue, este é referido como penumbra isquêmica (KATO; KOGURE, 1999). Esse tecido, marginalmente viável, pode ser consumido por injúrias progressivas, coalescendo com o núcleo do infarto, muitas vezes em poucas horas após o início AVEi, mas pode ser salvo pela restauração do fluxo ou, possivelmente, por agentes terapêuticos neuroprotetores (CECIL, 2005). Salvar este tecido está associado com melhora e recuperação neurológica.

O AVEi leva à hipoperfusão focal grave de uma área do cérebro e isto inicia uma série complexa de eventos, a chamada cascata isquêmica, que inclui eventos como: falha bioenergética, excitotoxicidade, estresse oxidativo, danos na microvasculatura, ativação hemostática, disfunção da barreira hematoencefálica e inflamação pós-isquêmica que por fim levam a morte celular de neurônios, células da glia e células do endotélio, é a chamada pan-necrose. O grau e a duração da isquemia são determinantes na extensão do dano cerebral (BROUNS; DE DEYN, 2009; SAENGER; CHRISTENSON, 2010). A microvasculatura cerebral rapidamente exibe múltiplas respostas dinâmicas à isquemia focal, entre as quais: aumento da permeabilidade das células endoteliais, fator que contribui para a disfunção da BHE; danos das células endoteliais; alta tensão de cisalhamento² ativam as plaquetas e posterior liberação de tromboxano A₂ e radicais livres que podem exacerbar a cascata

inflamatória através da liberação de mediadores quimiotáticos para migração de leucócitos (BROUNS; DE DEYN, 2009).

Um esquema para síntese do que ocorre durante a cascata isquêmica foi construído para melhor visualização, como mostra a Figura 1.

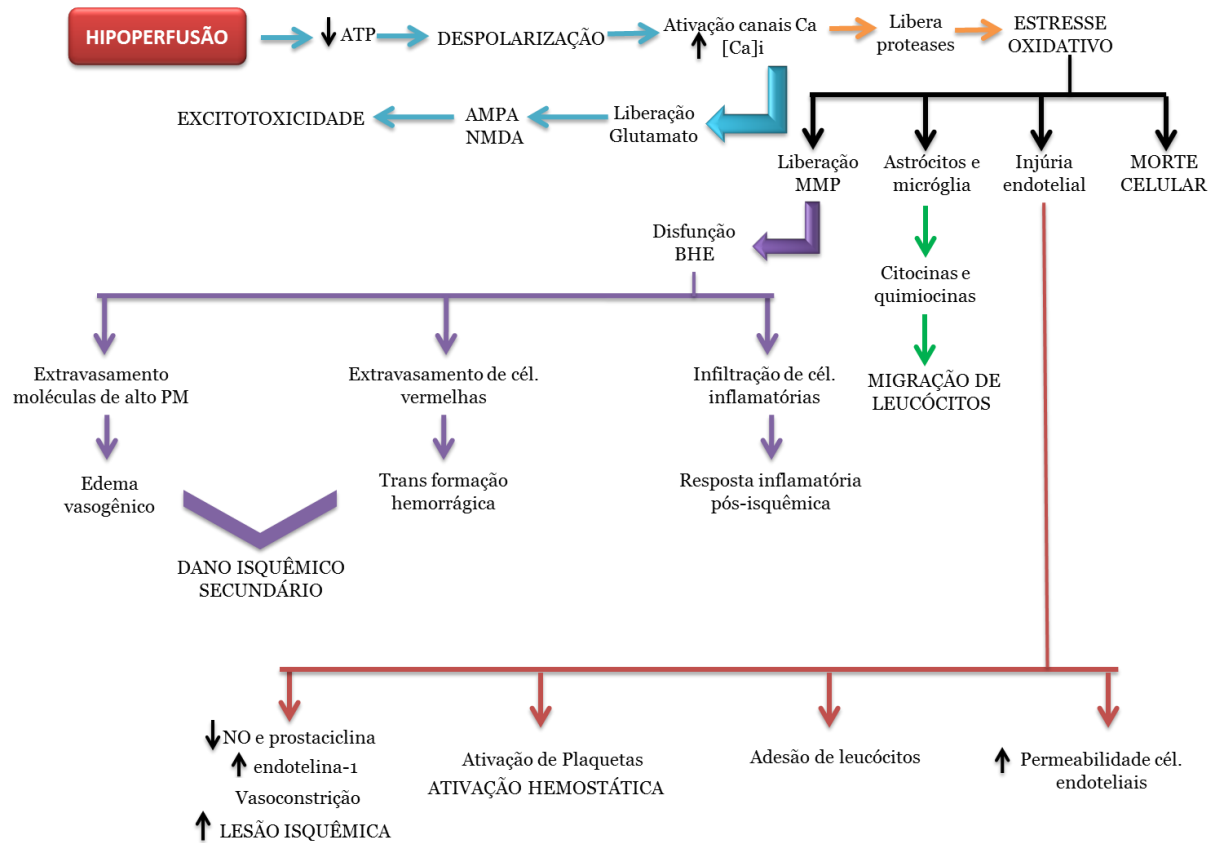


Figura 1: Esquema da cascata isquêmica.

2 INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO 1 (PAI-1)

É uma glicoproteína pertencente a família das serpinas que são inibidores das serinas proteases (enzimas do sistema fibrinolítico). O PAI-1 é um rápido e específico inibidor dos ativadores de plasminogênio, tanto o tipo tecidual (tPA) como o tipo uroquinase (uPA). Portanto é o principal inibidor da produção da plasmina, uma enzima ativa a partir do zimogênio plasminogênio (COLLEN, 2001).

O PAI-1 está presente no plasma, células vasculares lisas, plaquetas e células endoteliais, a partir do qual a sua liberação pode ser induzida pela trombina (EITZMAN et al., 1995). Fatores associados com o processo inflamatório vascular e aterosclerose, como a IL-1, TNF- α (DE PAULA SABINO et al., 2011; LUPU et al.,

1993) e TGF- β que são liberados a partir de plaquetas ativadas e macrófagos (LUPU et al., 1993) também induzem sua biossíntese. Os níveis de PAI-1 podem ser afetados por polimorfismos e determinantes metabólicos como, colesterol total, HDL, triglicerídeos, insulina entre outros (HENRY et al., 1998).

A elevação dos níveis de PAI-1 compromete o sistema fibrinolítico e favorece a permanência do coágulo de fibrina, o que ocasiona anormalidades neste sistema e pode está associado com o desenvolvimento de doenças tromboembólicas, como o infarto agudo do miocárdio (IAM) e AVE (PETROVIC et al., 2003; VAN GOOR et al., 2005), neste caso sua ação é controversa. Johansson e colaboradores observou que aumento do complexo tPA/PAI-1 demonstrou-se um fator independente no desenvolvimento do primeiro AVE, enquanto um estudo realizado com 637 holandeses idosos com aproximadamente 8 anos de acompanhamento concluiu um efeito protetor do aumento do PAI-1 (HOEKSTRA et al., 2003).

2.1 Genética

O gene do PAI-1 está localizado no cromossomo 7q21.3-q22 e vários polimorfismos foram descritos neste gene (DING et al., 2006; SU et al., 2006), onde alguns destes modulam os níveis plasmáticos de PAI-1. Um dos polimorfismos mais estudados é o -675 (polimorfismo na região promotora) inserção (5G) / deleção (4G) (rs1799889) (HULTMAN et al., 2010; SAIDI et al., 2007).

Os indivíduos homozigotos para a deleção (4G/4G) apresentam níveis plasmáticos de PAI-1 elevados e os portadores da adição (5G/5G) níveis reduzidos, enquanto indivíduos heterozigotos (4G/5G) possuem níveis intermediários (HENRY et al., 1998). Ambos alelos, 4G e 5G, tem um sítio de ligação para ativação da transcrição, mas o alelo 5G possui um sítio de ligação repressor adicional que está ausente no alelo 4G (HOEKSTRA et al., 2003). Como consequência, o alelo 4G produz 6x mais mRNA (in vitro) e está associado com um aumento da atividade plasmática do PAI-1, por isso, indivíduos que são homozigotos para o alelo 4G tem 25% maior concentração plasmática que indivíduos homozigotos para o alelo 5G (JOHANSSON et al., 2000).

O estudo do polimorfismo 4G/5G é uma assunto demasiadamente avaliado em AVEi, porém apenas dois estudos, um na população indiana e um na inglesa (ATTIA

et al., 2007; BABU et al., 2012) e uma meta-análise (RAO et al., 2009) que correlacionam este polimorfismo com a suscetibilidade para seus diferentes subtipos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo rs1799889 do gene do PAI-1 com o AVEi, bem como seus subtipos (aterotrombótico, cardioembólico, lacunar e criptogênico).

MÉTODO

Amostra

Os casos foram selecionados no serviço público do Ambulatório de Neurologia (seguimento pós-AVC) do Centro de Especialidade Médica (CEM) de Belo Horizonte, Minas Gerais, após realização de consulta com o neurologista. Durante a abordagem do participante, foi preenchida cuidadosamente pelo médico neurologista uma ficha clínica contendo informações pertinentes ao estudo. Em seguida, o participante foi encaminhado a um local adequado, para realização da coleta do sangue.

A seleção dos controles foi a partir da comunidade em geral que até o momento não tivesse diagnóstico de AVEi. O grupo controle e de pacientes foi ajustado por idade, sexo, hipertensão, diabetes e tabagistas (Tabela 1).

Instrumento

1 Amostras biológicas

A coleta das amostras de sangue foi realizada utilizando 2 tubos com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras de sangue obtidas foram centrifugadas para separação das amostras de plasma e, em seguida, foram distribuídas em várias alíquotas, armazenadas em tubos *ependorfs* e imediatamente estocadas à -80° C para futuros teste. Um dos tubos com sangue total após centrifugação e retirada do plasma, foi mantido a $4 - 8^{\circ}$ C para extração do DNA para análise genotípica do gene PAI-1. Um dos polimorfismos clinicamente relevante do gene PAI-1 foi estudado: o SNP -675 4G/5G, na região promotora.

A extração do DNA foi realizada pelo método “*mini salting out*” *in home*. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação, com adição de 300 µL de isopropanol absoluto e foi ressuspendido com água ultra pura autoclavada.

Para avaliação da pureza das amostras de DNA extraídas foi realizado a quantificação de DNA por espectrofotometria, Nanodrop ND 1000 (Nanodrop Technologies, Inc – EUA).

2 Análise polimórfica do gene pai-1

A genotipagem foi realizada no Eco Real Time PCR systems (Illumina) com análise da curva de HRM (*High Resolution Melting*). As condições de amplificação do gene PAI-1 foram: ativação da polimerase 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos e anelamento – extensão por 30 segundos, a temperatura variando conforme pares de primers utilizados. Para o HRM os parâmetros utilizados foram conforme fabricante (Illumina). Sequência dos pares de primers usados na genotipagem do gene PAI-1: F: 5'-AAGTTGTTGACACAAGAGAGCC-3' e R: 5'-CCTCCGATGATACACGGC-3'. A temperatura de fusão (*melting*) foi de 57,5 °C.

3 Perfil das curvas das genotipagens por HRM

No total, a partir das curvas de fusão (*melting*) normalizadas foi possível distinguir claramente três perfis de curva genotípico (Figura 2):

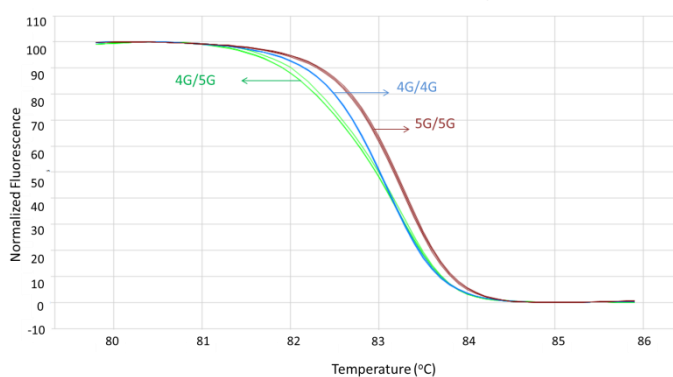


Figura 2: Gráfico normalizado para a genotipagem do rs1799889: 4G<5G.

4 Análise estatística

Para comparação entre os grupos foi usado o teste Qui-quadrado para testar a igualdade entre as amostras caso e controle ou o teste-t (idade). As diferenças das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos foram determinadas pelo teste do

qui-quadrado. Os dados foram analisados no software estatístico PRISM GraphPad Versão 3.0 e um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Contexto e Procedimento:

Os participantes foram selecionados no período entre abril de 2010 e julho de 2012. Após validarem sua participação assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1), foram incluídos no estudo um total de 172 casos (43 aterotrombóticos, 39 cardioembólicos, 40 lacunares e 22 criptogênicos) e 112 controles.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (0104.0.003.000-09) como parte integrante do projeto: Epidemiologia Genética do AVC.

Análise dos Dados

Dos participantes selecionados, 112 constituíram o grupo controle e 172 os casos, os quais foram subdivididos em suas etiologias: 43 aterotrombóticos, 39 cardioembólicos, 40 lacunares e 22 criptogênicos. Os dados da Tabela 1 apresentam a caracterização dos participantes dos grupos estudados, controle e pacientes com AVEi foram pareados em relação aos principais fatores de risco como: idade, sexo, hipertensão, diabetes e tabagismo ($P > 0,05$).

Tabela 1. Características clínicas da população em estudo.

	Controle	P	AVEi
N	112		172
Idade (Média ± EP)	60,30 ± 0,96	0,10	62,70 ± 0,98
Sexo (F/M) (F%)	57/55 (51%)	0,71	83/89 (48%)
Hipertensão, Sim/Não (S%)	74/38 (66%)	0,08	131/41 (76%)
Diabetes mellitus, Sim/Não (S%)	29/83 (26%)	0,50	38/134 (22%)
Tabagismo, Sim/Não (S%)	48/64 (43%)	1,00	74/98 (43%)

F = feminino M= masculino

A frequência genotípica e alélica dos polimorfismos não foi estatisticamente significativa quando comparados entre os grupos de pacientes e controles (Tabela 2).

Através do cálculo de OR é possível inferir o risco relativo de ocorrência de AVEi na presença do alelo ou genótipo em estudo.

Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo rs1799889 do gene PAI-1 em casos e controle.

Genótipos		Casos (n=172)	Controles (n=112)	OR (IC 95%)	P
rs1799889	4G/4G	34	20	0,8824 (0,4784-1,628)	0,84
	4G/5G	76	48	0,9474 (0,5860-1,532)	
	5G/5G	62	44	1,148 (0,7028-1,875)	
	alelo 4G (%)	0,42	0,39		
	alelo 5G (%)	0,58	0,61	0,8987 (0,5531-1,460)	

Ao avaliarmos a distribuição dos genótipos do rs1799889 entre os subtipos de AVEi (seguindo classificação TOAST): Aterotrombótico, Cardioembólico, Lacunar e Criptogênico, não encontramos significância da distribuição dos genótipos em nenhuma das etiologias do AVEi ($P > 0,05$) como mostra a Tabela 4. Ao estratificarmos o grupo de casos para os subtipos, o valor de n passou para 144 devido exclusão de pacientes que não apresentaram a classificação de TOAST em sua ficha clínica até o período de início das análises estatísticas.

Tabela 4. Frequência genotípica do gene PAI-1 por subtipos de AVEi

Genótipos	Subtipos AVEi				P
	Aterotrombótico (n=43)	Cardioembólico (n=39)	Lacunar (n=40)	Criptogênico (n=22)	
rs1799889					
4G/4G	6 (14%)	11 (28%)	9 (22,5%)	4 (18,2%)	0,59
4G/5G	22 (51%)	18 (46%)	17 (42,5%)	8 (36,4%)	
5G/5G	15 (35%)	10 (26%)	14 (35%)	10 (45,4%)	
alelo 4G (%)	0,4	0,51	0,44	0,36	
alelo 5G (%)	0,6	0,49	0,56	0,64	0,17

Considerações Finais

Neste presente estudo além da idade e sexo, os grupos caso e controle também se encontram pareados pelos principais fatores de risco para AVEi como hipertensão, diabetes mellitus e tabagismo.

O polimorfismo selecionado rs1799889, mais conhecido como polimorfismo da região promotora (-675) 4G/5G, possui os variantes funcionais bem descrito na literatura e sua ação no AVEi é controversa.

Nossos resultados suportam a opinião de que o polimorfismo 4G/5G do gene PAI-1 não influencia o risco de acidente vascular cerebral isquêmico, como mostra estudos anteriores (ADAMSKI et al., 2009; BABU et al., 2012; DE PAULA SABINO et al., 2011; SAIDI et al., 2007; VAN GOOR et al., 2005; YEH et al., 2004). No estudo realizado na população brasileira nossos resultados também corroboram (DE PAULA SABINO et al., 2011).

Os alelos 4G e 5G se ligam a um ativador de transcrição, mas o alelo 5G se liga adicionalmente a um repressor transcricional, o que diminui o nível plasmático do PAI-1 (ERIKSSON et al., 1995). O efeito protetor do alelo 4G sugere o envolvimento do polimorfismo 4G/5G do gene PAI-1 em AVEi através de um mecanismo patológico vascular não relacionado com a fibrinólise, possivelmente envolvendo a estabilização de placas ateroscleróticas alteradas, e/ou por meio de antagonismo do efeito do tPA (SAIDI et al., 2007). Devido às suas propriedades anti-fibrinolíticas, o PAI-1 foi anteriormente descrito como prejudicial na etiologia do AVE. Com base nos nossos resultados e os de outros estudos, em vez disso, parece que o PAI-1 tem um papel protetor, possivelmente envolvendo a supressão de enzimas de degradação da matriz na placa, o que resulta no crescimento limitado desta e previne a remodelação da matriz anormal (LUTTUN, 2002; ROSSIGNOL, 2006). Níveis de tPA na medida em que aumentam de atividade e são detectados em torno da placa (ROSSIGNOL, 2006), causam efeitos neurotóxicos (WANG, X. *et al.*, 2004), porém o PAI-1 exerce um papel de proteção através da atenuação dos efeitos deletérios do tPA em neurónios após acidente vascular encefálico isquêmico (ROSSIGNOL, 2006; YANG et al., 2003). O aumento da expressão de PAI-1 na placa aterosclerótica pode inibir o tPA e uPA e proteger o cápsula fibrosa contra a degradação por MMPs (Matrix Metaloproteinases) e posteriormente contra ruptura (OH et al., 2002).

Ao estratificarmos o grupo de pacientes para os subtipos de AVEi (aterotromótico, cardioembólico, lacunar e criptogênico), não encontramos diferença dos genótipos do polimorfismo 4G/5G entre as diferentes etiologias. Este resultado é apoiado por outros estudos (JOOD et al., 2005; YEH et al., 2004).

De acordo com os resultados apresentados concluímos que nenhum dos polimorfismos está associado a presença de AVEi, ou aos diferentes subtipos da doença.

Referências

ADAMS, H. P. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 35–41, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678184>>

ADAMSKI, M. G. et al. A-G-4G haplotype of PAI-1 gene polymorphisms -844 G/A, HindIII G/C, and -675 4G/5G is associated with increased risk of ischemic stroke caused by small vessel disease. **Acta neurologica Scandinavica**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 94–100, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19154538>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

ALBERS, Gregory W. et al. **Diretrizes Clínicas Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Screening**. [s.l: s.n.].

ATTIA, John et al. The PAI-1 4G/5G gene polymorphism and ischemic stroke: an association study and meta-analysis. **Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 173–9, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689414>>. Acesso em: 4 jan. 2012.

BABU, M. Sai et al. Association of genetic variants of fibrinolytic system with stroke and stroke subtypes. **Gene**, [s. l.], v. 495, n. 1, p. 76–80, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240314>>. Acesso em: 2 jan. 2013.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical neurology and neurosurgery**, [s. l.], v. 111, n. 6, p. 483–95, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19446389>>. Acesso em: 25 jul. 2011.

CASAS, Juan P. et al. Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. **Archives of neurology**, [s. l.], v. 61, n. 11, p. 1652–61, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511872>>

CAVALCANTE, Tahissa Frota et al. Demographic factors and risk indicators of stroke: comparison between inhabitants of Fortaleza municipal district and the national profile. **Revista latino-americana de enfermagem**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 703–8, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922316>>

COLLEN, D. Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. **Hematology: American Society of Hematology, Education Program**, [s. l.], p. 1–9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722975>>

CURIONI, Cintia et al. The decline in mortality from circulatory diseases in Brazil. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 9–15, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19341518>>

DE PAULA SABINO, Adriano et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 plasma levels in young patients with ischemic stroke. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 5355–60, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21373825>>. Acesso em: 1 fev. 2012.

DING, Jingzhong et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphisms and haplotypes are associated with plasma plasminogen activator inhibitor type 1 levels but not with myocardial infarction or stroke. **American heart journal**, [s. l.], v. 152, n. 6, p. 1109–15, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17161063>>. Acesso em: 24 ago. 2011.

DOYLE, Kristian P.; SIMON, Roger P.; STENZEL-POORE, Mary P. Neuropharmacology – Special Issue on Cerebral Ischemia Mechanisms of Ischemic Brain Damage – Review Article. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 310–318, 2009.

EITZMAN, DT et al. Peptide-mediated inactivation of recombinant and platelet plasminogen activator inhibitor-1 in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 95, n. 5, p. 2416, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC295874/>>. Acesso em: 1 fev. 2012.

ERIKSSON, P. E. R. et al. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 92, p. 1851–1855, 1995.

HENRY, M. et al. Metabolic Determinants Are Much More Important Than Genetic Polymorphisms in Determining the PAI-1 Activity and Antigen Plasma Concentrations: A Family Study With Part of the Stanislas Cohort. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 84–91, 1998. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.18.1.84>>. Acesso em: 1 fev. 2012.

HOEKSTRA, Tiny et al. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk

of stroke in elderly. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 2822–8, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605330>>. Acesso em: 1 fev. 2012.

HULTMAN, Karin et al. Allele-specific transcription of the PAI-1 gene in human astrocytes. **Thrombosis and haemostasis**, [s. l.], v. 104, n. 5, p. 998–1008, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20806116>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

JOHANSSON, Lars et al. Tissue Plasminogen Activator , Plasminogen Activator Development of a First Stroke. **Stroke**, [s. l.], 2000.

JOOD, Katarina et al. Fibrinolytic gene polymorphism and ischemic stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 2077–81, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179568>>. Acesso em: 21 dez. 2011.

KATO, H.; KOGURE, K. Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction. **Cellular and molecular neurobiology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 93–108, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079969>>

LUPU, F. et al. Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1090–1100, 1993. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.13.7.1090>>. Acesso em: 3 fev. 2012.

LUTTUN, A. Lack of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Growth and Abnormal Matrix Remodeling of Advanced Atherosclerotic Plaques in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 499–505, 2002. Disponível em: <<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/hq0302.104529>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

MARKUS, Hugh. Stroke: causes and clinical features. **Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 484–489, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303912001326>>. Acesso em: 13 nov. 2012.

MOHR, J. P. et al. Etiology of Stroke Diagnosis of Ischemic Stroke Mechanism Embolism to the Brain of Cardiac or Aortic Origin. **Therapy**, [s. l.], p. 1501–1506, 1997.

MONTAGU, Alexandra; RECKLESS, Ian P.; BUCHAN, Alastair M. Stroke: management and prevention. **Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 490–499, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135730391200134X>>. Acesso em: 2 jan. 2013.

MONTANER, Joan et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 2280–7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535284>>. Acesso em:

28 jun. 2011.

OH, CK et al. PAI-1 promotes extracellular matrix deposition in the airways of a murine asthma model. **Biochemical and biophysical ...**, [s. l.], v. 294, p. 1155–1160, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X02005776>>. Acesso em: 4 jan. 2013.

PETROVIC, D. et al. Prothrombotic gene polymorphisms and atherothrombotic cerebral infarction. **Acta neurologica Scandinavica**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 109–13, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859287>>

PIERI, Alexandre et al. Prevalence of cardiovascular risk factors among elderly Brazilians over eighty with ischemic stroke. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, [s. l.], v. 66, n. 3A, p. 454–7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813698>>

RAO, Rohit et al. Ischaemic stroke subtypes and their genetic basis: a comprehensive meta-analysis of small and large vessel stroke. **European neurology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 76–86, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19039225>>. Acesso em: 23 ago. 2011.

ROGER, Véronique L. et al. Heart disease and stroke statistics-2011 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, [s. l.], v. 123, n. 4, p. e18–e209, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21160056>>. Acesso em: 13 jun. 2011.

ROPPER, A. H. et al. **Adams and Victor's principles of neurology**. [s.l.] : McGraw-Hill Professional, 2005. Disponível em: <http://journals.lww.com/neurosurgery/Abstract/1998/02000/Principles_of_Neurology,_6th_Edition.148.aspx>. Acesso em: 18 jan. 2012.

ROSSIGNOL, P. Plasminogen activation: a mediator of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerotic plaques. ... **of Thrombosis and ...**, [s. l.], 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2005.01765.x/full>>. Acesso em: 2 jan. 2013.

SAENGER, Amy K.; CHRISTENSON, Robert H. Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation, and treatment. **Clinical chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 21–33, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926776>>. Acesso em: 16 mar. 2011.

SAIDI, Sarra et al. Association of PAI-1 4G/5G and -844G/A gene polymorphism and changes in PAI-1/tPA levels in stroke: a case-control study. **Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 153–9, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689411>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

SAPOSNIK, Gustavo et al. IScore: A Risk Score to Predict Death Early After Hospitalization for an Acute Ischemic Stroke. **Circulation**, [s. l.], v. 123, n. 7, p. 739–

749, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300951>>. Acesso em: 15 mar. 2011.

SU, Shaoyong et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene: selection of tagging single nucleotide polymorphisms and association with coronary heart disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 948–54, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424345>>. Acesso em: 24 jan. 2012.

VAN GOOR, M. L. et al. The plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 levels in ischemic stroke. A case-control study. **Thromb Haemost**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 92–96, 2005. Disponível em: <<http://www.schattauer.de/en/magazine/subject-areas/journals-a-z/thrombosis-and-haemostasis/contents/archive/issue/759/manuscript/3983.html>>. Acesso em: 3 fev. 2012.

WANG, Xiaoying et al. Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, [s. l.], v. 35, n. 11 Suppl 1, p. 2726–30, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459442>>. Acesso em: 15 dez. 2012.

WARDEN, Donald R.; REFSUM, Helga. Detection of single-nucleotide polymorphisms by PCR with universal energy transfer-labeled primers: application to folate- and cobalamin-related genes. **Clinical chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 1713–6, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037414>>. Acesso em: 10 out. 2011.

YANG, Quanhe et al. Improving the prediction of complex diseases by testing for multiple disease-susceptibility genes. **American journal of human genetics**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 636–49, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1180239&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

YEH, Poh-shiow et al. Prognosis of young ischemic stroke in Taiwan: impact of prothrombotic genetic polymorphisms. **Genetic Analysis**, [s. l.], p. 583–589, 2004.

Anexo

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Epidemiologia Genética do AVC

Prezado (a), _____

- Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo clínico.
- Por favor, leia atentamente todo este documento.
- Esclareça suas dúvidas com a equipe médica ou de pesquisadores que fazem parte desse estudo.
- Confirme sua participação através da assinatura deste termo.

Qual o objetivo desse estudo?

É avaliar se variações presentes no seu DNA podem aumentar o risco para desenvolvimento do AVC.

Por que fui escolhido?

Este estudo envolverá pessoas de ambos os sexos com idade entre 30 e 60 anos que forem admitidas no setor de acompanhamento da neurologia da Santa Casa de Belo Horizonte. Serão excluídos deste estudo indivíduos com doenças degenerativas crônicas, cardiopatia chagásica, doença tireoidiana, doença renal crônica, tumores malignos, trauma e alcoólatras.

Sou obrigado a participar?

Nenhum paciente é obrigado a participar, sendo sua participação voluntária e podendo abandoná-lo em qualquer momento, sem prejuízo do seu tratamento ou perda de benefícios.

Quais os riscos de participar do estudo? E o que acontece com as informações deste estudo?

Este estudo envolve coleta de dados de história clínica, exame físico e coleta de sangue venoso, sendo os riscos apenas os inerentes a este procedimento. As informações coletadas nesse estudo serão armazenadas, codificadas e datadas por um período de 10 anos. Será mantido sigilo absoluto sobre os dados pessoais, os quais serão utilizados somente para fins

acadêmicos e científicos. Este estudo foi rigorosamente avaliado por um comitê de ética em pesquisa que o aprovou, indicando que neste estudo não apresenta riscos para sua saúde.

Qual a minha participação? Quais as etapas do estudo?

Sua participação neste estudo envolverá a coleta de 20 ml de sangue venoso utilizando técnicas adequadas. Este volume é cerca de 20 vezes menor ao volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todas as dosagens importantes neste estudo.

Terei custos ao participar desse estudo? Receberei alguma ajuda financeira?

Não haverá custos ou nenhuma compensação financeira neste estudo.

Contatos para maiores informações

Prof Dr Paulo Pereira Christo

Profa Dra Valéria Cristina Sandrim

Dessa maneira:

1. Informo que li o documento acima, retirei as dúvidas e compreendi de maneira satisfatória sobre a minha participação neste estudo.
2. Entendo que minha participação é voluntária e posso recusar em participar em qualquer momento, sem prejuízo para minha saúde ou tratamento.
3. Compreendo que o material coletado (Sangue venoso) será utilizado apenas para fins científicos bem como autorizo o uso dessas informações para fins de publicação científica.

_____ Data _____
 Nome por extenso do paciente ou representante legal

Assinaturas:

 Pesquisador

 Paciente ou representante