

Interação entre fatores genéticos e não genéticos na recuperação após um Acidente Vascular Cerebral

Helena Manso, Astrid Moura Vicente

astrid.vicente@insa.min-saude.pt

Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção
de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

A elevada morbilidade devida a Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC) é um problema grave de saúde pública dado que 15 a 30% dos pacientes ficam permanentemente incapacitados, e cerca de 20% permanecem internados três meses após o evento ⁽¹⁾. A resolução deste problema requer a identificação e caracterização dos fatores que determinam a variabilidade inter-individual na recuperação após um AVC. Uma boa ou má recuperação é provavelmente determinada por múltiplas condicionantes, incluindo a gravidade do evento, fatores clínicos, género, idade e condição física do doente e ainda por fatores genéticos. Estudos em modelos animais de AVCs têm implicado genes que regulam a angiogénese, regeneração e proliferação neuronal e neuroinflamação na recuperação de isquémia ou hemorragia cerebral ^(2,3). Os mecanismos genéticos envolvidos na recuperação de pacientes após um AVC são, no entanto, ainda mal conhecidos.

Genes envolvidos nos processos neuroinflamatórios que se desencadeiam em resposta a danos cerebrais ou isquémia são exemplos de candidatos funcionais plausíveis com impacto na recuperação de um AVC. A sua expressão excessiva leva a morte neuronal, mas tem também efeitos benéficos paradoxais, dependendo da janela temporal em observação ⁽⁴⁾. Por exemplo, as metaloproteinases da matriz (*matrix metaloproteinases*, MMPs) contribuem para os danos cerebrais imediatamente após um AVC, mas são mais tarde importantes para a reparação e proliferação neuronal mediada por fatores de crescimento tais como o *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *heparin-binding growth factor 2* (HBGF-2), codificado pelo gene *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) e ainda o *vascular endothelial growth factor A* (VEGF) ⁽⁴⁾.

No presente trabalho analisámos o papel de alguns destes genes candidatos, nomeadamente dos genes *MMP2*, *MMP9*, *BDNF*, *FGF2* e *VEGFA*, na recuperação após um AVC avaliada 3 e 12 meses após o evento ^(5,6). O estudo incidiu sobre uma população de 568 pacientes que sofreram um AVC com idade inferior a 65 anos. Os doentes foram recrutados no âmbito de um trabalho prévio sobre a prevalência do AVC e fatores de risco associados em Portugal, realizado por um consórcio de clínicos portugueses em colaboração com o INSA, sob a coordenação do Professor José Ferro (Hospital de Santa Maria e Faculdade de Medicina de Lisboa) e do Dr. Marinho Falcão (INSA) ⁽⁷⁾.

Neste âmbito, foi estabelecida uma base de dados contendo informação demográfica, de estilo de vida e clínica, e incluindo a avaliação do grau de incapacidade 1, 3 e 12 meses após o AVC. Como parte do projeto foram ainda determinados, no INSA, múltiplos parâmetros bioquímicos (por exemplo perfil lipídico) e foi mais tarde feito o isolamento de material genético (DNA). As características demográficas e clínicas da população incluída no presente estudo são apresentadas na **Tabela 1**.

Para o estudo de associação aqui descrito foram genotipadas variantes nucleotídicas nos genes selecionados, nomeadamente *Haplotype-tagging Single Nucleotide Polymorphisms* (tag SNPs), distribuídas de forma a cobrir a variabilidade genética de cada um dos genes. A recuperação dos doentes foi avaliada 3 meses após o AVC utilizando a escala de incapacidade de Rankin (*Modified Rankin Scale*, mRS), que classifica o grau de incapacidade de cada doente numa escala de 0 (sem incapacidade) a 6 (morte) ⁽⁸⁾. De acordo com o nível de incapacidade determinado por esta escala, é estabelecido um limite para a boa recuperação (mRS ≤ 1) ou má recuperação (mRS > 1).

O impacto de parâmetros não genéticos na recuperação (tipo de AVC, idade, género, fatores de risco para AVC e variáveis clínicas durante hospitalização) foi estimado por análise univariada. Foi encontrada uma associação do tipo de AVC e de cinco parâmetros clínicos indicativos da gravidade do AVC (história de hipertensão, afasia, paresis, perturbação de consciência e complicações médicas durante hospitalização) com uma má recuperação, enquanto a idade, género e fatores de risco para AVC tinham proporções semelhantes nos grupos de boa e má recuperação (**Tabela 1**) ^(5,6).

O efeito de cada variante genética nos genes *MMP-2* e *MMP-9* na recuperação após um AVC foi determinado por regressão logística, ajustando para as variáveis não genéticas significativas (**Tabela 2**) ⁽⁵⁾. Seis SNPs no gene *MMP-2* apresentaram uma associação significativa na população total; dois destes SNPs, rs2241145 e rs1992116, mantiveram a significância após correção para testes múltiplos utilizando o método SNPSpD (que testa o efeito de testes múltiplos corrigindo para desequilíbrio de *linkage* entre os SNPs testados), sendo o alelo menos frequente um preditor significativo de uma má recuperação. Os mesmos dois SNPs mantêm uma associação significativa no *subset* de doentes com AVC isquémico após correção para testes múltiplos. Ambos os SNPs são intrónicos e não fazem parte de sequências regulatórias (análise *in silico* não mostrada), pelo que se consideram como marcadores em desequilíbrio de *linkage* com uma variante funcional localizada na proximidade, a qual poderá ser identificada através de sequenciação genética. O gene *MMP-9* não apresentou resultados significativos de associação ⁽⁴⁾.

artigos breves_ n. 5

Sabe-se que uma desregulação das *MMPs* ocorre após um AVC, levando a degradação da matriz neurovascular, enfraquecendo a barreira hemato-encefálica e contribuindo para morte celular, neurotoxicidade, edema e hemorragia; estas observações sugerem que inibidores das *MMPs* poderão constituir a base de um tratamento para o AVC (9). No entanto, as *MMPs* têm um efeito benéfico paradoxal nos processos de recuperação que ocorrem mais tardiamente, contribuindo para a angiogénese, remielinização, migração neuronal e recuperação geral da unidade neurovascular (4,9). Estudos funcionais serão necessários

para distinguir se as variantes do gene *MMP-2* associadas à recuperação contribuem principalmente para os danos cerebrais que ocorrem logo após um AVC, para os efeitos benéficos da resposta tardia ou para ambos. Os resultados deste estudo contestam eventualmente a utilidade de inibidores da *MMP-2* para o tratamento de AVCs, não só porque seriam benéficos apenas numa estreita janela temporal, mas também porque a sua eficácia seria dependente do genótipo *MMP-2* de cada indivíduo.

Tabela 1:  Características clínicas e demográficas dos pacientes com AVC.

Característica	Boa recuperação (mRS<ou=1)	Má recuperação (mRS>1)	p *
Idade e género			
Idade, média±SD (anos)	50.8±9	52.5±8.5	0,028
Género (masculino), n/N (%)	174/276 (63.0)	174/270 (64.4)	0,734
História clínica, n/N (%)			
Hipertensão	159/241 (66.0)	143/240 (59.6)	0,147
Diabetes	36/259 (13.9)	47/246 (19.1)	0,115
Doença cardíaca	37/264 (14.0)	43/257 (16.7)	0,390
Tipo de AVC, n/N (%)			
Isquémico	238/276 (86.2)	193/270 (71.5)	7.05x10 ⁻⁵
Hemorragico	33/276 (12.0)	72/270 (26.7)	–
Desconhecido	5/276 (1.8)	5/270 (1.9)	–
Apresentação clínica, n/N (%)			
Afasia	53/258 (20.5)	98/250 (39.2)	4.23x10 ⁻⁶
Neglect	11/266 (4.1)	19/240 (7.9)	0,072
Disfasia	15/270 (5.6)	25/251 (10.0)	0,059
Incontinência urinária	5/272 (1.8)	15/251 (6.0)	0,014
Paresis	203/273 (74.4)	244/269 (90.7)	5.59x10 ⁻⁷
Perturbação da consciência	21/275 (7.6)	59/265 (22.3)	1.72x10 ⁻⁶
Complicações médicas	18/265 (6.8)	82/254 (32.3)	1.83x10 ⁻¹³
Complicações neurológicas	14/274 (5.1)	39/267 (14.6)	2.03x10 ⁻⁴

(*) Mann-Whitney test ou χ^2 test. SD – standard deviation.

artigos breves_ n. 5

Tabela 2: Distribuição das frequências genotípicas e associação com a recuperação após um AVC dos SNPs testados no gene MMP-2.

SNP	Genótipo	Amostra total *				Subset de pacientes com AVC isquémico †			
		Frequência Genotípica		OR[95%CI]	P	Frequência Genotípica		OR[95%CI]	P
		Boa recuperação, n (%)	Má recuperação, n (%)			Boa recuperação, n (%)	Má recuperação, n (%)		
rs243866	G/G	142 (67.6)	117 (57.9)	1.67 [1.10-2.52]	0,0143	125 (67.6)	83 (56.8)	1.78 [1.13-2.80]	0,0128
	A/G	66 (31.4)	76 (37.6)			59 (31.9)	55 (37.7)		
	A/A	2 (1.0)	9 (4.5)			1 (0.5)	8 (5.5)		
rs243865	C/C	141 (67.8)	117 (57.9)	1.65 [1.09-2.50]	0,0162	124 (67.8)	83 (56.8)	1.76 [1.12-2.78]	0,0143
	C/T	65 (31.2)	76 (37.6)			58 (31.7)	55 (37.7)		
	T/T	2 (1.0)	9 (4.5)			1 (0.5)	8 (5.5)		
rs857403	A/A	124 (59.3)	138 (68.3)	0.71 [0.48-1.06]	0,0909	105 (57.1)	103 (70.5)	0.62 [0.40-0.97]	0,0349
	T/A	75 (35.9)	56 (27.7)			70 (38)	37 (25.3)		
	T/T	10 (4.8)	8 (4.0)			9 (4.9)	6 (4.1)		
rs1477017	A/A	100 (47.6)	81 (40.1)	1.42 [1.01-2.00]	0,0415	86 (46.5)	55 (37.7)	1.51 [1.04-2.20]	0,0306
	G/A	91 (43.3)	98 (48.5)			82 (44.3)	72 (49.3)		
	G/G	19 (9.0)	23 (11.4)			17 (9.2)	19 (13)		
rs17301608	C/C	94 (45.0)	75 (37.3)	1.40 [1.00-1.95]	0,0510	80 (43.5)	50 (34.5)	1.47 [1.01-2.12]	0,0412
	C/T	94 (45.0)	100 (49.8)			85 (46.2)	73 (50.3)		
	T/T	21 (10.0)	26 (12.9)			19 (10.3)	22 (15.2)		
rs1053605	C/C	188 (89.5)	170 (84.2)	2.02 [1.09-3.75]	0,0227	166 (89.7)	127 (87.0)	1.82 [0.93-3.58]	0,0817
	C/T	22 (10.5)	28 (13.9)			19 (10.3)	16 (11.0)		
	T/T	0 (0.0)	4 (2.0)			0 (0.0)	3 (2.0)		
rs2241145	G/G	79 (37.8)	56 (27.9)	1.66 [1.20-2.30]	0,0021‡	68 (37.0)	39 (26.9)	1.67 [1.17-2.40]	0,0044
	G/C	100 (47.8)	101 (50.2)			88 (47.8)	72 (49.7)		
	C/C	30 (14.4)	44 (21.9)			28 (15.2)	34 (23.4)		
rs243849	C/C	131 (62.7)	143 (71.5)	0.70 [0.46-1.07]	0,0948	112 (60.9)	108 (75)	0.59 [0.36-0.96]	0,0314
	T/C	70 (33.5)	52 (26.0)			65 (35.3)	33 (22.9)		
	T/T	8 (3.8)	5 (2.5)			7 (3.8)	3 (2.1)		
rs183112	G/G	134 (64.1)	145 (72.9)	0.66 [0.43-1.03]	0,0669	115 (62.5)	110 (76.9)	0.54 [0.32-0.90]	0,0162
	A/G	70 (33.5)	51 (25.6)			65 (35.3)	32 (22.4)		
	A/A	5 (2.4)	3 (1.5)			4 (2.2)	1 (0.7)		
rs1992116	G/G	87 (41.6)	65 (32.3)	1.67 [1.20-2.31]	0,0018‡	76 (41.3)	48 (33.1)	1.68 [1.17-2.42]	0,0042
	A/G	97 (46.4)	94 (46.8)			86 (46.7)	67 (46.2)		
	A/A	25 (12.0)	42 (20.9)			22 (12.0)	30 (20.7)		

95% CI – 95% Intervalo de confiança. * OR [95% CI] e P para modelo genético log-aditivo ajustado para co-variáveis significativas

† OR [95% CI] e P para modelo genético log-aditivo ajustado para co-variáveis significativas ‡ Resultado significativo após correção para testes múltiplos

Os resultados apresentados foram ajustados para co-variáveis significativas; OR>1 indica probabilidade aumentada de uma má recuperação para os portadores do do alelo de menor frequência; apenas SNPs associados a P<0,05 antes de correção para testes múltiplos são mostrados.

artigos breves_ n. 5

A análise de associação entre SNPs nos genes *BDNF*, *FGF-2* e *VEGFA* e a boa ou má recuperação não forneceu nenhuma evidência para um papel individual de cada um destes genes na recuperação após um AVC (6). No entanto, a análise de interações epistáticas (não aditivas) entre estes genes, utilizando o *Multifactor-dimensionality Reduction Method* (MDR), identificaram dois modelos preditivos da recuperação (Tabela 3) (6). Um modelo de interação entre um SNP no gene *BDNF* e três SNPs no gene *FGF2* classificou corretamente 59,2% dos indivíduos deste dataset como pertencentes ao grupo de boa ou má recuperação (*Testing Balanced Accuracy*, TBA=0,592, $P=0,026$ com 1000 permutações) sendo este modelo selecionado 6 vezes de 10 *cross-validation subsets* (*Cross-validation Consistency CVC*=6/10), OR=4,14 (CI=2,86-6,04). O segundo modelo, incorporando a interação entre um SNP no gene *FGF2* e dois SNPs no gene *VEGFA*, tem um maior poder preditivo da boa ou má recuperação (TBA=0,61, $P=0,002$ após 1000 permutações, CVC=3/10), com OR=2,54 (CI=1,76-3,67).

Estes resultados sugerem que a recuperação após um AVC pode ser modulada por interações epistáticas entre os genes *BDNF*, *FGF2* e *VEGFA* (6). A interpretação dos resultados necessita agora de estudos

funcionais em linhas celulares e modelos animais, dado que as variantes genéticas testadas se localizam em intrões e não parecem ter por si só um significado funcional. No entanto, é interessante que as interações entre variantes genéticas descritas venham corroborar observações anteriores de interações funcionais entre estes mesmos genes. Por exemplo, sabe-se que HBGF-2 (proteína codificada pelo gene *FGF2*) regula a angiogénese induzida por VEGF-A, e que efeitos funcionais sinérgicos entre HBGF-2 e BDNF melhoram a sobrevivência neuronal e promovem a regeneração do axónio (10). Adicionalmente, a administração de fatores de crescimento em modelos animais de AVC em murganho leva a uma melhoria da função neurológica e à indução de mecanismos neuroprotetores e de recuperação neuronal (11).

Múltiplas vias fisiológicas são ativadas após um AVC, resultando numa série de alterações bioquímicas, hemodinâmicas e neurofisiológicas cuja orquestração temporal precisa determina as consequências do AVC e o grau de recuperação do doente. As observações aqui descritas reforçam a importância de genes que codificam moléculas mediadoras da neurogénese, angiogénese e de mecanismos de neuroproteção e, em particular, das interações entre estes genes, para a recuperação após um AVC.

Tabela 3: Modelos de interação gene-gene gerados pelo método MDR.

Genes	Best Model *				N (poor good recovery) OR[95%CI]*	Global OR [95%CI]	CVC	TBA	P ^b
	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4					
<i>BDNF_FGF2</i>	<i>rs10835210_BDNF</i>	<i>rs167428_FGF2</i>	<i>rs308379_FGF2</i>	<i>rs3804158_FGF2</i>	238:262	4.15 [2.86-6.04]	6/10	0.592	0.026
	CA	TT	AT	GA	0.39 [0.24-0.97]				
	CA	CT	TT	GA	0.48 [0.32-0.99]				
	CC	TT	AT	GA	3.58 [1.34-10.82]				
	CA	CT	AT	GA	3.67 [1.18-13.18]				
<i>BDNF_FGF2_FGF2</i>	AA	TT	AT	GA	7.71 [1.09-62.18]				
	<i>rs833069_VEGFA</i>	<i>rs3025035_VEGFA</i>	<i>rs6905288_VEGFA</i>	-	246:258	2.15 [1.50-3.07]	4/10	0.559	0.143
<i>FGF2_VEGFA</i>	<i>rs167428_FGF2</i>	<i>rs3025000_VEGFA</i>	<i>rs6900017_VEGFA</i>	-	232:251	2.54 [1.76-3.67]	3/10	0.611	0.002
	CT	TT	CC		0.20 [0.11-0.88]				
	CC	CT	CC		6.49 [1.62-28.70]				
<i>BDNF_FGF2_VEGFA</i>	<i>rs10835210_BDNF</i>	<i>rs308441_FGF2</i>	<i>rs308379_FGF2</i>	<i>rs833069_VEGFA</i>	223:239	4.07 [2.76-5.99]	2/10	0.553	0.236

* Apenas combinações genotípicas significativas são apresentadas. ^bP para TBA (baseado em 1000 permutações)

O parâmetro CVC (numero de vezes que um modelo é selecionado de 10 subsets de cross-validation) é utilizado para selecionar o melhor modelo, mas não como teste estatístico primário; o parâmetro TBA estima a exatidão do método na classificação dos indivíduos nas categorias corretas (boa ou má recuperação); um valor de P significativo para a TBA com 1000 permutações é indicativo de um modelo de interação verdadeiro.

Referências bibliográficas:

- Asplund K, Stegmayr B, Peltonen M. From the twentieth to the twenty-first century: a public health perspective on stroke. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds. *Cerebrovascular Disease Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Vol. 2. Malden (MA): Blackwell Science; 1998: 901-918. Chapter 64.
- Nygren J, Kokaia M, Wieloch T. Decreased expression of brain-derived neurotrophic factor in BDNF(+/-) mice is associated with enhanced recovery of motor performance and increased neuroblast number following experimental stroke. *J Neurosci Res*. 2006;84(3):626-631.
- Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1843-1851.
- Rosell A, Lo EH. Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(1):82-89.
- Manso H, Krug T, Sobral J, et al. Variants of the Metalloproteinase-2 (MMP-2) but not the Metalloproteinase-9 (MMP-9) genes influence functional outcome after stroke. *BMC Med Genet*. 2010;11(1):40.
- Manso H, Krug T, Sobral J, et al. Evidence for epistatic gene interactions among growth factor genes in stroke outcome. *Eur J Neurol*. 2012;19(8):1151-3.
- Falcão JM, Ferro J, Gonçalves AF, et al., on behalf of the "Stroke before age 65" Study Group. Stroke before age 65 in Portugal: baseline results. 1999. Scientific report PECS/T/SAU/179/95.
- Weisscher N, Vermeulen M, Roos YB, et al. What should be defined as good outcome in stroke trials; a modified Rankin score of 0-1 or 0-2? *J Neurol*. 2008;255(6):867-74.
- Horstmann S, Kalb P, Koziol J, et al. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke* 2003;34(9):2165-2170.
- Mandriota SJ, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 18):2293-302.
- Logan A, Ahmed Z, Baird A, et al. Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. *Brain*. 2006;129(Pt 2):490-502.