



**ANA LÚCIA
FRANCISCO
CORREIA**

**FACTORES GENÉTICOS DE RISCO PARA ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL JOVEM**



**ANA LÚCIA
FRANCISCO
CORREIA**

**FACTORES GENÉTICOS DE RISCO PARA ACIDENTE
VASCULAR CEREBRAL JOVEM**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Carlos Faro e do Professor Doutor Manuel Santos do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

O Júri

Presidente

Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria da Conceição Venâncio Egas
Professora da Universidade de Coimbra

Professor Doutor Carlos José Fialho da Costa Faro
Professor do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra

Professor Doutor Manuel António da Silva Santos
Professor Associado da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Carlos Faro e Professor Doutor Manuel Santos, pela orientação científica deste trabalho. Em especial agradeço, ao Professor Doutor Carlos Faro pelo seu extraordinário apoio e os seus ensinamentos, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço, especialmente, ao Doutor Carlos Ferrer a oportunidade de desenvolver este trabalho na Unidade Biofairway do Biocant e na empresa Genebox. Agradeço-lhe ainda a obtenção das amostras biológicas utilizadas neste estudo.

Ao Laboratório de Hematologia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, agradeço pela simpatia e apoio na obtenção de amostras e dados clínicos referentes aos AVCs jovens.

Agradeço, a todas as pessoas que trabalham ou trabalharam na unidade Biofairway e Genebox, em especial, à Sandra Balseiro pelos seus ensinamentos, apoio, atenção, paciência, amizade e tempo dispensado, fundamentais à realização deste trabalho. Muito obrigado Sandra.

Finalmente, agradeço muito aos meus pais, avós, irmão, e amigos por todo o carinho e compreensão pelas horas que não lhes dediquei. Agradeço-lhes muito, pelo apoio nas horas menos felizes, ao longo deste trabalho.

palavras-chave

Doença cardiovascular; Acidentes Vascular Cerebral, Factores de risco trombótico, Polimorfismos

resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte e morbidade na união europeia. Os Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC) jovens são raros e de difícil diagnóstico, devido ao grande número de causas possíveis, quando comparado com os AVC's em idosos. A maioria dos estudos são pouco conclusivos no que diz respeito aos factores de risco associados a este tipo de AVC. Na origem dos AVC's jovens estão implicados vários factores: genéticos, ambientais, dietéticos, inflamatórios, entre outros. Tendo em conta o aumento de incidência desta patologia, a determinação de factores genéticos de risco trombótico poderá ser um passo importante para prevenção desta doença. Apesar da variedade de factores genéticos, apenas alguns deles foram objecto deste estudo, nomeadamente: o Factor V Leiden (F V Leiden), G20210 na protrombina, 4G/5G no Inibidor do Activador do Plasminogénio-1 (PAI-1), C677T e A1298C na Metileno-tetra-hidrofolato Redutase (MTHFR) e as posições T334C e C472T da Apolipoproteína E (Apo E). O principal objectivo deste trabalho foi associar estes polimorfismos à ocorrência do AVC jovem. Paralelamente à análise individual dos polimorfismos, desenvolveu-se um teste PCR-SSP multiplex com a maioria das mutações estudadas.

Neste estudo, foram analisadas amostras de sangue periférico de 294 indivíduos, divididos em três grupos distintos (98 AVC jovem, 98 população normal e 98 controlos) por PCR-SSP. Comparando a frequência dos polimorfismos, entre pacientes com AVC jovem e controlos, apenas se verificou diferenças significativas no factor V (alelo A e genótipo GA) e na Apo E (isoforma E2). O factor V Leiden revelou maior frequência no grupo AVC jovem ($p < 0,05$). Por outro lado, a isoforma E2 da Apo E apresentou maior prevalência na população controlo ($p=0,0399$). Para além dos resultados significativos, obtiveram-se duas tendências, uma no genótipo E4E4, mais prevalente no grupo alvo ($p=0,0827$), e outra no E2E2, que foi mais prevalente na população controlo ($p=0,0827$). Não foi possível correlacionar a maioria dos polimorfismos com a susceptibilidade para a AVC em jovem. Pode apenas concluir-se que o genótipo GA e o alelo A do factor V Leiden, e o genótipo E4E4 da Apo E podem ser considerados factores de risco e possíveis preditores da ocorrência de AVC jovem enquanto a isoforma E2 e o genótipo E2E2 podem ser consideradas factores responsáveis pela diminuição da susceptibilidade para AVC Jovem, podendo mesmo ter papel protector. Por fim, foi optimizada uma reacção multiplex bastante completa para a tipagem da maioria dos polimorfismos que demonstrou ser reprodutível, rápida, versátil, sensível, específica e económica.

keywords

Cardiovascular disease, stroke, thrombotic risk factors, polymorphisms.

abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death and morbidity in the European Union. The Strokes (CVA) in young adults are rare and difficult to diagnose due to the large number of possible causes, compared with strokes in the elderly. Most studies are inconclusive with regard to risk factors associated with this type of stroke. In the origins of the strokes in young adults, are involved several factors: genetic, environmental, dietary, inflammatory, and others. Having regard to the increased incidence of this pathology, the determination of genetic risk of thrombosis may be an important step in preventing this disease. Despite the variety of genetic factors, only some of them were the subject of this study, namely: Factor V Leiden (FV Leiden), the G20210 in prothrombin, 4G/5G in plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and the positions T334C e C472T of the Apolipoprotein E (Apo E). The main goal of this work was to associate these polymorphisms with the occurrence of stroke in young age. Parallel to the individual polymorphisms analysis, we developed a multiplex PCR-SSP reaction with most of the studied mutations.

In this work, we analyzed peripheral blood samples of 294 individuals, from three distinct groups (98 stroke in young adults, 98 standard population and 98 controls) by PCR-SSP. Comparing the frequency of polymorphisms among young stroke patients and controls, we only detect significant differences in the factor V (allele and genotype GA) and Apo E (E2 isoform). The factor V Leiden revealed more frequently in young stroke group ($p < 0.05$). Moreover, the E2 isoform of Apo E showed the highest prevalence in controls ($p = 0.0399$). In addition to the significant results were obtained two trends, one in E4E4, more prevalent in the target group ($p = 0.0827$), and another in E2E2, which was more prevalent in controls ($p = 0.0827$). It was not possible to correlate most polymorphisms with susceptibility to stroke in young age. It's only possible to conclude that the GA genotype and allele A of factor V Leiden, and the E4E4 genotype of Apo E can be considered risk factors and possible predictors of the occurrence of stroke in young, while the isoform E2 and E2E2 genotype can be considered a factor responsible for decreased susceptibility to stroke young and may have protective role. Finally, we optimized a multiplex reaction a lot of typing to complete most of the polymorphisms that proved to be reproducible, rapid, versatile, sensitive, specific and economic

INDÍCE

I.Introdução	1
1.Acidente Vascular Cerebral	1
2.AVC Jovem	3
2.1 Factores de Risco no AVC Jovem	4
2.1.1 Factores de Risco Definitivo	6
2.1.2 Factores de Risco Não Definitivos	7
2.2 Alterações Hematológicas e AVC Jovem	9
2.2.1 A Hemostase	9
2.2.2 Desordens Hematológicas	12
3.Factores Genéticos no AVC Jovem	13
3.1 Apolipoproteína E	14
3.2 Factor V	16
3.3 Inibidor do Activador do Plasminigénio-1	18
3.4 Metilenotetrahydrofolato Redutase	21
3.5 Protrombina	24
4.Marcadores Genéticos e AVC Jovem	26
4.1 Diagnóstico Molecular e AVC Jovem	26
5.Objectivos	28
II.Material e Métodos	29
1.População	29
1.1 População Alvo	29
1.2 População Normal	29
1.3 População Controlo	29
2.Análise dos polimorfismos	29
2.1 Extracção do DNA	29
2.2 Análise de Pureza e Quantificação do DNA Extraído	30
2.3 Tipagem Genética dos Factores de Risco Trombótico	31
2.3.1 Amplificação por PCR-SSP	31
2.3.2 Amplificação por PCR-SSP Multiplex	32
2.4 Electroforese em Gel de Agarose	33

2.5 Interpretação	34
2.6 Análise da Pureza e Concentração dos DNAs	34
3.Análise Estatística	34
3.1 Frequências Alélicas e Genotípicas dos Polimorfismos Estudados na População Portuguesa	34
3.2 Frequências Alélicas e Genotípicas dos Polimorfismos Estudados em AVC Jovem	35
III.Resultados	36
1. Caracterização da Amostra em Estudo	36
2.Pureza e Concentração das Amostras	37
3.Frequências Alélicas e Genotípicas dos Polimorfismos Estudados na População Portuguesa	37
4. Frequências Alélicas e Genotípicas dos Polimorfismos Estudados de Pacientes com AVC Jovem versus Controlo	38
5.PCR-SSP Multiplex	42
IV.Discussão	44
1.Qualidade das Amostras Biológicas	44
2. Polimorfismos e Equilíbrio de Hardy-Weinberg	44
3.Influência dos Polimorfismos Estudados no AVC Jovem	45
4.PCR-SSP Multiplex	49
V.Conclusão	51
VI.Referências	54
ANEXOS	67

I.INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte e morbidade na união europeia. ^[1, 2, 3] A doença trombótica pode ser classificada, em termos gerais, de acordo com o local onde ocorre: no sistema venoso (circulação lenta e baixa pressão) ou arterial (elevada circulação e pressão). Estas duas variantes possuem algumas distinções na composição do trombo (rico em plaquetas na arterial e rico em fibrina na venosa) e na presença de danos na parede vascular, o ateroma (presente na arterial e ausente na venosa). A DCV é caracterizada pela formação de placas ateromatosas culminando em lesões aterotrombóticas obstrutivas que levam a danos nos tecidos. ^[1] A DCV é de tal forma preocupante que foi estimado um aumento de mortes por esta doença na ordem dos 8%, de 1990 a 2020. ^[2, 3, 4] As DCV mais frequentes são as de origem aterosclerótica, nomeadamente: o acidente vascular cerebral (AVC); a doença cardíaca isquémica (DCI); enfarte do miocárdio (EM); e a insuficiência cardíaca. ^[2, 5] O AVC foi considerado a terceira causa de morte mais comum nos países mais desenvolvidos, pela Organização Mundial de Saúde. ^[5] Em Portugal, as doenças do aparelho circulatório, nomeadamente AVC e DCI, encontram-se entre as principais causas de internamento hospitalar, invalidez e mortalidade. ^[6, 7]

1.ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL (AVC)

A expressão AVC refere-se a um complexo de sintomas de deficiência neurológica que resultam de lesões cerebrais provocadas por alterações da irrigação sanguínea. Estas alterações podem dever-se a dois mecanismos diferentes: oclusão de vasos sanguíneos (originando isquémia e/ou enfarte de tecidos), ou ruptura vascular (comprometendo a função cerebral). Desta forma, os AVC's dividem-se em isquémico e hemorrágico, de acordo com mecanismo que o originou (Figura 1 e 2). ^[8, 9] De um modo geral o AVC hemorrágico apresenta um nível de incidência na população menor que o AVC isquémico. ^[10]

O AVC isquémico pode ser induzido por oclusão de um vaso ou por redução da pressão de perfusão cerebral (RPPC). A RPPC pode ser provocada tanto por redução do débito cardíaco (fibrilação atrial), como por hipotensão arterial grave sustentada. ^[9] O processo isquémico é caracterizado pela ausência

de irrigação sanguínea, impedindo o tecido de libertar dióxido de carbono e receber nutrientes e oxigénio. Deste modo, quando o tecido cerebral é privado do sangue arterial ocorre sofrimento celular. Se esta privação for de curta duração, a disfunção é considerada reversível e estamos perante um acidente isquémico transitório (AIT). Quando a isquémia persiste, podem instalar-se lesões definitivas e irreversíveis no cérebro (enfarte cerebral).^[8, 11]

Esta isquémia pode dever-se ao estreitamento de artérias do pescoço ou cabeça, provocando aterosclerose ou deposição gradual de gordura. Se as artérias ficarem demasiado estreitas, podem acumular-se células sanguíneas e formar um coágulo. Os coágulos podem bloquear as artérias cerebrais no local onde se formaram (subtipo trombótico) ou desalojar-se da artéria de origem e percorrer a corrente sanguínea até ficar alojado num vaso cerebral (subtipo embólico).^[11]

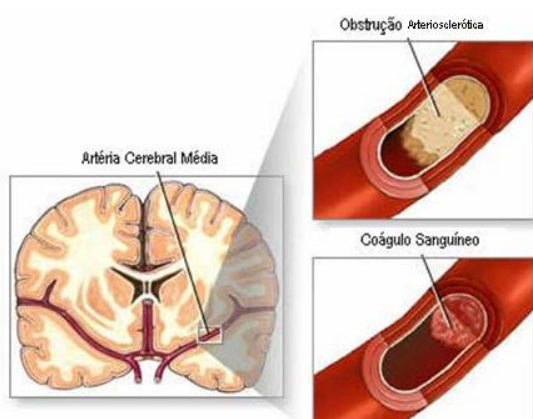


Figura 1: Representação de um AVC isquémico, originado por obstrução aterosclerótica ou por coágulo sanguíneo. (Adaptado de Oliveira S)^[12]

A hemorragia cerebral deve-se à ruptura dos vasos e extravasão sanguínea. Os subtipos intracerebral e subaracnóide diferenciam-se na localização de ocorrência. No subtipo intracerebral ocorre ruptura arterial no cérebro e consequente libertação de sangue, comprimindo as restantes estruturas cerebrais. Esta ruptura deve-se sobretudo à hipertensão arterial. No subtipo subaracnóide ocorre ruptura de artéria fora do cérebro e consequente libertação de sangue para o espaço subaracnóide. A extravasão sanguínea, neste subtipo,

deve-se à malformação de artérias (aneurismas) que tornam a parede arterial mais fina acabando por romper. [4, 11]

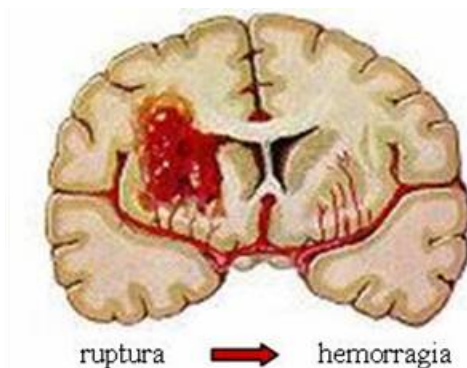


Figura 2: Representação de um AVC hemorrágico por ruptura de vaso. (Adaptado de Oliveira S)^[12]

Independentemente do tipo de AVC diagnosticado no paciente os seus efeitos dependem da zona do cérebro afectada e do grau de severidade do evento. Geralmente a ocorrência de um AVC pode causar súbita fraqueza, perda de sensibilidade, e/ou dificuldades na fala, visão e locomoção. A idade do doente na altura do episódio de AVC pode ser um factor muito relevante no que diz respeito ao prognóstico, diagnóstico e tratamento. [11]

2.AVC JOVEM

A definição AVC jovem deve-se sobretudo à idade do paciente aquando do acontecimento deste evento trombótico. Contudo, ainda não existe consenso em relação à idade limite para esta divisão. A maioria dos estudos realizados inclui nesta categoria doentes até aos 45 anos, sendo que alguns autores alargam a faixa etária até aos 65. [13] O AVC jovem e o AVC em idosos apresentam algumas diferenças, nomeadamente, na sua etiologia, que é mais vasta no jovem, e no seu prognóstico, que é em geral mais desfavorável nos idosos. [13]

O AVC em adultos jovens é considerado uma patologia rara a nível mundial, com uma incidência que varia entre 5 a 10%. Em Portugal, estima-se que ocorram cerca de 3.000 novos casos de AVC jovem, anualmente. [14] No entanto esta incidência tem vindo a aumentar ao longo dos anos devido a mudanças sociais, como por exemplo o aumento generalizado do consumo de

drogas, alimentação mais rica em gorduras e sedentarismo. Na população portuguesa 77,8% dos casos são AVC's Isquémicos, ^[10] devido principalmente a uma maior incidência da aterosclerose precoce. As causas desta incidência são mais diversificadas que na população idosa. Alguns autores, sugerem que é possível identificar o factor causal do AVC jovem, em 55 a 93% dos casos. Estas premissas são um desafio clínico importante não havendo consenso devido aos critérios usados na identificação. ^[10-16]

2.1 FACTORES DE RISCO NO AVC JOVEM

De acordo com o Dicionário de Epidemiologia, a definição de Factor de Risco é: "Aspecto do comportamento ou estilo de vida, exposição ambiental, característica inata ou hereditária pessoal ou populacional que, pelas evidências epidemiológicas, se sabe estar relacionado com um estado de saúde considerado importante para ser prevenido." ^[17] Tal como na maioria das doenças modernas, na génese da doença aterosclerótica estão implicados diversos tipos de factores: genéticos, ambientais, hemodinâmicos, dietéticos, metabólicos, inflamatórios, entre outros. A maioria dos autores defende que, a ocorrência de complicações cardiovasculares na doença aterosclerótica depende da presença concomitante de diversos factores. Estes factores interagem entre si potenciando-se mutuamente, tornando o risco cardiovascular global maior que a soma do risco dos factores isolados (Figura 3). ^[18-21]

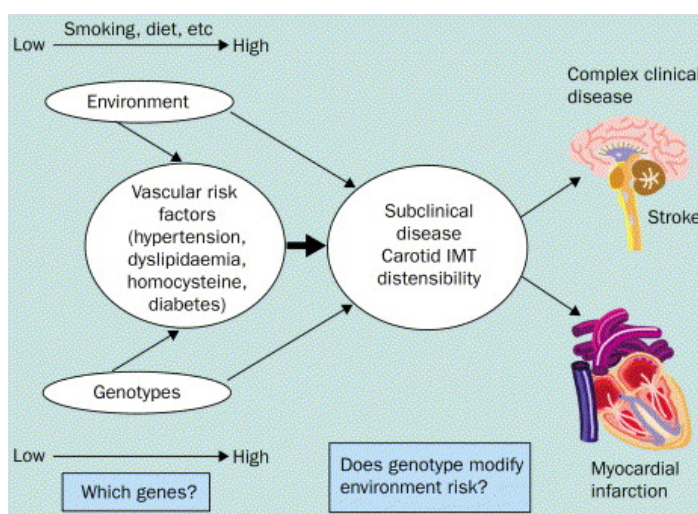


Figura 3: A interacção de factores ambientais e genéticos no AVC jovem e EM. (Adaptado de Humphries S & Morgan L) ^[9]

Existem inúmeros estudos que demonstram o impacto dos diferentes factores de risco para AVC em diversas populações mundiais. No caso específico de Portugal, Ana Gomes e colaboradores ^[13] referenciaram vários factores de risco para o AVC isquémico e hemorrágico (Figura 4 e 5). Este estudo prospectivo envolveu doentes com idade <60 anos com o diagnóstico de AVC, entre 1 de Janeiro de 2002 e 31 de Dezembro de 2003, realizado no Hospital de S. Teotónio SA-Viseu. No AVC isquémico destacaram-se os factores de risco clássicos, nomeadamente a hipertensão arterial, dislipidémias, obesidade e diabetes. Estes factores de risco clássicos, são pouco frequentes nos AVC's jovens, no entanto, a sua preponderância neste estudo, deve-se sobretudo à inclusão de doentes menos jovens na amostragem. ^[13] O hábito tabágico, o consumo excessivo de álcool, o uso de contraceptivos orais, a enxaqueca, o trauma, o consumo de drogas ilícitas, a gravidez e puerpério, têm um papel muito mais relevante, que os factores clássicos, nos AVC's jovens. ^[22] Devido às suas características distintas os factores de risco, clássicos e não clássico, podem ser divididos em factores definitivos e em factores não definitivos.

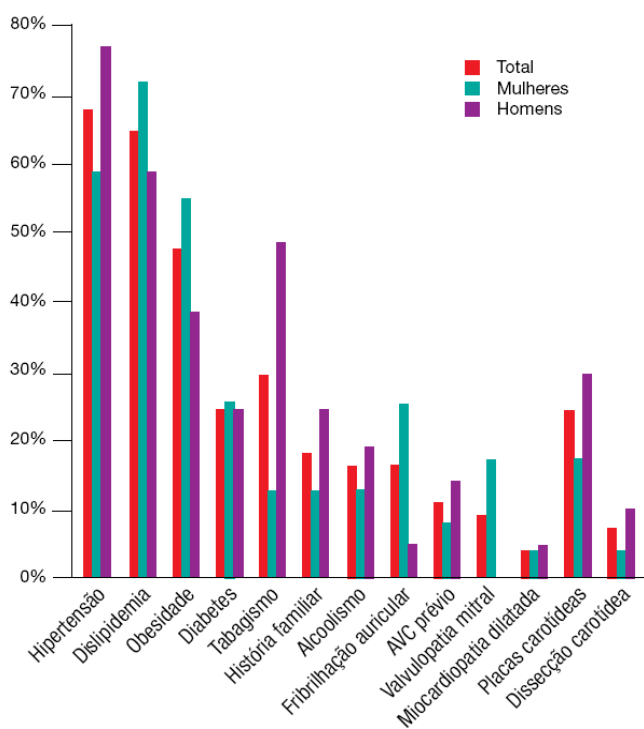


Figura 4: Factores de risco no AVC isquémico. (Adaptado de Gomes A) ^[13]

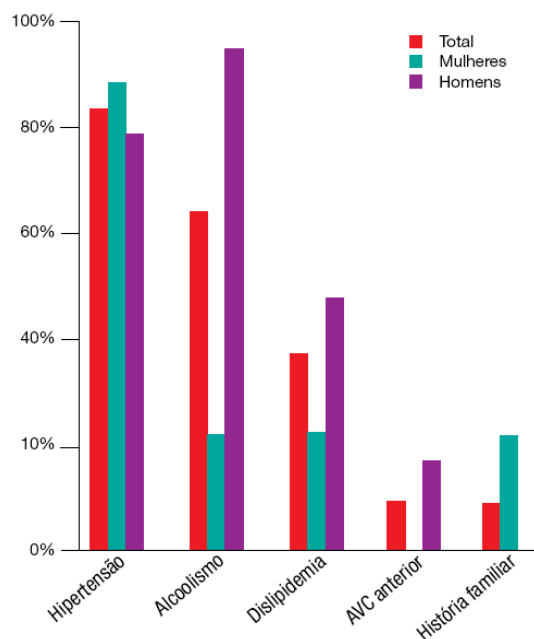


Figura 5: Factores de risco no AVC hemorrágico. (Adaptado de Gomes A) ^[13]

2.1.1 FACTORES DE RISCO DEFINITIVO

No grupo dos factores de risco definitivo, estão inseridos todas as características que não são possíveis de ser alteradas pelo paciente. Embora existam várias características que se incluem dentro deste grupo de factores, as mais relevantes são:

- ▶ **A idade:** os efeitos cumulativos do envelhecimento, associados ao aumento do número de factores de risco com a idade, acrescem substancialmente o risco de AVC isquémico e hemorrágico no AVC jovem. Tem sido referenciado que entre os 20 e os 50 anos o risco sobe de 5 para 10%, ou seja, duplica com a idade. ^[10, 17, 23]
- ▶ **O sexo:** de uma forma geral os homens apresentarem maior incidência de AVC e AVC jovem do que as mulheres. Contudo, o pico de incidência de AVC nas mulheres dá-se entre os 25 e os 44 anos, provavelmente relacionada com a gravidez e o uso de contraceptivos. ^[23, 24] Para além das diferenças ao nível da incidência, o sexo também influencia a forma de manifestação e de diagnóstico da doença, a sua evolução, o prognóstico e a resposta à terapêutica. ^[18]
- ▶ **A etnia:** apesar de o AVC ser uma doença que atinge todas as etnias de uma forma global, existe uma maior incidência da doença em indivíduos

com origens africanas e hispânicas. ^[25, 26] No caso particular da população portuguesa, esta, em geral, apresentou uma maior incidência da mortalidade por AVC jovem do que as restantes populações da Europa ocidental, entre 1985 e 1994. Esta incidência pode ser explicada por diferenças na incidência de alguns factores de risco clássicos, como o consumo de álcool, os hábitos tabágicos e a dieta. ^[23]

- ▶ **A herança de genes:** a existência de história familiar, nos pais e irmãos, está associada a uma maior prevalência do AVC jovem. Este risco acrescido pode dever-se à transmissão de doenças hereditárias raras ou à transmissão de factores poligénicos. Os factores poligénicos são muitas vezes associados ao risco de desenvolvimento da doença vascular ou ao aumento da susceptibilidade aos seus efeitos. ^[26-29] Apesar de raras, as doenças monogénicas associadas a AVC jovem apresentam elevadas taxas de morbilidade e mortalidade. ^[30]
- ▶ **O peso à nascença:** aparentemente os indivíduos com maior peso à nascença apresentam menor incidência de AVC jovem. Tem vindo a ser referenciado que o risco de AVC antes dos 50 anos é duas vezes superior nas pessoas que nascem com um peso inferior a 2,5kg. No entanto a razão para esta relação ainda permanece por esclarecer. ^[31, 32]

2.1.2 FACTORES DE RISCO NÃO DEFINITIVOS

Dentro do grupo dos factores de risco não definitivos, estão inseridos todas as características possíveis de ser alteradas pelo paciente.

- ▶ **O tabagismo:** o tabagismo é a segunda causa mais importante para a ocorrência do AVC. ^[31] Nos adultos jovens, a probabilidade de ocorrência do AVC é 2 a 4 vezes superior nos fumadores. ^[22, 32] O tabagismo pode ainda potenciar o efeito de outros factores de risco, sendo responsável por 12 a 14% das mortes por AVC. ^[9, 32] O tabagismo passivo (exposição ambiental ao fumo de tabaco) também pode aumentar risco de doença vascular. ^[33]
- ▶ **O álcool:** a relação entre o consumo de álcool e o risco de AVC tem sido difícil de estabelecer pelas diferentes definições e metodologias dos estudos, mas a relação parece não ser linear. ^[34] Alguns autores consideram o

consumo excessivo um factor de risco para todos os tipos de AVC e o consumo moderado (definido como ≤ 1 bebida para mulheres e ≤ 2 para homens, diário) como um factor protector. ^[32, 35] O consumo excessivo de álcool tem vindo a ser associado ao aumento da incidência da doença cardiovascular. ^[10, 22]

- ▶ **A obesidade e distribuição abdominal da gordura corporal:** os indivíduos com um índice de massa corporal (IMC - peso em kg / dividido pelo quadrado da altura em metros) superior a 25 são considerados com excesso de peso. O excesso de peso está associado, de forma proporcional, a um maior risco de AVC. A distribuição de gordura abdominal (perímetro da cintura > 102 cm no homem ou > 88 cm na mulher) também está associada a maior risco de AVC. ^[32-34] Paralelamente ao AVC, estas características também aparecem associadas a outros factores de risco importantes como: a hipertensão, a diabetes e a dislipidemia. ^[36]
- ▶ **A gravidez:** estudos de registos hospitalares demonstram que a gravidez triplica o risco de ocorrência de AVC. A incidência de AVC está aumentada principalmente no período periparto e puerpério. Há a considerar factores de risco para AVC na gravidez (como enxaqueca com aura, trombofilia, doença cardíaca, hipertensão arterial, trombocitopenia, idade acima 35 anos) e complicações da gravidez (eclampsia, pré-eclampsia severa, hemorragia, alterações electrolíticas, infecção). ^[10, 22, 37]
- ▶ **Drogas de abuso:** estudos caso-controlo têm identificado aumento da incidência de AVC em consumidores de drogas como heroína, cocaína, anfetaminas, LSD e marijuana. ^[22, 38] Os mecanismos envolvidos incluem vasoespasmo, embolia cardíaca, dissecação da aorta, vasculite, arterite séptica e rotura de vasos por aumento brusco de tensão arterial. ^[15, 39]
- ▶ **Os anticoncepcionais orais (ACO):** as estimativas de incidência de AVC em mulheres jovens variam de 0,9 a 10 por 100.000. ^[32] Alguns autores consideram que o uso de ACO é por si só, um factor de risco suficiente para se lhe atribuir a ocorrência de AVC, no entanto quando associado a enxaqueca o risco de AVC isquémico eleva-se. ^[10, 22]

2.2 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E AVC JOVEM

Nos países mais desenvolvidos, a população está sujeita a muitos desafios para manter o bem-estar cardiovascular, tal como elevados níveis de fumo (tabaco), alimentação rica em gordura (fast food) e consumo álcool. Mesmo face a estas agressões ambientais, algumas pessoas conseguem manter saúde a nível cardiovascular ao longo dos anos, enquanto outros, com uma expressão genética diferente, desenvolvem doenças vasculares, como arteriosclerose, enfarte do miocárdio e AVC. ^[9] As alterações hematológicas são potenciais factores de risco para o desenvolvimento do AVC Jovem.

2.2.1 A HEMOSTASE

O processo hemostático consiste num equilíbrio organizado dos factores protrombóticos e antitrombóticos na corrente sanguínea. Os mecanismos protrombóticos são responsáveis pela activação da coagulação e adesão/agregação plaquetar. Este mecanismo é regulado por vários anticoagulantes naturais (mecanismos antitrombóticos), como: a antitrombina; a proteína C activada (APC); a proteína S; o inibidor do factor tecidual; as células endoteliais; e o sistema fibrinolítico. No caso do sistema fibrinolítico e das células endoteliais, a sua acção anticoagulante é caracterizada pela degradação do coágulo de fibrina. ^[40-42] Após lesão vascular, o sistema hemostático é activado dando início à cascata da coagulação (Figura 6). A cascata da coagulação pode ser iniciada por duas vias, a intrínseca e a extrínseca. A activação do sistema intrínseco que inclui a requisição dos factores VIII, IX, XI, XIII de coagulação, bem como da precalicreina e kininogénio. Por outro lado, a via extrínseca é despoletada pela activação do factor VII e do factor tecidual. Ambas as vias convergem num sistema comum envolvendo os factores X, V e II (protrombina) de coagulação. Como resultado, destes processos, forma-se a trombina que leva a conversão do fibrinogénio em fibrina. Simultaneamente, ocorre adesão das plaquetas, com exposição das proteínas da matriz extracelular, e activação destas pela trombina e outros agonistas. Finalmente, após agregação de ambos os sistemas forma-se um trombo de plaquetas e de fibrina (Figura 6). ^[40, 41] Quando o coágulo deixa de ser necessário, inicia-se o processo de fibrinólise, responsável

pela degradação da fibrina e remoção do coágulo. Durante esta fase o plasminogénio é convertido em plasmina, molécula responsável pela degradação da fibrina e proteínas da matriz extracelular. O sistema fibrinolítico é regulado pelo inibidor do activador do plasminogénio-1 (PAI-1) e α 2-antiplasmina. [40-42]

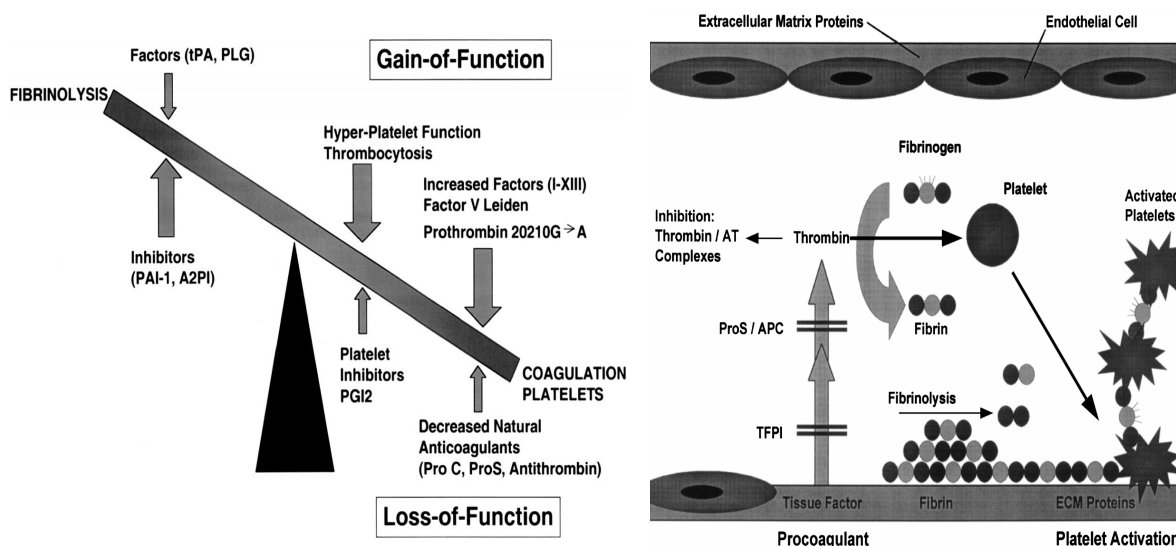


Figura 6: Equilíbrio dos factores protrombóticos e antitrombóticos da hemostase (esquerda). E regulação da hemostase após lesão vascular (direita). (Adaptado de Marchant K)^[40]

Testes *in vivo* demonstram que a activação da cascata de coagulação é bastante complexa, sendo o papel central assumido pelo factor VII e o factor tecidular. A coagulação é iniciada pela exposição do factor tecidular do subendotélio ao factor VII circulante formando um complexo enzimático. Este complexo activa proteoliticamente o factor X e IX. Este último, conjuntamente com o factor VIII, regulam a produção de factor X. Em determinadas situações, como o stress hemostático severo, é requerida a produção de factor IX suplementar, via activação do factor XI pela trombina. Por sua vez a activação de factor X e factor V, leva a conversão de protrombina em trombina e a criação do coágulo de fibrina a partir do fibrinogénio. Por fim a activação do factor XIII conduz à estabilização do coágulo de fibrina (Figura 7), por inibição da fibrinólise. [41, 42]

A importância da cascata da coagulação para o desenvolvimento de trombose foi apresentada por Virchow em 1974, através da Triade com o seu nome (Figura 8). Este autor sugeriu que a trombose é causada por 3 tipos de

alterações distintos: alterações na composição do sangue; alterações nas paredes dos vasos; e alterações na corrente sanguínea. [43] Estas alterações apresentam relevâncias distintas na trombose arterial e na trombose venosa. As modificações nas paredes dos vasos (arteriosclerose) bem como os factores de risco associados (hipertensão, hiperlipidémia, hábitos tabágicos, diabetes, aterosclerose) são grandes contribuintes para o desenvolvimento da trombose arterial. Devido à elevada pressão da corrente sanguínea nas artérias, a estase e a imobilização não são factores de risco para a trombose arterial. Por fim, a hipercoagulabilidade do sangue apresenta um papel relativamente menor neste tipo de trombose, quando comparado com a trombose do sistema venoso. No que diz respeito à trombose venosa, a estase ou imobilização apresentam um papel muito relevante no seu desenvolvimento, bem como anormalidades protrombóticas. Factores como, aterosclerose, hábitos tabágicos, hipertensão e/ou hiperlipidémia não influenciam o risco de trombose venosa. Existem algumas doenças hematológicas que também alteram a susceptibilidade dos pacientes para o desenvolvimento dos processos trombóticos. [40-44]

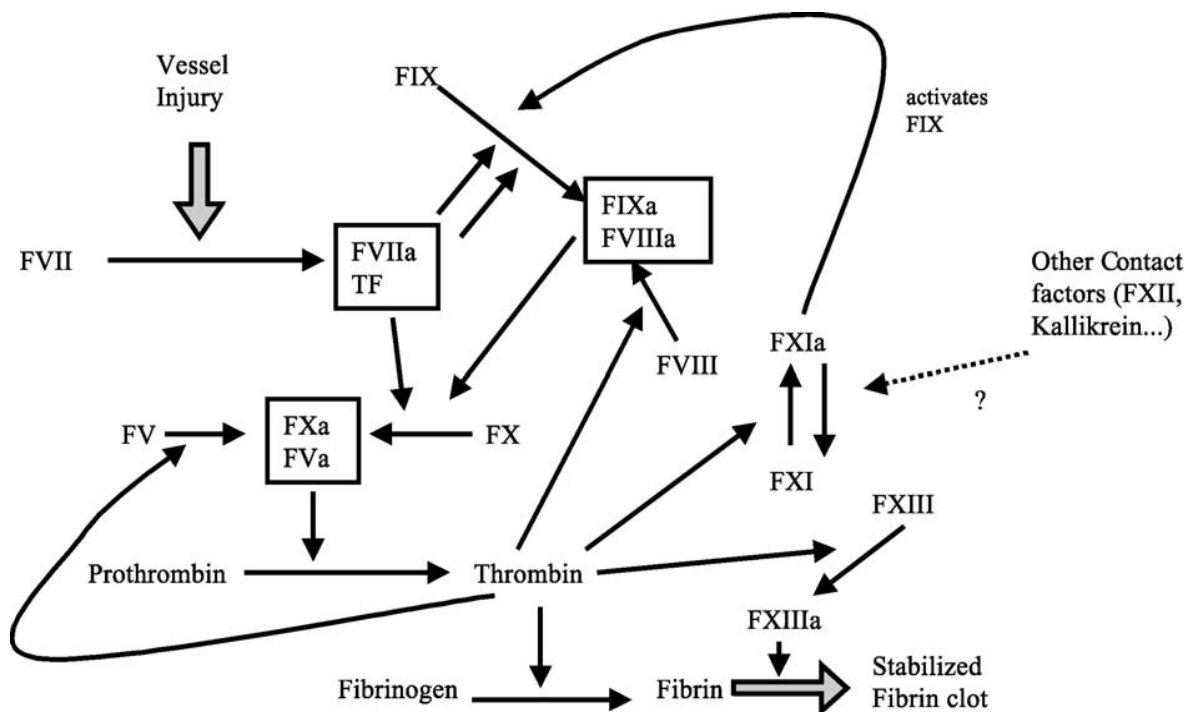


Figura 7: Cascata da coagulação *in vivo*. (adaptado de Luchtman-Jones and Broze) [41]

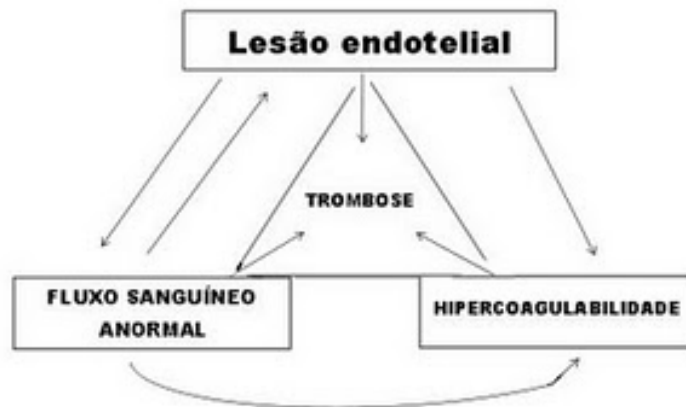


Figura 8: Tríade de Virchow e desenvolvimento da trombose arterial. ^[43]

2.2.2 DESORDENS HEMATOLÓGICAS

Existem inúmeras doenças do foro hematológico com implicação directa na hemostase sanguínea. Algumas destas doenças actuam directamente no risco trombótico. A Drepanocitose é das doenças hematológicas mais comuns, e é caracterizada pela mutação dos dois alelos da beta-globina, que originam a Hemoglobina S (HbS). ^[45] Esta vai provocar alterações na estrutura da Hb, bem como na estrutura dos eritrócitos (forma de “foice”), que têm assim maior probabilidade de se acumularem num vaso sanguíneo, provocando a sua oclusão. Esta mutação aumenta assim significativamente o risco trombotico dos indivíduos. Logo, o risco de AVC isquémico está aumentado neste tipo de pacientes. ^[46] Os indivíduos heterozigóticos para a Drepanositose, apresentam muitas vezes outros tipos de hemoglobinopatias, nomeadamente beta-Talassémias. Este tipo de patologia também aparece associado ao aumento do risco de AVC jovem. ^[45, 46]

O aumento de homocisteína sérica total (Hiperhomocisteinémia) altera a função endotelial normal. Nestes indivíduos ocorre um aumento do “stress” oxidativo celular que promove a inflamação e a hipercoagulabilidade sanguínea. ^[4] Este aumento dos níveis de homocisteína potencia o risco de ocorrência de eventos vasculares e de AVC isquémico em jovens adultos. ^[47] Variações genéticas da 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) influenciam directamente os níveis de homocisteína e o risco de AVC jovem. ^[4, 47]

As doenças que originam alterações no volume celular sanguíneo também se associam ao risco de AVC jovem. A Policitémia Vera, a Trombocitémia Essencial

e Síndromes Mieloproliferativas são exemplos destas alterações. Estas patologias são caracterizadas pela hiper celularidade sanguínea, isto é, pelo aumento do número de eritrócitos, plaquetas e/ou leucócitos. Este aumento do número de células do sangue influencia directamente a formação de trombos que por sua vez aumentam o risco de AVC isquémico. [48, 49]

Dentro das desordens hematológicas e com associações ainda pouco evidentes com o AVC jovem, estão inseridas as alterações no processo de coagulação. A hipercoagulabilidade aparece associada ao desenvolvimento da trombose venosa. No entanto, existe alguma controvérsia relativamente à sua associação com a trombose arterial e AVC em jovem. As alterações no factor V, na protrombina, nas proteínas C ou S e na antitrombina III fazem parte das principais causas da hipercoagulabilidade. Estas alterações estão associadas a diversas modificações proteicas que impedem o normal funcionamento da hemostase. [15, 21, 32]

A deficiência de plasminogénio e do activador do plasminogénio inserem-se nas alterações fibrinolíticas. Tal como as anteriores, a relação da fibrinólise com AVC jovem também é controversa. [49] Contudo, alguns estudos demonstram que a redução da actividade deste sistema se associa com AVC isquémico, nomeadamente no que diz respeito aos níveis de PAI-1. [50] A alteração dos níveis de lipoproteínas (Lps) é outro mecanismo associado ao AVC, por redução da actividade fibrinolítica. Esta redução deve-se sobretudo à semelhança estrutural entre as Lps e o plasminogénio, competindo pela ligação deste à fibrina. Níveis elevados de Lps são, por esta razão, considerados inibidores naturais de fibrinólise *in vitro*. [21, 50, 51] A associação da Apolipoproteína E (Apo E) com os níveis séricos de colesterol e triglicéridos tem vindo a ser implicada na ocorrência de AVC. Níveis plasmáticos elevados destes lípidos associam-se a um aumento de eventos cardiovasculares e de AVC isquémico. [51]

3.FACTORES GENÉTICOS NO AVC JOVEM

Factores de risco trombótico hereditários e adquiridos continuam a ser alvo de interesse para os investigadores. O objectivo principal do seu estudo é o conhecimento do seu papel no desenvolvimento de patologias vasculares,

morbilidade, e mortalidade. Recentemente, o aumento de conhecimentos de genética e biologia molecular, incentivaram estas pesquisas e levaram ao conhecimento de vários factores genéticos de risco hemostático. Estes factores são extremamente relevantes para o prognóstico de eventos trombóticos.

A hemostase normal é mantida, pelo equilíbrio entre os processos protrombóticos e antitrombóticos. Desarranjos genéticos que comprometam a produção, actividade, biodisponibilidade ou metabolismo de factores hemostáticos, podem desencadear eventos trombóticos.^[52, 53] Dentro dos factores genéticos mais estudados no risco trombótico inserem-se: o factor V, a protrombina, o PAI-1, a MTHFR e a Apo E. Mutações em determinados factores de coagulação, nomeadamente factor V e protrombina, alteram significativamente a cascata de coagulação. No caso concreto do PAI-1 e da Apo E, moléculas envolvidas no sistema fibrinolítico, mutações nestes genes favorecem o estado de hipercoagulabilidade. Outro factor genético relevante, o MTHFR, aparece associado a alterações no equilíbrio hematológico normal, provocando hiperhomocisteinémia. Os níveis elevados de homocisteína sérica contribuem para o desenvolvimento trombose arterial e venosa.^[52, 53]

3.1 APOLIPOPROTEÍNA E

As Lps são compostas por triglicerídeos, esters de colesterol, fosfolípidos e apolipoproteínas. Na circulação sanguínea existem 5 grupos de apolipoproteínas diferentes (A, B, C, D e E). A Apo E ajuda a estabilizar e solubilizar as Lps para que possam circular na corrente sanguínea. Actua como cofactor, nas reacções enzimáticas (Ex. catabolismo de várias Lps), e como ligando, para os receptores das Lps (Ex: LDL; VLDL). Esta proteína intervém na depuração de gorduras (triglicerídeos) da corrente sanguínea e tem um papel importante no transporte de colesterol. A função primordial da Apo E é desempenhada no fígado, onde se processa a captação/filtração lipídica do plasma. Os portadores de E4, tem uma absorção de colesterol no intestino, mais eficiente do que os portadores de E3. A isoforma E2, por sua vez, confere uma menor absorção do colesterol a nível intestinal, em comparação também com E3.^[54-60] Esta proteína é produzida

principalmente no fígado, no entanto, o cérebro, o baço, os rins e os macrófagos, também a podem sintetizar. [58, 61]

O gene da Apo E é muito polimórfico e têm sido alvo de estudo para vários autores em diversas patologias. O gene da Apo E localiza-se no cromossoma 19q13.2 (Figura 9), e consiste em 4 exões. [55, 58] Algumas das variantes deste gene são conhecidas por conferir diferentes capacidades de ligação ao receptor das LDL e influenciar a estabilidade dos níveis de colesterol. [62-64] Um dos principais variantes genéticos da Apo E é representado por 3 isoformas distintas, causadas por duas mutações pontuais na posição 334 (T/C) e 472 (C/T). Estas mutações determinam 3 haplótipos/isoformas diferentes: a Apo E2 (334T/472T), a Apo E3 (334T/472C) e a Apo E4 (334C/472C). As isoformas da Apo E apresentam assim substituições cisteína-arginina na sequência de aminoácidos nas posições 112 e 158. A Apo E2 contém cisteína nas duas posições, a Apo E3 apresenta cisteína na posição 112 e arginina na posição 158 e a Apo E4 possui arginina em ambas posições (Figura 10). [58, 64-66]

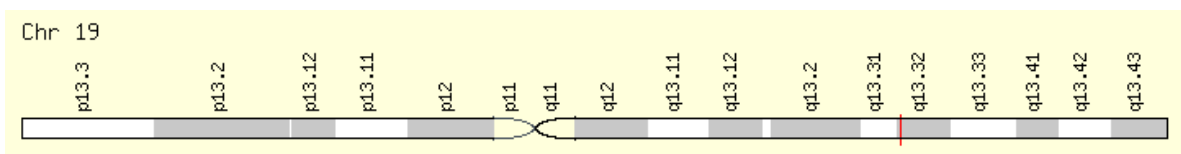


Figura 9: Localização genética do Apo E. (Adaptado de *genecards* [67])

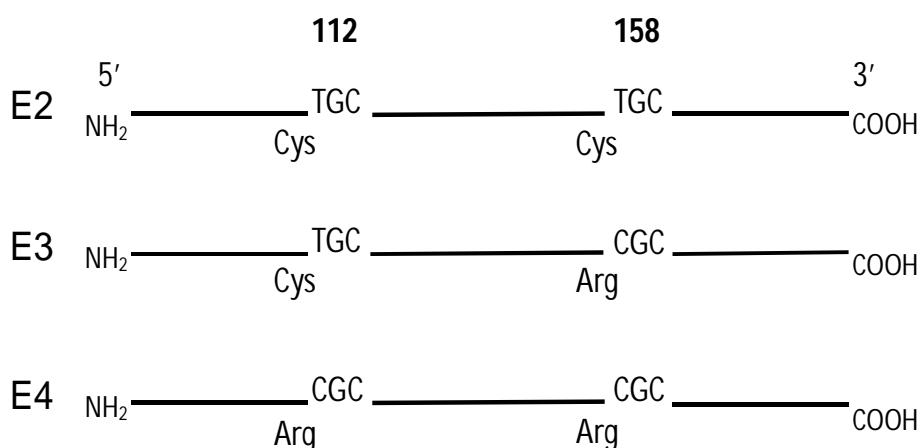


Figura 10: Variantes do gene Apo E: E2, E3 e E4. Constituição da sequência de aminoácidos. [64]

Os polimorfismos na Apo E têm um papel determinante no desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Este papel advém da sua função na regulação do metabolismo lipídico, na agregação plaquetar e nos processos de stress oxidativo. ^[55, 68] A isoforma E2 associa-se a baixos níveis de colesterol total e LDL, bem como a elevadas concentrações de Apo E e HDL. A maioria dos estudos revelam que Apo E2, em comparação com o E3, tem uma redução de 20% no risco de doenças coronárias e associa-se a perfil lipídico vantajoso. ^[57] No entanto, outros autores associaram a combinação E2E3 com doença arterioesclerótica da artéria carótida. A combinação E2E2 aparece sobretudo associada à hiperlipoproteinémia tipo III (caracterizada por níveis elevados de colesterol e triglicéridos). Esta correlação pode ser explicada pelo facto de a isoforma E2 conferir aos seus portadores uma depuração mais lenta das gorduras provenientes da dieta. Contudo, ainda não existem fortes evidências da correlação desta isoforma com outras patologias vasculares. ^[58] Contrariamente à E2, a isoforma E4 associa-se a baixas concentrações de Apo E e a elevados níveis de colesterol total e LDL. ^[56, 57, 61, 69] Devido à sua suposta elevada afinidade ao LDL, esta variante parece ser um importante marcador de dislipidémias associadas a DCV. Esta associação pode ser atribuída ao facto da combinação E4E4 estar associada a níveis elevados de parâmetros aterogénicos, bem como a menor actividade antioxidante da Apo E. ^[55, 58, 61, 62, 65, 70]

3.2 FACTOR V

O factor V é um cofactor enzimático com função central na manutenção do equilíbrio hemostático (envolvido no processo procoagulante e anticoagulante). Este factor conjuntamente com o factor X activado é responsável pela conversão de protrombina em trombina. ^[40, 71] A sua descoberta, em 1947 por Norwegian Paul Owren, baseou-se no estudo de um paciente com tendência hemorrágica severa e deficiência de um factor de coagulação desconhecido. Estudos clínicos posteriores demonstram que a deficiência em factor V conduzia a propensão hemorrágica devido à sua acção procoagulante. ^[72]

O factor V é uma glicoproteína de cadeia simples com cerca de 330kDa, maioritariamente sintetizada no fígado. Apesar de circular no plasma na forma

livre, esta proteína está também presente nos grânulos- α das plaquetas. Durante a coagulação, este factor é secretado como resultado da activação das plaquetas, tendo assim um efeito procoagulante. [40, 41, 71-73] A ligação da trombina ao seu receptor (trombomodulina) activa a proteína C, seguidamente a proteína C activada (APC) cliva o factor V nos aminoácidos Arg506, Arg306 e Arg679 (Figura 11). [40, 74] A clivagem deste factor conduz normalmente à fibrinólise, processo anticoagulante. Para além desta via, a relação APC-factor V tem papel determinante na regulação da actividade do factor VIII. O factor VIII é reconhecido pela sua acção procoagulante, desta forma o complexo anterior potencia a actividade anticoagulante do factor V. [40, 41, 71-73] Recentemente verificou-se um grande interesse no estudo do factor V na associação com eventos trombóticos. Mutações específicas no factor V, nomeadamente no aminoácido 506, alteram a sua actividade aumentando o risco de trombose. [40, 39, 75]

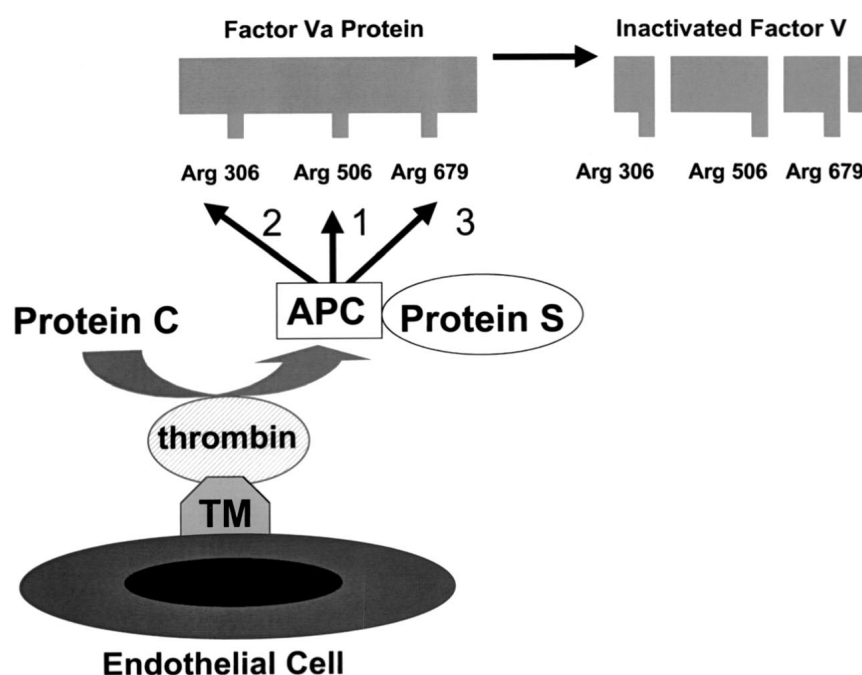


Figura 11: Esquema representativo da interacção entre a trombina, APC e factor V. (Adaptado de Marchant K) [40]

O gene do factor V, situado no cromossoma 1q23, possui mais de 80kd e contem 25 exões (Figura 12). Há muito que existem referências de alterações neste gene, algumas das quais com impacto significativo no processo de

hemostase. Após identificação da resistência à APC, análises no DNA revelaram a transição de uma guanina (G) para uma adenina (A), na posição nucleotídica 1691 no gene do factor V (factor V de Leiden – G1691A). Esta transição origina a substituição de arginina por glutamina na posição 506 na sequência de aminoácidos da proteína. O factor V Leiden está presente em aproximadamente 2 a 15% da população, sendo muito raro nos nativos Africanos e Asiáticos. [60, 41, 76] Esta modificação impede a APC de reconhecer o factor V circulante tornando-se assim resistente à degradação por esta molécula. O factor V de Leiden influencia significativamente o balanço pró e anticoagulante, através da activação não controlada da protrombina e da diminuição da proteólise do factor VIII. Ocorre assim a formação continuada de trombina, e conseqüentemente aumenta o estado de hipercoagulabilidade. [1, 5, 40, 52, 71-74, 77]

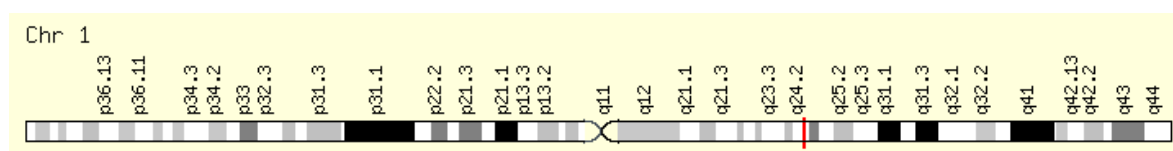


Figura 12: Localização genética do factor V. (Adaptado de *genecards* [67])

O factor V Leiden tem sido associado com as DCV. Estudos demonstram a relação desta mutação com o aumento do risco de eventos coronários. [73, 78] Quando associado ao factor de risco tabaco, o nível de incidência das DCV aumenta consideravelmente. [53] Comparativamente com o gene normal, a forma heterozigótica amplifica cerca de 3 a 8 vezes o risco de trombose, enquanto que a forma homozigótica amplia cerca de 80 vezes. [74, 79] Margaglione e colaboradores, sugeriram que o factor V Leiden pode ser um factor de risco para AVC isquémico nos adultos jovens. [41] No entanto, até à data, os estudos não são consensuais no que diz respeito à associação do factor V Leiden com trombose arterial. Contudo alguns autores defendem que esta mutação potencia o risco conferido pelos factores de risco clássicos, no AVC jovem. [71, 75]

3.3 INIBIDOR DO ACTIVADOR DO PLASMINIGÉNIO-1

Na formação e estabilização do coágulo intervêm a trombina e o factor XIII activado. Por outro lado, a plasmina participa na degradação da fibrina em D-

dímeros. A acção da plasmina é inibida pela α_2 -antiplasmina. Este inibidor liga-se à plasmina em circulação sendo incorporado no coágulo. Para a formação da plasmina, é necessária a clivagem do plasminogénio por proteases serínicas específicas. Este processo é impedido pelo PAI-1, que é activado pela trombina. O PAI-1 é por esta razão responsável pela estabilização do coágulo, desempenhando um importante papel na regulação na fibrinólise. Para além disso, o PAI-1 está envolvido na reparação e remodelação dos tecidos vasculares. [1, 62, 80,]

O PAI-1 pertence à família de inibidores de proteases serínicas (SERPINs). [1, 81] O PAI-1 é o maior inibidor da activação do plasminogénio. A actividade desta molécula é regulada a nível transcripcional pelo factor beta de transformação e crescimento (TGF)- β , que por sua vez por retrocontrolo é regulado pelos níveis de PAI-1. [81] Em condições normais o PAI-1 é libertado na circulação e no espaço extracelular pelas células do fígado, do músculo liso, adipósas e/ou plaquetáres. Em condições patológicas, pode ser secretado por células tumorais e células endoteliais. [81] Variações nos níveis séricos de PAI-1 estão relacionadas com diversas patologias, nomeadamente, doenças oclusivas vasculares, deposição de fibrina, doenças metabólicas, doenças inflamatórias e doenças tumorais. [1, 81]

O gene do PAI-1 codifica uma proteína de 50-kd, e está localizado no braço longo do cromossoma 7 (7q21.3-q22), e contem 9 exões e 8 intrões (Figura 13). [1, 62, 80] A transcrição deste gene é induzida por várias moléculas: insulina, glicocorticoides, angiotensina II, lipoproteínas e citocinas. Esta indução pode explicar a relação que existem entre hipofibrinólise e várias características semi-patológicas, como: a resistência à insulina, dislipidémias e inflamação sistémica (Figura 14). [80, 83]

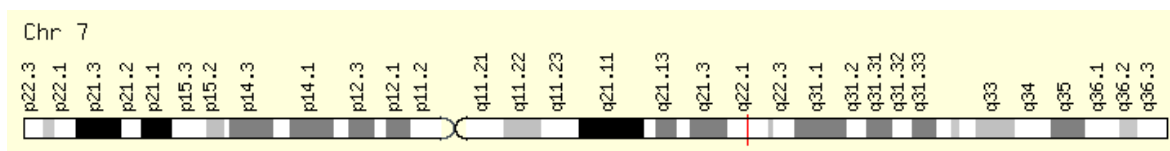


Figura 13: Localização genética do PAI-1. (Adaptado de *genecards* [67])

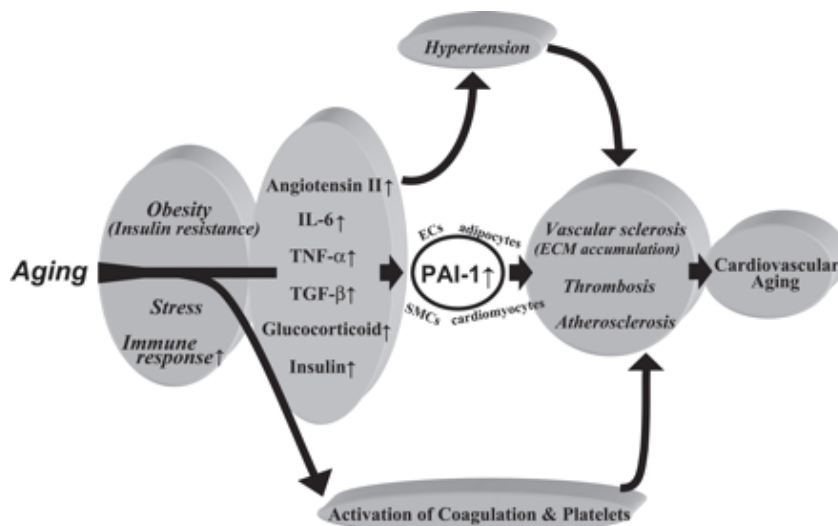


Figura 14: PAI-1 pode desempenhar um papel importante na progressão de do envelhecimento cardiovascular através da promoção de trombose e aterosclerose. (Adaptado de Bertina RM) [83]

Foi descrito, na região promotora do gene, um polimorfismo deleção/inserção na posição -675 (4G/5G) (Figura 15). [1, 62, 75, 80, 84] O genótipo 4G/4G reflecte a incapacidade do PAI-1 se ligar à proteína supressora transcripcional. Esta condição resulta numa elevada transcrição molecular e consequente diminuição da fibrinólise. Esta variação na degradação de fibrina conduz a um estado de hipercoagulabilidade e contribui para o desenvolvimento de complicações vasculares, incluindo o AVC. [85-87]

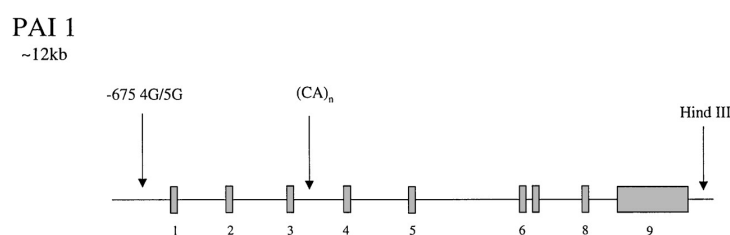


Figura 15: Representação da organização do gene do PAI-1. (Adaptado de Lane DA & Grant PJ) [1]

O alelo 4G aparece relacionado com aumento do risco de EM, sendo esta associação fortalecida pela presença de ateroma. [88] Contrariamente ao que seria de esperar, alguns autores chegam mesmo a sugerir que o alelo 4G tem um efeito protector contra o AVC, associando o alelo 5G ao risco trombótico. [85] Deste

modo, ainda não existe consenso entre os diversos estudos epidemiológicos realizados, em relação ao efeito do polimorfismo 4G/5G no risco de trombose arterial. [1, 43, 53, 62, 75, 80, 82, 84, 89, 90]

3.4 METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE

A MTHFR é uma enzima que catalisa a redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato (forma primária do folato em circulação). Esta enzima é um cofactor da remetilação da homocisteína em metionina originando a S-adenosil metionina. Esta molécula é o principal dador de grupos metil para a síntese de desoxinucleotídeos, tendo por isso um papel importante no processo de metilação do DNA (Figura 16). [9, 63, 91-93] Por esta razão, uma forma menos activa da MTHFR origina hipometilação, elevando o risco de desenvolvimento de alguns carcinomas. Uma forma menos activa da MTHFR pode também gerar níveis elevados de homocisteína (hiperhomocisteinémia). [80, 92-94]

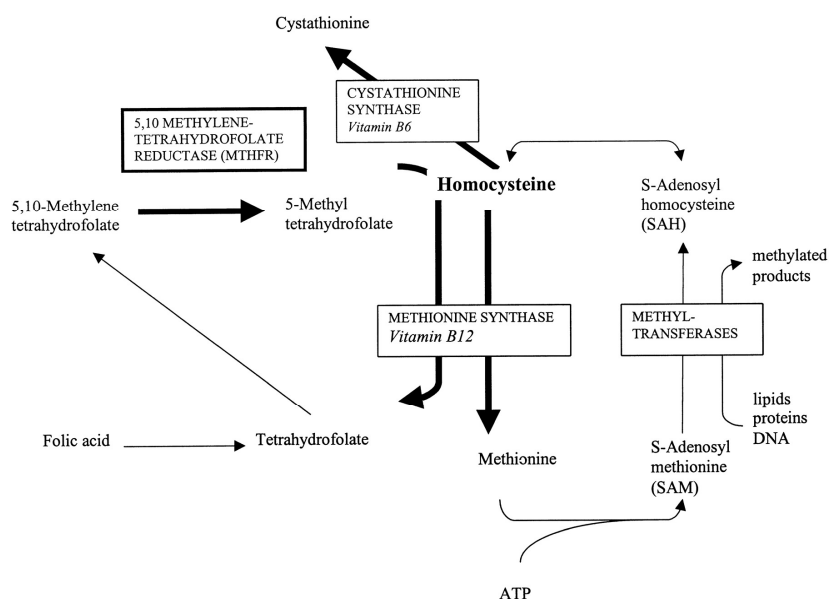


Figura 16: O papel da MTHFR na remetilação da homocisteína e no ciclo Carbono. (Adaptado de Harmon DL e colaboradores) [92]

Níveis elevados de homocisteína podem ser causados tanto por factores nutricionais (deficiências de folato, vitaminas B12 e B6), como genéticos (alteração no gene da MTHFR). A hiperhomocisteinémia aparece correlacionada

com a idade, níveis de creatinina sérica, pressão sistólica, gênero, hábitos tabágicos, consumo de café e álcool. [1, 53, 63] Esta condição induz stress oxidativo provocando disfunções no endotélio, inflamação e apoptose das células endoteliais vasculares. Todo este processo promove o desenvolvimento de arteriosclerose. [40, 63, 74, 80, 92, 94, 95] Assim, a hiperhomocisteinemia pode causar AVC isquêmico, através da formação de ateroma, ou AVC hemorrágico, através da ruptura de microaneurismas. [16]

O gene da MTHFR localiza-se no cromossoma 1p36.3 e é composto por 11 exões (Figura 17 e 18). [91] A causa genética mais comum de hiperhomocisteinemia, envolvendo o gene MTHFR, foi descoberta por Frosst e colaboradores. Estes investigadores verificaram que a homozigotia de uma mutação na região codificante do gene da MTHFR (exão 4), provocada pela troca de uma C por T na posição 677 (MTHFR C677T), era responsável pelo aumento da homocisteína na circulação sanguínea (Figura 18). Esta alteração na sequência genética resulta na substituição de alanina por valina no domínio catalítico da enzima (posição 222), originando uma enzima termolábil e menos activa. A actividade da MTHFR nos indivíduos com genótipo 677TT é de apenas 30%, enquanto nos 677CT é na ordem dos 65%. Aproximadamente 10% da população mundial apresenta o genótipo de baixa actividade, o que representa uma expressão bastante significativa. [5, 53, 75, 80, 89, 92, 93, 95-97]

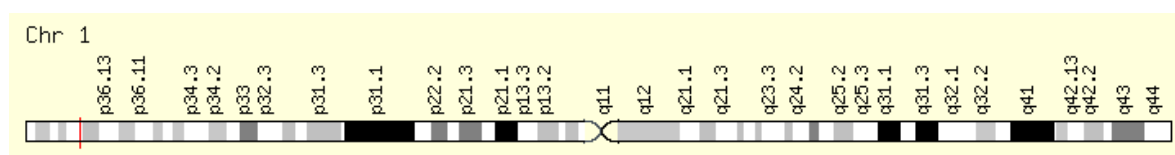


Figura 17: Localização genética da MTHFR. (Adaptado de *genecards* [67])

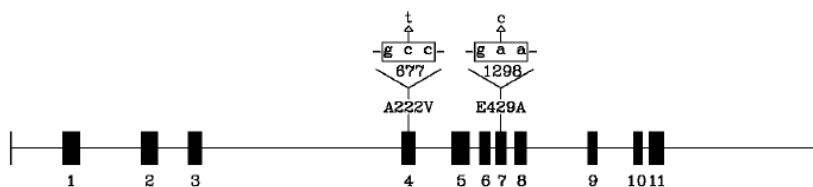


Figura 18: Representação esquemática do gene da MTHFR. (Adaptado de Trabetti E) [95]

O produto metabólico da MTHFR, 5-metiltetrahydrofolato, combina-se com a homocisteína e por acção da metionina sintetase, forma metionina (Figura 16). Os indivíduos homozigóticos para 677T não conseguem realizar a remetilação da homocisteína eficientemente. Como consequência, ocorre acumulação de homocisteína promovendo a formação de trombos a nível vascular e o aumento do risco de doenças cardiovasculares e/ou neurológicas. Quando combinada com baixos níveis de ácido fólico, esta alteração potencia o risco de enfarte e doença trombótica. [40, 43, 53, 92] No entanto, estudos de associação desta mutação com AVC jovem são contraditórios. Enquanto alguns autores encontram uma associação forte entre o alelo/genótipo mutado e o risco de AVC jovem, outros não apresentam qualquer associação entre eles. Esta variante é ainda responsável pela baixa disponibilidade de grupos metil (CH₃) nas reacções de metilação do DNA. Nos homozigóticos TT a baixa redução em 5-metiltetrahydrofolato é responsável pela uma baixa produção de S-adenosil metionina, principal dador de grupos metil para a metilação do DNA. (Figura 19). [98]

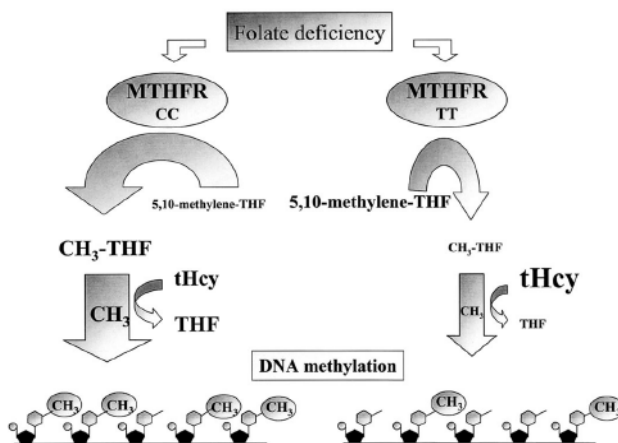


Figura 19: Interação entre a variante MTHFR C677T e os níveis de folato na metilação do DNA. (Adaptado de Friso S & Choi SW) [98]

Uma segunda variante no gene da MTHFR foi descrita em 1998, e consiste na substituição de A por C na posição 1298 (A1298C) no exão 7 (Figura 18). Esta alteração é responsável pela substituição do glutamato por alanina no domínio regulatório da enzima (codão 429). Nos homozigóticos para a variante 1298C ocorre uma diminuição da actividade da enzima MTHFR em cerca de 60%. Esta

diminuição da actividade deve-se, possivelmente, à perda do local de ligação do seu inibidor alostérico (S-adenosil metionina). O ponto de ligação deste inibidor à MTHFR situa-se perto do codão 429 e provavelmente é alterado por esta mutação. A MTHFR 1298C altera os níveis plasmáticos da homocisteína e compromete a reacção inversa de conversão 5-metiltetrahydrofolato. Neste processo, o 5-metiltetrahydrofolato é convertido novamente em tetrahydrofolato, para dar origem a Tetrahydrobiopterina (BH4). Esta molécula é necessária na degradação da fenilalanina, na biossíntese de neurotransmissores e na produção de óxido nítrico a partir de arginina. Como resultado desta mutação e da diminuição de BH4, ocorre conversão de arginina em radicais livres (superóxido e peroxinitrito) responsáveis por stress oxidativo e consequente desenvolvimento de aterosclerose. [97, 99] As várias vertentes associadas a esta mutação e as diferentes aplicações metabólicas inerentes são responsáveis pela sua associação a DCV independentemente da presença da variante C677T. Várias investigações foram realizadas em torno das duas variantes da MTHFR, associando-as a doenças tromboticas numa forma geral. [53, 62, 91, 93, 95, 100] Num estudo na população Turca, concluiu-se que o alelo 677T, o genótipo 677TT, e a combinação 677TT/1298AA, estão associados com AVC hemorrágico. Por outro lado, neste mesmo estudo, o genótipo 1298CC e a combinação 677CC/1298CC estão significativamente associados com AVC isquémico. Foi descrito uma associação entre MTHFR 1298C e doença da artéria coronária, independentemente da presença da variante C677T. [16]

3.5 PROTROMBINA

A protrombina é uma protease serínica, com um papel importante processo procoagulante e anticoagulante. Esta proteína potencializa a coagulação e simultaneamente activa a proteína C. A protrombina é activada pelo factor X, na presença de factor V e fosfolípidos, e promove a conversão do fibrinogénio em fibrina. É ainda responsável pela activação das plaquetas e dos factores VIII, XI e XIII, sendo por isso evidente o seu papel procoagulante no processo de hemostase. Por ser detentora deste efeito na cascata de coagulação, determinadas alterações na sequência do gene da protrombina, que tenham

como fenótipo o déficit desta proteína, estão associadas a tendência hemorrágica. [40, 41, 101]

O gene da protrombina localiza-se no cromossoma 11p11 (Figura 20) e tem sido alvo de vários estudos associados a doenças trombóticas. Poort e colaboradores, em 1996 identificaram uma variação na sequência deste gene, caracterizada pela transição de uma G por uma A na posição 20210 (G20210A). Esta variação no gene é responsável pela troca de uma glutamina por uma arginina na sequência de aminoácidos da proteína (Figura 21). A mutação G20210A na protrombina é descrita como sendo responsável pelo aumento da eficiência do local de clivagem 3'. Esta alteração resulta num aumento do reconhecimento dos locais de clivagem no mRNA (cauda poli-A). O resultado final desta mutação é a acumulação de mRNA, por aumento do tempo de vida, e consequente acréscimo da síntese de protrombina. Este acréscimo traduz-se pelo aumento dos níveis plasmáticos desta proteína em cerca de 50%. Esta mutação associa-se também com o incremento de cerca de 25% na actividade da trombina plasmática. Por estas razões a alteração genética G20210A da protrombina é considerada um factor de risco importante na trombose. [41, 75, 102, 103]

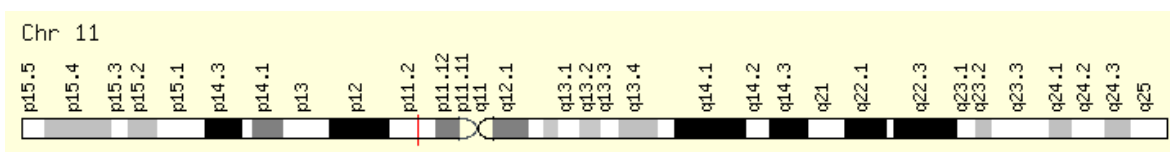


Figura 20: Localização genética da protrombina. (Adaptado de *genecards* [67])

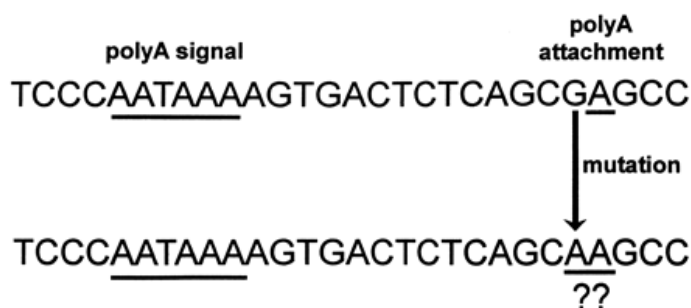


Figure 21: Transição de uma G por uma A na posição 20210 da sequência do gene da protrombina. (Adaptado de Bertina RM) [83]

A prevalência desta mutação é de 1 a 4% na população Europeia, com maior prevalência no Sul. [19, 40, 74, 75, 104, 105] Vários estudos têm sido realizados até

aos dias de hoje, no entanto, o papel desta mutação no risco de AVC ainda não está esclarecido. Contudo, diversos ensaios concluíram que a mutação G20210A na protrombina, quando combinada com outros factores de risco, potencia a ocorrência de eventos trombóticos. Esta relação é descrita como sendo mais relevante na trombose arterial do que na venosa, e esta presente tanto em adultos como em jovens. [19, 40, 80, 104-106] Estudos em pacientes que sofreram EM, chegaram à conclusão que o alelo 20210A potencia o risco desta patologia. Quando associado a hábitos tabágicos a incidência de EM aumenta mais de 40 vezes. [19, 53, 75, 104, 105] A presença simultânea da heterozigotia, para as mutações da protrombina e do factor V Leiden, foi descrita como potencial factor de risco e de severidade no AVC jovem. [1, 19, 53, 75, 102, 104, 105]

4.MARCADORES GENÉTICOS E AVC JOVEM

Na última década, têm sido apresentados vários marcadores genéticos para caracterizar as doenças trombóticas arteriais. No entanto o papel destes marcadores nestas patologias ainda não está claramente estabelecido, sendo mesmo controverso. Estes resultados devem-se, muito provavelmente a várias características dos estudos, nomeadamente, o volume amostral, os grupos étnicos, a dieta e as metodologias de estudo. [10, 16, 78, 105] Novos polimorfismos associados com doença trombótica estão continuamente a ser identificados, chegando actualmente às centenas. As variações descritas inserem-se no grupo das mais estudadas a nível das doenças trombóticas. No entanto, o papel preditivo destes polimorfismos no AVC em jovem ainda não está completamente esclarecido. A incidência desta enfermidade, tem vindo a aumentar ao longo dos anos e as suas causas são as mais diversas. Tudo isto torna o seu diagnóstico num desafio clínico. [10, 16, 78, 105-108]

4.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR E AVC JOVEM

Dentro dos estudos genéticos as mutações mais estudadas no risco trombótico incluem: o factor V de Leiden, a protrombina G20210A, o PAI-1 4G/5G, o MTHFR C677T e A1298C e APO E (T334C e C472T). Os testes de genotipagem, diagnóstico molecular, têm vindo a evoluir desde dos anos 80,

estando o PCR-SSP (Sequence-Specific Primer), e Multiplex PCR entre os métodos mais utilizados. O PCR-SSP é utilizado em muitos laboratórios, como método de screening para a detecção de mutações. Esta técnica baseia-se na amplificação preferencial de produtos complementares dos primers específicos de zonas alélicas definidas. ^[109] Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares de primers com emparelhamento total traduzem-se na amplificação de sequências alvo (Figura 22). Por outro lado, pares de primers com emparelhamento parcial não amplificam (Figura 22). Após a reacção de PCR, os fragmentos de DNA amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição a luz ultravioleta. A interpretação dos resultados de PCR-SSP baseia-se na presença ou ausência de um fragmento de DNA amplificado específico (Figura 22). ^[109-111] Tem como vantagens ser um método rápido, versátil, simples, sensível, específico e económico. Contudo apresenta algumas desvantagens, nomeadamente, o conhecimento prévio das sequências alvo, a utilização de primers de sequência específica e a necessidade de elevadas quantidade/qualidade de amostra biológica. Hoje em dia, estas desvantagens são facilmente ultrapassáveis no ambiente laboratorial normal. ^[109-111]

O PCR-SSP foi desenvolvido para a análise de um único polimorfismo. A necessidade constante de obtenção do maior número de informação genética no menor tempo possível requer técnicas de PCR cada vez mais exigentes. Recentemente a adaptação do PCR-SSP para análise de vários polimorfismos simultaneamente tem sido base para o aperfeiçoamento da técnica de PCR multiplex. O PCR multiplex consiste numa técnica de biologia molecular, utilizada para screening genético, análise de microsatélites entre outras aplicações. O seu objectivo principal é minimizar o tempo de resposta da PCR, amplificando vários polimorfismos numa única reacção. A base da técnica consiste na utilização de vários pares de primers alelo-específicos na mesma reacção de PCR. Esta técnica tem como vantagens a diminuição da intensidade e do período de trabalho laboratorial, a redução da quantidade de reagentes/amostra utilizados e consequentemente a redução dos custos inerentes. Como desvantagens, destacam-se, a redução da sensibilidade de detecção, a necessidade de elevada

integridade da amostra biológica, e a dificuldade de otimização. ^[112] Para ultrapassar estas desvantagens existem alguns processos indispensáveis. Na otimização do PCR multiplex é necessário ter em atenção no desenho de primers as temperaturas de annealing óptimas, bem como, o desenho do programa de PCR (ajuste de temperaturas/tempo de annealing e extensão). A otimização do PCR multiplex tem como finalidade amplificar todas as sequências alvo simultaneamente, sem amplificação inespecífica. ^[112, 113]

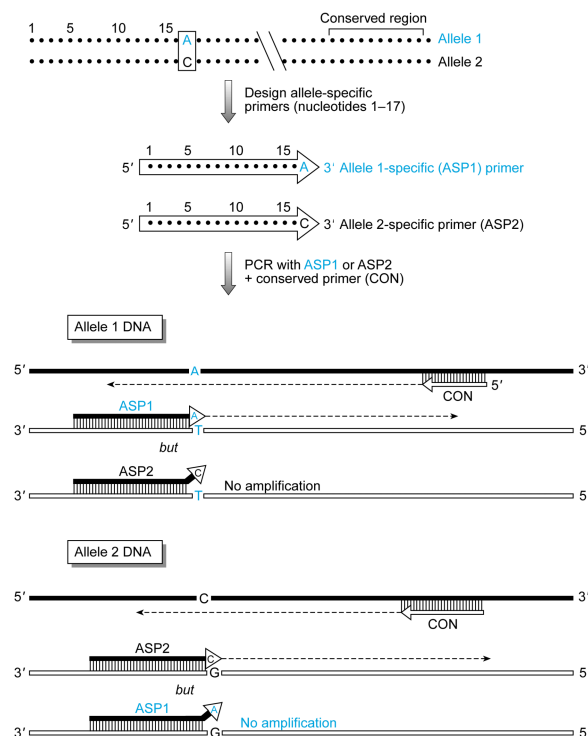


Figura 22: Esquema representativo de PCR-SSP. (Adaptado de Strachan T & Read AP) ^[109]

5.OBJECTIVOS

O objectivo principal deste trabalho foi determinar associação entre alguns factores genéticos de risco trombótico (Apo E2/E3/E4; factor V G1691A, MTHFR C677T/A1298C, PAI-1 4G/5G e protrombina G20210A) e a ocorrência de AVC jovem. Paralelamente, pretendeu-se determinar o impacto preditivo de cada um dos factores nesta patologia. Em terceiro lugar, pretendeu-se otimizar uma técnica de PCR-SSP Multiplex para a tipagem dos referidos factores genéticos de risco trombótico.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO

Utilizou-se uma amostra de 294 indivíduos Caucasoídes da região Centro de Portugal (amostras do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra - CHUC). Sendo 98 pacientes com AVC em idade jovem, 98 de indivíduos de população normal escolhidos ao acaso e 98 indivíduos de população controlo. A recolha das amostras foi efectuada nos CHUC. Foram colhidas amostras de sangue com anticoagulante ácido tetra-acético etilenodiaminado (EDTA) ou com citrato de sódio. O tratamento e processamento das amostras foram efectuados na unidade Biofairway do Biocant.

1.1 POPULAÇÃO ALVO:

Utilizaram-se amostras de 98 pacientes do CHUC que sofreram AVC Jovem, com idade inferior a 50 anos. Esta população de indivíduos era constituída por 40% de indivíduos do sexo feminino e 60% do sexo masculino e apresentava uma média de idades de 36,5 anos ($\pm 7,4$ anos).

1.2 POPULAÇÃO NORMAL:

Representada por amostras de 98 pacientes do CHUC escolhida ao acaso. Esta população apresentou a mesma distribuição de idade e sexo que a população alvo.

1.3 POPULAÇÃO CONTROLO:

Constituída por amostras de 98 pacientes do CHUC, que após análise do seu histórico se concluiu que não sofreram AVC com idade inferior a 50 anos. Nesta população 45% de indivíduos eram do sexo feminino e 55% do sexo masculino e apresentava uma média de idades de 66,7 anos ($\pm 12,4$ anos).

2. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

2.1 EXTRACÇÃO DO DNA:

A extracção de DNA foi realizada, a partir de sangue total, com recurso a um kit comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Califórnia, EUA). O

DNA foi extraído num robot (QIAcube - QIAGEN, Califórnia, EUA) utilizando o procedimento “DNA purification from total blood”. Pipetou-se 20 µl de QIAamp® proteinase K para tubos de 1,5 ml, de seguida adicionou-se 200 µl da amostra de sangue. Para assegurar uma lise eficaz adicionou-se 200 µl de Tampão de lise QIAamp® AL à amostra e agitou-se no vortex durante 15 segundos. De seguida incubou-se as misturas a 56°C durante 10 minutos. Nesta fase o DNA atinge o máximo de rendimento após a lise celular. Seguidamente, adicionou-se 200 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstad, Alemanha) misturou-se novamente e centrifugou-se brevemente os tubos. A etapa seguinte foi transferir a mistura dos tubos para colunas QIAamp® Mini Spin. Fechou-se as tampas e centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto. De seguida transferiu-se cada coluna QIAamp® Mini Spin para um tubo novo de 2 ml e descartou-se os outros tubos que continham o filtrado. Abriu-se cuidadosamente as colunas e adicionou-se 500 µl de Tampão de lavagem QIAamp® AW 1 e centrifugou-se a 6000 g durante 1 minuto. Transferiram-se as colunas para tubos novos de 2 ml e descartou-se os tubos que continham o filtrado. Abriu-se cuidadosamente as colunas e adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem QIAamp® AW2 e centrifugou-se a alta velocidade (20000 g) durante 3 minutos. Transferiram-se as colunas para tubos limpos de microcentrifuga, descartou-se os tubos que continham o filtrado, e adicionou-se 200 µl de Tampão de eluição QIAamp® AE. Incubou-se à temperatura ambiente (15°-25°C) durante 3 minutos e centrifugou-se a 6000g durante 1 minuto. Por fim, descartaram-se as colunas e armazenou-se os tubos com o DNA a -20°C. ^[114]

2.2 ANÁLISE DE PUREZA E QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

As amostras de DNA e foram quantificadas num espectrofotómetro GeneQuant pro (Biochrom, Cambridge, Inglaterra). Utilizou-se tampão de eluição QIAamp® AE como referência e 7 µl das amostras de DNA, colocando-os na cuvette de ultra-microvolume, para a quantificação e medição da concentração e a pureza da amostra, através da leitura a densidades ópticas adequadas (230 nm, 260 nm e 280 nm). A um comprimento de onda de 280 nm detectou-se a existência de nucleótidos e de proteínas enquanto que a 260 nm detectou-se

apenas a existência de nucleótidos. A um comprimento de onda de 230 nm detecta-se a presença de sais na amostra.

2.3 TIPAGEM GENÉTICA DOS FACTORES DE RISCO TROMBÓTICO:

A técnica baseia-se na amplificação preferencial de produtos complementares dos primers específicos de zonas alélicas definidas. Este conjunto de primers discrimina vários pontos polimórficos dos seguintes genes codificantes: Factor V de Leiden - G1691A, da Protrombina - G20210A, do PAI-1 - 4G/5G, da MTHFR - C677T e A1298C, e da Apo E - E2/E3/E4. A tipagem genética destes genes foi realizada a partir de um *kit* obtido por colaboração com a Genebox (Cantanhede; Portugal) “Factores de risco trombótico”. As placas de tipagem continham primers específicos para os polimorfismos das regiões codificantes e promotoras dos genes: Factor V de Leiden - G1691A, da Protrombina - G20210A, do PAI-1 - 4G/5G, da MTHFR - C677T e A1298C, e da Apo E - E2/E3/E4.

2.3.1 AMPLIFICAÇÃO POR PCR-SSP:

Agitou-se brevemente os tubos de DNA e da mistura de reacção. Juntou-se 7 µl da PCR Master Mix (Genebox, Cantanhede, Portugal), 15 µl de água bi-destilada estéril e 2 µl da amostra de DNA (concentração 100-200 ng/µl) num tubo de 1,5 ml. Agitou-se vigorosamente durante 15 segundos. Pipetou-se 10 µl da mistura para cada poço da tira de tipagem (2 pares de primers, excepto a Apo E, que são 4 pares de primers). Repetiu-se os passos anteriores para cada uma das amostras DNA (num total de 4 amostras por tira, excepto a Apo E, que 2 amostras por tira). Selou-se a tira de tipagem com a cápsula e colocou-se num termociclador (Thermo cycler de 96 poços), e seleccionou-se o programa de acordo coma Tabela 1. ^[115-120]

Tabela 1: Parâmetros do programa de PCR-SSP.

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação Inicial	96° C	1 min	1
Desnaturação	96° C	25 Seg	5
Emparelhamento	70° C	45 Seg	
Extensão	72° C	30 Seg	
Desnaturação	96° C	25 Seg	21
Emparelhamento	65° C	45 Seg	
Extensão	72° C	30 Seg	
Desnaturação	96° C	25 seg	4
Emparelhamento	55° C	1 min	
Extensão	72° C	2 min	
Extensão final	72° C	10 min	1

2.3.2 AMPLIFICAÇÃO POR PCR-SSP MULTIPLEX:

Foram realizadas duas misturas de primers: mix A (factor V Leiden G; protrombina G, MTHFR 677 T e 1298A, e PAI-1 4G) e mix B (factor V Leiden A; protrombina A, MTHFR 677 C e 1298C, e PAI-1 5G). Homogeneizou-se bem ao vortex. Agitou-se brevemente os tubos de DNA e da mistura de reacção. Juntou-se 8 µl da PCR Master Mix (Genebox, Cantanhede, Portugal), 5 µl de água bi-distilada estéril, e 7,5µl de mistura de primers e 1 µl da amostra de DNA (concentração 100-200 ng/µl), numa tira de tipagem. Para cada amostra foram necessários 2 poços, um para cada mistura de primers. Agitou-se vigorosamente durante 15 segundos. Selou-se a tira de tipagem com a cápsula e colocou-se num termociclador (Thermo cycler de 96 poços), e seleccionou-se o programa de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros do programa de PCR-SSP multiplex.

Passo	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação Inicial	96° C	1 min	1
Desnaturação	96° C	25 Seg	40
Emparelhamento	63° C	45 Seg	
Extensão	72° C	30 Seg	
Extensão final	72° C	10 min	1

2.4 ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As reacções de PCR, depois da amplificação, foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose Seakem ME (Biowhittaker Molecular Applications, Rockland, EUA) a 2% (para identificação dos produtos amplificados no Singleplex) ou 5% (para identificação dos produtos amplificados no Multiplex). A agarose foi dissolvida em TAE 1x (0,04 M Tris base (CalBiochem, EUA), 0.02 M Ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1 mM EDTA-Na₂), agitando-se durante 15 segundos. Colocou-se o preparado no forno micro-ondas para a agarose entrar em solução. Retirou-se o Erlenmayer do micro-ondas e deixou-se arrefecer, adicionou-se de seguida brometo de etídio (Sigma Chemical, St Louis, EUA) (corante que permite a visualização do DNA à luz UV) de modo a obter uma concentração final de 0,8 µg/ml e agitou-se durante 15 segundos, para homogeneizar. Colocou-se o preparado no berço, deixou-se solidificar e em seguida colocou-se a 4º C. Após a solidificação, pôs-se o berço na tina de electroforese, previamente cheia com 2,5 litros de solução TAE 1x. Colocaram-se as amostras de PCR nos poços do gel e num poço colocou-se o marcador phiX174 DNA/BsuRI, HaeIII (molecular probes, London, UK) (Figura 23) e deixou-se migrar cerca de 15 ou 30 minutos na voltagem máxima (2 e 5%, respectivamente).

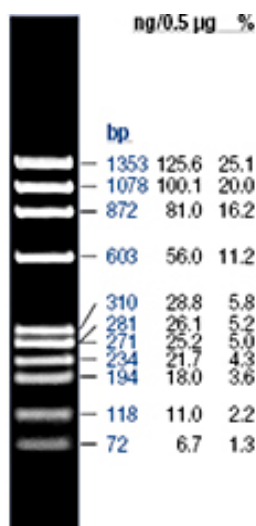


Figura 23: Esquema do marcador phiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 (molecular probes, London, UK) (adaptado de ^[121]).

Por fim, visualizaram-se os produtos de PCR à luz UV dum transiluminador (registaram-se os resultados numa fotografia digital, através de programa ZomBrowser EX – Canon).

2.5 INTERPRETAÇÃO

A fotografia foi numerada de 2 em 2 poços, com cada amostra, de 1 a 48 (cada placa, excepto a Apo E, que foi numerada de 4 em 4 poços, com cada amostra, de 1 a 24). Consideraram-se as reacções de amplificação positiva, tendo em conta a presença e o peso molecular de cada banda e o controlo interno. (Anexo I)

2.6 ANÁLISE DA PUREZA E CONCENTRAÇÃO DOS DNAs

No estudo da pureza e concentração dos DNA's, foram calculadas médias, desvios-padrão, coeficientes de variação e intervalos de confiança em relação às suas concentrações, quantidade de proteínas e sais. Esta análise estatística foi efectuada em 39 dos 294 DNA's estudados, tendo como finalidade verificar se as condições dos DNA's utilizados eram aceitáveis para que houvesse confiança nos resultados do estudo.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.1 FREQUÊNCIAS ALÉICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS NA POPULAÇÃO PORTUGUESA

As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas a partir das percentagens obtidas para cada polimorfismo estudado na população normal. A análise estatística foi realizada através do programa STATISTICA 9.1 (StatSoft, Inc., 2009). Para avaliar se as mutações se encontravam em equilíbrio, efectuou-se o teste Qui-quadrado utilizando o equilíbrio de Hardy-Weinberg como referência considerando os resultados significativos quando $p \leq 0,05$.

3.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS EM AVC JOVEM

As relações entre as amostras com AVC em jovem e os controlos foram calculadas com a ajuda do programa STATISTICA 9.1 (StatSoft, Inc., 2009), baseando-se no teste do Qui-Quadrado (quando $n > 5$), e no Teste Exacto de Fisher (quando $n < 5$). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

III. RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO

A amostra de 294 indivíduos foi subdividida em três grupos distintos: pacientes com AVC jovem, população normal e população controlo (sem AVC). O grupo AVC jovem e população normal apresentaram distribuições por género e médias de idades iguais e englobaram 98 indivíduos cada (Tabela 3 e Gráfico 1). Por outro lado, a população controlo, sem AVC antes dos 50 anos, apresentou uma distribuição por género e uma média de idades distintas das primeiras (Tabela 3 e Gráfico 1).

Tabela 3: Distribuição de amostras por género e idade dos três grupos de indivíduos estudados.

	AVC Jovem	P. Normal	P. Controlo
Total de Indivíduos	98	98	98
Média Idades	41,1	41,1	66,7
Desvio padrão Idades	7,4	7,4	12,4
Percentagem Mulheres	40	40	45
Percentagem Homens	60	60	55

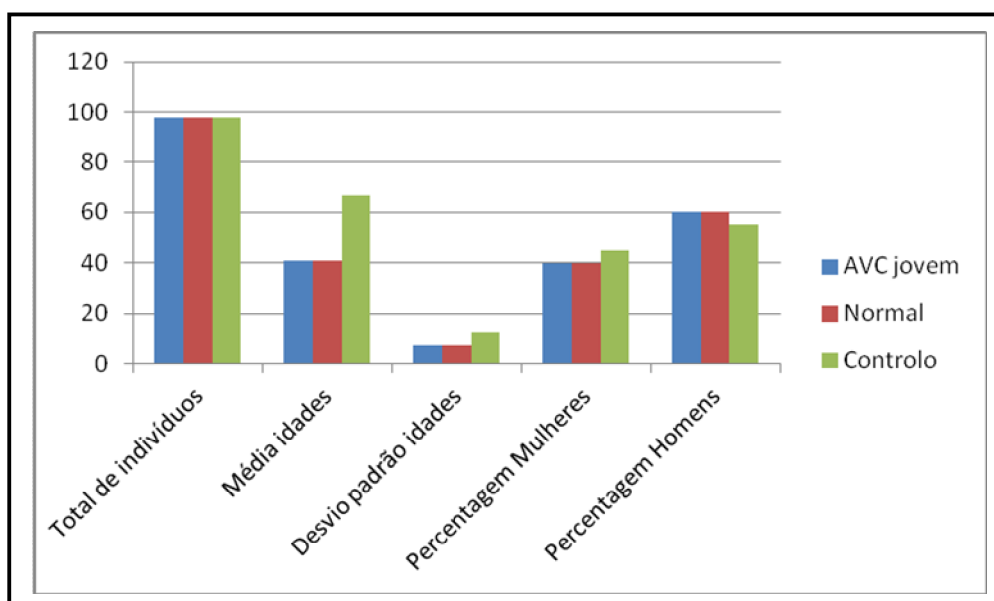


Gráfico 1: Caracterização da amostragem analisada (Número de indivíduos, idades, género).

2.PUREZA E CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A análise da pureza e concentração das amostras biológicas foram realizadas em 39 dos 294 DNA's estudados. Embora a concentração de DNA não seja uniforme (+/- 80,71) e seja superior (206 mg/ml) ao desejável (100 mg/ml), não se verificaram quaisquer problemas na amplificação por PCR-SSP. Apesar dos valores médios da pureza dos DNA's estarem dentro dos limites aceitáveis, 1,6-1,8 para D.O.260nm/D.O.280nm e 1,4-1,6 para D.O.230nm/D.O.260nm, ^[122] alguns DNA's apresentam quantidades de fenóis e de proteínas elevadas, estando o intervalo de confiança acima dos limites aceitáveis (Tabela 4). Os coeficientes de variação evidenciam a existência de amostras que se desviam dos padrões, tanto na concentração de DNA como na quantidade de fenóis. Estes DNA's podem afectar alguns resultados, contudo, a maioria das amostras apresenta um grau de pureza aceitável.

Tabela 4: Médias e desvios-padrão dos dados de pureza e concentração das amostras de DNA.

	Concentração	D.O.260nm/ D.O.280nm	D.O.230nm/ D.O.260nm
Média	206	1.83	1.54
Desvio padrão	80.71	0.09	0.15
Coefficiente de variação	39%	5%	28%
Intervalo de confiança (95%)		1.7 – 1.9	1.4 – 1.7

3.FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS NA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Na análise de frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos, utilizaram-se 98 DNA's de indivíduos da população normal (Tabela 5). Todos os polimorfismos estudados estão dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg, reflectindo a ausência de influência de factores não genéticos (selecção natural) na distribuição destas mutações.

Tabela 5: Frequências alélicas e genóticas em 98 população normal.

Gene	Posição	Alelo	Frequência relativa	Genótipo	Frequência relativa	Esperado	p
Apo E	334(T/C)	334T	0,9184	334TT	0,8367	0,8435	0,8968
		334C	0,0816	334TC	0,1633	0,1499	0,7966
				334CC	0,00001	0,0067	0,4190
	472(C/T)	472C	0,9184	472CC	0,8470	0,8435	0,9461
		472T	0,0816	472TC	0,1428	0,1499	0,8883
				472TT	0,0102	0,0067	0,7892
FactorV	1691	G	0,9999	Arg/Arg	0,9999	0,9998	0,9545
		A	0,0001	Arg/Gln	0,0001	0,0002	0,9545
					Gln/Gln	0,0001	0,00001
PAI-1	-675	4G	0,4694	4G/4G	0,2449	0,2203	0,684
		5G		4G/5G	0,4490	0,4981	0,492
					5G/5G	0,3061	0,2815
MTHFR	677	C	0,7245	Ala/Ala	0,5306	0,5249	0,9364
				Ala/Val	0,3878	0,3992	0,8704
	T	0,2755	Val/Val	0,0816	0,0759	0,8824	
	1298	A	0,6786	AA	0,4490	0,4605	0,8717
				AC	0,4592	0,4362	0,7465
		C	0,3214	CC	0,0918	0,1033	0,7864
Protrom	20210	G	0,9796	GG	0,9592	0,9596	0,9887
				GA	0,0408	0,0400	0,9773
		A	0,0204	AA	0,0001	0,0004	0,8945

4.FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS DE PACIENTES COM AVC JOVEM VERSUS CONTROLO

Foram determinados os polimorfismos factor V Leiden (G1691A), protrombina G20210A, PAI-1 4G/5G, MTHFR C677T e A1298C, e Apo E (E2, E3, E4) em 98 amostras de indivíduos que sofreram AVC em idade jovem (antes dos 50 anos) e de 98 indivíduos controlo com idade > 50 que não sofreram AVC ate a data de concretização do estudo. As tabelas 6 e 7 apresentam as frequências alélicas e genóticas, respectivamente, dos polimorfismos estudados, no total das amostras da população em estudo, normal e controlo. Apenas foram detectados valores significativos para as variações da Apo E e do factor V.

Tal como seria de esperar, no gene da Apo E a isoforma E3 foi a mais frequente em todos os grupos analisados. Relativamente à isoforma E2, esta foi significativamente mais frequente ($p=0,0399$) na população controlo do que no AVC jovem (10,72% vs 5,10%) (Gráfico 2). No grupo com patologia não se observou nenhum genótipo E2E2, enquanto que na população controlo se detectaram 3 indivíduos com este genótipo, embora não significativa esta diferença é considerável ($p=0,0827$) (Tabela 6 e 7). Por outro lado, a homozigotia E4E4 foi tendencialmente mais frequente na população que sofreu AVC jovem ($p=0,0827$), não havendo nenhum indivíduo controlo com este genótipo (Tabela 6 e 7).

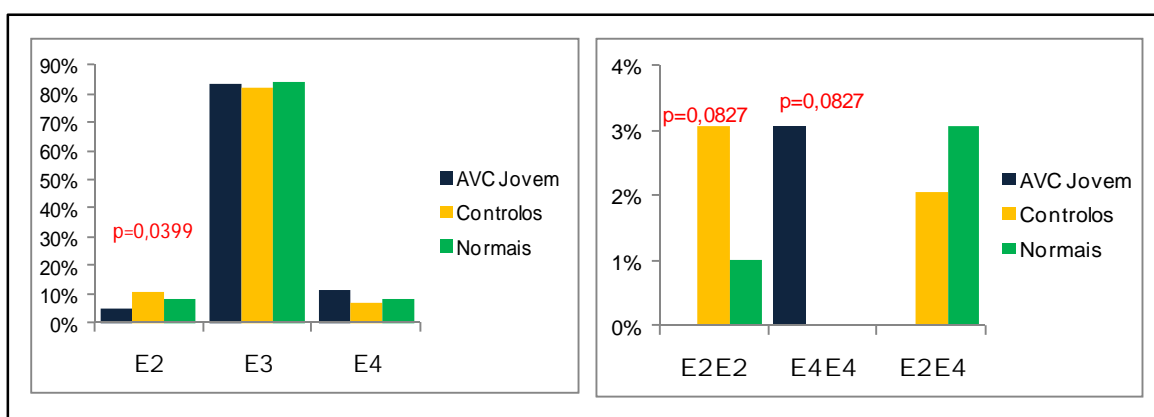


Gráfico 2: Comparação das frequências alélicas (esquerda) e genotípicas (direita) relativas as variações na Apo E nas populações estudadas

Das 98 amostras com AVC jovem, verificou-se que 4 possuíam o factor V de Leiden, e que nas amostras da população normal e controlo não se detectou a presença deste alelo. Observou-se assim uma diferença significativa na frequência alélica e genotípica (Gráfico 3), sendo o alelo com A na posição 1691 ($p=0,0467$) e o genótipo GA ($p=0,0455$), mais frequentes na população que sofreu AVC antes dos 50 anos, em comparação com os restantes grupos de indivíduos (Tabela 6 e 7).

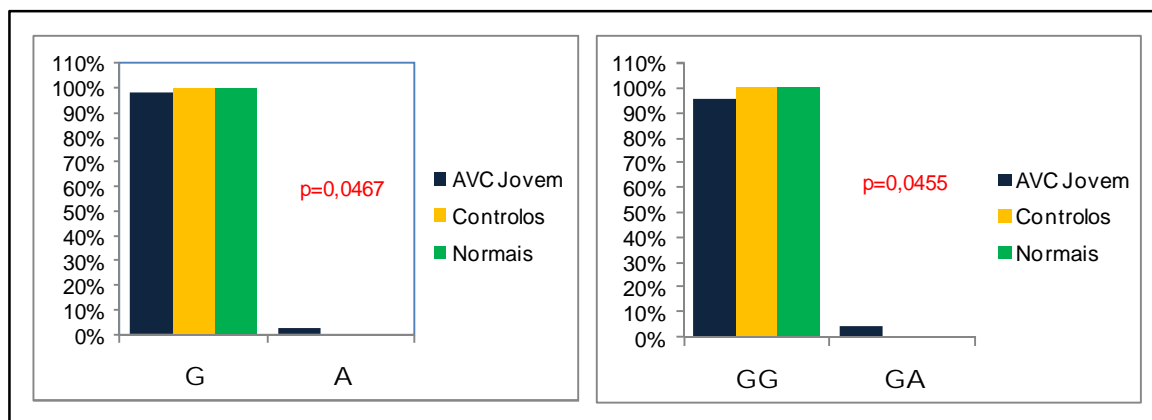


Gráfico 3: Comparação das frequências alélicas (esquerda) e genotípicas (direita) relativas ao Factor V Leiden nas populações estudadas.

Tabela 6: Frequências alélicas e comparação estatística da população com AVC em jovem e população normal e controlo.

Gene	Alelo	AVC jovem		População controlo		AVC Jovem Vs. População Controlo	População Normal		AVC Jovem Vs. População Normal
		N	%	N	%	<i>p</i>	N	%	<i>p</i>
APO E	E2	10	5,10	21	10,72	0,0399	16	8,17	0,3903
	E3	163	83,16	161	82,14	0,7899	164	83,67	0,9236
	E4	23	11,73	14	7,14	0,1209	16	8,16	0,4047
Factor V Leiden	1691 G	192	97,96	196	100	0,0467	196	100	0,0467
	1691 A	4	2,04	0	0		0	0	
PAI-1	4G	89	45,41	86	43,88	0,7608	92	46,94	0,8301
	5G	107	54,59	110	56,12		104	53,06	
MTHFR	677 C	132	67,35	146	74,49	0,1204	142	72,45	0,4373
	677 T	64	32,65	50	25,51		54	27,55	
	1298 A	136	69,39	135	68,88	0,9130	133	67,86	0,8177
	1298 C	60	30,61	61	31,12		63	32,14	
Protrom	20210G	193	98,47	191	97,45	0,3787	192	97,96	0,7877
	20210A	3	1,53	5	2,55		4	2,04	

Relativamente às mutações do MTHFR, a população patológica foi aquela que obteve maior percentagem de indivíduos com o alelo 677T (mutado) e os genótipos 677CT e 677TT. Relativamente ao MTHFR A1298C os indivíduos heterozigóticos 1298AC foram mais prevalentes na população controlo (Tabela 6 e 7).

Tal como no MTHFR, na protrombina G20210A não se observaram resultados significativos entre as populações em estudo, observaram-se 3 indivíduos com o alelo mutado nas amostras com AVC jovem estudadas, enquanto na população controlo está presente em 5. A homozigotia para o alelo mutado (AA) não foi detectada em nenhum dos grupos analisados (Tabela 6 e 7).

Tabela 7: Frequências genótípicas e comparação estatística da população com AVC em jovem e população normal e controlo

Gene	Genótipo	AVC jovem		População controlo		AVC Jovem Vs. População Controlo	População Normal		AVC Jovem Vs. População Normal
		N	%	N	%	<i>p</i>	N	%	<i>p</i>
Apo E	E3E3	68	69,39	68	69,39	1	70	71,43	0,7547
	E2E3	10	10,20	13	13,27	0,5051	11	11,22	0,8176
	E3E4	17	17,35	12	12,24	0,3150	13	13,27	0,4287
	E2E2	0	0	3	3,06	0,0827	1	1,02	0,3245
	E2E4	0	0	2	2,04	0,1247	3	3,06	0,0827
	E4E4	3	3,06	0	0	0,0827	0	0	0,0827
Factor V Leiden	1691 GG	94	95,92	98	100	0,0455	98	100	0,0455
	1691 GA	4	4,08	0	0	0,0455	0	0	0,0455
	1691 AA	0	0	0	0	1	0	0	1
PAI-1	4G4G	21	21,43	22	22,45	0,8632	24	24,49	0,6111
	4G5G	47	47,96	42	42,86	0,4742	44	44,90	0,668
	5G5G	30	30,61	34	34,69	0,5432	30	30,61	1
MTHFR	677 CC	42	42,86	53	54,08	0,1177	52	53,06	0,1546
	677 CT	48	48,98	40	40,82	0,2522	38	38,78	0,1518
	677 TT	8	8,16	5	5,1	0,3903	8	8,16	1
	1298 AA	48	48,98	45	45,92	0,6684	44	44,90	0,5678
	1298 AC	40	40,82	45	45,92	0,4722	45	45,92	0,4722
	1298 CC	10	10,20	8	8,16	0,6215	9	9,18	0,8095
Protrom	20210GG	95	96,94	93	94,90	0,4713	94	95,92	0,7008
	20210GA	3	3,06	5	5,66	0,4713	4	4,08	0,7008
	20210AA	0	0	0	0	1	0	0	1

5. PCR-SSP MULTIPLEX

Na elaboração do PCR-SSP multiplex incluíram-se os diferentes polimorfismos analisados deste estudo, excluindo-se apenas as variações da Apo E (334T/C e 472C/T). Por esta razão, como resultado final, obteve-se um método eficaz de análise dos polimorfismos do factor V, protrombina, MTHFR e PAI-1. A concentração dos primers variou de 1pM, para o MTHFR e protrombina, até 8pM, para PAI e factor V, para uma amplificação a 63°C. Numa electroforese em gel de agarose a 5% foi possível distinguir com nitidez as 5 bandas específicas, referentes aos diferentes polimorfismos estudados (Figura 24).

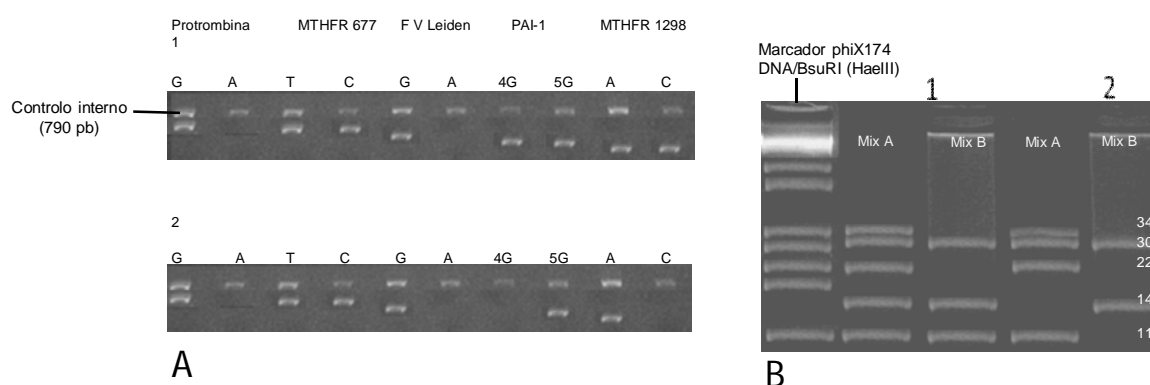


Figura 24: Esquema comparativo de singleplex e multiplex em duas amostras distintas. Imagem de singleplex em gel de agarose a 2% (A) e de multiplex em gel de agarose a 5% (B). Mix A (factor V Leiden G; protrombina G, MTHFR 677 T e 1298A, e PAI-1 4G) e mix B (factor V Leiden A; protrombina A, MTHFR 677 C e 1298C, e PAI-1 5G).

Na Figura 24 é possível ver a electroforese de duas amostras (1 e 2) após PCR-SSP em singleplex (A) e multiplex (B). A tipagem está ordenada de acordo com os pesos moleculares das bandas obtidas após PCR, do maior para o mais pequeno. Desta forma, a amostra 1 é GG para a protrombina (340pb), TC para o MTHFR 677 (302pb), GG para o factor V Leiden (228pb), 4G5G para o PAI-1 (140pb) e AC para MTHFR 1298 (115pb). A amostra 2 é GG para a protrombina, TC para o MTHFR 677, GG para o factor V Leiden, 5G5G para o PAI-1 e AA para MTHFR 1298. Como é evidente pela análise das amostras os resultados são facilmente reproduzíveis em multiplex sem Apo E (Gráfico 4). Com estes resultados podemos verificar que o método multiplex é uma boa alternativa de tipagem de amostras em meio laboratorial.

Através da observação de 10 amostras referência (já tipadas por CVD StripAssay, ViennaLab, Austria) em paralelo (singleplex e multiplex) comparou-se a reprodutibilidade entre os dois métodos de análise (Gráfico 4). Em todas as amostras houve uma reprodução fiel das tipagens para a maioria dos polimorfismos, exceptuando-se a reacção multiplex que incluía a Apo E. Sendo assim evidente a inexistência de falsos positivos e falsos negativos para as reacções singleplex e multiplex sem a Apo E. Por outro lado, a inclusão de primers para as variações da Apo E levou a um aumento significativo da incidência de falsos negativos (100%) (Gráfico 4). Resumindo, a reprodutibilidade foi máxima para as reacções singleplex e multiplex sem a Apo E e mínima para a reacção multiplex com a Apo E. Estes resultados demonstram que a reacção multiplex sem a Apo E é um método fiável, sensível, rápido e económico.

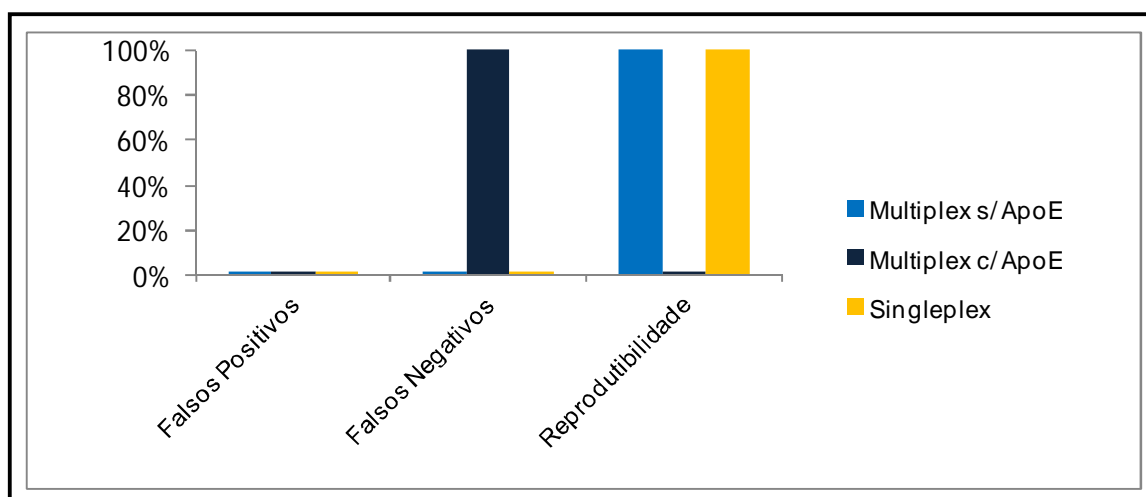


Gráfico 4: Comparação de níveis de reprodutibilidade entre a técnica singleplex e multiplex (sem e com Apo E).

IV. DISCUSSÃO

1. QUALIDADE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Algumas amostras de DNA (Tabela 4) não apresentaram as condições ideais em relação à pureza e concentração. Contudo, o ajuste das suas concentrações aos protocolos de PCR utilizados permitiu minimizar a influência de baixas ou elevadas concentrações das amostras na amplificação por PCR. As elevadas concentrações de fenóis e proteínas, encontradas em algumas amostras (Tabela 4), não influenciaram significativamente a obtenção dos dados genéticos por PCR. No geral, não foram detectados problemas de amplificação nas amostras que saíam da norma ^[122]. Assim, podemos considerar que as amostras utilizadas estavam em boas condições e que não influenciaram a fiabilidade global do estudo.

2. POLIMORFISMOS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Todos os polimorfismos analisados encontram-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). Uma explicação possível para estes resultados é que todos os polimorfismos estudados não sofrem influência, positiva ou negativa, da selecção natural. ^[109, 110] Isto é, não existe vantagem adaptativa para nenhuma das variações genéticas analisadas. Este facto deve-se provavelmente ao impacto das variações não ser limitativo em termos reprodutivos destes indivíduos. Para além deste facto, a antiguidade dos genótipos permitiu que houvesse tempo suficiente para se fixarem na população e se encontrarem em equilíbrio. ^[109, 110] Esta análise foi importante, uma vez que após a observação destes resultados os valores obtidos nos controlos podem ser correlacionados normalmente com o AVC jovem. Tendo em conta a distribuição normal destes polimorfismos na população, os resultados significativos obtidos, entre o AVC jovem e os controlos, não são perturbados por nenhuma pressão selectiva sobre as referidas mutações. O desequilíbrio dos polimorfismos na população normal implicaria um defeito na correlação entre factores genéticos e patologia. Sendo que o aumento ou diminuição da frequência destes factores poderia ser devido à pressão exercida pela selecção natural e não pela presença ou ausência de doença. ^[109, 110]

3. INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS NO AVC JOVEM

O objectivo principal deste trabalho, foi testar a hipótese dos polimorfismos nos genes do factor V, protrombina, PAI-1, MTHFR e Apo E, poderem ser utilizados como marcadores de susceptibilidade para AVC jovem (antes dos 50 anos). Embora referenciada, a relação destes polimorfismos com a ocorrência de AVC em idade jovem ainda permanece por esclarecer. Alguns autores apresentam associações significativas destas mutações com trombose arterial, enquanto outros não detectam qualquer relação. Esta controvérsia pode dever-se a métodos de estudo que englobam amostragens pequenas, vários grupos étnicos, ambiente diverso e metodologias não uniformes. [10, 16, 78, 105] Neste estudo, pretendeu-se uniformizar algumas das variáveis de forma a minimizar o seu impacto na análise genética. Houve algum cuidado na escolha da amostragem, nomeadamente, em relação à etnia e ao local de origem dos pacientes e indivíduos sem AVC jovem (controlo). Na análise do impacto dos vários polimorfismos na susceptibilidade para AVC jovem, neste trabalho, apenas se observaram resultados significativos nos genes da Apo E e do factor V de Leiden.

Relativamente aos polimorfismos no gene da Apo E, a maioria da literatura refere que a isoforma E4 está associada ao risco de ocorrência de DCV e a isoforma E2 (apesar de associada à hiperlipoproteinémia tipo III) tem um efeito protector nestas patologias. [56-58, 123] Song *et al*, numa meta análise sobre a relação da Apo E (T334C/C472T) com doença coronária cardíaca, concluíram que a isoforma E4 estava significativamente correlacionada com o aumento de risco desta patologia e que E2 não tinha qualquer efeito. [56] Bennet e colaboradores, também numa meta-análise, observaram que em comparação com a isoforma normal, E3, os portadores de E2, têm uma redução de cerca de 20% do risco de doença coronária. Neste estudo, ainda se observou que os portadores de E4, têm um risco um pouco aumentado para a patologia. [57] Margaglione e colaboradores, num estudo Italiano caso-controlo, concluíram que para ocorrer AVC não é necessária a presença da variante E4. Observou ainda que esta mutação apresentava uma associação com AVC isquémico, concluindo assim que E4 aumenta a probabilidade de ocorrência desta desordem. [123] Contrariando estes

resultados, Kuusisto *et al* descrevem no seu estudo que o haplótipo E4 não se associa com AVC. [58]

Neste trabalho, foi observada uma associação significativa entre a isoforma E2 da Apo E e o AVC jovem. Esta isoforma aparece associada à ausência de doença, sendo mais prevalente na população controlo, sem AVC jovem (Tabela 6), sendo desta forma considerado um factor de protecção para a doença. Estes resultados estão de acordo com os estudos onde esta variação tem vindo a ser relacionada com AVC, não como factor de risco, mas como factor de protecção ou de menor susceptibilidade para desenvolver a patologia. Esta relação deve-se à sua associação com um perfil lipídico vantajoso (níveis elevados de colesterol HDL, e níveis de colesterol total mais baixos). A isoforma E2 tem menor afinidade para se ligar as Lps, o que explica a sua relação com perfil lipídico vantajoso. [56, 57, 61, 69] Apesar de alguns estudos a associarem com a ocorrência de eventos trombóticos, devido ao facto de esta isoforma fazer uma depuração mais lenta das gorduras no sangue, a maioria relaciona-a com a redução de ocorrência de DCV. [56-58]

Para além destes resultados significativos também se verificaram algumas associações entre as combinações E4E4 e E2E2 da Apo E e o AVC jovem. Apesar de não serem significativas, provavelmente devido ao baixo número amostral, estes genótipos aparecem com diferenças, de distribuição entre os grupos, bastante consideráveis (Tabela 7). Neste trabalho é assim evidenciada a associação de E4E4 com a maior susceptibilidade para a ocorrência de AVC jovem. A associação detectada pode dever-se ao seu papel no transporte das Lps, levando ao aumento do colesterol LDL e total. O aumento do colesterol é um factor de risco muito importante, uma vez que potencia a formação de placas ateromatosas nas artérias, que vão provocar doenças trombóticas, nomeadamente AVC jovem. [55-58, 61, 62, 65, 69, 70] Por sua vez E2E2, tem uma associação contrária à de E4E4 (Tabela 7), reforçando os resultados significativos obtidos no seu haplótipo.

O papel do factor V Leiden na trombose arterial tem sido examinado em numerosos estudos trombóticos, embora com resultados bastante discrepantes. [1, 51, 75, 79, 124] Numa meta-análise, realizada por Kim e Becker, que englobou

resultados de vários estudos de associação entre eventos arteriais isquémicos e as mutações do factor V, protrombina e MTHFR, concluíram que o factor V Leiden se associava ao de risco de trombose arterial. ^[124] Ozmen e colaboradores, num estudo na população Turca, observaram que esta variação é por si só, um factor de risco para trombose. ^[79] Contrariamente a estes estudos Sykes *et al* referem estudos onde não se detectaram aumentos no risco de AVC nos pacientes portadores do factor V Leiden. ^[75] Um grupo italiano, na sua pesquisa, também não detectou qualquer associação do factor V Leiden com o aumento de risco da ocorrência de EM jovem (< 45 anos). ^[125]

Neste trabalho, obteve-se uma associação significativa entre a presença do alelo A e do genótipo GA, do factor V Leiden, e a ocorrência do AVC jovem. No grupo com AVC jovem foram observados 4 pacientes heterozigóticos, enquanto que nos controlos (sem AVC jovem) o alelo A estava ausente. A partir destes resultados, pode dizer-se que a presença do alelo mutado A está associado com a susceptibilidade para a ocorrência de AVC jovem. Estes resultados estão de acordo com a maioria dos estudos realizados, que evidenciam o aumento do risco de ocorrência AVC nos portadores do factor V Leiden. ^[41, 73, 78, 124] Esta relação, entre AVC jovem e factor V de Leiden, pode ser explicada através do processo de hemostase. Após activação, esta variante é degradada pela APC de forma menos eficiente do que o factor V normal. Como resultado desta degradação menos eficiente, ocorre aumento da síntese de trombina. Este aumento deve-se à activação descontrolada da protrombina pelo factor V mutado. Estes níveis elevados de trombina vão provocar um estado de hipercoagulação potenciando o risco de AVC jovem. ^[40-42]

Relativamente ao polimorfismo no gene PAI-1 (-675 4G/5G), os resultados da literatura acabam por ser mesmo contraditórios. Alguns autores publicam que o alelo 4G está associado com o risco de trombose arterial, enquanto outros afirmam que este alelo não está associado, como também tem um efeito contrário (protector), sendo atribuído neste caso o risco de trombose ao alelo 5G. ^[19, 85] Roest e colaboradores, encontraram uma redução significativa da mortalidade no AVC, nos homozigóticos para 4G quando comparado com os homozigóticos para 5G. ^[126] Endler e Saidi sugeriram que o alelo 4G teria um efeito protector contra

AVC em pacientes jovens. ^[127] Estes resultados não estão de acordo com a hipótese convencional de fibrinólise, uma vez que o genótipo 4G/4G, tem sido associado com elevados níveis plasmáticos de PAI-1, que por sua vez se associa com trombose arterial. ^[84, 126]

Neste trabalho, não se registaram diferenças significativas entre a população que sofreu AVC jovem e a população controlo (sem AVC até os 50 anos). No que diz respeito à presença deste polimorfismo, verifica-se que o alelo 5G é ligeiramente mais frequente em todas as populações. Pode apenas dizer-se que o alelo 5G é ligeiramente mais frequente no grupo de indivíduos sem AVC jovem (controlo), em comparação com a população patológica. Estes resultados permitem apoiar os estudos que não fazem referência a qualquer associação entre PAI-1 e o AVC jovem. ^[87]

Os estudos realizados em torno dos polimorfismos no MTHFR e da sua relação com eventos trombóticos arteriais também têm sido pouco conclusivos. ^[14, 72, 92] Relativamente ao polimorfismo MTHFR C677T, a maioria dos autores apoiam a hipótese de que este se associa a maior susceptibilidade de ocorrência de AVC. ^[14, 92] No entanto, outros autores não apoiam esta associação. A mutação MTHFR A1298C é referida por alguns estudos como factor de risco de DCV, independentemente da presença do MTHFR C677T. ^[16] Outros autores, apresentam associação deste polimorfismo com AVC apenas quando combinado com MTHFR C677T. ^[94] Sazci *et al*, num estudo na população Turca, concluíram que o alelo 677T, o genótipo 677TT e o diplótipo 677TT/1298AA estão significativamente associados com AVC hemorrágico, enquanto o genótipo 1298CC e o diplótipo 677CC/1298CC, estão significativamente associados com AVC isquémico. ^[16] Margaglione e seus associados, concluíram que o genótipo MTHFR 677TT, tem uma associação fraca com ocorrência de AVC isquémico antes dos 50 anos. ^[41] Esta associação modesta foi apoiada por Kim e Becker. ^[124] Goraci *et al* obtiveram resultados significativos, na associação do MTHFR C677T e o risco de AVC isquémico e Linnebenk *et al*, num estudo na Alemanha, apresentaram o polimorfismo MTHFR C677T como preditor de AVC em adultos jovens. ^[96] Os estudos de Szazcklik *et al* e Laraqui *et al*, correlacionaram o

MTHFR A1298C e doença da artéria coronária.^[95] Por outro lado, os estudos de Friso *et al* e Gueant-Rodriguez *et al*, não referiram qualquer correlação.^[95]

Neste estudo, não se observou nenhum resultado significativo em nenhum dos polimorfismos do gene do MTHFR. Estes resultados sugerem que as variantes do gene do MTHFR não constituem factores de risco para a ocorrência de AVC em idade jovem. Desta forma, apoiam-se os estudos que não obtêm qualquer associação significativa entre o gene MTHFR e esta patologia.^[41, 95, 124]

Finalmente, as variações na protrombina não são excepção em relação aos resultados pouco conclusivos, no que diz respeito ao seu papel na trombose arterial.^[1, 41, 43, 105] Os estudos de Rosendaal *et al* e Doggen *et al* referenciam que o polimorfismo G20210A da protrombina pode ampliar o risco de trombose arterial.^[1, 43] Kim e colaboradores verificaram um aumento de risco de eventos trombóticos arteriais, na presença do polimorfismo, e que esta associação era mais forte em pacientes com idade inferior aos 50 anos.^[124] Stefano *et al*, encontraram associação entre este polimorfismo e a ocorrência de AVC isquémico jovens,^[105] já Margaglione e colaboradores não obtiveram qualquer associação.^[41]

No presente trabalho, não se registou qualquer resultado significativo em relação ao polimorfismo G20210A da protrombina. Observaram-se 3 heterozigóticos GA na população alvo e 5 na população controlo, que não sofreu AVC até os 50 anos. Estes resultados acabam por ser contraditórios, em relação à maioria dos estudos efectuados, uma vez que esta variação está associada com o aumento em cerca de 25% da actividade da trombina plasmática. Este aumento de actividade da trombina potencia o estado de hipercoagulabilidade, logo seria de esperar que este polimorfismo fosse mais prevalente no AVC jovem.^[19, 40 104, 105] No entanto neste estudo verificou-se precisamente o inverso. Esta discrepância pode dever-se sobretudo à influência, mais significativa, de outros factores de risco genético, nomeadamente o factor V e a Apo E.

4.PCR-SSP MULTIPLEX

Outro grande objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento e optimização de PCR-SSP multiplex com os vários polimorfismos estudados. O PCR multiplex

consiste numa técnica de biologia molecular, cujo objectivo principal é minimizar o tempo de resposta e os custos da PCR, amplificando vários polimorfismos numa única reacção. No entanto, esta técnica acarreta vários inconvenientes, destacando-se a competição dos diferentes primers pelo DNA alvo. Após diversos processos de optimização foi possível incluir a maioria dos polimorfismos objecto deste estudo, exceptuando-se as variações da Apo E (334T/C e 472C/T). Uma das possíveis causas desta exclusão baseia-se no facto destes primers potenciarem inespecificidades, impedindo mesmo os restantes primers de hibridizarem.^[112, 113] Esta inespecificidade pode dever-se então à competição dos primers da Apo E pelos constituintes da reacção de PCR, nomeadamente pelo DNA. Outra das justificações reside na formação de dímeros de primers, isto é, os primers da Apo E podem hibridizar com os restantes primers formando estruturas secundárias complexas e impedindo a sua amplificação.^[112, 113] De qualquer modo foi optimizada uma reacção multiplex bastante completa que permite a tipagem de 5 polimorfismos (factor V Leiden, protrombina, PAI-1, MTHFR 677 e 1298).

Esta reacção de PCR multiplex demonstrou ser bastante reprodutível (Gráfico 3) e um óptimo método alternativo à reacção convencional de PCR-SSP. Esta reacção tem vindo a ser descrita como um método rápido, versátil, simples, sensível, específico e económico, tendo como principal limitação a interpretação dos resultados. A interpretação torna-se mais difícil quando os fragmentos amplificados têm pesos moleculares muito semelhantes. Neste trabalho, foi possível obter uma reacção de fácil interpretação, mesmo em gel de agarose, em que todos os fragmentos são perfeitamente diferenciáveis.

V. CONCLUSÃO

A trombose arterial é um fenómeno complexo, envolvendo inumeráveis factores moleculares, genéticos, celulares e ambientais. Incluído neste tipo de patologias, o AVC é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos. Em idade jovem o AVC é pouco frequente e apresenta uma etiologia bastante distinta do AVC em pacientes idosos. A prevenção, através da diminuição dos factores de risco adquiridos, é de extrema importância no entanto, no caso do AVC jovem, é insuficiente. A história clínica familiar de DCV é um dos principais indicadores de susceptibilidade para o AVC jovem e um dos principais motivadores do diagnóstico molecular. Neste tipo específico de AVC, o estudo e conhecimento de factores de risco genéticos torna-se uma ferramenta bastante útil na definição de causas e no diagnóstico precoce.

Apesar de não se por em causa o contributo dos factores genéticos para a ocorrência de AVC em jovem, os estudos sobre o impacto dos diferentes polimorfismos de genéticos ainda permanecem controversos. Devido à complexidade e natureza multifactorial do AVC em idade jovem, muitos mais estudos serão precisos para determinar a interacção dos polimorfismos genéticos com os restantes factores de risco, na patogénese da doença. Factores de risco, como a hipertensão, Diabetes mellitus e tabagismo, são considerados muito importantes e o desenvolvimento de AVC deve-se à acção combinada de ambos os factores genéticos e ambientais.

Neste estudo de associação entre o AVC jovem e os polimorfismos nos genes do factor V, protrombina, MTHFR e Apo E, detectaram-se algumas ligações significativas entre eles. O factor V Leiden apresentou uma associação significativa com esta patologia, sendo significativamente mais frequente na população patológica em comparação com a população controlo. Aparentemente, esta molécula leva a que um indivíduo portador do alelo mutado seja mais susceptível ao desenvolvimento de AVC antes dos 50 anos. Pode por isso concluir-se, que este gene é um possível factor de risco para o AVC jovem.

Além do factor V também os polimorfismos da Apo E parecem influenciar o desenvolvimento deste tipo de AVC. Neste trabalho, verificou-se que a isoforma E2 se associa significativamente à ausência da patologia. À isoforma E2 pode

então ser atribuído um papel protector em relação ao AVC jovem, diminuindo a susceptibilidade dos indivíduos para o desenvolvimento desta patologia. O genótipo E2E2 da Apo E, que se correlacionou de uma forma mais modesta do que a isoforma E2, parece reforçar a ideia do papel protector desta variante na susceptibilidade para o AVC jovem. Por último, embora com uma baixa correlação, o genótipo E4E4 demonstrou conferir um ligeiro aumento de risco para o desenvolvimento da doença. Conclui-se desta forma, que a pesquisa destas variações no gene da Apo E, tal como o factor V de Leiden, é de extrema importância para o diagnóstico molecular, tanto nos pacientes, como familiares. Desta forma, o clínico pode tomar medidas preventivas, mais concretas, no paciente (evitando a recorrência da doença) e nos familiares (indicando alterações no seu estilo de vida).

A aparente divergência entre os resultados observados na literatura, pode dever-se a diferenças nas prevalências dos polimorfismos entre os diferentes grupos étnicos, bem como, à variação do tamanho das amostragens. Este estudo não foi excepção, visto que alguns dos pressupostos da literatura não foram evidenciados pelos nossos resultados, nomeadamente nos polimorfismos da protrombina, do PAI-1 e do MTHFR. Contudo estes resultados reforçam as conclusões de determinados autores que defendem o papel secundário destes 3 genes no desenvolvimento do AVC jovem.

Este trabalho contribuiu ainda para o desenvolvimento e optimização de reacção de PCR-SSP multiplex. Este método demonstrou ser bastante eficiente e reprodutível tendo grande impacto no diagnóstico molecular desta patologia. Desta forma, permite a diminuir a tempo de resposta, minimizar o trabalho do seu operador, diminuir os custos e aumentar a eficácia do laboratório.

Com este trabalho, demonstrou-se que os polimorfismos do factor V e da Apo E influenciam, de facto, a ocorrência de AVC jovem. O estudo destes polimorfismos será de extrema importância para a adequação de medidas preventivas para ocorrência e recorrência desta patologia. Torna-se assim pertinente englobar a análise destes dois polimorfismos no acompanhamento pós AVC jovem nos pacientes e seus familiares. Por outro lado, a optimização da técnica de PCR-SSP multiplex é fundamental para facilitar a obtenção da tipagem

genética dos factores de risco analisados, permitindo uma fácil e rápida implementação da técnica em laboratório.

VI. REFERÊNCIAS

1. Lane DA, Grant PJ. Role of haemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* March 2000; 95(5): 1517 – 32.
2. Macedo A, Santos A, Rocha E, Perdigão C. Percepção da doença cardíaca e cerebral e dos factores de risco cardiovasculares em Portugal: Estudo AMALIA. *Revista Portuguesa de Cardiologia* Maio 2008; 27(5): 569 – 80.
3. Simões JÁ, Gama ME, Contente CB. Factores de risco cardiovascular numa população rural com idade entre os 25 e os 44 anos – 1º estudo. *Anamnesis* Dezembro de 1999; 8(84): 5 – 8.
4. Hennekens CH. Increasing burden of cardiovascular disease: Current knowledge and future directions for research on risk factors. *Circulation* 1998; 97: 1095 – 102.
5. Casas JP, Hingorán AD, Bautista LE, Sharma P. Meta-analysis of genetic studies in Ischemic Stroke. Thirty-two genes involving approximately 18000 cases and 58000 controls. *Archives of Neurology* 2004; 61: 1652 – 62.
6. Brandão MP, Pimentel FL, Silva CC, Cardoso MF. Factores de risco cardiovascular numa população universitária portuguesa. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2008; 27(1): 7 – 25.
7. Pereira S, Coelho FB, Barros H. Acidente Vascular Cerebral. Hospitalização, Mortalidade e Prognóstico. *Acta Médica Portuguesa* 2004; 17: 187 – 92.
8. Cancela DMG. O acidente vascular cerebral – classificação, principais consequências e reabilitação. [dissertação] Universidade Lusíada do Porto; 2008.
9. Humphries SE, Morgan L. Genetic risk factors for Stroke and Carotid Atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *The Lancet Neurology* 2004; 3: 227 – 36.
10. Cardoso T, Fonseca T, Costa M. Acidente Vascular Cerebral no adulto jovem. *Acta Médica Portuguesa* 2003; 16: 239 – 44.
11. Internet Stroke Center, 2010. Types of Stroke in <http://www.strokecenter.org/>

12. Instituto Gulbenkian da Ciência, 2007. Estudos genéticos nos AVC's in <http://www.igc.gulbenkian.pt/sites/soliveira/tiposAVCs.html>
13. Gomes A, Nascimento E, Matos L, Martins I, Mós M, Correia J, Capelo J, Lemos J, Garrido A, Farinha, Henriques P. Acidente Vascular Cerebral no adulto jovem: Estudo prospectivo de 58 doentes. *Publicação Trimestral* 2008, 15(3): 161 – 8.
14. Baptista MV, Ferreira S, Pinho-e-Melo T, Carvalho M, Cruz VT, Carmona C, Silva FA, Tuna A, Rodrigues M, Ferreira C, Pinto AN, Leitão A, Gabriel JP, Calado S, Oliveira JP, Ferro JM. Mutations of the GLA Gene in young patients with Stroke. The PORTYSTROKE Study—Screening Genetic Conditions in Portuguese Young Stroke Patients. *Stroke* 2010; 41: 431 – 6.
15. Martin PJ, Enevoldson TP, Humphrey PRD. Causes of Ischemic Stroke in the young. *Postgraduate Medical Journal* 1997; 73: 8 – 16.
16. Sazci A, Ergul E, Tuncer N, Akpinar G, Kara I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with Ischemic and Hemorrhagic Stroke: Dual effect of MTHFR polymorphisms C677T and A1298C. *Brain Research Bulletin* 2006; 71: 45 – 50.
17. Last JM. *A dictionary of epidemiology*. New York, Oxford University Press 2001.
18. Mafra F, Oliveira H. Avaliação do risco cardiovascular – metodologias e suas implicações na prática clínica. *Revista Portuguesa de Clínica Geral* 2008; 24: 391 – 400.
19. Franco FR, Reitsma PH. Gene polymorphisms of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. *British Journal of Haematology* 2001; 115: 491 – 506.
20. Malarstig A, Hamsten A. Genetics of Atherothrombosis and Thrombophilia. *Current Atherosclerosis Reports* 2010; 12: 159 – 66.
21. Ng KWP, Loh PK, Sharma VK. Role of investigating Thrombophilic disorders in young Stroke. *Stroke Research and Treatment* 2011; 2011: 1 – 9.
22. Ferro JM, Massaro AR, Mas JL. Aetiological diagnosis of Ischaemic Stroke in young adults. *Lancet Neurology* 2010; 9: 1085 – 96.

23. Sarti C, Rastenyte D, Cepaitis Z, Tuomilehto J. International Trends in Mortality From Stroke, 1968 to 1994. *Stroke* 2000; 31: 1588 – 601.
24. Sacco RL, Albala BB, Gan R, Chen X, Kargman DE, Shea S, Paik MC, Hauser WA, the Northern Manhattan Stroke Study Collaborators. Stroke incidence among White, Black, and Hispanic residents of an urban community: The Northern Manhattan Stroke Study. *American Journal of Epidemiology* 1998; 147: 259 – 268.
25. Sheinart KF et al. Stroke Recurrence is more frequent in Blacks and Hispanics. *Neuroepidemiology* 1998; 17: 188 – 98.
26. Rodrigues M, Noronha MM, Vieira-Dias M, Lourenço S, Santos-Bento M, Fernandes H, Reis F, Machado-Cândido J. Stroke incidence and case fatality in Portugal: POPBASIS 2000 Study. Final results. *Cerebrovascular Diseases* 2002; 13(s3): 47 (Abstract)..
27. El Saed A, Kuller LH, Newman AB, Lopez O, Costantino J, McTigue K, Cushman M, Kronmal R. Geographic variations in Stroke incidence and mortality among older populations in four US communities. *Stroke* 2006; 37: 1975 – 9.
28. Kajantie E, Rautanen A, Kere J, Andersson S, Yliharsila H, Osmond C, Barker DJP, Forsén T, Eriksson J. The effects of the ACE gene Insertion/Deletion polymorphism on glucose tolerance and insulin secretion in elderly people are modified by birth weight. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* November 2004; 89(11): 5738 – 41.
29. Hankey GJ. Potential new risk factors for Ischemic Stroke. What is their potential? *Stroke* 2006; 37: 2181 – 8.
30. Majersik JJ, Skalabrin EJ. Single-Gene Stroke disorders. *Seminars in Neurology* 2006; 26: 33 – 48.
31. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global burden of disease and risk factors. Capítulo 4 - Comparative quantification of mortality and burden of disease attributable to selected risk factors. *World Bank* 2006: 241 -306.
32. Goldstein LB, Adams R, Alberts M. et al. Primary prevention of Ischemic Stroke. A guideline from the AHA/ASASC. *Stroke* 2006; 37: 1583 – 633.

33. Sacco RL, Adams R, Albers G, et al. Guidelines for prevention of Stroke in patients with Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack: a statement from the AHA/ASASC. *Stroke* 2006; 37(2): 577 – 617.
34. Goldstein LB. Is there a causal relationship between the amount of alcohol consumption and Stroke risk? *Stroke* 2006; 37: 1 – 2.
35. Elkind MS, Sciarra R, Boden-Albala B. Moderate alcohol consumption reduces risk of Ischemic Stroke. The NOMAS. *Stroke* 2006; 37: 13 – 9.
36. Straus SE, Majumdar SR, McAlister FA. New evidence for Stroke prevention: scientific review. *Journal of the American Medical Association* 2002; 288(11): 1388 – 95.
37. James AH, Bushnell CD, Jamison MG. Incidence and risk factors for Stroke in pregnancy and puerperium. *Obstetrics & Gynecology* 2005; 106: 509 – 16.
38. Neiman J, Haapaniemi HM, Hillbom M. Neurological complications of drug abuse: pathophysiological complications. *European Journal of Neurology* 2000; 7: 596 – 606.
39. Enevoldson TP. Recreational drugs and their neurological consequences. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2004; 75: 9 – 15.
40. Kottke-Marchant K. Genetic polymorphisms associated with venous and arterial Thrombosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2002; 126: 295 – 304.
41. Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous Thrombosis. *Clinica Chimica Acta* 2003; 31 – 55.
42. Lippi G, Franchini M, Targher G. Arterial thrombus formation in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology* 2011; 8; 502 – 12.
43. Páramo JA, Lecumberri R, Orbe J. Trombosis arterial y polimorfismos genéticos: demasiados actores, escenario complejo. *Medicina Clinica* 2005; 124(2): 69 – 74.
44. Bauer CA, Rosendaal FR, Heit JA. Hypercoagulability: Too many tests, too much conflicting data. *Hematology* 2002; 353 – 67.
45. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* 2004; 364: 1343 – 60.

46. Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ. Pathophysiology and treatment of Stroke in Sickle-cell disease: Present and future. *Lancet Neurology* 2006; 5: 501 – 12.
47. Toole JF, Malinow MR, et al. Lowering homocysteine in patients with Ischemic Stroke to prevent recurrent Stroke, Myocardial Infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 2004; 291: 565 – 7.
48. Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia Vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia. *Annals Internal Medicine* 1995; 123: 656 – 64.
49. Hart RG, Kanter MC. Hematologic disorders and Ischemic Stroke. A selective review. *Stroke* 1990; 21: 1111 – 21.
50. Fields MC, Levine SR. Thrombophilias and Stroke: Diagnosis, treatment and prognosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2005; 20(2): 113 – 26.
51. Sanossian N, Ovbiagle B. Multimodality Stroke prevention. *The Neurologist* 2006; 12: 14 – 31.
52. Edelberg JM, Christie PD, Rosenberg RD. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. *Circulation Research* 2001; 89: 117 – 24.
53. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24: 216 – 29.
54. Moreno JA, Pérez-Jiménez F, Marín C, Gomez P, Pérez-Martínez P, Moreno R, Bellido C, Fuentes F, Lopez-Miranda J. Apolipoprotein E gene promoter - G219→T polymorphism increases LDL-cholesterol concentrations and susceptibility to oxidation in response to a diet rich in saturated fat. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 80: 1404 – 9.
55. Jasinska-Myga B, Opala G, Goetz CG, Tustanowski J, Ochudlo S, Gorzkowska A, Tyrpa J. Apolipoprotein E gene polymorphism, total plasma cholesterol level, and Parkinson Disease Dementia. *Archives of Neurology*. 2007; 64: 261 – 5.

56. Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-Analysis: Apolipoprotein E genotypes and risk for Coronary Heart Disease. *Annals Internal Medicine* 2004; 141: 137 – 47.
57. Bennet AM; Angelantonio E; Zheng Ye; et al. Association of Apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *Journal of the American Medical Association*. 2007; 298(11): 1300 - 11.
58. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology* 2002; 155: 487 – 95.
59. Marz W, Hoffmann MM, Scharnagl H, Fisher E, Chen M, Nauck M, Feussner G, Wieland H. Apolipoprotein E2 (Arg136 - Cys) mutation in the receptor binding domain of Apo E is not associated with dominant type III Hyperlipoproteinemia. *Journal of Lipid Research* 1998; 39: 658 – 69.
60. Garcés C, Benavente M, Ortega H, Rubio R, Lasunción MA, Artalejo FR, Pardo JF, Oya M. Influence of birth weight on the Apo E genetic determinants of plasma lipid levels in children. *Pediatric Research* 2002; 52: 873 – 8.
61. Beilby JP, Hunt CCJ, Palmer LJ, Chapman CML, Burley JP, McQuillan BM, Thompson PL, Hung J. Apolipoprotein E gene polymorphisms are associated with carotid plaque formation but not with intima-media wall thickening. *Stroke* 2003; 34; 869 – 74.
62. Tarnow L, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Poirier O, Cambien F, Hansen BV, Parvung H. Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Apolipoprotein E gene polymorphism and diabetic angiopathy. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2000; 15: 625 – 30.
63. Guerra A. Factores de risco cardiovascular na infância de doença com expressão clínica na idade adulta. *Acta Pediátrica Portuguesa* 2008; 39(1): 23 – 9.
64. Yang-chun Z, Xiu-fang H, Da-yi H, Xing-yuan J, Xin-chun Y, Liang C, Zhi-min X. Effect of Apolipoprotein E gene polymorphisms on pathogenesis of coronary atherosclerosis disease. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2006; 1 (1): 1 – 5.

65. Koch W, Mehilli J, Pfeufer A, Schömig A, Kastrati A. Apolipoprotein E gene polymorphisms and Thrombosis and Restenosis after coronary artery stenting. *Journal of Lipid Research* 2004; 45: 2221 – 6.
66. Cambien F, Tiret L. Genetics of cardiovascular diseases. From single mutations to the whole genome. *Circulation* 2007; 116: 1714 – 24.
67. Weizmann Institute of Science, 2011. Genes database in <http://genecards.org>.
68. Souza DRS, Nakachima L, Biagioni RB, Nakazone MA, Pinhel MAS, Trindade DM, Mafra VT, Tácito LHB, Martin JFV, Pinheiro Júnior S, Brandão AC. Relevance of Apolipoprotein E4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2007; 40: 189 – 97.
69. Slieter AJC, Bots ML, Havekes LM, Iglesias del Sol A, Cruts M, Grobbee DE, Hofman A, Van Broeckhoven C, Witteman JCM, van Duijn CM. Apolipoprotein E and carotid artery atherosclerosis: The Rotterdam Study. *Stroke* 2001; 32: 1947 – 52.
70. Castillo S, Tejedor D, Mozas P, Reyes G, Civeira F, Alonso R, Ros E, Pocovi M, Mata P. The Apolipoprotein B R3500Q gene mutation in Spanish subjects with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2002; 165: 127 – 35.
71. Hamedani AG, Cole JW, Mitchell BD, Kittner SJ. Meta-analysis of Factor V Leiden and Ischemic Stroke in young adults: The importance of case ascertainment. *Stroke* 2010, 41:1599 – 603.
72. Nicolaes GAF, Dahlbäck B. Factor V and thrombotic disease: Description of a janus-faced protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002; 22: 530 – 8.
73. Auro K, Alanne M, Kristiansson K, Silander K, Kuulasmaa K, et al. Combined effects of Thrombosis pathway gene variants predict cardiovascular events. *Public Library of Science Genetics* 2007; 3(7): 1244 – 53.
74. Slavik L, Krcova V, Hlusi A, Prochazkova J, Prochazka M, Ulehlova J, Indrak K. Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to

- laboratory diagnostics. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czechoslovakia Republic 2009, 153(1): 19 – 26.
75. Sykes TCF, Fegan C, Mosquera D. Thrombophilia, polymorphisms, and vascular disease. *Journal of Clinical Pathology and Molecular Pathology* 2000; 53: 300 – 6.
 76. Murin S, Marelich GP, Arroliga AC, Matthay RA. Hereditary Thrombophilia and Venous Thromboembolism. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998; 158: 1369 – 73.
 77. Donahue BS, Gailani D, Higgins MS, Drinkwater DC, George AL. Factor V Leiden protects against blood loss and transfusion after cardiac surgery. *Circulation* 2003; 107: 1003 – 8.
 78. Botto N, Spadoni I, Giusti S, Ait-Ali L, Sicari R, Andreassi MG. Prothrombotic mutations as risk factors for Cryptogenic Ischemic Cerebrovascular events in young subjects with patent foramen ovale. *Stroke* 2007; 38: 2070 – 3.
 79. Ozmen F, Ozmen MM, Ozalp N, Akar N. The prevalence of Factor V (G1691A), MTHFR (C677T) and PT (G20210A) gene mutations in arterial Thrombosis. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery* 2009; 15(2): 113 – 9.
 80. Feinbloom D, Bauer KA. Assessment of hemostatic risk factors in predicting arterial thrombotic events. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005; 25: 2043 – 53.
 81. Binder BR, Christ G, Grunber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW. Plasminogen Activator Inhibitor 1: Physiological and pathophysiological roles. *News in Physiological Sciences* 2002; 17: 56 – 61.
 82. Bayan K, Tuzun Y, Yilmaz S, Canoruc N, Dursun M. Analysis of inherited thrombophilic mutations and natural anticoagulant deficiency in patients with idiopathic portal hypertension. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2009; 28(1): 57 – 62.
 83. Bertina RM. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clinical Chemistry* 1997; 43(9): 1678 – 83.

84. Morange PE, Henry M, Tregouet D, Granel B, Aillaud MF, Alessi MC, Juhan-Vague. The A -844G polymorphism in the PAI-1 gene is associated with a higher risk of venous Thrombosis in Factor V Leiden carriers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20; 1387 – 91.
85. Saidi S, Slamia LM, Mahjoub T, Ammou SB, Almawi WI. 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* 2007; 16(4): 153 – 9.
86. Wiklund P, Nilsson L, Ardnor SN, Eriksson P, Johansson L, Stegmayr B, Hamsten A, Holmberg D, Asplund K. Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of Stroke. Replicated findings in two nested case–control studies based on independent cohorts. *Stroke* 2005; 36: 1661 – 5.
87. Chen C, Eng H, Chang C, Tsai T, Lai M, Chen H, Liu C, Lin T. 4G/5G promoter polymorphism of Plasminogen Activator Inhibitor-1, lipid profiles, and Ischemic Stroke. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2003; 142: 100 – 5.
88. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of Myocardial Infarction from polymorphisms in candidate genes. *The New England Journal of Medicine* 2002; 347(24): 1916 – 23.
89. Ginsburg D. Genetic Risk Factors for arterial Thrombosis and inflammation. *Hematology* 2005: 442 – 4.
90. Tsiolakidou G, Koutroubakis IE. Thrombosis and inflammatory bowel disease-the role of genetic risk factors. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 14(28): 4440 – 4.
91. Spiroski I, Kedev S, Antov S, Arsov T, Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S, Kostovska S, Trajkov D, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Spiroski M. Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genetic polymorphisms with Occlusive Artery Disease and Deep Venous Thrombosis in Macedonians. *Croatian Medical Journal* 2008; 49: 39-49.

92. Harmon DL, Doyle RM, Meleady R, Doyle M, Shields DC, Barry R, Coakley D, Graham IM, Whitehead AS. Genetic analysis of the thermolabile variant of 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase as a risk factor for Ischemic Stroke. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999; 19; 208 – 11.
93. Dong X, Wu J, Liang P, Li J, Yuan L, Liu X. Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer: A meta-analysis. *Archives of Medical Research* 2010; 41: 125 – 33.
94. Boccia S, Boffetta P, Brennan P, Ricciardi G, Gianfagna F, Matsuo K, van Duijn CM, Hung RJ. Meta-analyses of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C polymorphisms and risk of head and neck and lung cancer. *Cancer Letters* 2009; 273: 55 – 61.
95. Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *Journal of Applied Genetics* 2008; 49: 267 – 82.
96. Goracy I, Cyrylowski L, Kaczmarczyk M, Fabian A, Koziarska D, Goracy J, Ciechanowicz A. C677T polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene and the risk of Ischemic Stroke in Polish subjects. *Journal of Applied Genetics* 2009; 50: 63–7.
97. Gromadzka G, Rudnicka M, Chabik G, Przybylkowski A, Czlonkowska A. Genetic variability in the Methylenetetrahydrofolate Reductase gene (MTHFR) affects clinical expression of Wilson's Disease. *Journal of Hepatology* 2011; 1 – 7.
98. Friso S and Choi SW. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *Journal of Nutrition* 2002; 132: 2382 – 7.
99. Comprehensive Heart Care and Cardiologist James Roberts, 2007. Advanced Magnetic Research Institute in <http://www.heartfixer.com/AMRI-Nutrigenomics.htm>
100. Curtin K, Bigler J, Slattery ML, Caan B, Potter JD, Ulrich CM. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: Diet, estrogen, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2004; 13: 285 – 92.

101. Ercan B, Tamer L, Sucu N, Pekdemir H, Çamsan A, Atik U. Factor V Leiden and Prothrombin G20210A gene polymorphisms in patients with Coronary Artery Disease. *Yonsei Medical Journal* 2008; 49(2): 237 – 43.
102. Ehrenforth S, M. Prondsinski MD, Aygoren-Pursun E, Nowak-Gottl U, Scharrer I, Ganser A. Study of the Prothrombin gene 20201 GA Variant in FV: Q506 Carriers in relationship to the presence or absence of juvenile venous Thromboembolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999; 19; 276 – 80.
103. Bosler D, Mattson J, Crisan D. Phenotypic heterogeneity in patients with homozygous Prothrombin 20210AA genotype. A paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *Journal of Molecular Diagnostics* 2006; 8(4): 420 – 5.
104. Micco P, Fiore R, Niglio A, Quaranta S, Angiolillo A, Cardillo G, Castaldo G. Different outcome of six homozygotes for Prothrombin A20210A gene variant. *Journal of Translational Medicine* 2008; 6(36): 1 – 5.
105. Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Casorelli I, Rossi E, Molinari M, Servidei S, Tonali PA, Leone G. Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for Cerebrovascular Ischemic Disease in young patients. *Blood* 1998; 91(10): 3562 – 65
106. Junker R, Koch HG, Auberger K, Munchow N, Ehrenforth S, Nowak-Gottl U. Prothrombin G20210A gene mutation and further prothrombotic risk factors in childhood Thrombophilia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999; 19: 2568 – 72.
107. Hacke W, Kaste M, Bogousslavsky J, Brainin M, Guggning M, Chamorro A, Lees K, Leys D, Kwiecinski H, Toni D. European Stroke Initiative – EUSI. AVC Isquémico: Profilaxia e Tratamento. *Recomendações* 2003
108. Marcoux M. Stroke in young adults. *Stroke* 2000; 11(2): 1 – 5.
109. Strachan T and Read AP. *Human Molecular Genetics* 3. New York and London: Garland Science; 2005.
110. Lewis R *Human Genetics – concepts and applications*. USA: Mc Graw-Hill; 2005.

111. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science; 1994.
112. Loffert D, Karger S, Twieling G, Ulber V, Kang J. Optimization of Multiplex PCR. Qiagen 1999. 2: 5 – 8.
113. Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. Genome Research 1994; 3: 65 – 75.
114. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. QIAGEN, Sample & Assay Technologies. Second Edition. November 2007.
115. GeneBox. Manual de instruções de APOE Box 1.0 Typing Kit. Versão 1.6; Maio 2010.
116. GeneBox. Manual de instruções de FACTOR V Box 1.0 Typing Kit. Versão 1.3; Maio 2010.
117. GeneBox. Manual de instruções de PAI-1 Box 1.0 Typing Kit. Versão 1.1; Maio 2010.
118. GeneBox. Manual de instruções de MTHFR C677T Box 1.0 Typing Kit. Versão 1.3; Maio 2010.
119. GeneBox. Manual de instruções de MTHFR Box 2.0 Typing Kit. Versão 1.0; Janeiro 2011.
120. GeneBox. Manual de instruções de Prothrombin Box 1.0 Typing Kit. Versão 1.7; Maio 2010.
121. Thermo Fisher Scientific Inc. and all its subsidiaries, 2011. DNA electrophoresis in <http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/phage-dna-markers/sm025-phix174-dna-bisuri>
122. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning - A laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. USA. Volume 1.
123. Margaglione M, Seripa D, Gravina C, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Merla G, Papa S, Postiglione A, Di Minno G, Fazio VM. Prevalence of Apolipoprotein E alleles in healthy subjects and survivors of Ischemic Stroke: An Italian Case-Control Study. Stroke 1998; 29: 399 – 403.
124. Kim RJ, Becker RC. Association between Factor V Leiden, Prothrombin G20210A, and Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and

- events of the arterial circulatory system: A meta-analysis of published studies. *American Heart Journal* 2003; 146: 948 – 57.
125. Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Italian Study Group. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* 2003; 107: 1117 – 22.
126. Roest M, Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, Groot PG, Sixma JJ, Grobbee DE. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation* 2000; 101: 67 – 70.
127. Endler G, Lalouscheck W, Exner M, Mitterbauer G, Haring D, Mannhalter C. The 4G/4G genotype at nucleotide position -675 in the promoter region of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene is less frequent in young patients with minor stroke than controls. *British Journal of Haematology* 2000; 110: 469 – 71.

ANEXOS

Anexo I: Tabela de interpretação dos resultados PCR-SSP

Gene	Polimorfismo	Alelo	Banda específica	Banda controlo
Apo E	334/ 472	Poço 1 - CC (E4)	173	790
		Poço 2 - TT (E2)		
		Poço 3 - CT (E3)		
		Poço 4 - TC		
Factor V Leiden	1691	Poço 1 - G	228	
		Poço 2 - A		
PAI-1	675	Poço 1 - 4G	140	
		Poço 2 - 5G		
MTHFR	677	Poço 1 - C	302	
		Poço 2 - T		
	1298	Poço 1 - T	115	
		Poço 2 - C		
PROTROMBINA	20210	Poço 1 - G	340	
		Poço 2 - A		