



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MIRTA TOMIE ITÓ

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM PACIENTES
COM ANEMIA FALCIFORME E ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL

CAMPINAS
2018

MIRTA TOMIE ITÓ

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E ACIDENTE VASCULAR
CEREBRAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências na Área de Concentração em Clínica Médica.

ORIENTADOR: MÔNICA BARBOSA DE MELO

COORIENTADOR: SUELI MATILDE DA SILVA COSTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MIRTA TOMIE ITÓ, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 14/00984-3; CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

It6a	Ito, Mirta Tomie, 1969- Análise de expressão gênica de células endoteliais em pacientes com anemia falciforme e acidente vascular cerebral / Mirta Tomie Ito. – Campinas, SP : [s.n.], 2018. Orientador: Mônica Barbosa de Melo. Coorientador: Sueli Matilde da Silva Costa. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Anemia falciforme. 2. Acidente vascular cerebral. 3. Expressão gênica. I. Melo, Mônica Barbosa de, 1968-. II. Silva-Costa, Sueli Matilde da, 1962-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Gene expression analysis of endothelial cells from sickle cell anemia patients and its relation with stroke

Palavras-chave em inglês:

Sickle cell anemia

Stroke

Gene expression

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Mônica Barbosa de Melo [Orientador]

Camila Andréa de Oliveira

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Data de defesa: 31-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MIRTA TOMIE ITÓ

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO
2. PROFA. DRA. CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA
3. PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO

Programa de Pós-Graduação em CLÍNICA MÉDICA da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno

DATA DA DEFESA 31/08/2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com muito Amor aos meus pais Mitsuo Ito e Tatsuko Goto Ito que não mediram esforços para que eu concretizasse mais uma etapa importante na minha vida!

Às minhas irmãs Lucimara e Susi pelo apoio, carinho e força!

E aos meus sobrinhos Kenji e Yasmin que com muito amor, dedicação e paciência me apoiaram em todos os momentos da realização deste trabalho!

Muito obrigada!

O Senhor é o Pastor que me conduz!
SI 22

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar Força, Coragem e aumentar a minha Fé a cada dia!

Aos meus pais que sempre se preocuparam com a educação e bem-estar dos filhos e netos. E aos meus queridos sobrinhos e familiares!

À minha orientadora, Prof^ª Dr^a Mônica Barbosa de Melo pela confiança, paciência e dedicação. Agradeço os ensinamentos e apoio durante este tempo que convivemos juntas desde o TT3.

À minha coorientadora Dr^a Sueli Matilde da Silva Costa por ter acreditado em mim, sempre me ensinando com muita paciência e amor. Foi minha grande parceira em todos os momentos da minha vida acadêmica, a admiro e sempre lhe serei grata.

À todos os professores e colaboradores que participaram da minha banca de qualificação Prof^ª Dra Nicola Amanda Conran Zorzetto, Dr^a Cláudia Vianna Maurer Morelli, Dr^a Carla Penteado e Dr^a Priscila K. Matsumoto Martin.

Aos professores e colaboradores que aceitaram em participar da minha banca de defesa da dissertação Dr^a Nicola Conran Zorzetto, Prof^ª Dra Camila Andréa de Oliveira, Dr^a Priscila K. Matsumoto Martin e Dr^a Manoela Marques Ortega.

Ao Dr Fernando Ferreira Costa por ter me ensinado, apoiado e pela sua dedicação.

À Dra Margareh Castro Ozelo pelos ensinamentos e em fornecer as amostras de células endoteliais para a execução deste trabalho

À minha querida Danizinha pelos ensinamentos, carinho e companheirismo.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular Humana- CBMEG- Bruno, Flávia, Francisco, Gabriela, Gislene, Dr Jamil, Jhonathan, Letícia, Dr Marcelo, Dr^a Marina, Dr^a Milena, Paulo, Pedro, Thiago, Vinícius e Yuri.

Ao pessoal e funcionários do Hemocentro que me ajudaram nos experimentos, ensino e apoio.

A Dulcinéia Albuquerque, Stephanie Ospina, Carol Lanaro, Priscila Boyano e Karla Priscila Ferro.

Ao Dr Fernando Cendes do Laboratório de Neuroimagem do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Unicamp por ter autorizado a realização das ressonâncias magnéticas.

Aos meus pacientes que sem o consentimento deles este trabalho não se realizaria.

Às agências fomentadoras CAPES e FAPESP pelas bolsas e auxílios concedidos.

Enfim, agradeço a todos que, em algum momento estiveram presentes!

RESUMO

Embora a anemia falciforme (AF) resulte da homozigotidade de uma única mutação no códon 6 (recentemente renumerado códon 7) da β -globina, o quadro clínico desta doença é muito heterogêneo, de modo que diferentes pacientes podem apresentar evoluções clínicas significativamente distintas. Praticamente todos os órgãos podem ser afetados, merecendo destaque o Sistema Nervoso Central (SNC), onde são observados acidentes isquêmicos transitórios, infartos e hemorragia cerebral, os quais acometem aproximadamente 25% dos pacientes com AF. As complicações neurológicas são graves, podendo ser fatais em até 15% dos casos. Entre os tipos de acidente vascular cerebral (AVC) destacamos neste estudo o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi), síndrome clássica da anemia falciforme, responsável por 20% da mortalidade nesses pacientes. O AVCi é caracterizado pela oclusão nas artérias cerebrais, impedindo o fluxo sanguíneo e o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes para a área afetada. Apesar da anemia falciforme ser caracterizada pela falcização das hemácias, o endotélio vascular possui um papel importante na fisiopatologia desta hemoglobinopatia. Diferenças de expressão de moléculas produzidas por células endoteliais (CE) podem estar associadas a heterogeneidade clínica entre indivíduos afetados com doenças vasculares. Neste estudo, investigamos a expressão diferencial de genes em vias que podem estar associadas ao risco ou a proteção ao acidente vascular cerebral em amostras de RNAs extraídos a partir de células endoteliais progenitoras circulantes (CEFCs - *Blood Outgrowth Endothelial Cells*) de quatro pacientes com AF com história clínica de AVCi e de seis pacientes com AF sem AVCi (confirmados por ressonância magnética). A abordagem incluiu o isolamento e cultivo de CEFCs e análise de expressão de 84 genes por meio da técnica de *PCR Array (Human Endothelial Cell Biology RT² PCR Array)*. Os resultados de análise de expressão gênica identificaram 29 genes diferencialmente expressos em pacientes com AF e AVCi, (11 mais expressos e 18 menos expressos) quando comparados com o grupo sem AVCi. Baseado nos resultados de *PCR Array* foram selecionados para a validação cinco genes que tiveram a expressão aumentada (*FLT-1*, *IL-6*, *MMP-1*, *PGF* e *PROCR*) e cinco genes que tiveram a expressão diminuída (*CCL-2*, *ICAM-1*, *KDR*, *SELPLG* e *TNFSF10*). Dentre os genes mais expressos destacamos o *PGF* e *MMP-1* e dentre os menos expressos, o *ICAM-1* e o *TNFSF-10*. Os resultados obtidos poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de AVCi em pacientes com AF, no diagnóstico preventivo e ainda contribuir para o desenvolvimento de abordagens úteis para o tratamento do AVCi nestes pacientes.

Palavras-chave: Anemia falciforme, AVCi, Expressão gênica.

ABSTRACT

Although sickle-cell anemia (SCA) results from the homozygosity of a single mutation at the 6th position of the β -globin (recently renumbered 7th position), the clinical manifestation of this disease is very heterogeneous, so that different patients may present significantly different clinical evolutions. Almost all organs can be affected, with emphasis on the Central Nervous System (CNS), where transient ischemic events, infarcts and cerebral hemorrhage are observed, affecting approximately 25% of the patients with SCA. Neurological complications are severe and can be fatal in up to 15% of the cases. Among the types of cerebrovascular accident (CVA) we highlight in this study ischemic cerebrovascular accident, which is the classical syndrome of sickle cell anemia, accounting for 20% of mortality in these patients. The ischemic stroke is characterized by occlusion in the cerebral arteries, preventing blood flow and adequate supply of oxygen and nutrients to the affected area. Although sickle cell anemia is characterized by sickling of red blood cells, vascular endothelium plays an important role in the pathophysiology of this hemoglobinopathy. Differences in the expression of molecules produced by endothelial cells may be associated with clinical heterogeneity among individuals affected by vascular diseases. In this study, we investigated the differential expression of genes previously associated with the risk of stroke in endothelial cells from four patients with SCA with stroke and six patients with SCA without stroke (confirmed by magnetic resonance imaging). The approach included the isolation and culture of *Blood Outgrowth Endothelial Cells* (CEFCs) and expression analysis of 84 genes by *PCR Array* technique (*Human Endothelial Cell Biology RT² PCR Array*). The analysis of the array showed that 11 genes were upregulated and 18 were downregulated, from which ten were chosen for validation (five upregulated – *FLT-1*, *IL-6*, *MMP-1*, *PGF* and *PROCR* and five downregulated – *CCL-2*, *ICAM-1*, *KDR*, *SELPLG* and *TNFSF10*). *PGF*, *MMP-1*, *ICAM-1* and *TNFSF10* genes were validated by qRT PCR. Among the upregulated genes we highlight *PGF* and *MMP-1* and among the downregulated genes, *ICAM-1* and *TNFSF-10*. The results obtained may help to understand the mechanisms involved in the development of stroke in patients with SCA, in the preventive diagnosis and also contribute to the development of useful approaches for the treatment of stroke in these patients.

Keywords: Sickle cell anemia, Stroke, Gene expression

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Fisiopatologia da doença falciforme- Adaptado Steinberg, 2008.....	21
Figura 2. Área isquêmica devido a oclusão de um vaso pela presença de um trombo, levando a AVCi. Adaptado Caplan, 2006.....	26
Figura 3. Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme.....	30
Figura 4. Representação esquemática da cultura de CEFCs.....	47
Figura 5. Esquema do método de <i>PCR Array</i> (Qiagen).....	52
Figura 6. Padronização dos primers que amplificam o gene <i>MMP-1</i>	55
Figura 7. Caracterização de CEFCs por citometria de fluxo. O primeiro quadro mostra a delimitação da população de CEFCs a serem analisadas para a construção do histograma. Nos quadros seguintes as CEFCs expressam os marcadores de células endoteliais: CD31, CD144, CD146 e KDR positivos e CD45, CD133 e CD34 negativos.....	63
Figura 8. Representação gráfica dos genes mais expressos no grupo com AVCi em relação ao grupo sem AVCi (<i>FLT-1</i> , <i>PGF</i> , <i>MMP-1</i> , <i>PROCR</i> e <i>IL-6</i> , *p <0.05** e p<0.01.....	66
Figura 9. Representação gráfica dos genes menos expressos no grupo com AVCi em relação ao grupo sem AVCi (<i>ICAM-1</i> , <i>SELPLG</i> , <i>CCL-2</i> , <i>KDR</i> e <i>TNFSF10</i> . *p <0.05 e **p<0.01.....	67
Figura 10. Representação da ausência de expressão do gene <i>MMP-1</i> em leucócitos dos pacientes portadores de anemia falciforme com e sem AVCi	69
Figura 11. Representação do <i>Western Blot</i> - A: Detecção da Pró-MMP-1 – forma latente (62 KDa), B: Detecção da MMP-1-forma ativa (54KDa), C: Detecção do controle endógeno GAPDH, D- Análise da expressão da proteína MMP-1 nos pacientes com AVCi e sem AVCi em relação ao controle endógeno GAPDH. E: Análise da expressão da proteína MMP-1 nos pacientes com AVCi comparados com os indivíduos sem AVCi em relação ao controle endógeno GAPDH e representação das médias ± DP.....	70
Quadro 1. Genes representados na placa <i>Human Endothelial Cell Biology PCR Array</i> .RT ² Profiler PCR Array Human Endothelial Cell Biology (PAHS- 015ZC).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes modificadores candidatos associados a ocorrência de AVC em adultos e crianças. Adaptado de Steinberg, 2008.....	32
Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes com AF com e sem AVCi.....	44
Tabela 3. Sequência dos primers utilizados para validação da PCR Array	54
Tabela 4. Sequências dos primers utilizados para sequenciamento da região promotora do gene <i>MMP-1</i>	57
Tabela 5. Diluição do BSA para produzir uma curva padrão.....	59
Tabela 6. Genes relacionados a biologia das CE mais expressos em pacientes com AF e AVCi em relação ao grupo sem AVCi.....	64
Tabela 7. Genes relacionados a biologia das células endoteliais menos expressos em pacientes com AF e AVCi em relação ao grupo sem AVCi.....	64
Tabela 8. Validação dos resultados dos genes mais expressos obtidos a partir do PCR Array em pacientes com AF e AVCi.....	65
Tabela 9. Validação dos resultados dos genes menos expressos obtidos a partir do PCR Array em pacientes com AF e AVCi.....	66
Tabela 10. Frequência alélica e p-valor das variantes estudadas na região promotora do gene <i>MMP-1</i>	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α L β 2	Integrina α L β 2
α M β 2	Integrina α M β 2
AF	Anemia falciforme
AIT	Acidente isquêmico transitório
AKT	Proteína quinase
APC	Proteína C ativada
AVCi	Acidente vascular cerebral isquêmico
BAC/ACTB	Beta actina
BHE	Barreira hematoencefálica
β 2M	Beta 2 microglobulina
BOECs	Blood Outgrowth Endothelial Cells (Células endotéliais progenitoras circulantes)
BSA	Albumina de soro bovino
CBF	Fluxo sanguíneo cerebral
CCL	Proteína quimioatraente de mon
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CE	Células endoteliais
CEFCs	Células endoteliais formadoras de colônias
CEP	Célula endotelial progenitora
CO ₂	Gás carbônico
Ct	Cycle threshold
DcR	Decoy receptor- receptor chamariz
$\Delta\Delta$ Ct	Delta- delta Ct
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Receptores de morte
DTC	Doppler transcraniano
EBM-2	<i>Endothelial Basal Média</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra- acético
EGM TM -2	Endothelial Growth Média
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática

eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPCR	Receptor de proteína C endotelial
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
ET-1	Endotelina-1
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLT-1	Fms relacionado a tirosina quinase 1
FvW	Fator von Willebrand
GA	Gentamicina
GAPDH	Gliceraldeído- 3 fosfato desidrogenase
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM- CSF	Fator estimulante de crescimento de colônias de macrófago granulócitos
GTP	Trifosfato de guanosina
HbC	Hemoglobina C
HbD	Hemoglobina D
HbS	Hemoglobina S
HbSC	Hemoglobinopatia SC
hEGF	Fator de crescimento epidermal
hFGF	Fator de crescimento de fibroblastos humanos
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ICS	Infarto cerebral silencioso
IL	Interleucina
KDR	Receptor de tirosina quinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	Antígeno associado a função linfocitária 1
MAC-1	Antígeno macrófago-1
MEC	Matriz extracelular
μl	Microlitro
mL	Mililitro
min	Minuto
MMP	Metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro

ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
OACM	Oclusão da artéria cerebral média
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF-AA	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PerCP	Proteína clorofila peridina
PGF	Fator de crescimento placentário
pmoles	Picomoles
PROCR	Receptor da proteína C
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RANTES	Ativação na regulação das células T expressas e secretadas- CCL-5
R3IgF	Fator de crescimento de insulina
RMC	Ressonância magnética do crânio
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPLP0	Proteína ribossomal P0
rpm	Rotação por minuto
<i>RT²PCR</i>	Real Time PCR
SCA	Sickle cell anemia- Anemia falciforme
SELPLG	Ligante da P- selectina
SFB	Soro fetal bovino
sFLT	Forma solúvel do VEGF
SNC	Sistema nervoso central
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Fator de crescimento tumoral
TH	Transformação hemorrágica
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFSF10	Fator de necrose tumoral relacionado ao ligante 10
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

VCAM	Molécula de adesão vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Fator de crescimento endotelial vascular, receptor

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Histórico e fisiopatologia da anemia falciforme.....	20
1.2 Acidente vascular cerebral.....	22
1.2.1 Epidemiologia.....	23
1.2. 2 Sintomatologia	23
1.2.3 Tipos de AVC	24
1.2.4 Fatores de risco para AVCi	26
1.2.5 Diagnóstico por imagem	26
1.2.6 Tratamento.....	27
1.3 Endotélio e células endoteliais	27
1.4 Aspectos genéticos do AVC na anemia falciforme	31
1.4.1 <i>MMP-1</i>	33
1.4.2 <i>PGF</i>	36
1.4.3 <i>ICAM-1</i>	37
1.4.4 <i>TNFSF10</i>	39
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42
3.1 Geral	42
3.2 Específicos.....	42
4. CASUÍSTICA.....	43
4.1. Ressonância magnética.....	44
4.2. Aspectos éticos da pesquisa.....	45
5. MÉTODOS	46
5.1 Cultura de células endoteliais formadoras de colônias (CEFCs)	46
5.1.1 Caracterização das CEFCs.....	48
5.2. Extração de RNA.....	49
5.2.1. Controle de qualidade do RNA.....	49
5.3 Síntese cDNA para <i>PCR Array</i>	50
5.4 <i>PCR Array</i>	50
5.5 Análise dos dados obtidos do <i>PCR Array</i>	52
5.6 Validação da <i>PCR Array</i>	53
5.7 qRT PCR	53
5.7.1 Síntese de cDNA.....	53
5.7.2 Desenho dos <i>primers</i>	53
5.7.3 Padronização.....	54

5.7.4 Reação de qRT-PCR.....	55
5.7.5 Análise estatística	56
5.8 Sequenciamento do gene <i>MMP-1</i>	56
5.8.1 Obtenção das amostras de sangue e extração de DNA	56
5.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	56
5.8.3 Sequenciamento da região promotora do gene <i>MMP-1</i>	57
5.9 qRT-PCR do gene <i>MMP-1</i> em amostras de leucócitos	58
5.10 <i>Western Blot</i> para detecção da proteína MMP-1	58
5.10.1 Extração de proteínas.....	59
5.10.2 Quantificação das proteínas- método Bradford.....	59
5.10.3 <i>Western Blot</i>	60
5.10.4 Análise estatística.....	61
6. RESULTADOS	62
6.1 Resultados da caracterização das CEFCs por citometria de fluxo	62
6.2. Resultados do PCR Array	63
6.3. Resultados da validação por qRT-PCR	65
6.4. Resultados do sequenciamento da região promotora do gene <i>MMP-1</i>	67
6.5 Resultados do qRT-PCR da <i>MMP-1</i> em amostras de leucócitos	68
6.6 <i>Western Blot</i> - MMP-1	69
6.7 Análise densitométrica das bandas da proteína MMP-1.....	70
7. DISCUSSÃO	71
8. CONCLUSÕES	76
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
10. ANEXOS	88
ANEXO 1 Parecer do Comitê de Ética da Plataforma Brasil.....	88
ANEXO 2 Termo de Consentimento livre e esclarecido	93
ANEXO 3 Termo de Consentimento livre e esclarecido- Ressonância magnética...	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e fisiopatologia da anemia falciforme

Em 1910, James Herrick publicou pela primeira vez um estudo em que visualizou a forma anormal de células vermelhas no sangue periférico de um estudante negro com anemia grave, icterícia e com dores fortes nas articulações (1).

A doença falciforme teve origem na África e chegou ao continente americano em função do tráfico de pessoas negras, escravizadas durante o período colonial. Atualmente, mais da metade da população brasileira apresenta traços de afrodescendência, o que faz da doença falciforme a enfermidade hereditária mais comum do Brasil (2).

A anemia falciforme é decorrente da substituição de uma adenina por uma timina (GAG→GTG) no códon 6 (recentemente renumerado códon 7) da beta globina no cromossomo 11p15.5.7 (4). Tal mutação leva a troca do ácido glutâmico por valina (Glu6Val) alterando a estabilidade da hemoglobina e levando a polimerização induzida por desoxigenação quando as hemácias passam pela microcirculação (3).

A denominação “anemia falciforme” é reservada para a forma da doença que ocorre nos homozigotos SS. Além disso, a HbS pode combinar-se com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como a hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD), beta-talassemia, entre outros, gerando combinações que também são sintomáticas, denominadas respectivamente, hemoglobinopatia SC, hemoglobinopatia SD, S/beta-talassemia. No conjunto, todas estas formas sintomáticas da HbS, em homozigose (HbSS- anemia falciforme) ou em combinação, são conhecidas como doenças falciformes (4).

Na HbS a substituição dos aminoácidos faz com que a valina estabeleça interações hidrofóbicas com outros resíduos também hidrofóbicos na cadeia da β -globina de outra molécula de HbS desoxigenada. Tal interação origina polímeros que se alongam em fibras helicoidais que, quando agrupados, endurecem e levam as células a adquirirem a forma de foice, além de desencadear uma cascata de várias outras anormalidades celulares, as quais participam do mecanismo fisiopatológico global. Devido a essa polimerização ocorrem eventos de vaso-oclusão bem como a consequente anemia hemolítica devido a fragilidade dos glóbulos vermelhos (5).

O fenômeno de “falcização” pode ser reversível após a reoxigenação. Contudo, a repetição desse fenômeno pode causar lesões na membrana em algumas células suscetíveis, fazendo com que a rigidez e configuração em forma de foice persistam mesmo após a

reoxigenação. Esses eritrócitos, denominados “células irreversivelmente falcizadas”, permanecem com a forma anormal mesmo na ausência de polimerização intracelular da hemoglobina. O quadro clínico da anemia falciforme depende substancialmente da ocorrência de lesões orgânicas causadas pela obstrução vascular e das chamadas “crises de falcização”. Em geral, a vaso-oclusão na anemia falciforme ocorre na microcirculação, podendo, contudo, afetar grandes artérias (6) como ilustrado na Figura 1.

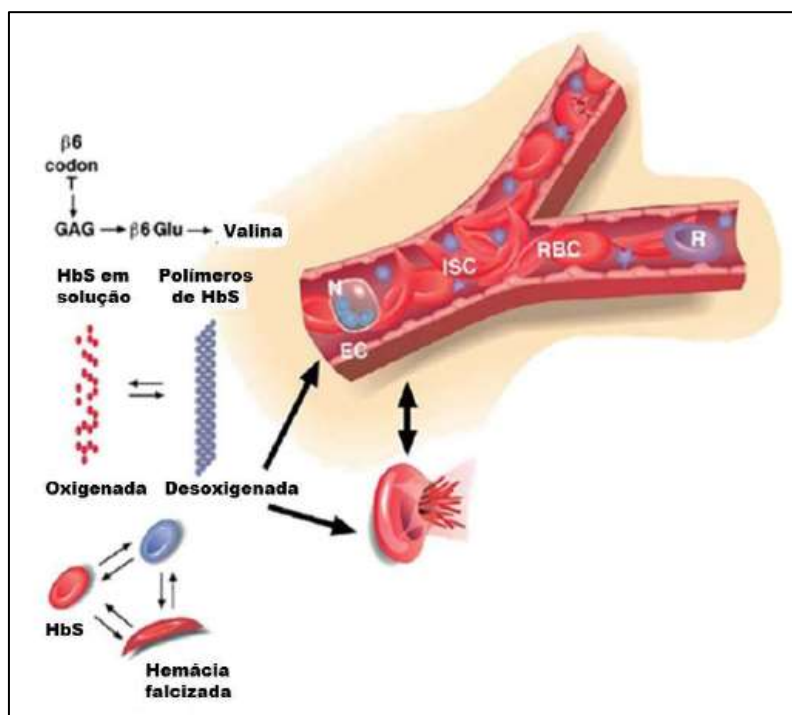


Figura 1. Fisiopatologia da doença falciforme. A mutação pontual (GAG- GTG) causa a troca do ácido glutâmico por valina (Glu6Val) alterando a estabilidade da hemoglobina gerando a formação da HbS. A HbS quando desoxigenada forma polímeros no interior das hemácias levando a formação de hemácias falcizadas. A polimerização repetida da HbS causa dano na membrana das hemácias levando a hemólise e fenômenos de vaso-oclusão. N(neutrófilo), EC (células endoteliais), ISC (células irreversivelmente falcizadas), RBC (hemácias), R (reticulócitos). Adaptado de Steinberg 2008.

Por muitas décadas foi confirmado que a vaso-oclusão ocasionada pelas células anormais causam isquemia do tecido provocando disfunção dos órgãos em pacientes com anemia falciforme. Os fenômenos vaso-oclusivos podem ocorrer devido a associação de vários fatores como inflamação, ativação endotelial, anormalidades na membrana dos eritrócitos, adesão de leucócitos, ativação e agregação plaquetária, ativação da coagulação e anormalidades na biodisponibilidade de vários fatores vasoativos (7).

Além disso, mais recentemente tem sido demonstrado que o processo vaso-oclusivo compreende mecanismos que envolvem tônus vascular anormal e ativado e endotélio adesivo. Essas anormalidades se atribuem a vias envolvidas no processo hemolítico associando biodisponibilidade de óxido nítrico (ON), estresse oxidativo, alterações de isquemia-reperfusão, ativação da hemostasia, leucócitos e plaquetas. A lise de eritrócitos libera arginase que destrói L-arginina, substrato para a produção de ON. Esta molécula é um importante cofator da enzima guanilato-ciclase, responsável pela conversão de GTP (trifosfato de guanosina) em cGMP (monofosfato de guanina cíclica) que leva ao relaxamento dos músculos lisos vasculares e vasodilatação e, conseqüentemente, ao aumento do fluxo sanguíneo na microcirculação (8–10). Além disso, a hemoglobina livre no plasma também resultado da destruição eritrocitária, consome o ON, gerando meta-hemoglobina e nitrato bioativo, sendo outro mecanismo que contribui para diminuição do ON (1). Como consequência a baixa disponibilidade de NO resulta em vasoconstrição e altera a homeostase vascular, aumentando a ativação plaquetária e expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais (CE) (11).

A anemia hemolítica e os eventos vaso-oclusivos são encontrados em diferentes graus em todos os genótipos da doença; alguns genótipos são clinicamente mais graves do que outros. Isto ocorre devido a variação da concentração de HbS nas hemácias e a propensão para a formação de polímeros, que é dependente da concentração de HbS (12).

1.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma doença que envolve a destruição e/ou disfunção das células cerebrais, levando a *déficits* neurológicos clinicamente definidos com sinais e sintomas neurológicos evidentes (13).

O AVC é a principal causa neurológica de morte e invalidez em crianças e adultos, sendo esta uma das principais complicações da anemia falciforme (13) (14). É considerada uma complicação catastrófica da anemia falciforme causada por estenose e oclusão de grandes vasos (4). A maioria dos sobreviventes sofre danos neurológicos, resultando em limitações significativas na vida diária.

1.2.1 Epidemiologia

O AVC é a terceira causa de morte em países em desenvolvimento e a causa mais frequente de incapacidade permanente em adultos no mundo (12). Cerca de 25% dos pacientes com AF são acometidos por algum tipo de comprometimento neurológico, sendo estes mais frequente em pacientes homozigotos SS, sendo raro naqueles com HbSC e S-beta-talassemia (14- 17).

O risco de ocorrência de um primeiro acidente vascular cerebral é de 11% até os 20 anos de idade, 15% até os 30 anos e 24% em torno de 45 anos (9). Dentre o grupo infantil a incidência é de 5 a 10% até os 17 anos de idade, sendo que o grupo etário mais afetado é o de 2 a 10 anos (16). Crianças com AF têm um risco 300 vezes maior de AVC agudo do que outras crianças sem anemia falciforme e, aos 45 anos de idade, um em cada quatro adultos com anemia falciforme teve AVC (13). Aproximadamente 30% das crianças não tratadas com essa condição terão um evento cerebrovascular (20,21); 80% desses eventos resultarão em *déficits* cognitivos significativos (22). Devido à alta incidência desta vasculopatia cerebral, destaca-se a necessidade de desenvolvimento de testes prognósticos para a identificação do AVC nas crianças com AF mais propensas a desenvolver esta doença cerebral irreversível (16).

1.2. 2 Sintomatologia

Alterações da consciência, *déficits* neurológicos focais, convulsões, paresias, afasias, confusão mental e cefaleia de grande intensidade ou duração são sinais e sintomas sugestivos de acidente vascular cerebral. Os pacientes podem ainda apresentar alteração neurológica breve reversível (ataque isquêmico transitório), que é um fator de risco para o AVC, e também pequenos infartos silenciosos, levando a dificuldades de atenção e aprendizagem (17–20).

Anormalidades cognitivas podem ocorrer em pacientes com doença falciforme que possuem doença vascular cerebral ou AVC. Estudos sugerem que em adultos a deficiência neurocognitiva é comum, sem comprometimento neurológico evidente. Em crianças com AF as sequelas são preocupantes, levando a complicações graves, como *déficit* motor, danos neurológicos e comprometimento cognitivo (21–23).

Satoh e colaboradores realizaram um estudo com crianças com AVCi até 16 anos de idade no Japão e observaram que as manifestações clínicas em crianças com AVCi são

diferentes das de adultos. O AVCi localizado nos gânglios da base, com estenose na artéria carótida distal é a característica principal encontrada na infância, sendo esta associação incomum em adultos. Hemiparesia (paralisia parcial de um lado do corpo) foi a forma mais comum de incapacidade após AVCi (89%), seguida de distúrbios da consciência (39%) e distúrbios da fala (45%). O curso clínico da afasia é diferente da observada em adultos. Em crianças é caracterizada com perda da fala, parafasia e disgrafia (Afasia de Wernicke). A hemidistonia que é uma complicação da hemiplegia (paralisia motora) é uma sequela comum nas crianças e incomum no AVCi adulto. Dusser e colaboradores observaram a hemidistonia (movimentos anormais) em 40% dos casos. Observaram também que as convulsões parciais motoras do mesmo lado da hemiparesia são mais frequentes em crianças do que em adultos mas podem ser generalizadas (21–23). Em geral, o prognóstico, a recuperação funcional e os índices de sobrevivência são melhores em crianças do que em adultos. Por outro lado, cerca da metade das crianças mantiveram *déficit* neurológico durante o seu desenvolvimento, sendo que a hemiparesia e retardo mental são comuns. Muitas incertezas permanecem sobre o AVCi infantil, mas é importante a prevenção pois os distúrbios são graves e ocorrem num período crítico do desenvolvimento da criança (21,22).

1.2.3 Tipos de AVC

O AVC pode ser classificado como: AVC isquêmico (AVCi), AVC hemorrágico e AVC isquêmico transitório (AIT) (13).

O AVC isquêmico é a síndrome clássica da anemia falciforme e é responsável por 20% da mortalidade entre esses pacientes (7,8). O AVCi é caracterizado pela oclusão nas artérias cerebrais, impedindo o fluxo sanguíneo e o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes para a área afetada (Figura 2). Na anemia falciforme o AVCi é mais comum em indivíduos mais jovens até os 20 anos de idade, mas também ocorre em adultos com mais de 30 anos (13). O AVCi é usualmente causado por oclusão de uma grande artéria cerebral e pode ocorrer como uma complicação da síndrome aguda do tórax podendo se manifestar como um ataque isquêmico transitório, com fraqueza e perda da consciência (18), (19).

Em termos de identificação de AVCi a lesão é focal. Na região central da isquemia o bloqueio de fluxo sanguíneo cerebral (CBF) é quase sempre total, ocorrendo morte celular desta área em poucos minutos. Ao redor desta área há uma região denominada zona de penumbra, onde o fluxo sanguíneo é menor, com hipofunção transitória, mas que não leva a morte celular. Esta zona de penumbra é metaestável, permite a sobrevivência celular por um

determinado período de tempo. Por isso esta região é potencialmente alvo de recuperação tecidual, onde se concentram esforços para atender o paciente com AVC agudo (26). O AVC isquêmico afeta aproximadamente 10% dos pacientes pediátricos com AF, com maior prevalência na idade de cinco anos (10).

Quanto ao AVC do tipo hemorrágico, a incidência em pacientes com anemia falciforme parece ser maior em pacientes com idade entre 20 e 29 anos (13). Frequentemente este é causado por ruptura de um aneurisma que pode resultar em lesão vascular. O AVC hemorrágico é uma das complicações neurológicas mais devastadoras da doença falciforme (DF). É comumente atribuída a aneurismas que acompanham a vasculopatia em pacientes com anemia falciforme. A maioria das hemorragias intracerebrais é relacionada ao aneurisma intracranial, mas há hemorragias relacionadas à doença de Moyamoya e a conversão em hemorrágica decorrente do AVCi. A doença de Moyamoya é o desenvolvimento de novos vasos envolvendo vasos frágeis e dilatados, que surgem como circulação colateral ao redor de áreas de infarto e aneurismas, e são os fatores que causam hemorragias em adultos e crianças (27). O AIT é um preditor significativo de AVCi. Ohene-Frempong e colaboradores relataram que o AIT em pacientes com doença falciforme é um grande fator de risco, podendo levar a ocorrência de AVCi ou hemorrágico. O AIT foi definido como um breve episódio de disfunção neurológica isquêmica focal, cujos sintomas melhoram dentro de 24 horas (ou 48 horas se o sistema basilar for envolvido). Este fato deve ser atentado pelos clínicos considerando que o AIT é um sinal de doença cerebrovascular e às vezes passa despercebido principalmente em crianças (13).

Os AVCs que se manifestam clinicamente afetam aproximadamente 6 a 17% dos pacientes com AF, sendo que a recorrência pode chegar a cerca de 80% nos três anos seguintes ao primeiro evento se nenhuma terapia for instituída (28). Alguns AVCs em anemia falciforme ocorrem na ausência de vasculopatia. Aproximadamente 20% dos AVCs coincidem com eventos agudos, como a síndrome torácica aguda grave com hipóxia ou anemia grave devido à parvovirose ou sequestro esplênico (29).

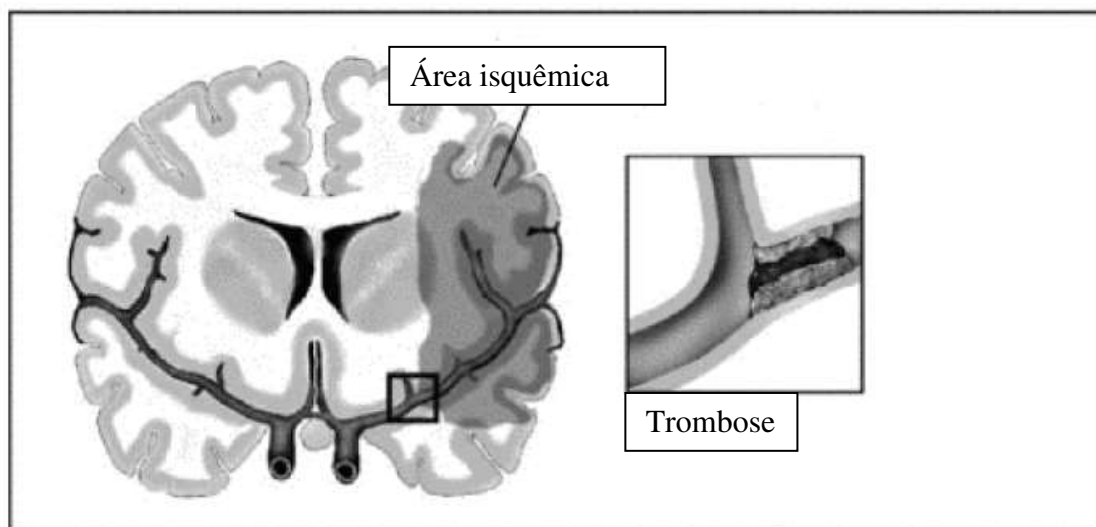


Figura 2. Área isquêmica devido a oclusão de um vaso pela presença de um trombo, levando a AVCi. Adaptado Caplan, 2006.

1.2.4 Fatores de risco para AVCi

O principais fatores de risco associados à ocorrência de AVCi são AIT prévio, elevada pressão sistólica, alta contagem de leucócitos, baixos níveis de hemoglobina e síndrome torácica aguda (13). Entretanto baseado em evidências, a predisposição genética ou familiar pode favorecer o AVCi em pacientes com doença falciforme (13,30,31).

1.2.5 Diagnóstico por imagem

A avaliação imediata para diagnóstico de AVC é a ressonância magnética do crânio (RMC) (24). Esta é indicada, principalmente, em pacientes com infarto cerebral silencioso (ICS). O ICS é definido como área de hiperintensidade do parênquima cerebral na RMC em pacientes sem história ou sem sinais físicos de déficit neurológico focal (32). Os ICSs são principalmente visíveis como substância branca na RMC e embora a etiologia permaneça desconhecida, os pacientes com vários ICSs apresentam sérios riscos de ter um comprometimento cognitivo que pode influenciar no rendimento acadêmico e social (33,34).

Em relação à prevenção de AVC primário e prognóstico a única ferramenta clínica utilizada é a medida do tempo da velocidade média (TVM) da artéria carótida interna distal e da artéria cerebral média usando Doppler transcraniano (DTC) (35). A realização do exame de DTC é um importante instrumento para detecção de risco para AVC isquêmico e deve ser realizado anualmente dos dois aos 16 anos. Crianças com DTC alterado ($TVM \geq 200$ cm/s) têm 44 vezes mais risco de desenvolver AVC do que aqueles com DTC normal $TVM < 170$

cm/s) (36). Nas crianças com alteração TVM, superior a 200 cm/s, é indicado o programa crônico de hemotransfusão que reduz o risco de AVC em 90% ou mais (37,38).

Devido à dificuldade em avaliar por meio de DTC todos os pacientes com anemia falciforme que podem apresentar AVC e a dificuldade no comprometimento da transfusão sanguínea regular, estudos tem buscado o desenvolvimento de um painel específico de biomarcadores na prevenção de AVC (16).

1.2.6 Tratamento

A identificação precisa de alto risco de AVC pode permitir o tratamento precoce, prevenindo assim o desenvolvimento de doenças cerebrovasculares e especialmente o AVC primário (16).

Em geral, as medidas terapêuticas aplicadas a casos de infarto na AF não podem ser implementadas antes da ocorrência do primeiro AVC, sendo preferível identificar fatores de risco para prevenir o AVC e adotar terapia direcionada a prevenção de AVCi recorrentes por um programa de transfusão em longo prazo (39). Em duas décadas houve um progresso no entendimento de mecanismos celulares e moleculares na patofisiologia do AVC (26).

1.3 Endotélio e Células endoteliais

O endotélio reveste a parede vascular interna dos vasos sanguíneos, sendo constituído por uma monocamada de CE. No adulto, este é composto por 10 trilhões de CE (40). Esta camada do endotélio é semipermeável e permite a transferência de micro e macromoléculas e de células entre o sangue e o tecido, além de ser importante para a manutenção do equilíbrio de água e proteínas entre os compartimentos intra e extracelular (41,42).

As CE também participam no controle da coagulação sanguínea, manutenção do tônus vascular por meio da produção de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, atuam na resposta inflamatória, por meio da produção de mediadores inflamatórios e na formação de novos vasos sanguíneos.

Os mecanismos que induzem a inflamação e a ativação do endotélio vascular na doença falciforme ainda permanecem pouco compreendidos, mas sabe-se que o endotélio sofre ativação pela adesão das hemácias falciformes devido a alterações nas propriedades da membrana. Acredita-se que nos processos segundo os quais ocorre a ativação inflamatória no

endotélio vascular, há o aumento da expressão do receptor Fc das CE e também das integrinas ICAM-1, VCAM-1 e P-selectinas. Destacam-se também o aumento no plasma de leucócitos como neutrófilos e monócitos, CE circulantes ativadas, citocinas pró-inflamatórias, fator ativador de plaquetas, proteína C-reativa e estímulos angiogênicos (Figura 3) (43,44).

As células endoteliais desempenham um papel importante na fisiopatologia da AF, tanto no mecanismo de vaso-oclusão como na disfunção endotelial. Este é um processo que envolve várias etapas. Os eventos vaso-oclusivos são iniciados pela adesão anormal de hemácias e leucócitos ao endotélio e também pela interação de vários tipos de células. Essas interações podem ser mediadas pela ativação das vias de sinalização dessas células (estímulos inflamatórios) e pelo aumento da atividade e expressão de moléculas de adesão na superfície das CE, hemácias e leucócitos (45–50). Além disso, a diminuição da biodisponibilidade do ON pela Hb e o aumento na liberação da endotelina 1 (ET-1), favorecem a vasoconstrição, contribuindo para fenômenos vaso-oclusivos. O ON é importante na manutenção do tônus vascular e na prevenção da agregação plaquetária, através do aumento do GMPc e na redução do cálcio intraplaquetário (51). Além do ON, o endotélio produz prostaciclina que são substâncias vasodilatadoras e substâncias vasoconstritoras, tais como enzima conversora de angiotensinogênio, tromboxano A₂, leucotrienos, radicais livres e endotelina-1 (40). A produção da endotelina-1 pelo endotélio é modulada por citocinas inflamatórias que induz a inflamação e a ativação endotelial (52). A obstrução vascular e lesão do endotélio e dos tecidos, desencadeiam uma resposta inflamatória que levam ao estado inflamatório crônico em pacientes com AF, produzindo uma série de citocinas inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 (IL-1e IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), os fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF, TGF β), as quimiocinas (CCL-2, IL-8) e as proteínas de fase aguda (PCR). Estas também atuam em processos de isquemia-reperfusão, desencadeando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez ativam respostas inflamatórias nos vasos sanguíneos (43,53).

Além de todas as moléculas mencionadas anteriormente, ressalta-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator angiogênico que exerce um papel importante na resposta inflamatória, sendo produzido por vários tipos de células, entre elas as CE. A sua participação em processos angiogênicos, tem sido implicada em todas as fases do desenvolvimento vascular, incluindo o desenvolvimento neurovascular, o qual compreende: (1) vasculogênese ou desenvolvimento de novos vasos a partir de células mesenquimais precursoras, (2) angiogênese ou formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes devido a hipóxia, (3) arteriogênese ou alongamento da anastomose arterial em resposta ao

gradiente de pressão arterial, (4) ocorrência de efeito trófico direto e proteção sobre os neurônios. As ações vasculares e neurológicas são relevantes para a angiogênese no acidente vascular cerebral (54).

O endotélio vascular é altamente responsivo a alterações, e uma vez lesado ou ativado, tem suas funções modificadas. Em resposta a lesão pode ocorrer perda da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) com liberação de CE para a circulação sanguínea (55). Essas células endoteliais circulantes maduras têm sido consideradas como um potencial marcador de dano tecidual (56). Na tentativa de reparação do endotélio são desencadeados mecanismos para a reendotelização (56). O reparo endotelial é desencadeado por mecanismos angiogênicos originando processos de migração e proliferação de células endoteliais maduras. Já foi demonstrado que o recrutamento de células endoteliais progenitoras (CEPs) da medula óssea e sua diferenciação em células endoteliais maduras seria um mecanismo adicional na recuperação da integridade endotelial no adulto (57).

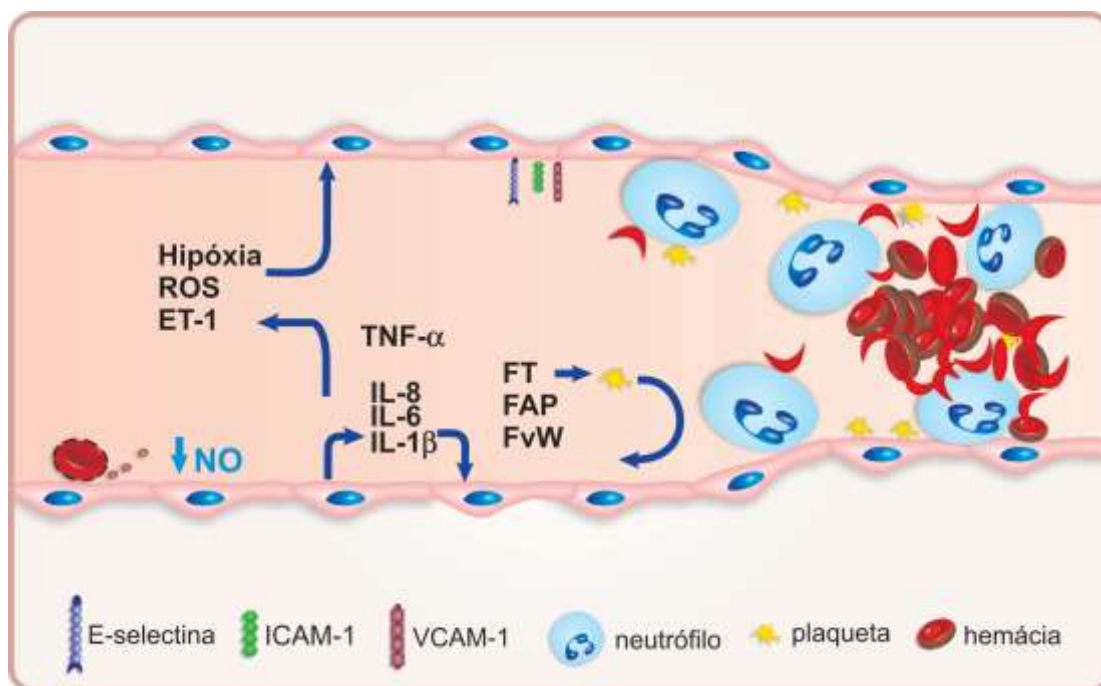


Figura 3. Costa FF, Conran N, Fertrin KY. Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme. In Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Tratado de Hematologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2013. P. 205-223.

O contato direto das hemácias SS e a presença de hemólise intravascular levam a ativação das células endoteliais que revestem o vaso; a presença do heme livre na circulação tem efeito deletério no vaso e ainda consome o Óxido Nítrico (NO) sintetizado pelas células endoteliais. A presença de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), hipóxia e os vasoconstritores como Endotelina-1 (ET-1) contribuem para a ativação das células endoteliais. O estado de hipercoagulabilidade leva a níveis aumentados de Fator Tecidual (FT), Fator Ativador de Plaquetas (FAP), Fator de von Willebrand (FvW) e ativação plaquetária. A ativação do endotélio também conta com a presença das plaquetas ativadas no vaso sanguíneo e a sua adesão à parede vascular. Após sua ativação, as células endoteliais aumentam a expressão das moléculas de adesão (como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) na superfície do vaso e também liberam mais citocinas e quimiocinas como o IL-8, IL-6 e IL-1β, que com o TNF-α, contribuem para a inflamação vascular e a ativação das células sanguíneas. A vasoconstrição elevada e a obstrução física do vaso ocasionam uma redução no fluxo sanguíneo com consequente hipóxia e falcização das hemácias, dificultando a passagem do sangue, e finalmente resultando na vaso-oclusão.

As CEPs são originadas de hemangioblastos, que são precursores de células vasculares e hematopoiéticas (58). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um fator que ativa a maturação dos hemangioblastos em angioblastos, que se diferenciam em CEPs e em seguida em células endoteliais maduras (59). As CEPs parecem gerar um grupo de células heterogêneas originadas na medula óssea, e estão presentes em diferentes estágios de diferenciação endotelial no sangue periférico (60).

Na literatura várias nomenclaturas têm sido utilizadas para identificar as células endoteliais progenitoras circulantes. Neste estudo, as CE com características de células maduras são denominadas Células Endoteliais Formadoras de Colônias (CEFCs) (61). Estas

células também são denominadas *Blood Outgrowth Endothelial Cells* (BOECs) (62), *Outgrowth Endothelial Cells* (63) e *late Outgrowth Endothelial Cells* (64).

As CEFCs podem ser isoladas do sangue periférico por meio da cultura *in vitro*. Estas células estão presentes em baixo número dentre as células mononucleares (0,01 – 0,1%), contudo, possuem alta capacidade proliferativa, com morfologia característica de CE (*cobblestone*) e fenótipo estável na cultura (CD133-, CD34+/-, VEGFR-2+, CD31+, FvW+, VE-caderina+, eNOS+, CD105+, CD144+, CD146+), acetilam a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e têm a capacidade angiogênica de formar vasos *in vitro* (61,62,65,66).

Muitos estudos têm utilizado as CEFCs como fonte de células no processo de regeneração vascular (67), como biomaterial aplicado na terapia gênica e em estudos da fisiopatologia vascular (68). Em modelos de lesão vascular no camundongo, elas são rapidamente recrutadas para o local de lesão vascular ou isquemia tecidual após injeção intravenosa, onde iniciam uma resposta vasculogênica, e tem sido relatado que aumentam o reparo vascular e melhoram o fluxo sanguíneo após infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, retinopatia isquêmica e lesão do membro isquêmico (56,57). Interessantemente Ding e colaboradores em 2016, utilizando um teste de escore de gravidade neurológica modificado e análise histológica de cortes cerebrais com imunomarcação de CD31 no tecido cerebral demonstrou restauração funcional, melhora da angiogênese, neurogênese e diminuição de apoptose em camundongos isquêmicos após infusão de CEFC, confirmando que as CEFCs podem ser um agente terapêutico promissor para o AVC.

1.4 Aspectos genéticos do AVC na anemia falciforme

A heterogeneidade fenotípica observada em pacientes portadores de AF tem sido atribuída a genes modificadores. Estudos recentes de associação de amplitude genômica têm associado polimorfismos em vários desses genes com o aumento de incidência de complicações nas doenças falciformes e ajudam a explicar a heterogeneidade clínica nesses pacientes. Na tabela 1 estão listados alguns genes que podem estar associados ao risco de AVC.

Tabela 1. Genes modificadores candidatos associados a ocorrência de AVC em adultos e crianças. Adaptado de Steinberg, 2008.

Gene	Nome gene	Variante	Via envolvida	Referência
ANXA2	Anexina A2	rs11853426	Hipercoagulabilidade	Sebastiani, 2005.
BAI1	Inibidor de angiogênese específica do cérebro 1	rs11167147	Angiogênese	
BMP6	Proteína morfogenética óssea 6	rs267196	Inflamação	
		rs408505		
		rs267201		
		rs449853		
CCL2	Quimiocina ligante 2	rs4586	Inflamação	
CSF2	Fator estimulador de colônia 2	rs25882	Adesão celular	
ECE1	Enzima conversora de endotelina 1	rs212528	Adesão celular	
		rs212531		
TEK	Receptor de tirosina Kinase TEK	rs489347	Adesão celular	
TGFB3	Fator III de crescimento transformante do receptor beta	rs2148322	Inflamação	
		rs2765888		
		rs2007686		
		rs284875		
IL4R	Receptor de interleucina 4	rs1805015	Inflamação	Hoppe, 2004; Hoppe, 2007.
TNF alfa	Fator de necrose tumoral	rs1800629	Inflamação	
LTC4S	Leucotrieno 4 sintase	rs730012	Inflamação	
MMP3	Matrix metaloproteinase 3	rs3025058	Inflamação	
MMP-1	Matrix metaloproteinase- 1	rs498186	Angiogênese	Qintao, 2014.
		rs475007		
		rs514921		
		rs494379		
		rs1799750		
		rs1799750	Angiogênese	Zhang,2018; Huang, 2016; Chehaibi, 2014.

Um dos estudos genéticos mais importantes foi realizado por Sebastiani e colaboradores. Ao analisarem 108 variantes em 39 genes candidatos em 1.398 indivíduos com AF o grupo reportou 31 variantes em 12 genes que parecem interagir com a hemoglobina fetal modulando o risco de AVC nesses pacientes. A presença de fatores de risco associados ao AVC sugere também que fatores genéticos que predisõem ao AVC são comuns em pacientes com anemia falciforme e na população geral (71).

Abaixo descrevemos sobre alguns genes de importantes vias associadas ao AVC, os quais foram analisados no presente estudo.

1.4.1 MMP-1

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas, zinco e cálcio dependentes associadas a degradação e remodelamento de proteínas que compõem a matriz extracelular (MEC) (59,60). Cerca de vinte e quatro tipos de MMPs já foram identificadas em humanos e classificadas de acordo com sua estrutura molecular e o substrato que degradam (74). Elas se dividem em MMPs associadas à membrana e em MMPs solúveis. As MMPs associadas à membrana são representadas por seis tipos, divididas de acordo com o mecanismo de ancoragem à membrana. As MMPs solúveis são divididas principalmente em collagenases (degradam o colágeno intersticial tipos I, II, III e V), gelatinases (degradam colágenos previamente desnaturados) e estromelisinases (degradam especificamente fibronectina, elastina, laminina e a proteína central das proteoglicanas) (75–78). A maioria das MMPs são sintetizadas como enzimas inativas na forma latente. A sua conversão em enzima ativa é geralmente mediada por ativadores que incluem ativador de plasminogênio ou o pró-hormônio convertase denominado furina (79). As MMPs são um grande grupo de proteases que degradam todas as proteínas da matriz extracelular e estão envolvidas na reconstrução e reparo tecidual, migração celular, angiogênese, processos inflamatórios e invasão tumoral (20, 21).

Essencialmente, todos os membros das MMPs têm sido associados ao desenvolvimento de cânceres metastáticos, inflamação crônica com subsequente dano tecidual e distúrbios neurológicos (80). Particularmente, as MMPs desempenham um importante papel na fisiopatologia do AVCi e no acompanhamento da evolução clínica (81).

Como já citado anteriormente, o AVCi ocorre quando o fluxo sanguíneo cerebral é localmente interrompido como resultado de um coágulo dentro de um vaso. Devido ao fornecimento insuficiente de oxigênio e nutrientes, o tecido neural circundante afetado é danificado, e os neurônios eventualmente morrem. No entanto, após isquemia e reperfusão, o tecido cerebral danificado secreta citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) que recrutam células inflamatórias para a área lesada. Estas células assim como a microglia ativada liberam fatores inflamatórios e ROS adicionais, levando ao estresse oxidativo e ativação das MMPs, causando rompimento da BHE, edema e hemorragia (69).

Há uma grande associação entre o estresse oxidativo e MMPs na fisiopatologia da lesão da BHE e no AVCi. Radicais livres, incluindo ROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidas rapidamente após oclusão vascular (83). O acúmulo de radicais livres não somente aumenta a suscetibilidade a isquemia tecidual cerebral, mas também a ativação

das MMPs. Isto leva a degradação da BHE e aumenta a permeabilidade vascular, favorecendo a isquemia cerebral (84).

A metaloproteinase de matriz-1 (MMP-1) ou collagenase A, a primeira enzima identificada da família das MMPs, faz parte do grupo das collagenases e participa da clivagem de colágeno tipos I, II e III (85). É sintetizada por células tumorais, CE, fibroblastos, macrófagos, plasmócitos, linfócitos e neutrófilos e está envolvida em várias patologias do SNC como isquemia cerebral, trauma cerebral, esclerose múltipla e infecção bacteriana (86). A MMP-1 degrada a matriz extracelular por clivagem do colágeno que é o componente mais abundante da matriz extracelular, resultando na fragilidade da BHE, facilitando a migração celular através da matriz. A MMP-1 também pode degradar os principais colágenos estruturais da placa aterosclerótica. Na aterosclerose humana a maioria dos eventos clínicos e patológicos ocorre quando a integridade da placa é interrompida contribuindo para expansão, ruptura, hemorragia e trombose.

Entre 2014 e 2018 estudos também tem associado variantes na região promotora do *MMP-1* com risco de doença vascular e AVC. Dentre elas destacamos o trabalho de Zhang e colaboradores que relatam o papel fundamental do gene *MMP-1* na degradação do colágeno intersticial tipos I, II e III e das principais estruturas da capa fibrosa que levam a ocorrência de AVCi aterosclerótico. O aumento de expressão do *MMP-1* pode levar a instabilidade da placa fibrosa, contribuindo para a degradação intersticial do colágeno e afinamento da capa fibrosa acarretando a sua ruptura (87). Qintao e colaboradores sugerem que este processo pode contribuir para a progressão da doença arterial coronariana (DAC) e seus estudos revelaram que variantes localizadas na região promotora do *MMP-1* podem favorecer o desenvolvimento da DAC. Destas variantes Zhang e colaboradores e Huang e colaboradores estudaram a associação da variante rs1799750 e AVCi. Ambos realizaram este estudo na população geral da China e encontraram associação da mesma com AVCi. Chehaibi e colaboradores também estudaram esta variante na população geral da Tunísia e não encontraram nenhuma associação. Estes pesquisadores relatam que mais estudos devem ser realizados para confirmar estes achados com amostras maiores e diferentes populações étnicas.

Além da MMP-1, há evidências na literatura de que as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 também desempenham um papel central no AVC, no entanto, dados conflitantes têm sido relatados. Um efeito patológico precoce e importante da atividade dessas MMPs após a isquemia cerebral é a abertura da BHE pela degradação da matriz neurovascular, que promove a inflamação neural, o edema vasogênico e a transformação hemorrágica (TH) (88). Por outro

lado, dados mais recentes propõem uma ação benéfica das MMPs. Ao modular a matriz cerebral, as MMPs podem estar envolvidas nas fases de reparação da isquemia cerebral, tanto na angiogênese quanto na plasticidade cerebral (83,89). Com relação a esse efeito destrutivo / protetor das MMPs após acidente vascular cerebral isquêmico, há uma questão em aberto, se tal fato depende de um efeito temporal ou de um efeito dependente de MMP (89). A definição do papel exato das MMPs após o AVC isquêmico terá importantes implicações para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem modular, ao invés de inibir, as MMPs.

A gelatinase A (MMP-2) e a gelatinase B (MMP-9) são conhecidas como collagenases tipo IV. Elas representam um subgrupo de MMPs, e tem como substrato o colágeno tipo IV, fibronectina e gelatina. O aumento da atividade do MMP-2 tem sido identificado logo após o início da isquemia, no primeiro período de abertura da BHE com ruptura, degradação das proteínas da membrana claudina e ocludina e com grande possibilidade de transformação hemorrágica (TH) (78,70). Em um estudo clínico, Lucivero e colaboradores relataram que entre os subtipos de AVCi, houve um aumento de MMP-2 plasmática somente no AVCi lacunar dentro de 24 horas. Segundo ele, esse aumento precoce da MMP-2 está associado a um melhor prognóstico e recuperação. Em contrapartida, alguns autores sugerem que a diminuição do MMP-2 nos estágios iniciais pós AVC tem efeito protetor, assim como o seu aumento na fase mais tardia no núcleo isquêmico (81,90–92).

A MMP-9 (gelatinase B) cliva a maioria das proteínas, particularmente o colágeno tipo IV e V (93). Entre as MMPs, a MMP-9 é amplamente estudada no AVCi e a sua atividade é significativamente elevada no tecido cerebral humano pós AVC (92,94–96). Após a primeira quebra da BHE mediada pela MMP-2, o segundo período de abertura tem sido correlacionado com o aumento da atividade da MMP-9, associada ao aumento de edema vasogênico e transformação hemorrágica em humanos e em modelos animais (90, 94, 97). A digestão do colágeno tipo IV facilita o transporte de leucócitos através do endotélio e está envolvida na resposta inflamatória desencadeada pela isquemia cerebral. Além disso, ao digerir ocludinas e claudinas, a MMP-9 leva a destruição da BHE e hemorragia que ocorre particularmente após trombólise (78). O aumento da MMP-9 foi observado mais tardiamente pós AVCi e foi relacionado a um AVC mais grave (81). Estudos mostram que o aumento da MMP-9 horas após AVCi está correlacionado com pior prognóstico, com aumento da lesão do infarto e prévia transformação em AVC hemorrágico, especialmente em pacientes tratados com fator ativador de plasminogênio tecidual recombinante (94,98). Portanto, níveis de MMP-9 não detectados em fase precoce indicam a baixa gravidade do AVC e baixa taxa de transformação para AVC hemorrágico (91).

1.4.2 *PGF*

O fator de crescimento placentário (PGF) faz parte da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que apresenta sete membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o fator de crescimento placentário (PGF), com três tipos de receptores VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) (99). O PGF se liga somente ao VEGFR-1 e a forma solúvel do VEGFR-1 (sFLT-1) (100). Em humanos quatro isoformas de PGF foram identificadas, PGF 1-4, devido ao processamento alternativo do RNAm (39).

Após um evento isquêmico no cérebro, o desenvolvimento e a perfusão de vasos sanguíneos colaterais agem como um importante mecanismo de defesa por fornecer uma rota alternativa de fluxo sanguíneo arterial para a região isquêmica. Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimulam a angiogênese e a vasculogênese (38).

O PGF é uma glicoproteína que exerce atividade angiogênica e está envolvida em: **1.** Ativação de monócitos mediados pelo VEGFR-1; **2.** Eventos vaso-oclusivos; **3.** Estimulação da quimiotaxia em monócitos; **4.** Neuroproteção e angiogênese em isquemia cerebral. Na isquemia cerebral a PGF é super-regulada em neurônios e células vasculares. Gáal e colaboradores mostraram que após a administração intravenosa de células tronco mesenquimais com super expressão de *PGF* em camundongos com lesão isquêmica induzida cirurgicamente, observou-se a redução do tamanho da lesão, o aumento da angiogênese e a atenuação da isquemia induzida por *déficit* funcional; **5.** Indução da expressão dos vasoconstritores endotelina-1 (*ET-1*) de CE da microvasculatura humana e receptor da endotelina-B em monócitos, contribuindo para a inflamação e hipertensão pulmonar em pacientes com doença falciforme (101). A ET-1 cerebral e seus receptores parecem exercer um grande papel fisiopatológico no AVC por modular funções neuronais e regular o metabolismo e o fluxo sanguíneo cerebral.

Os fatores de crescimento da família VEGF desempenham papéis importantes no desenvolvimento e funções normais do sistema nervoso central e esta expressão aumentada após a lesão ativa várias vias de sinalização, alterando funções de apoptose, inflamação, angiogênese, diferenciação e proliferação celular. Os níveis de *PGF* são elevados em pacientes com doença falciforme, os quais estão correlacionados com eventos de hemólise (88,89). Beck e colaboradores realizaram um experimento em camundongos normais e detectaram níveis de RNAm de PGF, assim como níveis de proteína de PGF em todas as células do tecido cerebral (104). Quase todas as células identificadas como neurônios expressaram PGF, enquanto vasos e astrócitos não expressaram PGF. Após indução de AVC,

os autores verificaram a super-expressão de *PGF* em neurônios isquêmicos com pico de expressão 24 horas após a oclusão da artéria cerebral média (OACM). O pico de expressão foi diminuindo, com ausência após 3 dias da oclusão. O RNAm e a proteína PGF foram detectados ao redor da área infartada e em neurônios e astrócitos. Somente a proteína do PGF foi detectada na *border zone* (zona de fronteira). Observou-se também a presença de macrófagos no tecido infartado, mostrando a expressão de PGF entre 3-7 dias após a OACM. Desta forma, concluiu-se que o PGF é super-regulado em neurônios na área peri-infartada, indicando que este pode exercer um efeito neuroprotetor e neurotrófico devido a indução da angiogênese (104).

1.4.3 ICAM-1

A molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) é uma glicoproteína de cadeia única pertencente à superfamília das imunoglobulinas. A ICAM-1 é constitutivamente expressa no endotélio vascular e regulada positivamente em resposta a vários estímulos. Pode ser induzida por vários tipos de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-4 (IL-4) (105,106).

A ICAM-1 desempenha um importante papel na adesão de leucócitos às CE. Liga-se aos receptores de membrana LFA-1 e MAC-1, CD43, molécula solúvel de fibrinogênio, fator hialurônico de matriz, rinovírus e eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* na malária. As integrinas LFA-1 e MAC-1 são as mais estudadas, sendo que o antígeno-1 está associado a função linfocitária-1 (LFA-1, também denominada CD11a/ CD18, α L β 2) e o MAC-1 aos macrófagos (CD11b, CD18 ou α M β 2). As integrinas são expressas em leucócitos e se ligam a diferentes domínios da ICAM-1 (106).

No endotélio a ICAM-1 é fundamental para ativação e migração de leucócitos para os locais de inflamação. É liberada pelas células e detectada no plasma como ICAM-1 solúvel (sICAM-1). A ICAM-1 está aumentada em muitas patologias e a alteração de sua expressão contribui para a manifestação clínica de muitas doenças por interferir no sistema imune. Entre elas estão as doenças malignas (melanomas e linfomas), doenças inflamatórias (asma e doenças autoimunes), aterosclerose, isquemia, doenças neurológicas e transplante de órgãos alogênicos) (105).

Entre as doenças neurológicas a ICAM-1 está envolvida na fisiopatologia do AVC (107). A sua expressão está aumentada durante inflamação neurovascular, e está implicada na transmigração de leucócitos através da neurovasculatura (107).

A inflamação pós-isquêmica é caracterizada por uma sequência de eventos envolvendo o cérebro, vasos sanguíneos, circulação sanguínea e as células do sistema imune. Evidências recentes sugerem que as células do sistema imune estão envolvidas em toda a cascata isquêmica desde a fase aguda da oclusão pela interrupção do fluxo sanguíneo até processos parenquimatosos que levam ao dano cerebral e a reparação do tecido isquêmico (108).

Após lesão e posterior reperusão, a *ICAM-1* regula a interação entre leucócitos e células endoteliais vasculares e facilita a infiltração de leucócitos na área cerebral danificada. Como consequência ocorre distúrbio na microvasculatura, lesão cerebral com edema e disfunção neurológica. A ICAM-1 juntamente com outras proteínas atua sinergicamente agravando o dano cerebral com aumento da resposta inflamatória e morte celular (108).

Além disso, as células endoteliais ativadas resultam em maior expressão das moléculas de adesão endotelial em neutrófilos, como por exemplo E-selectina, P-selectina e ICAM-1 (109). Isto indica que a ativação endotelial e a invasão leucocitária interferem na fisiopatologia do AVC, e podem ser utilizados no tratamento anti-inflamatório (107). As células endoteliais ativadas resultam no aumento da expressão das moléculas de adesão endotelial para neutrófilos, como por exemplo, E-selectina, P-selectina e ICAM-1 (109).

Mosnier e colaboradores mostraram que uma glicoproteína plasmática, a APC (proteína C ativada), devido ao seu efeito anti-inflamatório inibe a expressão de ICAM-1 nos vasos cerebrais, e elimina a infiltração de neutrófilos na isquemia cerebral. Os efeitos neuroprotetores da APC inibem a apoptose neuronal, reduzem o volume do infarto cerebral, diminuem a formação de edema e melhoram atividade motora. A proteína C ativada pelo complexo trombina-trombomodulina se liga a um receptor EPCR ou PROCR (Receptor de proteína C endotelial) (110). Essa ligação APC-PROCR exerce ação citoprotetora e regenerativa como a neurogênese (111). Em um estudo Shibata e colaboradores realizaram um experimento para avaliar os efeitos da APC em camundongos com AVC e os níveis de ICAM-1. Após administrarem APC em camundongos após oclusão da artéria cerebral média, notaram a redução do tamanho da lesão em 69% e do volume do edema em 61%, houve aumento da restauração do fluxo sanguíneo cerebral em relação ao controle e eliminação de acúmulo de neutrófilos. Também notaram níveis detectáveis reduzidos de ICAM-1 na BHE, prevenindo assim a adesão de neutrófilos aos vasos e seu subsequente transporte através da barreira. Desta forma, os autores concluíram que os efeitos neuroprotetores da APC observados neste experimento em camundongos com AVCi demonstram a relevância do potencial terapêutico da APC em benefício do tratamento clínico no AVCi (112).

1.4.4 TNFSF10

O TNFSF10 (Fator de necrose tumoral relacionado ao ligante 10) também denominado TRAIL é um membro da superfamília TNF. É uma proteína capaz de mediar os sinais celulares que são responsáveis por ativar caspases e pela morte celular programada em vários tipos de células. A apoptose ocorre em várias situações, como na organogênese, hematopoiese, reposição fisiológica de tecidos maduros, atrofia dos órgãos, resposta inflamatória e eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos. Embora tenha sido de grande interesse estudar suas características biológicas relacionadas à atividade anticancerígena, grande atenção tem sido dada ao envolvimento do TRAIL na homeostase imunológica normal e no desenvolvimento/ monitoramento de condições patológicas, em virtude do seu envolvimento em diferentes processos do sistema imune inato e adaptativo.

O TRAIL exerce a sua atividade biológica através da sua interação com cinco receptores, que podem se ligar com diferentes afinidades sob condições fisiológicas normais. Destes, somente dois são receptores de morte celular (DR4 e DR5, também conhecidos como TRAIL-R1 e TRAIL-R2 respectivamente); ambos têm a capacidade de induzir morte celular apoptótica (113).

Estudos anteriores também mostram que o TRAIL tem a capacidade de proteger contra apoptose e promover a proliferação de células endoteliais vasculares ativando a Akt (Proteína quinase) e ERK (quinase regulada por sinal extracelular) (114). Estudos demonstram que a adição de TRAIL as CE humanas, aumentam a fosforilação do óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), a atividade NOS e a síntese do óxido nítrico, sugerindo que o TRAIL possa ter um importante papel na função das CE. Além disso, vários estudos têm demonstrado a possível atividade anti-inflamatória e anti-aterogênica *in vitro* e *in vivo* do TRAIL (113,115).

A apoptose mediada por TRAIL tem sido documentada em roedores com isquemia, sugerindo o papel do mesmo em AVCi (76). A produção de TRAIL não foi detectada no cérebro humano normal, porém a expressão de DR4 e DR5 tem sido detectada em neurônios, principalmente em neuropatias como esclerose múltipla, tumores cerebrais primários, doença de Alzheimer e encefalopatia pelo HIV. (97). Além dos receptores primários (DR4 e DR5), dois outros receptores (DcR1 e DcR2) têm sido identificados (115). Eles são inativos em relação à atividade apoptótica, podem se ligar ao TRAIL, mas não induzem apoptose. O principal interesse das moléculas DcR1 e 2 vem de sua expressão em certos tumores, onde eles inibem competitivamente os receptores DR4 e 5 (117). Tisato e colaboradores relatam

que os membros da família TNF podem apresentar tanto efeitos neuroprotetores quanto efeitos neurotóxicos em condições patológicas (113). A função neuroprotetora foi sugerida, mostrando que o TNFSF10 promove a sobrevivência/ proliferação das CE, sugerindo que o TNFSF10-R exerce um importante papel na fisiologia das CE e na biologia do sistema vascular. Além disso, o TNFSF10 afeta a sobrevivência, migração, e proliferação das células musculares lisas vasculares através da ativação de vias específicas intracelulares (118). Estes efeitos pró-proliferativos e pró-sobrevivência interferem em processos de diferenciação em vários tipos de células, incluindo células tronco pluripotentes, osteoclastos, células mielóides e células intestinais (113). Esses efeitos biológicos contraditórios (proliferação/sobrevivência *versus* apoptose) parecem depender dos tipos de células envolvidas, e torna uma das características importantes da biologia do TNFSF10. Quanto a função neurotóxica do TNFSF10 no SNC, este contribui para a lesão cerebral em diferentes condições patológicas (119). Durante o AVCi a ativação da micróglia é seguida pelo recrutamento de leucócitos para a área isquêmica, contribuindo assim para a patogênese da lesão cerebral (120–122). Neste contexto, o TNFSF10 parece exercer função apoptótica, como evidenciado em modelos pré-clínicos que destacam o envolvimento do mesmo na apoptose neuronal *in vivo* após isquemia (123,124). A morte celular mediada por receptores TNFSF10 são encontrados em neurônios e oligodendrócitos e o TNFSF10 solúvel medeia a morte neuronal e oligodendroglial em algumas partes do cérebro humano (119). As células T humanas e macrófagos regulam positivamente a expressão de TNFSF10 após ativação e o TNFSF10 induz a morte das células neurais (107). Em termos de perspectivas clínicas futuras, o TNFSF10 parece ser um alvo terapêutico e potencial biomarcador para distúrbios relacionados ao SNC, como comprometimento neurocognitivo e depressão.

2. JUSTIFICATIVA

A anemia falciforme é uma doença hematológica hereditária que apresenta um impacto significativo na morbimortalidade da população acometida pela doença. O alto custo envolvido no tratamento desta enfermidade também é de grande relevância. De modo geral, pacientes com AF apresentam um quadro clínico muito variável sendo, o AVCi considerado um indicador da gravidade de doença. Cerca de 25% dos pacientes com anemia falciforme são acometidos por algum tipo de comprometimento neurológico. As complicações neurológicas são graves e podem ser fatais em até 15% dos casos.

Estudos anteriores deixam claro que existem componentes genéticos importantes associados ao desenvolvimento da doença cerebrovascular em pacientes com AF. Evidências indicam o envolvimento de vários genes candidatos na predisposição ao AVCi e alterações ou interações gênicas podem influenciar o risco de subtipos específicos de AVC. Sendo assim, este estudo propõe investigar a expressão diferencial de genes em CE provenientes de pacientes com AF com história clínica de AVCi *versus* pacientes com AF sem AVCi (confirmados por ressonância magnética).

Desta forma, a análise de expressão gênica pode ter uma grande contribuição para a identificação de genes envolvidos em processos biológicos, traçar o perfil de expressão gênica em uma determinada anomalia, e posteriormente identificar marcadores para o diagnóstico molecular de doenças.

Acredita-se que os resultados obtidos possam auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de AVCi em pacientes com AF, no diagnóstico preventivo e ainda, contribuir para o desenvolvimento de abordagens úteis para o tratamento do AVCi nestes pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Analisar a expressão de genes associados ao risco de AVCi em células endoteliais formadoras de colônias de pacientes portadores de anemia falciforme com AVCi e sem AVCi.

3.2 Específicos

- Isolar e estabelecer cultura de CEFCs em pacientes com AF com e sem AVCi
- Investigar se há diferença na expressão dos genes relacionados a biologia das células endoteliais entre as amostras de CEFCs.
- Validar os resultados obtidos por meio de qRT-PCR.

4. CASUÍSTICA

Este trabalho consiste em um estudo preliminar e exploratório que compreende a avaliação de dois grupos: Grupo com AVCi (n=4) composto por pacientes com anemia falciforme e diagnóstico de AVCi e grupo sem AVCi (n=6), composto por pacientes com anemia falciforme sem AVCi. Os pacientes que fizeram parte dos grupos com AVCi e sem AVCi foram selecionados no período de setembro de 2015 a novembro de 2017. Todos os pacientes participantes são provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO de Campinas – Unicamp e apresentavam diagnóstico de anemia falciforme por eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta performance.

Os critérios de inclusão foram: pacientes com genótipo SS não aparentados (não mais de um paciente por família) e que não estavam fazendo uso de hidroxiuréia, medicamento utilizado para o tratamento da anemia falciforme e que interfere no crescimento celular. Alguns pacientes estavam em programa de transfusão sanguínea regular (aproximadamente a cada 15 dias), sendo as amostras coletadas antes do recebimento do concentrado de hemácias. Pacientes do grupo com AVCi deveriam apresentar história clínica de AVCi e idade superior a 18 anos. Dos quatro pacientes com AVCi, um deles teve AVC na infância, aos 11 anos de idade e um segundo AVCi aos 41 anos, e apresenta sequela motora e cardiopatia. No grupo sem AVCi foram incluídos pacientes com idade superior a 20 anos sem história de AVCi confirmado por exame de imagem (ressonância magnética do crânio) para exclusão de AVC silencioso.

Os critérios de exclusão foram: pacientes que tinham outras hemoglobinas anômalas (tais como HbC, HbD), outras hemoglobinopatias (como talassemia, dentre outras) e/ ou que apresentassem outras doenças genéticas que interferissem na estabilidade das células vermelhas como persistência hereditária da hemoglobina fetal). A tabela 2 mostra os dados clínicos dos pacientes incluídos nesse estudo.

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes com AF com e sem AVCi.

Características	Com AVCi	Sem AVCi
Número de pacientes	04	06
Masculino/feminino	01/03	01/05
Idade (anos)(mínima –máxima) (DP)	35 (26-44) ($\pm$ 8.7)	39,5 (29-56) ($\pm$ 11.3)
Idade AVC	28.5 (11- 41)	-
Hemoglobina (g/dl)	9,4 (8.5-11.4)	8,3 (7.4-9.6)
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	9,61 (5.11-12.64)	8.24 (6.17-11.11)
Reticulócitos (contagem absoluta)	9.04 (6.2-14.5)	11.9 (7.3-18.6)
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	396 (304-473)	352 (285-433)
Necrose asséptica	0	1 (16.6%)
Colecistectomia	2 (50%)	3 (50%)
Doença renal crônica	1 (25%)	1 (16.6%)
Hepatopatia	0	2 (33.3%)
Osteoporose	4 (100%)	3 (50%)
Hipertensão pulmonar	0	2 (33.3%)
Retinopatia	1 (25%)	1 (16.6%)
Esplenectomia	0	0

4.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Todos os pacientes com AF tanto pacientes com AVCi como pacientes sem AVCi neurologicamente assintomáticos foram submetidos a RMC sem contraste. Os pacientes com AVCi, além da confirmação de AVCi clínico foram submetidos a este exame para confirmação de AVCi, e nos indivíduos sem AVCi para a exclusão de AVC silencioso ou outras lesões intracerebrais.

A neuroimagem elucida a topografia, mecanismo subjacente de isquemia cerebral e extensão da lesão isquêmica, com base na informação fisiopatológica. Auxilia na seleção de estratégias terapêuticas, desde fases hiperagrupadas a crônicas do AVCi cerebral (14).

As RMCs foram realizadas no Laboratório de Neuroimagem do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, sob responsabilidade do Dr. Fernando Cendes. As imagens cerebrais foram adquiridas em equipamento de ressonância magnética de 3 Tesla (Phillips Achieva, Best Netherlands) .3D T1, 3D T2, recuperação de inversão atenuada de fluido 3D, ponderação axial, imagens ponderadas por difusão axial e angiografia MR. Todas as aquisições 3D foram realizadas nos planos axial, coronal e sagital para revisão de imagem. As imagens foram analisadas, com atenção especial para quaisquer anormalidades relacionadas a isquemia e pequenas alterações da substância branca profunda.

4.2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi aprovado em 01/02/2017 pelo Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, segundo o parecer nº 1.903.046, conforme previsto na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO 1). Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2 e ANEXO 3)

5. MÉTODOS

5.1 Cultura de células endoteliais formadoras de colônias (CEFCs)

As células mononucleares dos pacientes com e sem AVCi foram isoladas a partir de amostras de sangue periférico (45 mL), coletadas em tubos contendo o anticoagulante heparina sódica (BD Vacutainer, San Jose, CA, EUA) e processadas logo após a coleta que ocorreu imediatamente antes da transfusão programada, nos casos que estavam em programa de transfusão.

As amostras de sangue foram diluídas em solução salina tamponada fosfatada (PBS, pH 7,4) na proporção 1:1. Em seguida foram submetidas a centrifugação em gradiente de *Ficoll- PaqueTM Plus 1.77* (GE Healthcare, Upsala, Suécia) por 30 minutos a 1.500 rpm a temperatura ambiente. Após a centrifugação foi coletada a camada de células mononucleares formada na interface (*buffy coat*) e transferida para tubo cônico (Falcon - 50 mL). Em seguida, as células foram lavadas primeiramente com PBS e posteriormente com meio EBM-2 (*Endothelial Basal Media*) (Lonza, Walkersville, MD, EUA). As células foram então ressuspensas em 1 mL de meio para contagem em Câmara de Neubauer. Aproximadamente $1 \times 10^7/\mu\text{l}$ de células foram cultivadas em placas de 12 poços previamente tratadas com colágeno tipo I de cauda de rato (50 $\mu\text{g/L}$) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). O meio de cultura EBM-2 utilizado foi suplementado com os fatores do kit EGMTM2 Single Quots® (*Endothelial Growth Media*) (Lonza, Walkersville, MD, EUA) contendo fator de crescimento de fibroblastos humanos (hFGF-B), VEGF, fator de crescimento epidermal (hEGF), fator de crescimento de insulina (R3IGF), gentamicina (GA-1000), hidrocortisona, heparina, ácido ascórbico. Foi também acrescentado soro fetal bovino (SFB) 10%, penicilina (100U/mL), estreptomicina (100U/mL) e L-glutamina (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e ainda fungizona (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) (Gibco, *Life Technologies*, EUA).

As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e na primeira semana o meio foi trocado diariamente para retirar as células não aderidas e nas semanas seguintes em dias alternados. As primeiras colônias de CEFCs surgiram por volta de 9-21 dias de cultura com morfologia de células endoteliais maduras (morfologia *cobblestone*). Ao atingirem 90% de confluência foi realizada a primeira passagem, quando as células foram transferidas da placa de 12 poços para uma placa de 6 poços (TPP, Suécia), em seguida para uma placa de 100 mm (segunda passagem) e, novamente, após atingida a confluência desejada as células foram distribuídas em 4-5 placas de 100 mm (terceira passagem) o que ocorreu aproximadamente

40 dias após o início da cultura. Todas as placas utilizadas foram adquiridas da empresa Sarstedt (Newton, NC, EUA).

As passagens foram realizadas por meio de tripsinização, que promove o rompimento dos peptídeos que formam a matriz extracelular resultando na desagregação das células. Primeiramente foi aspirado o meio de cultura e em seguida foram realizadas duas lavagens com PBS. Adicionou-se tripsina/EDTA 0,25% (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) seguida de incubação por 2 minutos, 37 °C, 5% CO₂. A tripsina foi neutralizada com adição do meio EBM-2 suplementado e a solução com as células submetida a centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura e distribuído nas placas (Figura 4).

Na terceira passagem, ao atingirem 85-90% de confluência as células foram caracterizadas pela identificação da morfologia *cobblestone* e por citometria de fluxo com a utilização de marcadores endoteliais presentes na superfície celular. Parte das células obtidas em cultura foram então utilizadas para extração de RNA, parte para congelamento em nitrogênio líquido congeladas em solução composta por 90% de SFB e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha), em concentração de 1×10^6 células/mL para preservação.

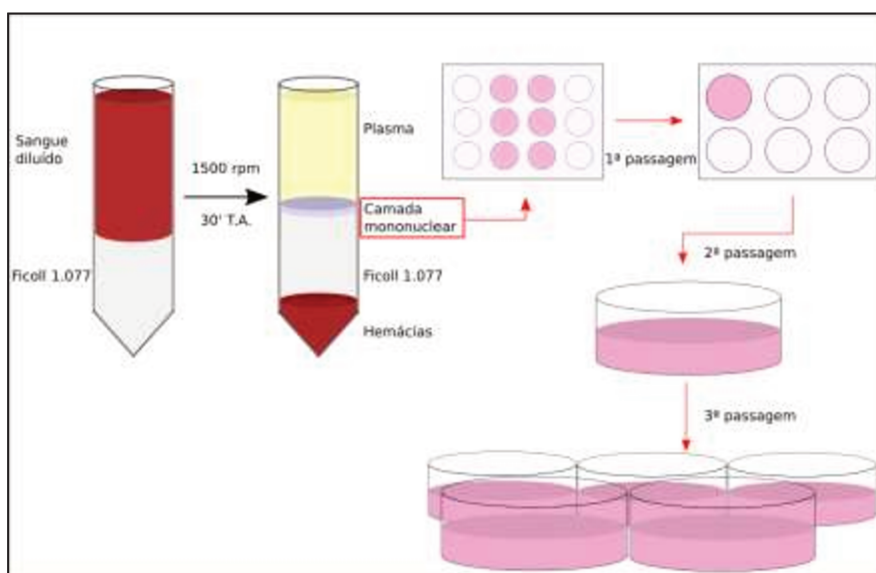


Figura 4. Representação esquemática da cultura de CEFCs.

5.1.1 Caracterização das CEFCs

A caracterização das CEFCs foi realizada pela identificação da morfologia *cobblestone* e citometria de fluxo. As células com a morfologia *cobblestone* foram submetidas a citometria de fluxo para detecção de marcadores endoteliais presentes na superfície. Os anticorpos específicos conjugados a fluorocromos utilizados foram: anti-CD31- FITC Conjugate Human (Life Technologies Corp USA), anti-CD144-PE, IO Test (Beckmann Coulter, Inc, France), anti-CD146 (BD Pharmingen, PE Mouse Anti-Human, San Jose, CA, EUA), anti-VEGF R2/KDR-PE, clone 89106 (R&DSsystems, Minneapolis, MN, EUA), anti-CD34-FITC, clone My10 (BD, San Jose, CA, EUA), anti-CD45- PerCP, clone 2D1 (BD, San Jose, CA, EUA), anti-CD133-APC, clone AC 133 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, EUA). A análise foi realizada no software BD FACS DIVA 7.9 (BD, San Jose, CA, EUA).

Ao final da terceira passagem as células foram tripsinizadas e o sedimento de células foi ressuspensionado em PBS. Uma suspensão de 100 µl foi distribuída em quatro tubos para citometria e em seguida foram adicionados os anticorpos específicos, conforme o painel de cores descrito abaixo:

Tubo 1: somente células

Tubo 2: CD45-PerCP (5µl), CD133-APC (5µl), CD31- FITC (5µl), CD146- PE (2µl).

Tubo 3: CD34- FITC (5µl), KDR- PE (5µl).

Tubo 4: CD144- PE (5µl), CD 34- FITC (5µl).

Após 30 minutos de incubação a 4°C e protegidas da luz, as amostras foram lavadas com 500µl de PBS, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a TA. Ao sedimento foram adicionados 300 µl de paraformaldeído 1% em PBS e armazenado a 4°C até a leitura.

Para detecção da fluorescência foi utilizado o citômetro de fluxo (FACS Calibur, Immunofluorometry systems, MountainView, CA, USA). A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo (TREE STAR, Inc.- USA). As células foram caracterizadas como CEFCs quando a expressão dos marcadores CD31, CD146, CD144, VEGFR-2 / KDR foram positivos, expressão diminuída de CD34 (positivo/ negativo) e negativo para CD45 e CD133.

5.2. Extração de RNA

Para a extração de RNA, também ao final da terceira passagem as células foram tripsinizadas e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de Trizol (Life Technologies, MD, EUA) e mantidos em freezer -80 °C até a próxima etapa da extração de RNA.

Etapas de extração: Após descongelamento, a solução de células mais Trizol foi incubada por 5 minutos a TA (15-30°C), em seguida foram acrescentados 200 µl de clorofórmio/mL de Trizol e após homogeneização por 15 segundos e incubação por 5 minutos a TA a solução foi centrifugada a 13.500 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um eppendorf e o RNA precipitado com 500 µl de isopropanol (CHOHCH₃)/mL de Trizol. Após agitação a solução foi incubada por 10 minutos a TA, centrifugada a 13.500 rpm por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi lavado com álcool 75% (no mínimo 1mL de álcool/mL de Trizol) e submetido a centrifugação a 11.800 rpm por 5 minutos a 4°C. Ao *pellet*, depois de seco por inversão, foi adicionada água tratada com o reagente dietil pirocarbonato (DEPC) para evitar a degradação do RNA.

O volume de água variou de acordo com o tamanho do *pellet*: *pellet* grande - 30µl; *pellet* pequeno – 20 µl; *pellet* muito pequeno 10µl. O tubo foi colocado com a tampa aberta para evaporar o álcool residual no banho-seco por 10 minutos a 55°C (para inativação de alguma RNase restante). Passados 10 minutos os tubos foram colocados no gelo, homogeneizados e após uma breve centrifugação deixada novamente no gelo por mais 30 minutos. Em seguida o RNA foi quantificado e armazenado no freezer -80°C.

5.2.1. Controle de qualidade do RNA

O RNA foi quantificado por meio de leitura da densidade óptica no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, CA, EUA), em comprimento de onda de 260 nm.

Depois de realizada a transcrição reversa e antes da reação em cadeia da polimerase (PCR) *Array*, todas as amostras foram submetidas à reação de qRT- PCR para o controle endógeno beta-actina (BAC) com o objetivo de avaliar a qualidade das amostras com relação à existência de contaminação por DNA (ácido desoxirribonucleico) genômico.

5.3 Síntese cDNA para *PCR Array*

Para a síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi utilizado o kit *RT2 First Strand* (SABiosciences, MD, EUA). Para cada amostra, 0,5 µg de RNA foi adicionado a 2 µl de tampão 5x de eliminação de DNA genômico e água livre de RNase para um volume final de 10 µl. A reação foi incubada a 42°C por 10 min, e em seguida colocada rapidamente no gelo por pelo menos 1 minuto. A mistura de transcrição reversa foi preparada com 4 µl de tampão (5x Buffer BC3), 2 µl da mistura da enzima (RE3 Reverse Transcriptase Mix), 1 µl de controle para *primer* (Control P2) e 3 µl de água livre de RNase. Esta mistura foi adicionada aos 10 µl da reação para eliminação de DNA genômico e incubado a 42°C por 15 min. Em seguida foi incubado a 95°C por 5 min para bloqueio da reação. Após a incubação, foram adicionados 91 µl de água livre de RNase e a mistura foi estocada a -20°C até ser realizado o *PCR array*. Todo o protocolo foi seguido conforme as instruções do fabricante. O cDNA foi quantificado por meio de leitura da densidade óptica no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, CA, EUA), em comprimento de onda de 260 nm.

5.4 *PCR Array*

Para a realização da *RT₂ PCR Array* (Qiagen, Maryland, EUA) foi realizada previamente a transcrição reversa para a síntese de cDNA. O *RT₂ Profiler PCR Array* (Qiagen, Maryland, EUA) é uma combinação da técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) e microarranjo que analisam vários genes simultaneamente. Para este estudo foi utilizada a placa de biologia das células endoteliais (*Human Endothelial Cell Biology- PCR Array* – Qiagen Maryland, EUA- PAHS-015ZC) representada no quadro 1.

Quadro 1. Genes representados na placa *Human Endothelial Cell Biology PCR Array*. RT² Profiler™ PCR Array Human Endothelial Cell Biology (PAHS -015ZC).

Array Layout											
ACE	ADAM17	AGT	AGTR1	ALOX5	ANGPT1	ANXA5	BAX	BCL2	BCL2A1	BCL2L1	CXCR5
A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
CASP1	CASP3	CASP6	CCL2	CCL5	CDH5	CFLAR	COL18A1	CPB2	CRADD	CSF2	CX3CL1
B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
TYMP	EDN1	EDN2	EDNRA	FAS	FASLG	FGF1	FLT1	FN1	ICAM1	IFNB1	IL11
C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
IL1B	IL3	IL6	IL7	ITGA5	ITGAV	ITGB1	ITGB3	KDR	KIT	KLK3	MMP1
D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
MMP2	MMP9	NOS2	NOS3	NPPB	NPR1	OCLN	PDGFRA	PECAM1	PF4	PGF	PLA2G4C
E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
PLAT	PLAU	PLG	PTGIS	RHOB	RIPK1	SELE	SELL	SELPLG	SERPINE1	SOD1	SPHK1
F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
TEK	TFPI	THBD	THBS1	TIMP1	TNF	TNFAIP3	TNFRSF10C	TNFSF10	VCAM1	VEGFA	VWF
G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC
H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

Nesta placa estão incluídos 84 genes envolvidos em 7 vias que podem estar ou não associadas ao AVCi, cinco controles endógenos, um controle de eliminação de DNA genômico, três controles de transcrição reversa, três controles positivos da PCR. Para a realização do *PCR Array* foi utilizado o kit *RT₂ SYBR Green Mastermix* do próprio fabricante da placa de *PCR Array* (Qiagen, Maryland, EUA). O reagente para detecção utilizado foi o *SYBR Green*, que é um corante composto por uma molécula que emite fluorescência ao intercalar com DNA de dupla fita. Para preparar a mistura da reação de qRT PCR foram utilizados 1350 µl do “2x *RT₂ SYBR Green Mastermix*”, 102 µl da síntese de cDNA e 1248 µl de água livre de RNase. Foi utilizada a placa de 96 poços, e em cada poço foram adicionados 25 µl da mistura (Figura 5).

O equipamento utilizado para detectar a expressão gênica foi o *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*, CA, EUA) e as condições dos ciclos foram: um ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Cada placa detecta a expressão gênica de uma amostra a ser analisada. As reações foram realizadas em duplicata para cada paciente.



Figura 5. Esquema do método de *PCR array* (Qiagen).

5.5 Análise dos dados obtidos do *PCR Array*

A partir dos resultados obtidos da placa de *PCR Array* em duplicata foram calculadas as médias das duas placas. Para comparar e expressão de cada gene foi utilizado o programa *RT₂ Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5* (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). O programa avaliou os dados e a expressão de cada gene foi calculada em relação aos controles endógenos β -actina (*ACTB*), β 2 Microglobulina (β 2M) e proteína ribossomal P0 (*RPLP0*).

O cálculo da expressão gênica foi realizado pela fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ que fornece os valores de *fold change*, ou seja, quantas vezes um gene de paciente com AVCi é mais ou menos expresso em comparação ao grupo sem AVCi.

5.6 Validação da *PCR Array*

Os resultados obtidos no *RT₂ PCR Array* foram validados pelo método *Quantitative Real-Time PCR* (qRT-PCR). Para tanto, foram selecionados dez genes que se mostraram diferencialmente expressos no grupo com AVC em relação aos sem AVC (cinco super expressos e cinco sub expressos). Para selecionar os genes duas variáveis foram consideradas, o valor de *fold change* (diferença de expressão de 2 vezes tanto para expressão aumentada como para diminuída) e o valor de p (p valores < 0,05 foram considerados significantes).

5.7 qRT PCR

5.7.1 Síntese de cDNA

As amostras de RNA (1µg) foram tratadas com DNAaseI (Fermentas –*Thermo Scientific*, Carlsbad, CA, USA), por 30 minutos a 37°C para a remoção de DNA contaminante. A reação foi interrompida com a adição de EDTA e incubação a 65°C por 10 minutos. Em seguida foram adicionados oligo dT (liga-se a cauda poli-A do RNA mensageiro) e incubados por 5 minutos a 65°C. Foram então adicionados os reagentes: dNTPs (necessários para a formação da fita a ser sintetizada) e a transcriptase reversa (responsável pela síntese da cadeia de cDNA) e a reação foi incubada por 60 minutos a 42°C. Uma nova incubação foi realizada por 5 minutos a 70 °C para inativação da enzima transcriptase reversa.

5.7.2 Desenho dos *primers*

Para a realização do método qRT-PCR foram desenhados *primers* para amplificação dos genes selecionados através do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os *primers* foram desenhados por meio do programa *Primer Express* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gerando produtos de amplificação entre 60 e 150 pb na temperatura de anelamento de 60°C. Em seguida as sequências foram submetidas aos programas Blast (www.ncbi.nlm.gov/blast) para a confirmação da homologia do gene. A formação de estruturas como *hairpins* e *dimers* foi avaliada pelo programa Gene Runner v.3.1 (<http://generunner.net>). Os *primers* utilizados estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para validação da *PCR Array*.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento(pb)	[] <i>primer</i>
<i>CCL-2</i>	F: 5'-GCTCAGCCAGATGCAATCAAT-3' R: 5'-CACTTGCTGCTGGTGATTCTTC-3'	110	300nM
<i>FLT-1</i>	F: 5'-GAAAACGCATAATCTGGGACAG-3' R: 5'-CTATGATTGTATTGGTTTGTCTGATG-3'	150	300nM
<i>ICAM-1</i>	F: 5'-GGAAATACTGAAACTTGCTGCCTA-3' R: 5'-ACACATGTCTATGGAGGGCCAC-3'	81	150nM
<i>IL-6</i>	F: 5'-CCAGGAGCCCAGCTATGAAC-3' R: 5'-CCCAGGGAGAAGGCAACTG-3'	64	70nM
<i>KDR</i>	F: 5'-TGAAAGAAGGAGCAACACACAG-3' R: 5'-AGAATTCCACAATCACCATGAGT-3'	147	150nM
<i>MMP-1</i>	F: 5'-CAAGCCATATATGGACGTTCC-3' R: 5'-CGCATGTAGAATCTGTCTTTAAAGA-3'	143	300nM
<i>PGF</i>	F: 5'-GAGGTGGAGCACATGTTTCAGC-3' R: 5'-GATCTTTAGGAGCTGCATGGTG-3'	126	70nM
<i>PROCR</i>	F: 5'-GAAAACACGAAAGGGAGCCA-3' R: 5'-CTACAGCCACACCAGCAATGAT-3'	94	70nM
<i>SELPLG</i>	F: 5'-GCTGGTGCCATGCCTCTG-3' R: 5'-GGCTTTCTCGGCTTCATCTG-3'	102	150nM
<i>TNFSF10</i>	F: 5'-TGAAGCAGATGCAGGACAAGTAC-3' R: 5'-TCTTTCTAACGAGCTGACGGAG-3'	147	300nM
<i>BAC</i>	F: 5'-TGACCCAGATCATGTTTGAGACC-3' R: 5'-CAGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'	81	150nM
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AAGATCATCAGCAATGCCTCCT-3' R: 5'-GGTCATGAGTCCTTCCACGATAC-3'	96	150nM

F: Forward, R: Reverse, []: concentração

5.7.3 Padronização

As concentrações ideais dos *primers* foram definidas a partir de reações contendo cada um dos *primers* selecionados nas concentrações finais de 70 nM, 150 nM e 300 nM. A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (*cycle threshold*), ou seja, a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente. As reações de qPCR foram feitas em triplicata e o sistema de detecção utilizado foi o kit *SYBRTM Green PCR Master Mix®* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) que contém todos os reagentes necessários para a PCR. A detecção da amplificação também foi realizada no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystem, CA, EUA). A concentração ideal de cada *primer* consta na tabela 3.

Para haver eficiência na reação, os resultados da qRT PCR devem ser confiáveis e reprodutíveis. A eficiência foi analisada a partir de uma reação utilizando-se a concentração de *primers* selecionada e diluições seriadas de uma amostra, obtendo-se uma curva cujo valor

da inclinação (*slope*) é aplicado a fórmula $[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100 = 100\%$, resultando no valor percentual de eficiência de reação. Foram aceitas como ótimas as curvas que apresentaram valores entre 99 e 100%, correlação acima de 0,98 e *cut-off* de 35,0. Um exemplo pode ser visualizado na Figura 6.

A expressão dos genes foi determinada de forma relativa utilizando-se a fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, sendo os valores de expressão normalizados em relação a média dos controles endógenos *BAC* e *GAPDH*.

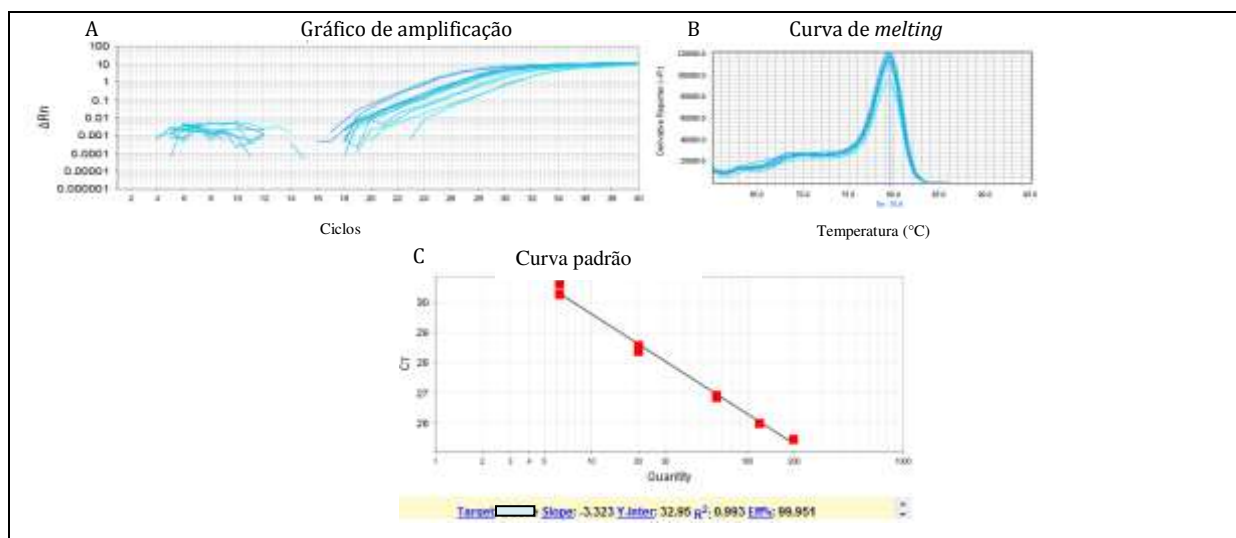


Figura 6. Padronização dos primers que amplificam o gene *MMP-1*. A figura mostra a curva de diluição em seis concentrações de cDNA (6,32 ng, 20,0 ng, 63,26 ng, 120,0 ng, 200,0 ng e 632,6 ng) (A) e a curva de *melting* dos *primers* (79,6°C) (B), indicando a especificidade da amplificação e a curva de eficiência > 99% (C).

5.7.4 Reação de qRT-PCR

Para todas as amostras foram realizadas reações com 12 µl de volume final; sendo 6,0 µl do reagente SYBR Green PCR Master Mix 1x, 3,0 µl da mistura de amostra de cDNA (10 ng/µl de concentração final) e 3,0 µl do mistura do *primer*. Foi feito controle negativo para cada *primer* analisado, ou seja, os 3,0 µl da mistura de amostra de cDNA foram substituídos por 3,0 µl de água estéril a fim de avaliar eventual contaminação dos *primers*. O programa foi iniciado a 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/15 s e 60°C/1 min. Posteriormente, adicionou-se um passo de 20 min, no qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C.

5.7.5 Análise estatística

Todas as análises das reações de qRT-PCR foram realizadas a partir da quantificação relativa baseada na fórmula de ΔCt . A expressão gênica foi quantificada usando o programa geNorm, e os níveis de RNAm de cada gene foram normalizados em relação aos controles endógenos (BAC e GAPDH). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os gráficos e os cálculos foram obtidos por meio do programa *GraphPad Prism 4* (*GraphPad Software, Inc.*). Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.8 Sequenciamento do gene *MMP-1*

5.8.1 Obtenção das amostras de sangue e extração de DNA

Foram obtidos de 4 a 8 ml de sangue periférico de todos os pacientes, em frasco estéril contendo EDTA 10% como anticoagulante. As amostras de DNA foram extraídas com a utilização do *QIAamp DNA Blood kit* (Qiagen, Inc., Valencia, CA), segundo as instruções do fabricante.

5.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A região promotora do gene *MMP-1* foi amplificada através da reação em cadeia da polimerase. Para todas as reações, a PCR foi preparada com 40-100 ng de DNA genômico, 25 pmoles dos *primers* direto e reverso, 75 pmoles de desoxinucleotídeos (dNTP), tampão enzima 1x (Tampão 10X: Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM), 0,1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água ultrapura para completar o volume de 25 μ l.

As amostras foram amplificadas em aparelhos termocicladores *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto; 35 ciclos a 94°C por 1 minuto; anelamento dos iniciadores em temperaturas específicas para cada região por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando com extensão a 72 °C por 7 minutos.

Os *primers* foram desenhados de acordo com sequências de referência das regiões de interesse depositadas no banco de dados Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), utilizando-se o programa *Primer3Plus* (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>).

Os oligonucleotídeos obtidos foram confirmados pelos programas *PCR in silico* do *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) e *Primer Blast NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) As sequências dos *primers* utilizados estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências dos *primers* utilizados para sequenciamento da região promotora do gene *MMP-1*.

Gene	Sequências dos <i>primers</i>	Tamanhos dos fragmentos (pb)
<i>MMP-1</i> - <i>Fragmento 1</i>	F: 5'-AGTCACGCTCAGTCTCTTTCCAG-3' R: 5'- GAGACACACTCTGCCATGTAAACA -3'	856
<i>MMP-1</i> - <i>Fragmento 2</i>	F: 5'-TAGCACTTTATGACCATCAGAACC-3' R: 5'- TTCACTCTCACCTCCAACCTGGA -3'	711
<i>MMP-1</i> - <i>rs1799750</i>	F: 5'- CTCATGCCCCACTCTCCTTC -3' R:5'-TGGTCACATGCTGCTTTCCT -3'	611

pb: pares de bases

5.8.3 Sequenciamento da região promotora do gene *MMP-1*

Considerando que o gene *MMP-1* apresentou expressão aumentada em relação aos demais genes estudados, analisou-se se tal aumento estava associado a alguma variante localizada na região promotora do gene. Para tanto realizamos o sequenciamento desta região pelo método de Sanger. Foram analisadas as mesmas amostras submetidas a avaliação pelo PCR Array, além de 9 amostras de pacientes com AVCi e 19 de pacientes sem AVCi. No total, foram avaliadas por sequenciamento 13 amostras de pacientes SS com AVCi e 25 amostras de indivíduos SS sem AVCi. As amostras adicionais testadas também foram obtidas a partir do grupo de pacientes com anemia falciforme atendidos no Hemocentro da UNICAMP.

Dentre as variantes analisadas quatro já foram associadas a doença vascular ou ao AVC, sendo elas: rs498186, rs475007, rs514921 e rs494379) (126,127). A variante rs1799750 foi incluída posteriormente e apenas foi analisada nas quatro amostras de pacientes com AVCi e seis pacientes sem AVCi da casuística.

As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos *primers* utilizados na reação de PCR. Os reagentes utilizados para a reação de sequenciamento foram o produto da PCR purificado (40ng); "Big Dye" 2x (ABI PRISM Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); tampão "Save Money" 1x (fornecido pelo mesmo fabricante do Big Dye), *primer* direto ou reverso (5 pmol) e água

ultrapura para completar o volume da reação final para 20 µl. As condições da reação de sequenciamento foram: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida por 30 ciclos de 96°C por 12 segundos, 50°C por 6 segundos e 60°C por 4 minutos.

Para a purificação as amostras foram precipitadas com 80µl de etanol 80% e centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado, seguido da adição de 150µl de etanol 70%. Foi realizada nova centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos. Para finalizar o sobrenadante foi descartado e as amostras foram para secagem por 3 minutos a 64°C. O produto da reação de sequenciamento foi ressuspendido em 10µl de formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo agitado e posteriormente desnaturado a 94°C por 5 minutos. As leituras das sequências de bases nitrogenadas dos fragmentos foram realizadas em sequenciador automático *ABI PRISM 3700 DNA Analyzers* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA).

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências de referência com auxílio dos programas *Chromas Lite®v 2.5.1* (Technelysium Pty Ltd. <http://www.technelysium.com.br/chromas_lite.html>) e *CLC Sequence Viewer v 6.5.1* (CLC bio A / S. <<https://clcbio.com/download>>).

5.9 qRT-PCR do gene *MMP-1* em amostras de leucócitos

Foi realizada a análise por qRT-PCR da expressão de *MMP-1* em leucócitos de sangue periférico de pacientes incluídos na casuística para verificar se a expressão aumentada do gene *MMP-1* identificada nas amostras de CEFC dos pacientes com AVCi também ocorreria nos leucócitos desses pacientes. Inicialmente foram testados apenas 4 pacientes SS da casuística, três com AVCi e um sem AVCi. O protocolo para obtenção de cDNA, *primers* utilizados, assim como a realização de *PCR Array* seguiu o protocolo já descrito acima.

5.10 Western Blot para detecção da proteína MMP-1

A fim de detectar a proteína MMP-1 e verificar a expressão da mesma, realizamos a análise por *Western blot*. Primeiramente realizamos a extração de proteínas e em seguida a quantificação.

5.10.1 Extração de proteínas

Amostras de *pellet* de CEFCs de cada paciente foram lavadas 2x com PBS por centrifugação por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da extração. Para o procedimento de extração as amostras foram colocadas em banho de gelo para descongelamento gradativo. Ao *pellet* descongelado foi adicionado 1 mL de tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, NP-40 1% e desoxicolato de sódio 0,5%) e em seguida acrescentados os inibidores de proteases (10 µl/mL de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100mM, 10 mM de ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) 100 mM, 1 µl /ml de leupeptina 1mg/ml e 1µl/ml de pepstatina 1mg/ml). As amostras permaneceram no gelo por 40 minutos e em seguida foram submetidas a centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (proteína) foi coletado e o *pellet* desprezado.

5.10.2 Quantificação das proteínas- método Bradford

Curva padrão: foram preparados 200µl de BSA (Albumina de soro bovino) (1mg/mL) e a partir desta solução foram realizadas diluições seriadas conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5 – Diluição do BSA para produzir uma curva padrão.

Poço	H ₂ O	BSA
<i>A</i>	220 µl	20 µl
<i>B</i>	230 µl	10 µl
<i>C</i>	232 µl	8 µl
<i>D</i>	234 µl	6 µl
<i>E</i>	236 µl	4 µl
<i>F</i>	238 µl	2µl
<i>G</i>	239 µl	1µl
<i>H</i>	240 µl	0

Na placa de 96 poços a solução acima foi adicionada a diluição de BSA nas fileiras 1 e 2 para construção da curva padrão. Em seguida, nas fileiras 3 e 4 foram adicionados 60 µl da solução de Bradford (Kit Bio- Rad Protein Assay (Sigma Aldrich, CA, USA), 239 µl de água ultrapura, e 1µl de cada amostra. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente e medida colorimetricamente no leitor de ELISA a 595 nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA), utilizando-se o programa Softmax pro.

5.10.3 Western Blot

Quantidades proteicas iguais a 50µg de cada paciente foram adicionadas a 20µl de solução de Liming 1x (1 ml Liming 5x + 100 µl mercaptoetanol) e aplicadas em géis de poliacrilamida SDS- PAGE 10%, por meio do qual as proteínas migram permitindo a separação de forma homogênea. A seguir foi aplicado também um marcador de peso molecular *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific, Flórida, Rockford, EUA) para estimar o peso molecular da proteína nas amostras. Foi acrescentado um tampão de corrida do gel na cuba para permitir a migração das proteínas em direção ao polo positivo sob um campo elétrico. A seguir foi realizada uma incubação a uma amperagem de 60, 80 e 100 volts por 120 minutos para garantir a separação das bandas. Decorrido este tempo foi realizada a transferência eletroforética das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose a 100 volts por 90 minutos em gelo. Para verificar se houve a transferência das proteínas de todas as amostras para a membrana foi adicionado o corante Ponceau S (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). Em seguida foram realizadas várias lavagens com tampão TBST a 10 mmol/L (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, NP-40 1% e desoxicolato de sódio 0,5%) ara retirar todo o corante. Foi adicionada a solução de bloqueio 5% (5% leite + 20 ml TBST), seguida de homogeneização por 1 hora sob agitação.

A fim de visualizar a proteína de interesse MMP-1, foi utilizado um anticorpo específico que reage com um epítipo da proteína, formando um complexo anticorpo-antígeno. Esse anticorpo é denominado primário e utilizou-se o anti- MMP-1 mouse monoclonal (clone 3A9.3; ab38923 Abcam, Cambridge, UK) na diluição 1:5.000, seguido de incubação “overnight” a 4°C. No dia seguinte, após 3 lavagens com TBST para garantir a retirada de anticorpos inespecíficos, foi adicionado o anticorpo secundário anti-mouse [*Goat Anti- Mouse IgG, HRP conjugate (KPL-074-1806)* - Santa Cruz Biotechnology, California, EUA] na diluição 1:5.000 e procedeu-se com a incubação a temperatura ambiente por uma hora.

As imunoreatividades foram visualizadas pelo *ECL Chemiluminescent Western Blotting Analysis System* (Thermo Fisher, Rockford, IL, EUA).

Controle endógeno: Foi utilizado como controle endógeno o anti GAPDH- mouse C65, (SC 32233, Santa Cruz Biotechnology, California, US) na diluição 1:5.000. As membranas foram incubadas novamente “overnight” a 4°C e a seguir foram realizadas 3 lavagens com TBST com solução de leite 2,5%. Foi adicionado anticorpo secundário anti-mouse (*Goat Anti-*

Mouse IgG, HRP conjugate (KPL-074-1806) - Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) na diluição 1:5.000 e incubado a temperatura ambiente por uma hora.

A seguir as membranas foram submetidas a incubação a temperatura ambiente por uma hora e em seguida foram realizadas 3 lavagens com TBST. A imunoreatividade foi realizada com revelador *ECL Chemiluminescent Western Blotting Analysis System* (Thermo Fisher, Rockford, IL, EUA) em câmara escura, sendo a membrana incubada por 2 minutos e em seguida ocorreu a visualização das bandas da proteína específica. Para detecção da proteína de interesse utilizou-se o sistema *Amersham ECL Western Blotting Systems* (GE Healthcare, Pierce, Rockford, USA), segundo o protocolo do fabricante.

5.10.4 Análise estatística

Para a análise da densitometria das bandas foi utilizado o programa UN- SCAN-IT. Para comparação da expressão da proteína MMP-1 entre os grupos com AVCi e sem AVCi foi utilizado o teste de Mann- Whitney e o valor de p. O cálculo da média $\pm$ DP e construção dos gráficos foi utilizado o programa Graph Pad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)

6.0 RESULTADOS

6.1 Resultados da caracterização das CEFCs por citometria de fluxo

Neste estudo, propomos investigar a expressão diferencial de genes relacionados a biologia das CE por *PCR Array*. A cultura de CEFCs foi realizada em 4 pacientes com AVCi e 6 indivíduos sem AVCi com anemia falciforme. Para este experimento houve sucesso em todas as culturas dos pacientes. As primeiras colônias surgiram em torno de 9 a 21 dias. O tempo médio de expansão das CEFCs para caracterização foi de aproximadamente 33 dias (23 a 45 dias) com morfologia *cobblestone* e 85-90% de confluência. Foram consideradas CEFCs as células positivas para os marcadores endoteliais: CD31, CD144, CD146 e VEGFR-2/KDR, negativas para CD 45 (marcador de leucócitos) e CD133 (marcador de células progenitora endotelial) e positivo/ negativo para CD34 (65) (Figura 7).

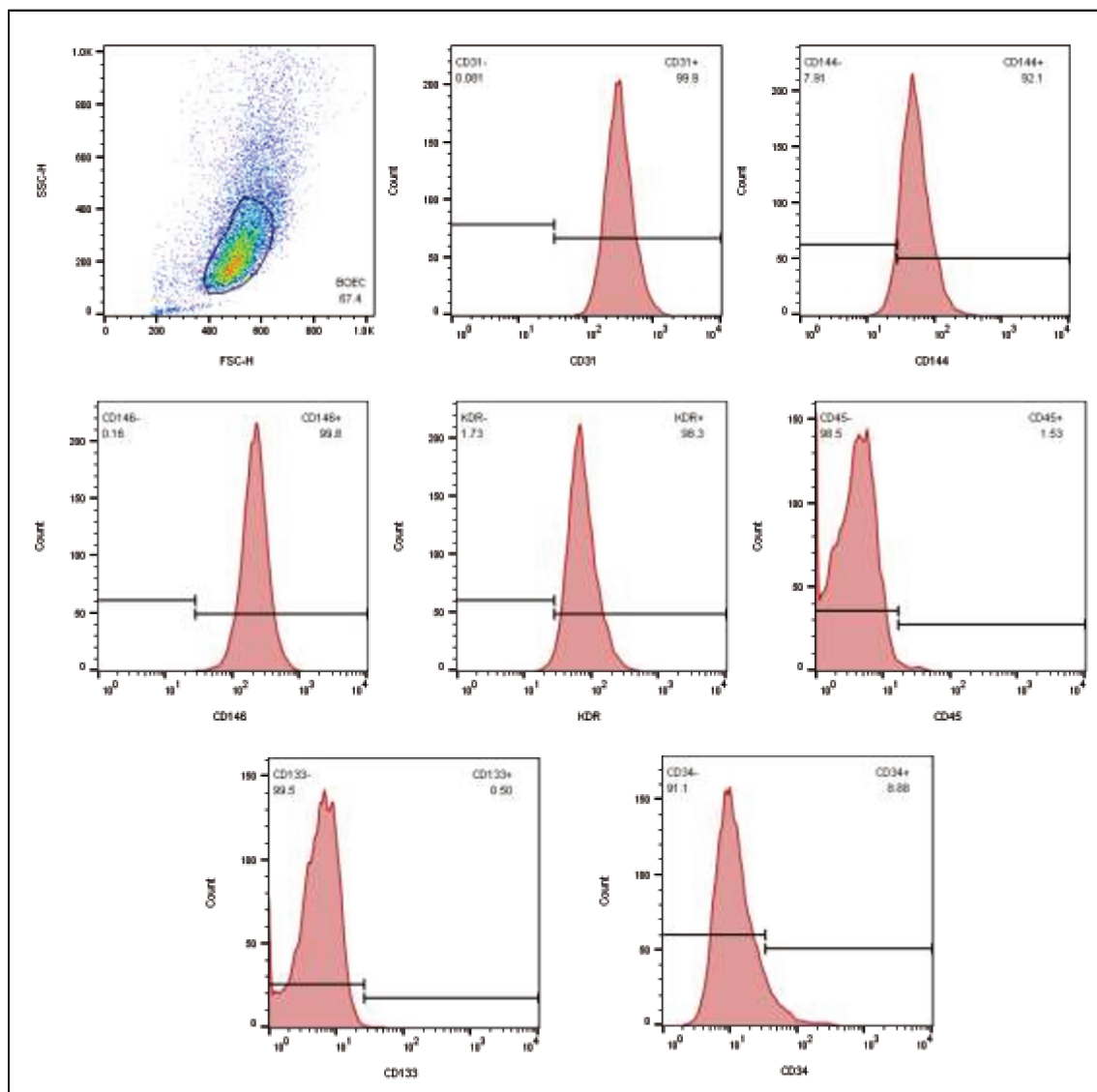


Figura 7.. Caracterização de CEFC por citometria de fluxo. O primeiro quadro mostra delimitação da população de CEFCs a ser analisada para construção do histograma. Nos quadros seguintes as CEFCs expressam os marcadores de células endoteliais: CD31, CD144, CD146 e KDR positivos e CD45, CD133 negativos e CD34 positivo/negativo. Os histogramas são baseados em cultura de CEFCs de um indivíduo controle em 35 dias de cultura, sendo representativo para os 4 pacientes com AVCi e para os 6 indivíduos sem AVCi.

6.2. Resultados do PCR Array

Dos 84 genes analisados, 29 apresentaram diferença de expressão no grupo com AVCi em relação ao grupo sem AVCi: Desses, 11 genes foram mais expressos (Tabela 6) e 18 genes foram menos expressos (Tabela 7). Destacamos que entre os mais expressos foram considerados estatisticamente significantes ($p < 0.05$) os genes *FLT-1*, *PGF*, *MMP-1* e *PROCR* observando que a via angiogênica tem participação importante dentre os pacientes com AVCi

e interessante uma expressão consideravelmente aumentada do *MMP-1*. Entre os genes menos expressos foram detectados o *ICAM-1*, *SELPLG*, *KDR* e *TNFSF1*, destacando as vias de angiogênese e adesão celular. Todas as análises foram realizadas em duplicata para cada paciente.

Tabela 6: Genes relacionados a biologia das CE mais expressos em pacientes com AF e AVCi em relação ao grupo sem AVCi.

Gene	Fold change	p-valor	Via envolvida
<i>PF4</i>	5.02	0.0680	Angiogênese
<i>KIT</i>	3.72	0.8006	Angiogênese
<i>FLT-1</i>	3.49	0.0218*	Angiogênese
<i>PGF</i>	2.93	0.0150*	Angiogênese
<i>PLAU</i>	2.52	0.8081	Angiogênese
<i>THBD</i>	2.08	0.1683	Ativação de plaquetas
<i>MMP-1</i>	204.64	0.0004**	Angiogênese/Coagulação
<i>PLAT</i>	3.85	0.3670	Coagulação
<i>PROCR</i>	1.64	0.0479*	Coagulação
<i>IL-6</i>	3.05	0.4405	Resposta inflamatória
<i>IL1B</i>	2.20	0.2231	Resposta inflamatória

p valor: *p<0.05 e **p<0.01. Em negrito encontram-se os genes significativamente mais expressos no grupo com AVCi em relação ao grupo sem AVCi.

Tabela 7. Genes relacionados a biologia das CE menos expressos em pacientes com AF e AVCi em relação sem AVCi.

Gene	Fold change	p-valor	Via envolvida
<i>SELE</i>	-6.79	0.2093	Adesão celular
<i>ICAM-1</i>	-2.83	0.0531	Adesão celular
<i>SELPLG</i>	-2.29	0.0090**	Adesão celular
<i>SELL</i>	-2.27	0.2139	Adesão celular
<i>CCL-2</i>	-4.01	0.0799	Angiogênese
<i>MMP-9</i>	-2.67	0.1141	Angiogênese
<i>CCL-5</i>	-2.64	0.3832	Angiogênese
<i>TYMP</i>	-2.50	0.0860	Angiogênese
<i>KDR</i>	-1.62	0.0360*	Angiogênese
<i>IL-7</i>	-42.71	0.2101	Apoptose
<i>TNFSF10</i>	-13.34	0.0253*	Apoptose
<i>TNF</i>	-5.00	0.3930	Apoptose
<i>OCN</i>	-2.16	0.2451	Apoptose
<i>EDNRA</i>	-2.12	0.2611	Apoptose
<i>TFPI</i>	-2.33	0.1797	Coagulação
<i>APOE</i>	-3.06	0.2442	Resposta inflamatória
<i>CX3CL1</i>	-5.36	0.1323	Vasoconstrição e vasodilatação
<i>ACE</i>	-3.41	0.1797	Vasoconstrição e vasodilatação

p valor: *p<0.05 e **p<0.01. Em negrito encontram-se os genes significativamente menos expressos no grupo com AVC em relação ao grupo sem AVC.

6.3. Resultados da validação por qRT-PCR

Baseado nos resultados de *PCR Array*, foram selecionados 5 genes mais expressos (*FLT-1*, *PGF*, *MMP-1*, *PROCR* e *IL-6*) e 5 menos expressos (*ICAM-1*, *SELPLG*, *CCL-2*, *KDR* e *TNFSF10*) para validação por qRT-PCR. O gene *ICAM-1* foi incluído na validação por apresentar valor de *p* próximo de 0,05. Além disso, exerce importante papel no AVCi e está relacionado a inflamação neurovascular participando de uma complexa via de sinalização e adesão celular. Para validação a expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa e os valores de expressão foram normalizados em relação aos controles endógenos *BAC* e *GAPDH*.

Todos os resultados obtidos por qRT-PCR foram compatíveis aos obtidos anteriormente por *PCR Array*, com exceção do *SELPLG*, que apresentou resultados opostos na validação por qRT-PCR e *PCR Array*. Dentre estes genes foram considerados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram *p* valor <0,05 tanto no *PCR Array* como na validação por qRT-PCR. Dentre os genes mais expressos destacam-se os genes *PGF* e *MMP-1* (Tabela 8), e dentre os menos expressos, o *ICAM-1* e o *TNFSF10* (Tabela 9). Os gráficos elaborados mostram os resultados obtidos a partir da validação, durante a qual comparamos a expressão gênica do grupo falciforme com AVCi em relação ao grupo sem AVCi. O programa utilizado foi o *GraphPad Prism 4* (*GraphPad Software, Inc.*) (Figuras 6 e 7).

Tabela 8. Validação dos resultados dos genes mais expressos obtidos a partir do *PCR Array* em pacientes com AF e AVCi.

<i>Gene</i>	<i>PCR Array</i>		qRT PCR-Validação	
	Fold change	p-valor	Fold change	p-valor
<i>FLT-1</i>	3.49	0.021821*	2.60	0.1714
<i>PGF</i>	2.93	0.015078*	3.68	0.0095**
<i>MMP-1</i>	204.64	0.000428**	21.66	0.0095**
<i>PROCR</i>	1.64	0.047928*	2.04	0.4762
<i>IL-6</i>	3.05	0.440533	1.74	1.0000

p valor: **p*<0.05 e ***p*<0.01. Em negrito estão destacados os genes mais expressos com *p*-valor significativo no *PCR Array* e qRT PCR.

Tabela 9. Validação dos resultados dos genes menos expressos obtidos a partir do PCR Array em pacientes com AF e AVCi.

Gene	PCR Array		qRT PCR-Validação	
	Fold change	p-valor	Fold change	p-valor
<i>ICAM-1</i>	-2.83	0.053111	-6.45	0.0381*
<i>SELPLG</i>	-2.29	0.009066**	1.28	0.9143
<i>CCL-2</i>	-4.01	0.079924	-2.18	0.1143
<i>KDR</i>	-1.62	0.036005*	-3.03	0.4762
<i>TNFSF10</i>	-13.34	0.025398*	-4.64	0.0381*

p valor:*p<0.05 e **p<0.01. Em negrito estão destacados os genes menos expressos com p-valor significativo no PCR Array e qRT PCR

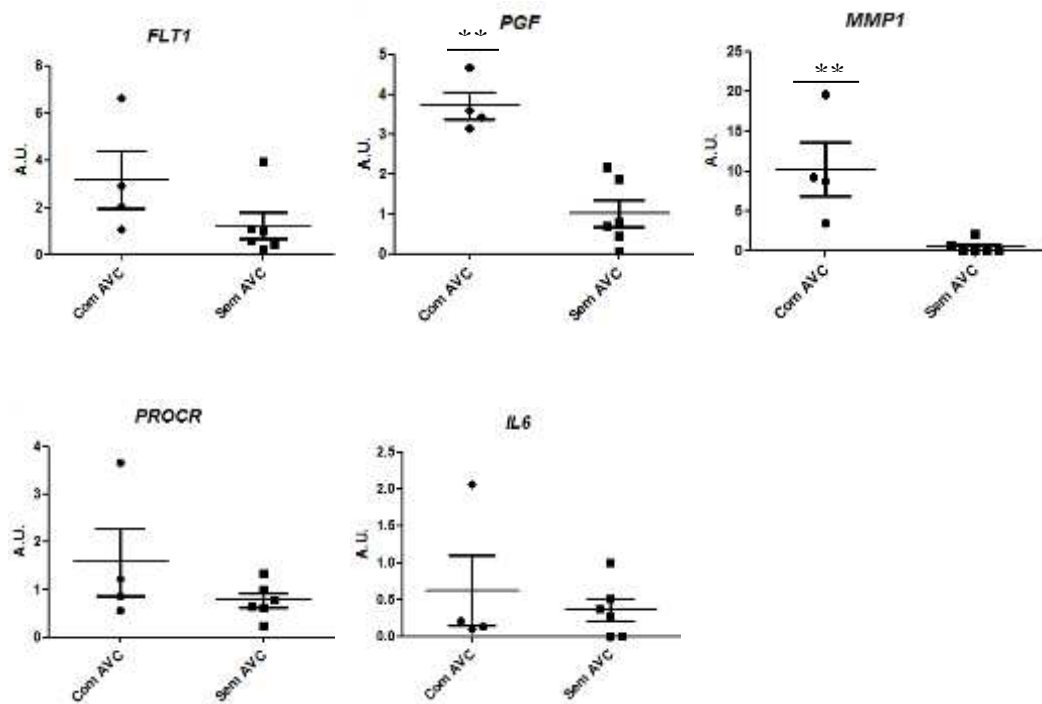


Figura 8. Representação gráfica dos genes mais expressos no grupo com AVCi em relação ao grupo sem AVCi- *FLT-1*, *PGF*, *MMP-1*, *PROCR* e *IL-6*.

**p<0.01.

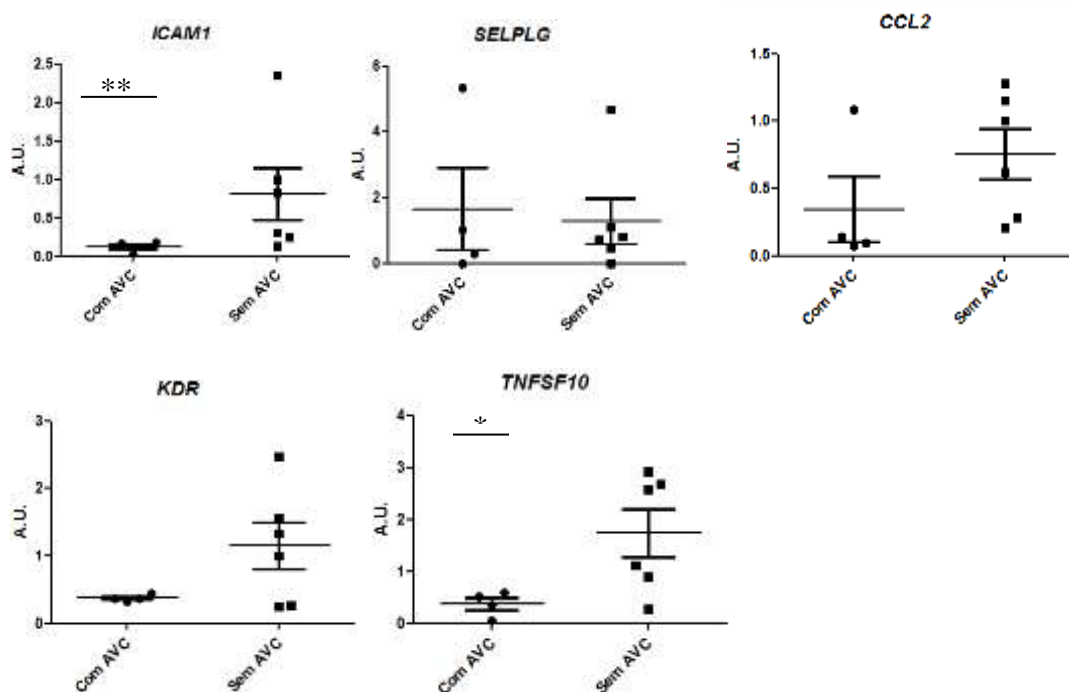


Figura 9. Representação gráfica dos genes menos expressos no grupo com AVCi em relação ao grupo sem AVCi- *ICAM-1*, *SELPLG*, *CCL-2*, *KDR* e *TNFSF10*.
* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

6.4. Resultados do sequenciamento da região promotora do gene *MMP-1*

A pesquisa das variantes na região promotora do gene *MMP-1* foi avaliada por meio de sequenciamento de Sanger de 13 pacientes com AVCi e 25 sem AVCi para as variantes rs498186, rs475007, rs514921 e rs494379 e para a análise da variante rs1799750 foram incluídos 4 pacientes com AVCi e 6 indivíduos sem AVCi com anemia falciforme (*) (Tabela 10). Esta análise foi realizada para verificar se algumas dessas variantes estavam associadas a suscetibilidade ao AVC.

Calculou-se as frequências alélicas de cada variante e p-valor. Os dados não apresentaram resultados estatisticamente significativos. Com os dados das frequências alélicas foi verificado se estas variantes estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e constatou-se que das variantes analisadas, somente duas não estavam em equilíbrio, rs514921 e rs 1799750.

Tabela 10. Frequência alélica e p-valor das variantes estudadas na região promotora do gene *MMP-1*.

Variante	Freq. Alélica Pop européia	Freq.alélica Pop africana	Freq alélica Com AVCi n=13	Freq. Alélica Sem AVCi n=25	p-valor (Fisher)
rs498186 A→C	A:52% C:48%	A:76% C:24%	A:65.38% C:34.62%	A:82% C:18%	0.1545
rs475007 A→T	A;56% T:44%	A;47% T:53%	A;38.46% T:61.54%	A;52% T:48%	0.3350
rs514921 A→G	A;70% G:30%	A;85% G:15%	A;88.46% G:11.54%	A;82% G:18%	0.5295
rs494379 A→G	A:68% G:32%	A:79% G:21%	A:53.85% G:46.15%	A:68% G:32%	0.3163
rs1799750 C/-	C;50% -:50%	C;48% -:52%	C:100% (*)	C:100% (*)	1.0

* Para a análise desta variante a casuística foi composta por 4 pacientes com AVCi e 6 indivíduos sem AVCi com anemia falciforme.

6.5 Resultados do qRT-PCR da *MMP-1* em amostras de leucócitos

A expressão do gene *MMP-1* foi investigada em leucócitos de sangue periférico de 3 pacientes com AVCi que apresentaram expressão aumentada em amostras de CEFCs e um paciente sem AVCi. Para esta análise foi adicionado também um controle negativo para garantir que não houve amplificação do primer ou contaminação e normalizados com o controle endógeno BAC.

Nenhuma das amostras analisadas apresentou expressão do gene *MMP-1* em leucócitos (Figura 10), já que este gene é pouco expresso nestas células.

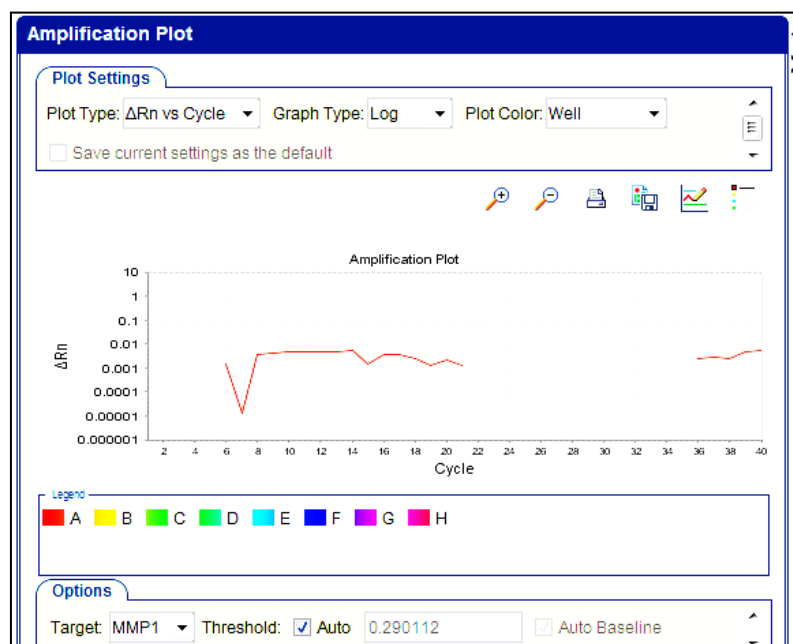


Figura 10: Representação da ausência de expressão do gene *MMP-1* em leucócitos dos pacientes portadores de anemia falciforme com e sem AVCi.

6.6 Western Blot - MMP-1

A técnica de *Western Blot* foi realizada para confirmar a expressão da proteína MMP-1 em amostras de CEFCs dos pacientes estudados. Dos quatro pacientes com AVCi, a expressão da proteína MMP-1 em CEFCs foi confirmada somente em 3 pacientes. Embora a expressão da MMP-1 tenha sido confirmada entre os pacientes com AVCi no PCR Array, não foi possível detectar a expressão em um paciente com AVCi devido ao não restabelecimento da cultura, não havendo proliferação das CEFCs. No entanto em 2 dos 6 pacientes sem AVCi analisados, a proteína MMP-1 foi detectada. Os resultados de PCR Array e qRT PCR também indicaram a expressão dessa proteína nestes dois pacientes. Nos outros 4 pacientes sem AVCi não houve expressão por PCR Array nem por *Western Blot*.

Os resultados de expressão proteica corroboraram com a expressão gênica do MMP-1 em ambas os métodos. Notamos a presença de duas bandas para MMP-1 conforme descritas na literatura (128). A banda superior é a forma latente, pró-MMP-1 com peso molecular de 62 KDa e a banda inferior o MMP-1 na forma ativa com 54 KDa. Para a análise quantitativa, foi realizada somente a quantificação da banda da forma ativa MMP-1.

A técnica de *Western Blot* foi repetida em mais de uma análise para todos os pacientes e os resultados foram confirmados.

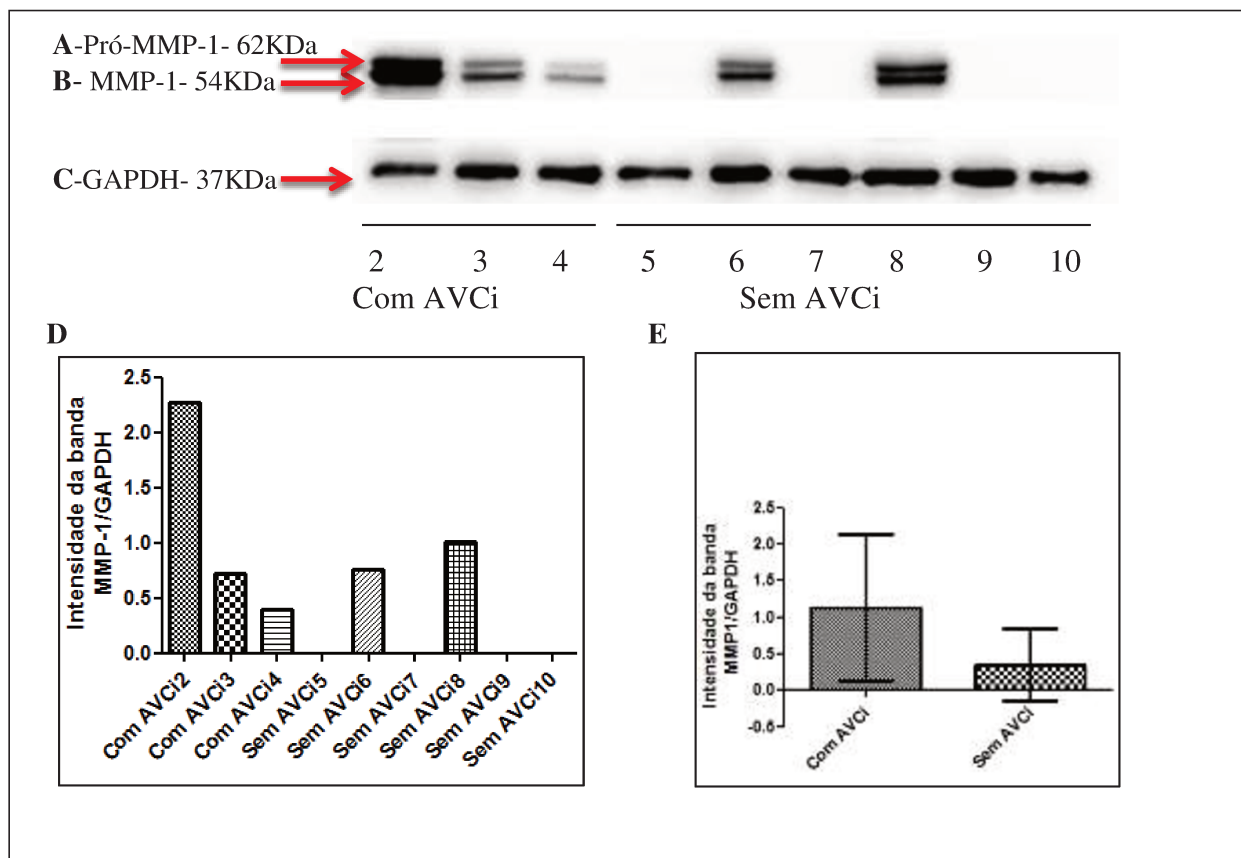


Figura 11: Representação do *Western Blot* - A: Detecção da Pró- MMP-1 – forma latente (62 KDa), B: Detecção da MMP-1-forma ativa (54KDa), C: Detecção do controle endógeno GAPDH, D- Análise da expressão da proteína MMP-1 nos pacientes com AVCi e sem AVCi em relação ao controle endógeno GAPDH. E: Análise da expressão da proteína MMP-1 nos pacientes com AVCi comparados com os indivíduos sem AVCi em relação ao controle endógeno GAPDH. Média $\pm$ DP com AVCi: 1.129 ± 0.9986 ; Média $\pm$ DP sem AVCi: 0.3519 ± 0.4895 .

6.7 Análise densitométrica das bandas da proteína MMP-1

Para a densitometria das bandas da membrana de *Western blot* foi utilizado o programa UN- SCAN-IT e foi quantificada a proteína MMP-1 de cada paciente e também do controle endógeno. Foi realizada uma comparação da intensidade da banda no grupo com AVCi e sem AVCi (figura 11) com dados normalizados com o controle endógeno GAPDH utilizando o programa Graph Pad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) através do teste estatístico de Mann- Whitney U para o cálculo p- valor (p- valor = 0.2619, média $\pm$ DP e construção dos gráficos.

7. DISCUSSÃO

A doença falciforme apresenta uma grande variabilidade fenotípica que se manifesta nas várias complicações apresentadas pelos pacientes. Algumas dessas variabilidades têm sido associadas a modificadores genéticos conhecidos ou suspeitos (129).

No presente estudo investigamos, por meio de *PCR Array*, a expressão diferencial de genes em vias que podem estar associadas ao risco ou a proteção ao AVCi em amostras de RNAs extraídos de CEFCs de pacientes com AF com história clínica de AVCi e sem AVCi.

Em resposta a estímulos como trauma ou hipóxia tecidual, CEPs são mobilizadas da medula óssea para o sangue periférico e consequentemente podem participar da regeneração e reparação das células endoteliais e dos processos de neovascularização tecidual. Em um contexto experimental e em humanos estudos demonstraram que a neovascularização está presente no cérebro de adultos após isquemia e que as CEPs participam da neovascularização cerebral em cérebro de camundongos adultos pós-isquemia. Observaram também que após um alto incremento de CEPs circulantes durante a primeira semana após o AVCi, obteve-se melhores resultados na recuperação. Estes resultados sugerem que as CEPs podem mediar processos de neuroreparação após isquemia cerebral, e que a suplementação exógena de CEPs em pacientes com AVC podem constituir uma nova e promissora estratégia terapêutica (130).

Entre os genes investigados, foram identificados 29 genes diferencialmente expressos. Cinco genes mais expressos (*FLT-1*, *PGF*, *MMP-1*, *PROCR* e *IL-6*) e cinco menos expressos (*ICAM-1*, *SELPLG*, *CCL-2*, *KDR* e *TNFSF10*) foram selecionados para validação por qRT-PCR. Apenas o gene *SELPLG* apresentou resultados conflitantes entre as técnicas utilizadas PCR-array (*Fold Change* igual a - 2,29 e p-valor 0.009066) e qRT-PCR (*Fold Change* igual a 1,28 e p-valor 0.9143). Uma das explicações possíveis para tal resultado pode estar relacionada a utilização de *primers* diferentes, uma vez que não temos as sequências utilizadas pelo fabricante do ensaio de *PCR Array*. Outra possível explicação é que no método de *PCR array*, é utilizado o mesmo protocolo para os 84 genes diferentes e, consequentemente, este pode não ser ideal para todos os genes. A utilização de outra técnica, como *Western blot*, poderia contribuir para esclarecer este resultado, porém esta análise não foi realizada para este gene neste estudo.

Dentre os 29 genes diferencialmente expressos, 11 foram mais expressos, dos quais a maioria são associados, principalmente, as vias de angiogênese (55%), resposta inflamatória (18%) e coagulação (18%). Menor expressão foi observada em 18 genes, sendo a maioria

associados principalmente as vias de angiogênese (28%), apoptose (28%) e adesão celular (22%).

A angiogênese é um processo complexo e finamente regulado, desencadeado pela hipóxia, e consiste no surgimento de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas vasculares pré-existent. Estudos em animais e humanos demonstraram que a angiogênese pode desempenhar um papel importante no AVC isquêmico agudo, melhorando a recuperação do tecido cerebral e o resultado funcional (131,132).

A angiogênese é um processo de progressão por etapas as quais incluem aumento na permeabilidade vascular, degradação da matriz circundante, proliferação e migração de células endoteliais e, finalmente, estabilização da angiogênese (133). Consequentemente, muitos genes estão envolvidos nesse fenômeno. Estudos anteriores mostraram que algumas moléculas angiogênicas estavam aumentadas após a isquemia cerebral, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores, angiopoietinas e seus receptores e outros peptídeos com propriedades angiogênicas (62,104,134,135). Portanto muitas outras moléculas, no entanto, podem influenciar esses fatores angiogênicos.

Dentre os genes mais expressos em pacientes falciformes com AVCi em comparação aos pacientes falciformes sem AVCi (*MMP-1*, *PF4*, *KIT*, *FLT-1*, *PGF*, *PLAU*), associados a via angiogênica, destaca-se o gene *MMP-1* que apresentou um aumento significativo de expressão gênica tanto por meio da técnica de *PCR Array* (*Fold Change* igual a 204.64 e p valor igual a 0.000428) como na validação por qRT PCR (*Fold Change* igual a 21,66 e p-valor 0,0095). Já se sabe que no AVC agudo, a primeira proteína MMP ativada durante a hipóxia é a MMP-2, seguida pela ativação da MMP-9 pela MMP-3 e pelos radicais livres gerados logo após a oclusão do vaso.

As MMPs ativas degradam a lâmina basal e as *tight junctions* das células endoteliais, afetando diretamente a integridade da BHE e levando a edema vasogênico, hemorragia, infiltração de leucócitos e reações inflamatórias progressivas (22,23). Zhang e colaboradores mostraram uma associação entre o nível sérico aumentado de MMP-1 em pacientes com diabetes com infarto cerebral agudo, indicando seu importante papel no desenvolvimento de infarto cerebral em pacientes diabéticos (136). Ainda, Wu e colaboradores mostraram o envolvimento da proteína MMP-1 na fisiopatologia da aterosclerose (137).

Embora as MMPs produzam efeitos danosos durante a fase isquêmica, elas são benéficas durante a fase de recuperação, que inclui a angiogênese e o restabelecimento do fluxo sanguíneo cerebral (22,24). Após o acidente vascular cerebral, o tecido isquêmico penumbral libera fatores angiogênicos que induzem a proliferação e migração de CEs para

formar novos vasos sanguíneos. A angiogênese requer a degradação da membrana basal vascular e a remodelação da MEC, a fim de permitir que os CEs migrem e invadam o tecido circundante, sendo, portanto, crucial a ação das MMPs nesse processo (138).

Não há na literatura, até o momento, estudos que indiquem o significado clínico da MMP-1 no AVCi em pacientes com AF. Alguns estudos têm investigado a associação da presença de algumas variantes na região promotora do gene *MMP-1* com fator de risco para AVCi e doença vascular na população, incluindo as variantes rs475007, rs498186, rs514921, rs494379 e rs1799750, porém com resultados ainda controversos (139).

Para investigar se tais variantes poderiam estar associadas ao alto nível de expressão deste gene, detectado em alguns pacientes incluídos na casuística desse estudo, foi realizado sequenciamento da região promotora das amostras de DNA de todos os pacientes. Os resultados obtidos não foram estatisticamente significantes indicando que não existe associação dessas variantes com aumento da expressão do gene *MMP-1*, nesses casos.

Interessantemente, a análise de expressão do gene *MMP-1* de cada paciente com AVCi por *qRT-PCR* detectou maior expressão deste gene em pacientes falciformes com AVCi em relação ao grupo sem AVCi ($p=0,0095$). Para confirmar esta expressão diferenciada realizou-se *Western Blot* somente da proteína MMP-1 em todos os pacientes. Os resultados também mostraram maior expressão da proteína MMP-1, porém não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,2619$) entre os grupos com AVC e sem AVC. Notou-se um aumento da expressão da proteína em dois pacientes sem AVCi, que já havia sido observada no teste de validação por *qRT-PCR*. Buscando informações clínicas dos pacientes observou-se que somente esses dois pacientes sem AVCi apresentavam hepatopatia.

As MMPs, juntamente com inibidores teciduais de MMPs, têm sido implicadas na patogênese de doenças do fígado. Embora, o mecanismo de ação preciso das MMPs em vários distúrbios relacionados ao fígado seja desconhecido, dados de diversos modelos experimentais indicam que essas proteinases influenciam as atividades celulares, incluindo proliferação e sobrevivência, angiogênese, expressão gênica, bem como múltiplos aspectos da inflamação (140).

Nossos resultados indicam que o gene *MMP-1* pode estar contribuindo para o processo de angiogênese em resposta a diferentes mecanismos de hipóxia presentes nos pacientes que apresentaram maior expressão deste gene, na tentativa de revascularizar a região não perfundida. Embora a casuística seja pequena é possível sugerir que a regulação positiva do *MMP-1* pode ser um biomarcador para esse processo. Ainda, o *MMP-1* parece ser marcador de prognóstico no AVCi e merece ser melhor estudado.

Além disso, nossos dados mostraram uma super expressão do gene *PGF* em pacientes com acidente vascular cerebral, quando comparado com pacientes sem acidente vascular cerebral, tanto na técnica de PCR Array (*Fold Change* igual a 2,93 e p valor igual a 0,0150) como na validação por qRT PCR (*Fold Change* igual a 3,68 e p-valor 0,0095).

Na isquemia cerebral, o gene *PGF* é super regulado em vasos e em torno da área infartada e neurônios (29). Foi hipotetizado que a proteína PGF contribui para a angiogênese em condições patológicas (29). *PGF* e *VEGFs* desempenham papéis importantes no desenvolvimento das funções normais do SNC e a expressão aumentada após lesão ativa várias vias de sinalização, alterando funções de apoptose, inflamação, angiogênese, diferenciação e proliferação celular (102,103). Como as MMPs estão claramente implicadas na angiogênese, nossos dados podem indicar uma possível associação entre *PGF* e *MMP-1* contribuindo com a angiogênese nos pacientes com anemia falciforme e AVC. No entanto, outros fatores angiogênicos associados ao *MMP-1* podem estar atuando nos pacientes sem AVC, uma vez que eles não apresentaram expressão aumentada do gene *PGF*, sendo necessário mais estudo para confirmar essa hipótese.

Dentre os genes pouco expressos em pacientes falciformes com AVCi em comparação aos pacientes falciformes sem AVCi, importantemente destacamos o ICAM-1, molécula de adesão celular. Os resultados mostraram a expressão gênica diminuída por meio da técnica de PCR Array (*Fold Change* igual a -2,83 e p valor igual a 0.053) e na validação por qRT PCR (*Fold Change* igual a -6,45 e p-valor 0,0381). Diversos estudos têm demonstrado que a *ICAM-1* está envolvida na fisiopatologia do AVC e a sua expressão está aumentada durante inflamação neurovascular (141). No entanto, esses pacientes com AVCi e AF realizam terapia transfusional sanguínea regular e talvez esta esteja causando a expressão diminuída de *ICAM-1*. Nossos resultados estão em concordância com estudos de Hyacinth e colaboradores que investigaram o efeito das transfusões de hemácias nas concentrações séricas de biomarcadores de ativação endotelial, coagulação e neuro-isquemia em crianças com anemia falciforme, e a relação desses biomarcadores com a sobrevida livre de acidente vascular cerebral (142). O estudo mostrou que as concentrações séricas de sVCAM-1, catepsina-D, PDGF-AA, RANTES (CCL5) e sICAM-1 foram menores entre os indivíduos que receberam transfusões de hemácias, em comparação com aqueles que receberam tratamento padrão. Esses dados indicaram que as transfusões têm efeito antiinflamatório e reduzem a isquemia cerebral, a ativação endotelial e o potencial para trombose. No entanto, a mieloperoxidase sérica (MPO, marcador de inflamação mediada por neutrófilos) foi maior entre os indivíduos transfundidos. Uma vez que outros marcadores de inflamação / ativação endotelial, sICAM-1, sVCAM-1 e

RANTES foram menores no grupo transfundido, é possível que a transfusão de hemácias tenha menos efeito sobre a ativação neutrofílica em comparação com outras células inflamatórias e/ou endoteliais. Além disso, um estudo recente mostrou que produtos sanguíneos (concentrados e plasma fresco congelado) acentuam a expressão de marcadores inflamatórios e a transmigração de neutrófilos através de monocamadas endoteliais, o que foi associado ao conteúdo de ácidos graxos do hemoderivado (142).

Um outro gene pertencente a via de apoptose, o *TNFSF10*, apresentou expressão diminuída no grupo com AVCi em relação ao grupo sem AVCi, (*PCR Array - Fold Change* igual a -13,34 e p valor igual a 0,025; qRT PCR - *Fold Change* igual a -4,64 e p-valor 0,0381). O AVCi resulta em uma cascata de eventos envolvendo morte neuronal, alteração da substância branca e inflamação local (110). Durante o AVCi a ativação da micróglia é seguida pelo recrutamento de leucócitos para o local da lesão, contribuindo para o aumento da lesão tecidual (112-114). Neste contexto o *TNFSF10* parece desempenhar um papel na indução da apoptose destacando o seu envolvimento na apoptose pós isquemia (115-116).

Evidências sugerem que o tecido cerebral é suscetível a apoptose induzida por *TNFSF10* e sugere a hipótese de um duplo papel potencial deste gene no SNC, por um lado levando a ativação de vias apoptóticas provocando dano celular e progressão da doença e por outro lado exercendo um efeito protetor (115,143). Os efeitos biológicos contrastantes (proliferação/ sobrevivência versus apoptose) parece depender do tipo de célula envolvida, do local da ação do *TNFSF10* e dos processos inflamatórios envolvidos. Hipóteses consideram que os padrões de expressão do *TNFSF10* diferem também em relação a qual receptor ocorre a ligação. Quando ligado a receptores DR4 e DR5 o *TNFSF10* exerce função apoptótica e por outro lado ao se ligar a receptores chamariz (DcR), este exerce efeito neuroprotetor, o que poderia estar ocorrendo nos pacientes sem AVCi estudados (71,72).

Esse estudo utilizando uma nova abordagem de análise de expressão de genes de vias que podem estar associadas ao AVC apresenta resultados ainda não relatados na literatura e pode abrir novas perspectivas para o esclarecimento da fisiopatologia do AVC na anemia falciforme e contribuir para o estudo de novas terapias para esta doença.

8. CONCLUSÕES

A análise comparativa da expressão de genes associados ao risco de AVCi em CEFC de pacientes portadores de anemia falciforme com AVCi e sem AVCi identificou 29 genes diferencialmente expressos.

Dentre os genes mais expressos destacaram-se os genes (*PF4*, *KIT*, *FLT-1*, *PGF*, *PLAU*, *THBD*, *MMP-1*, *PLAT*, *PROCR*, *IL-6* e *IL1B*) e foram validados pela técnica de qRT PCR os genes *PGF* e *MMP-1*.

Dentre os genes menos expressos destacaram-se os genes (*SELE*, *ICAM-1*, *SELPLG*, *SELL*, *CCL-2*, *MMP-9*, *CCL-5*, *TYMP*, *KDR*, *IL-7*, *TNFSF10*, *TNF*, *OCN*, *EDNRA*, *TFPI*, *APOE*, *CX3CL1* e *ACE*) e foram validados pela técnica de qRT PCR os genes (*ICAM-1* e *TNFSF10*) Os estudos de validação confirmaram os resultados obtidos com exceção do gene *SELPLG*, que apresentou resultados conflitantes entre as técnicas.

Dentre os genes diferencialmente expressos, destaca-se o gene super expresso *MMP-1* que parece estar associado ao processo de angiogênese nos pacientes com AVCi estudados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frenette PS, Atweh GF. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* abril de 2007;117(4):850–8.
2. Adewoyin AS. Management of sickle cell disease: a review for physician education in Nigeria (sub-saharan Africa). *Anemia.* 2015;2015:791498.
3. Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz TV, Stiles JK. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Genomics Insights.* 30 de julho de 2009;2009(2):23–48.
4. National Agency for Sanitary Vigilance. Manual of diagnosis and Treatment of Sickle Cell Disease. 2002 [citado 14 de abril de 2016]; Disponível em: <http://www.bvsms.saude.gov.br>
5. Odièvre M-H, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J Med Res.* outubro de 2011;134:532–7.
6. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 11 de setembro de 1997;337(11):762–9.
7. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol.* 1º de setembro de 2009;84(9):618–25.
8. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho M das G. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol E Med Lab* [Internet]. 2003;39(4). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000400012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
9. Mack AK, McGowan Ii VR, Tremonti CK, Ackah D, Barnett C, Machado RF, et al. Sodium nitrite promotes regional blood flow in patients with sickle cell disease: a phase I/II study. *Br J Haematol.* setembro de 2008;142(6):971–8.
10. Head CA, Swerdlow P, McDade WA, Joshi RM, Ikuta T, Cooper ML, et al. Beneficial effects of nitric oxide breathing in adult patients with sickle cell crisis. *Am J Hematol.* outubro de 2010;85(10):800–2.
11. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* janeiro de 2007;21(1):37–47.
12. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal.* 25 de dezembro de 2008;8:1295–324.
13. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moehr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.* 1º de janeiro de 1998;91(1):288–94.

14. Ikram MA, Seshadri S, Bis JC, Fornage M, DeStefano AL, Aulchenko YS, et al. Genomewide association studies of stroke. *N Engl J Med*. 23 de abril de 2009;360(17):1718–28.
15. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *The Lancet*. 10 de maio de 2008;371(9624):1612–23.
16. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood*. 16 de junho de 2011;117(24):6681–4.
17. Kinney TR, Sleeper LA, Wang WC, Zimmerman RA, Pegelow CH, Ohene-Frempong K, et al. Silent Cerebral Infarcts in Sickle Cell Anemia: A Risk Factor Analysis. *Pediatrics*. 1º de março de 1999;103(3):640–5.
18. Pegelow CH. Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. *Blood*. 15 de abril de 2002;99(8):3014–8.
19. Miller ST, Macklin EA, Pegelow CH, Kinney TR, Sleeper LA, Bello JA, et al. Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J Pediatr*. setembro de 2001;139(3):385–90.
20. Wang WC, Langston JW, Steen RG, Wynn LW, Mulhern RK, Wilimas JA, et al. Abnormalities of the central nervous system in very young children with sickle cell anemia. *J Pediatr*. junho de 1998;132(6):994–8.
21. Giroud M, Lemesle M, Madinier G, Manceau E, Osseby GV, Dumas R. Stroke in children under 16 years of age. Clinical and etiological difference with adults. *Acta Neurol Scand*. dezembro de 1997;96(6):401–6.
22. Satoh S, Shirane R, Yoshimoto T. Clinical survey of ischemic cerebrovascular disease in children in a district of Japan. *Stroke*. maio de 1991;22:586–9.
23. Dusser A, Goutières F, Aicardi J. Ischemic strokes in children. *J Child Neurol*. abril de 1986;1(2):131–6.
24. Kassim AA, Galadanci NA, Pruthi S, DeBaun MR. How I treat and manage strokes in sickle cell disease. *Blood*. 28 de maio de 2015;125(22):3401–10.
25. King AA, Rodeghier MJ, Panepinto JA, Strouse JJ, Casella JF, Quinn CT, et al. Silent cerebral infarction, income, and grade retention among students with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. outubro de 2014;89(10):E188-192.
26. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. maio de 2003;4(5):399–415.
27. Costa FF, Conran N, Fertrin, K.Y. Tratado de hematologia. São Paulo; 2013. 205–223 p.
28. Tang DC, Prauner R, Liu W, Kim KH, Hirsch RP, Driscoll MC, et al. Polymorphisms within the angiotensinogen gene (GT-repeat) and the risk of stroke in pediatric patients

- with sickle cell disease: a case-control study. *Am J Hematol.* novembro de 2001;68(3):164–9.
29. Fasano RM, Meier ER, Hulbert ML. Cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis.* janeiro de 2015;54(1):17–25.
 30. Chang Milbauer L, Wei P, Enenstein J, Jiang A, Hillery CA, Scott JP, et al. Genetic endothelial systems biology of sickle stroke risk. *Blood.* 1º de abril de 2008;111(7):3872–9.
 31. Lawrence C, Webb J. Sickle Cell Disease and Stroke: Diagnosis and Management. *Curr Neurol Neurosci Rep.* março de 2016;16(3):27.
 32. Casella JF, King AA, Barton B, White DA, Noetzel MJ, Ichord RN, et al. Design of the silent cerebral infarct transfusion (SIT) trial. *Pediatr Hematol Oncol.* março de 2010;27(2):69–89.
 33. Bernaudin F, Verlhac S, Fréard F, Roudot-Thoraval F, Benkerrou M, Thuret I, et al. Multicenter prospective study of children with sickle cell disease: radiographic and psychometric correlation. *J Child Neurol.* maio de 2000;15(5):333–43.
 34. Schatz J, Brown RT, Pascual JM, Hsu L, DeBaun MR. Poor school and cognitive functioning with silent cerebral infarcts and sickle cell disease. *Neurology.* 24 de abril de 2001;56(8):1109–11.
 35. Adams RJ. TCD in sickle cell disease: an important and useful test. *Pediatr Radiol.* março de 2005;35(3):229–34.
 36. Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med.* 27 de fevereiro de 1992;326(9):605–10.
 37. Adams RJ. Toward a stroke-free childhood in sickle cell disease: the 2013 Sherman Lecture. *Stroke.* outubro de 2013;44(10):2930–4.
 38. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med.* 2 de julho de 1998;339(1):5–11.
 39. Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr.* março de 1992;120(3):360–6.
 40. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* julho de 2004;93(1):105–13.
 41. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* dezembro de 2002;34(12):1508–12.
 42. Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers* [Internet]. 14 de janeiro de 2015 [citado 6 de maio de 2018];3(1–2). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4372023/>

43. Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA, Thompson JA, et al. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 de dezembro de 2001;98(26):15215–20.
44. Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, Bowlin PR, Kielbik MC, Bischof JC, et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood*. 15 de maio de 2003;101(10):3953–9.
45. Hillery CA, Du MC, Wang WC, Scott JP. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. *Br J Haematol*. maio de 2000;109(2):322–7.
46. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet Lond Engl*. 9 de outubro de 2004;364(9442):1343–60.
47. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol*. 2005;113(2):130–6.
48. Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad STO, Costa FF, et al. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. *Eur J Haematol*. fevereiro de 2007;78(2):144–51.
49. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad STO, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*. abr de 2008;93(4):605–9.
50. Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem*. dezembro de 2009;42(18):1824–38.
51. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. setembro de 1992;6(12):3051–64.
52. Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol*. abril de 1997;15(2):163–7.
53. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirc N Y N* 1994. março de 2004;11(2):129–51.
54. Greenberg DA, Jin K. Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) and Stroke. *Cell Mol Life Sci CMLS*. maio de 2013;70(10):1753–61.
55. Goon PKY, Lip GYH, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating Endothelial Cells, Endothelial Progenitor Cells, and Endothelial Microparticles in Cancer. *Neoplasia N Y N*. fevereiro de 2006;8(2):79–88.
56. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med*. março de 2009;13(3):454–71.

57. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 14 de fevereiro de 1997;275(5302):964–7.
58. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. dezembro de 2004;8(4):498–508.
59. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell*. 31 de maio de 2002;109(5):625–37.
60. Lee PSS, Poh KK. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells*. 26 de julho de 2014;6(3):355–66.
61. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res*. 28 de novembro de 2003;93(11):1023–5.
62. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. janeiro de 2000;105(1):71–7.
63. Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA, et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics*. 13 de maio de 2010;3(1):18.
64. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1º de setembro de 2008;28(9):1584–95.
65. Beem RTV, Verloop RE, Kleijer M, Noort WA, Loof N, Koolwijk P, et al. Blood outgrowth endothelial cells from cord blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro. *J Thromb Haemost*. 1º de janeiro de 2009;7(1):217–26.
66. Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Res*. 1º de outubro de 2006;326(1):79–92.
67. Critser PJ, Yoder MC. Endothelial Colony Forming Cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant*. fevereiro de 2010;15(1):68–72.
68. Fernandezl A, Sanzrodriguez F, Zarrabeitia R, Perezmolino A, Hebbel R, Nguyen J, et al. Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res*. 1º de novembro de 2005;68(2):235–48.
69. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni J-L, Piercecchi M-D, Sabatier F, et al. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev*. março de 2011;7(1):208–20.
70. Huang X-T, Zhang Y-Q, Li S-J, Li S-H, Tang Q, Wang Z-T, et al. Intracerebroventricular Transplantation of Ex Vivo Expanded Endothelial Colony-

- Forming Cells Restores Blood–Brain Barrier Integrity and Promotes Angiogenesis of Mice with Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 15 de dezembro de 2013;30(24):2080–8.
71. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet*. abril de 2005;37(4):435–40.
 72. Pereira ALA, Veras SSL, Silveira ÉJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol*. fevereiro de 2005;71(1):81–6.
 73. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1º de janeiro de 2010;1803(1):39–54.
 74. Sternlicht MD, Werb Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463–516.
 75. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 15 de fevereiro de 2006;69(3):562–73.
 76. Morrison CJ, Butler GS, Rodríguez D, Overall CM. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr Opin Cell Biol*. outubro de 2009;21(5):645–53.
 77. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. novembro de 2004;10(6):311–8.
 78. Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, et al. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*. 2010;17(31):3751–68.
 79. Malesmud C J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*. 2006;11(1):1696.
 80. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*. julho de 2011;41(2):271–90.
 81. Chang JJ, Stanfill A, Pourmotabbed T. The Role of Matrix Metalloproteinase Polymorphisms in Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci*. 12 de agosto de 2016;17(8).
 82. Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. março de 2000;20(3):452–7.
 83. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*. dezembro de 2000;31(12):3034–40.

84. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* julho de 2001;86(1):324–33.
85. Chung L, Dinakarbandian D, Yoshida N, Lauer-Fields JL, Fields GB, Visse R, et al. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J.* 4 de agosto de 2004;23(15):3020–30.
86. Gasche Y, Soccal PM, Kanemitsu M, Copin J-C. Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1º de maio de 2006;11:1289–301.
87. Huang X-Y, Han L-Y, Huang X-D, Guan C-H, Mao X-L, Ye Z-S. Association of Matrix Metalloproteinase-1 and Matrix Metalloproteinase-3 Gene Variants with Ischemic Stroke and Its Subtype. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc.* fevereiro de 2017;26(2):368–75.
88. Kufner A, Galinovic I, Brunecker P, Cheng B, Thomalla G, Gerloff C, et al. Early infarct FLAIR hyperintensity is associated with increased hemorrhagic transformation after thrombolysis. *Eur J Neurol.* fevereiro de 2013;20(2):281–5.
89. Wang W, Li M, Chen Q, Wang J. Hemorrhagic Transformation after Tissue Plasminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke: Mechanisms, Models, and Biomarkers. *Mol Neurobiol.* dezembro de 2015;52(3):1572–9.
90. Yang Y, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res.* 14 de outubro de 2015;1623:30–8.
91. Lucivero V, Prontera M, Mezzapesa DM, Petruzzellis M, Sancilio M, Tinelli A, et al. Different roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 after human ischaemic stroke. *Neurol Sci.* 1º de agosto de 2007;28(4):165–70.
92. Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett.* 28 de novembro de 1997;238(1–2):53–6.
93. Buraczynska K, Kurzepa J, Ksiazek A, Buraczynska M, Rejdak K. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphism in Stroke Patients. *Neuromolecular Med.* dezembro de 2015;17(4):385–90.
94. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke.* 1º de dezembro de 2001;32(12):2762–7.
95. Horstmann S, Kalb P, Koziol J, Gardner H, Wagner S. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke.* setembro de 2003;34(9):2165–70.
96. Switzer JA, Hess DC, Ergul A, Waller JL, Machado LS, Portik-Dobos V, et al. Matrix metalloproteinase-9 in an exploratory trial of intravenous minocycline for acute ischemic stroke. *Stroke.* setembro de 2011;42(9):2633–5.

97. Lee CZ, Xue Z, Zhu Y, Yang G-Y, Young WL. Matrix metalloproteinase-9 inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-induced intracerebral hemorrhage. *Stroke*. setembro de 2007;38(9):2563–8.
98. Kim KS, Choi HM, Lee Y-A, Choi IA, Lee S-H, Hong S-J, et al. Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial fluid of patients with arthritis. *Rheumatol Int*. 1º de abril de 2011;31(4):543–7.
99. Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, Wiesmann C. The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J Biol Chem*. 12 de março de 2004;279(11):10382–8.
100. The Role of Endothelin-1 in Atherosclerosis | GU Journal of Health Sciences [Internet]. [citado 8 de maio de 2018]. Disponível em: <https://blogs.commonsgorgetown.edu/journal-of-health-sciences/issues-2/previous-volumes/vol-3-no-1-march-2006/role-of-endothelin-1-in-atherosclerosis/>
101. Gaál EI, Tammela T, Anisimov A, Marbacher S, Honkanen P, Zarkada G, et al. Comparison of vascular growth factors in the murine brain reveals placenta growth factor as prime candidate for CNS revascularization. *Blood*. 1º de agosto de 2013;122(5):658–65.
102. Patel N, Gonsalves CS, Malik P, Kalra VK. Placenta growth factor augments endothelin-1 and endothelin-B receptor expression via hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood*. 1º de agosto de 2008;112(3):856–65.
103. Newell LF, Holtan SG. Placental growth factor: What hematologists need to know. *Blood Rev*. janeiro de 2017;31(1):57–62.
104. Beck H, Acker T, Püschel AW, Fujisawa H, Carmeliet P, Plate KH. Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling. *J Neuropathol Exp Neurol*. abril de 2002;61(4):339–50.
105. Stolpe A van de, Saag PT van der. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*. 1º de janeiro de 1996;74(1):13–33.
106. Shiu YT, Udden MM, McIntire LV. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Blood*. 15 de maio de 2000;95(10):3232–41.
107. Deddens LH, van Tilborg GAF, van der Marel K, Hunt H, van der Toorn A, Viergever MA, et al. In Vivo Molecular MRI of ICAM-1 Expression on Endothelium and Leukocytes from Subacute to Chronic Stages After Experimental Stroke. *Transl Stroke Res*. 16 de maio de 2017;
108. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 7 de julho de 2011;17(7):796–808.
109. Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol*. março de 2011;89(3):359–72.

110. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. Cytoprotective-selective activated protein C therapy for ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* novembro de 2014;112(5):883–92.
111. Griffin JH, Mosnier LO, Fernández JA, Zlokovic BV. 2016 Scientific Sessions Sol Sherry Distinguished Lecturer in Thrombosis: Thrombotic Stroke: Neuroprotective Therapy by Recombinant-Activated Protein C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* novembro de 2016;36(11):2143–51.
112. Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH, et al. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation.* 3 de abril de 2001;103(13):1799–805.
113. Tisato V, Gonelli A, Voltan R, Secchiero P, Zauli G. Clinical perspectives of TRAIL: insights into central nervous system disorders. *Cell Mol Life Sci CMLS.* maio de 2016;73(10):2017–27.
114. Kang YH, Park M-G, Noh K-H, Park HR, Lee HW, Son SM, et al. Low serum TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) levels are associated with acute ischemic stroke severity. *Atherosclerosis.* maio de 2015;240(1):228–33.
115. Aktas O, Schulze-Topphoff U, Zipp F. The role of TRAIL/TRAIL receptors in central nervous system pathology. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1º de maio de 2007;12:2912–21.
116. Panneerselvam M, Patel PM, Roth DM, Kidd MW, Chin-Lee B, Head BP, et al. Role of decoy molecules in neuronal ischemic preconditioning. *Life Sci.* 11 de abril de 2011;88(15–16):670–4.
117. Cannella B, Gaupp S, Omari KM, Raine CS. Multiple Sclerosis: Death Receptor Expression and Oligodendrocyte Apoptosis in Established Lesions. *J Neuroimmunol.* agosto de 2007;188(1–2):128–37.
118. Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, Milani D, Pandolfi A, Zella D, et al. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation.* 6 de maio de 2003;107(17):2250–6.
119. Dörr J, Bechmann I, Waiczies S, Aktas O, Walczak H, Krammer PH, et al. Lack of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand But Presence of Its Receptors in the Human Brain. *J Neurosci.* 15 de fevereiro de 2002;22(4):RC209–RC209.
120. Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES, Liao H, Yan SF, Pinsky DJ. CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke.* maio de 1999;30(5):1110–7.
121. Mabuchi T, Kitagawa K, Ohtsuki T, Kuwabara K, Yagita Y, Yanagihara T, et al. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* julho de 2000;31(7):1735–43.

122. Lehnardt S, Lehmann S, Kaul D, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, et al. Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroimmunol.* outubro de 2007;190(1–2):28–33.
123. Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, et al. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 15 de maio de 1999;19(10):3809–17.
124. Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, et al. Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ.* julho de 2001;8(7):679–86.
125. Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin K-M. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma *in vivo*. *Nat Med.* agosto de 2002;8(8):808–15.
126. Quintao C, Yan L, Changhong D, Xiaoliang G, Xiaochen L. Genetic Polymorphism of Matrix Metalloproteinase-1 and Coronary Artery Disease Susceptibility: A Case–Control Study in a Han Chinese Population. *Genet Test Mol Biomark.* 5 de novembro de 2014;18(12):826–31.
127. Armstrong C, Abilleira S, Sitzler M, Markus HS, Bevan S. Polymorphisms in MMP family and TIMP genes and carotid artery intima-media thickness. *Stroke.* novembro de 2007;38(11):2895–9.
128. Iimuro Y, Brenner DA. Matrix Metalloproteinase Gene Delivery for Liver Fibrosis. *Pharm Res.* fevereiro de 2008;25(2):249–58.
129. Serjeant GR. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1º de outubro de 2013;3(10):a011783.
130. Arenullas, J.F., Brea, D. Relationship between endothelial progenitor cells (EPCs) and outcome in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2006;21:98.
131. Liu XS, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg S, Morris DC, Wang Y, et al. Stroke induces gene profile changes associated with neurogenesis and angiogenesis in adult subventricular zone progenitor cells. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* março de 2007;27(3):564–74.
132. Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* fevereiro de 2003;23(2):166–80.
133. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 16 de fevereiro de 2001;49(3):507–21.
134. Plate KH. Mechanisms of Angiogenesis in the Brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1º de abril de 1999;58(4):313–20.

135. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol.* março de 2000;156(3):965–76.
136. Zhang J-X, Zhang Z-Y, Cheng Y. Elevated MMP-1 and TIMP-1 are related with acute cerebral infarction patients with diabetes mellitus. :7.
137. Wu Y-W, Yang W-S, Chen M-F, Lee B-C, Hung C-S, Liu Y-C, et al. High Serum Level of Matrix Metalloproteinase-1 and Its Rapid Surge After Intervention in Patients with Significant Carotid Atherosclerosis. *J Formos Med Assoc.* janeiro de 2008;107(1):93–8.
138. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* junho de 2005;9(2):267–85.
139. Zhang G, Li W, Guo Y, Li D, Liu Y, Xu S. MMP Gene Polymorphisms, MMP-1 -1607 1G/2G, -519 A/G, and MMP-12 -82 A/G, and Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc.* janeiro de 2018;27(1):140–52.
140. Naim A, Pan Q, Baig MS. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Liver Diseases. *J Clin Exp Hepatol.* dezembro de 2017;7(4):367–72.
141. Frijns CJM, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke.* agosto de 2002;33(8):2115–22.
142. Hyacinth HI, Adams RJ, Voeks JH, Hibbert JM, Gee BE. Frequent red cell transfusions reduced vascular endothelial activation and thrombogenicity in children with sickle cell anemia and high stroke risk. *Am J Hematol.* 1º de janeiro de 2014;89(1):47–51.
143. Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, et al. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet Lond Engl.* 2 de setembro de 2000;356(9232):827–8.

10. ANEXOS

ANEXO 1 -Parecer do Comitê de Ética da Plataforma Brasil

	UNICAMP - FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE CAMPINAS	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME E ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL		
Pesquisador: Mirta Tomie Ito		
Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);		
Versão: 2		
CAAE: 57824116.7.0000.5404		
Instituição Proponente: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética		
Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.903.046		
Apresentação do Projeto:		
"Embora a anemia falciforme (AF) resulte da homozigotidade de uma única mutação na posição 6 do locus da -globina, o quadro clínico desta doença é muito heterogêneo, de modo que diferentes pacientes podem apresentar evoluções clínicas significativamente distintas. Praticamente todos os órgãos podem ser afetados, merecendo destaque o Sistema Nervoso Central (SNC), onde são observados acidentes isquêmicos transitórios, infartos e hemorragia cerebral, os quais acometem aproximadamente 25% dos pacientes com AF. As complicações neurológicas são graves, podendo ser fatais em até 15% dos casos. Genes candidatos à suscetibilidade ao Acidente Vascular Cerebral (AVC) incluem aqueles implicados em adesão celular, metabolismo da homocisteína, regulação da transcrição neuronal, inflamação e estresse oxidativo. Estudos de expressão gênica têm permitido avanços importantes na compreensão da fisiopatologia de várias doenças. Diferentes perfis de expressão podem permitir a identificação de genes envolvidos, assim como, facilitar o estudo de como tais genes interagem entre si em redes. Sendo assim, este projeto propõe investigar, por meio da técnica SYBR Green Real-Time PCR, a expressão de genes previamente associados ao risco de acidente vascular cerebral em pacientes com AF com história clínica de AVC, em um grupo com AF sem AVC e ainda em um grupo controle sem AF. Os resultados obtidos contribuirão para		
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887 UF: SP Município: CAMPINAS Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br		



UNICAMP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.903.048

identificar vias associadas ao desenvolvimento dessa complicação neurológica em pacientes com AF, melhorar a compreensão da fisiopatologia do AVC, assim como fornecer dados para identificação de possíveis marcadores biológicos que poderão ser utilizados em diagnóstico preventivo e que ainda poderão contribuir para o desenvolvimento de abordagens úteis para o tratamento do AVC nestes pacientes*.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar, por meio da técnica SYBR Green Real-Time PCR a expressão dos genes associados ao risco para o Acidente Vascular Cerebral em pacientes com anemia falciforme.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Foram identificados riscos associados à confidencialidade (sigilo da identidade do participante). Os pesquisadores informam no TCLE o compromisso de preservar a identidade dos participantes.

Há riscos e/ou desconfortos associados à coleta de sangue periférico, como dor e/ou possibilidade de equimoses no local da coleta do sangue (punção venosa). Há desconfortos associados ao exame de ressonância magnética como ruído típico emitido pelo aparelho, disponibilidade de tempo do participante para realizar o exame e a duração do exame.

Não há benefícios diretos aos participantes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de mestrado da pós-graduada Mirta Tomie Ito (pesquisadora responsável), com orientação da Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo. Nesta pesquisa, pretende-se analisar, por meio da técnica SYBR Green Real-Time PCR a expressão de genes associados ao risco para o acidente vascular cerebral em pacientes com anemia falciforme.

Para isso, pretende-se incluir 34 participantes, os quais constituirão dois grupos experimentais: 1. Grupo casos com AVC e anemia falciforme (n=13) e 2. Grupo controle (n=21) participantes com anemia falciforme e sem AVC. Todos os participantes serão provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia-HEMOCENTRO de Campinas-Unicamp.

Os participantes serão submetidos à coleta de sangue periférico (até 60ml) por meio de punção venosa no braço e será solicitado exame de ressonância magnética de crânio dos participantes do grupo controle com anemia falciforme, para exclusão de AVC silencioso.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-867

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.503.048

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável, Mirta Tomie Ito e por Edi Lúcia Sartorato diretora do CBMEG-Unicamp, instituição indicada como proponente
2. Termos de consentimento Livre Esclarecido: um termo geral para todos os participantes e um termo específico para o procedimento de ressonância magnética.
3. Novo formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto;
4. Projeto completo reformulado;
5. Arquivo pdf com Anexo II do Termo de Outorga FAPESP;
6. Regulamento de Biorrepositório.
7. Carta resposta ao CEP com esclarecimentos sobre as questões levantadas no parecer consubstanciado 1.650.687 de 27 de julho de 2016.
8. Carta de anuência assinada pelo Dr Fernando Cendes, concordando com a realização da pesquisa.

Recomendações:

1. No caso da versão final impressa do TCLE ter duas ou mais folhas, o participante ou o representante legal pelo participante, bem como, o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular no 003/2011/CONEP/CNS).
2. TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador.
3. Observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 466/12 CNS/MS.
4. Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (resolução 466/12).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As questões levantadas no parecer consubstanciado 1.650.687 de 27 de julho de 2016 foram esclarecidas. Não restam pendências ou inadequações.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

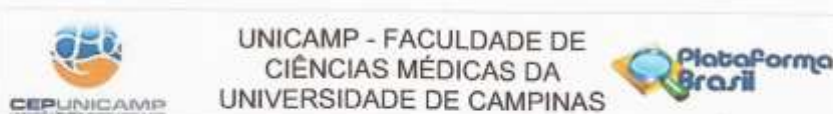
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.903.046

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.903.046

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_756087.pdf	27/01/2017 10:25:10		Aceito
Outros	CARTA_RENATA.pdf	27/01/2017 10:19:05	Mirta Tomie Ito	Aceito
Outros	Questionarioressonancia.pdf	26/01/2017 22:50:24	Mirta Tomie Ito	Aceito
Outros	Carta_de_informacao.pdf	26/01/2017 22:44:07	Mirta Tomie Ito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEressonancia.pdf	26/01/2017 22:40:08	Mirta Tomie Ito	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Expressao.pdf	26/01/2017 22:39:37	Mirta Tomie Ito	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_3.pdf	17/01/2017 21:14:30	Mirta Tomie Ito	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio_2017.pdf	08/01/2017 13:23:05	Mirta Tomie Ito	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_expressao_plataforma.pdf	04/01/2017 21:04:48	Mirta Tomie Ito	Aceito
Outros	Carta_anuencia.pdf	04/01/2017 20:54:14	Mirta Tomie Ito	Aceito

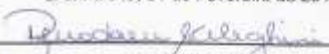
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 01 de Fevereiro de 2017


Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-867

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2- Termo de Consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA CBMEG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARTICIPANTES CASOS E CONTROLES

Título do projeto: Avaliação de expressão gênica de células endoteliais em pacientes com anemia falciforme e Acidente Vascular Cerebral

Pesquisadora principal: Mirta Tomie Itó- F: (19) 981421908

Número do CAAE: 57824116.7.0000.5404

OBJETIVO DA PESQUISA:

Você está sendo convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos:

- () Com doença falciforme () Sem Acidente Vascular Cerebral (AVC)
() Com Acidente Vascular Cerebral (AVC)

Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com a pesquisadora. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

O objetivo do estudo é identificar alterações genéticas que levam ao risco de AVC na doença falciforme. Isso poderá melhorar o entendimento da doença, levando a novas abordagens no tratamento e diagnóstico (se a alteração for encontrada).

PROCEDIMENTOS:

Caso concorde em participar desse estudo, a pesquisadora fará perguntas a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares (rápida entrevista, cerca de 5 minutos). Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 a 60 mL, o equivalente a duas colheres de sopa). Além do que, seus prontuários serão analisados para aquisição de dados demográficos, tais como cidade de origem, data de nascimento; além de exames que comprovem a inclusão do indivíduo na pesquisa, como eletroforese de hemoglobina; e exames que possam excluí-lo da pesquisa, como exame que comprove doença maligna.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 10 a 60 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e habilitado para realizar esse procedimento. Esse sangue para a pesquisa será coletado durante a coleta do hemograma, que faz parte dos cuidados médicos de rotina para um (a) paciente com doença falciforme, e também em doadores de sangue sem doença falciforme durante os procedimentos para coleta de exames para triagem. Em caso de dano decorrente da pesquisa, está garantida a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário. Você também tem direito a indenização em caso de danos.

SIGILO:

Você deve entender que toda informação médica que consta em seu prontuário médico será submetida aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica, excetuando-se os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, que não irão para o prontuário. Se os resultados ou informações fornecidas resultarem em publicação científica, nenhum nome será utilizado.

RESSARCIMENTO:

Os procedimentos serão realizados durante as consultas de rotina ao Hospital das Clínicas da Unicamp. Você não receberá qualquer valor em dinheiro. Logo, como não há gastos, não haverá ressarcimento.

BENEFÍCIOS:

Você não obterá nenhum benefício direto com a colaboração nesse estudo, seu tratamento provavelmente não será modificado. Contudo, os resultados desse estudo podem, em longo prazo, oferecer benefícios para indivíduos com doença falciforme, possibilitando melhor diagnóstico e tratamento adequado. Se você desejar obter orientação genética junto ao seu resultado (quando solicitado), ela será oferecida pela equipe de pesquisa.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Se assim desejar, você pode requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A mestrande Mirta Tomie Itó (tel: 019 981421908; Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG/UNICAMP, Av. Cândido Rondon - Cidade Universitária, Campinas - SP, CEP: 13083-875) estará disponível (9h – 17h) para responder às questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações sobre os aspectos éticos você pode contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa, tel. (19) 3521-8936 (8:30h-11:30h, 13h-17h), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP 130783-887 – Campinas, SP. Uma vez que o Comitê de Ética e Pesquisa é o órgão que visa assegurar os direitos do sujeito de pesquisa, salvaguardando sua integridade.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

A participação é voluntária, você pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento e interromper a participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebe atualmente ou receberá no futuro no HC-UNICAMP. A mestrande Mirta Tomie Itó pode interromper sua participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado, como quando houver fatores de exclusão que sejam descobertos durante a pesquisa, por exemplo, através da análise dos prontuários.

Você leu e compreendeu esse termo de consentimento e está de pleno acordo em participar desse estudo. Logo, informa que:

() Autorizo o armazenamento do material biológico e devo ser consultado para reconsentimento em caso de uso de sua amostra em outras pesquisas, sendo que o tempo de armazenamento é de 5 anos, podendo ser prorrogado por mais 5 anos.

() **NÃO** autorizo o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado após o encerramento de sua participação nessa pesquisa.

RESULTADOS DOS EXAMES GENÉTICOS REALIZADOS

- () Desejo ser informado (a) sobre o resultado de seus exames.
- () **NÃO** desejo ser informado (a) sobre o resultado de seus exames.

DISPONIBILIZAÇÃO PÚBLICA DOS DADOS GENÔMICOS

Com o avanço das pesquisas na área genômica, é hoje de grande importância compartilhar em bancos de dados públicos os resultados de alguns testes moleculares. No compartilhamento dos dados genômicos é sempre assegurado que não haverá qualquer referência aos identificadores das amostras, (exemplo de identificadores: nome, filiação, endereço, número de registro hospitalar), mas poderão ser incluídas informações relevantes para a interpretação dos dados genômicos no contexto das pesquisas, tais como: sexo, idade, país e região de procedência, diagnóstico e outras informações clínicas pertinentes.

- () Autorizo que os resultados dos testes genômicos realizados no âmbito deste projeto de pesquisa sejam disponibilizados em bancos de dados públicos que poderão ser consultados por pesquisadores da área médica, desde que esses dados não sejam vinculados com identificadores da amostra.
- () **NÃO** autorizo a disponibilização dos resultados dos testes genéticos realizados neste projeto de pesquisa.

Nome do (a) participante ou responsável

Assinatura do (a) participante ou responsável

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Assinatura da pesquisadora (Mirta Tomie Itó)

Data

ANEXO 3- Termo de Consentimento livre e esclarecido- Ressonância magnética**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto: Análise de expressão gênica de células endoteliais em pacientes com anemia falciforme e Acidente Vascular Cerebral

Pesquisadora principal: Mirta Tomie Itó F: (19) 981421908

Número do CAAE: 57824116.7.0000.5404

Objetivos da pesquisa:

Este projeto tem por objetivo o estudo dos genes associados ao Acidente Vascular Cerebral (AVC) em indivíduos com anemia falciforme. Você está sendo convidado para participar deste estudo envolvendo indivíduos com:

() Com doença falciforme () Sem Acidente Vascular Cerebral

Procedimentos:

Caso concorde em participar deste estudo a pesquisadora irá explicar sobre o procedimento do exame de Ressonância Magnética. Também fará investigação sobre o uso de implantes metálicos, anamnese e história clínica e orientações pré e pós-exame.

Você estará sendo submetido a um campo magnético, onde ondas de rádio-frequências são enviadas aos tecidos no interior do corpo e os “ecos” retornantes são então transformados em imagens das estruturas internas do corpo através de procedimento computadorizado. O protocolo adotado nesta pesquisa não inclui uso de contraste e a duração média do exame é de 30 minutos.

Riscos e desconfortos:

A ressonância magnética não poderá ser realizada caso seja portador de marca-passo cardíaco ou desfibriladores, alguns tipos de clips de aneurisma intracraniano, corpo estranho metálico intra ocular, implante coclear ou prótese metálica. Excetuando-se os casos acima e possível desconforto decorrente do tempo de decúbito no equipamento de imagem e o ruído típico emitido pelo aparelho, não há maiores riscos para o indivíduo submetido ao exame.

Rubrica do pesquisador:_____

Rubrica do participante:_____

Benefícios esperados:

Existe a necessidade de associar testes genéticos aos programas já existentes de prevenção e diagnóstico precoce de AVC, a fim de se conhecer a magnitude deste problema e de dar um passo de alerta à população, aos profissionais de saúde e às autoridades locais. Isto gera benefício à população afetada e a seus familiares, pois a precocidade do diagnóstico e reabilitação gera grandes reduções no orçamento público.

Garantia de resposta às perguntas:

Será garantida respostas a quaisquer perguntas que possam ocorrer em qualquer momento da pesquisa e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa.

Garantia de privacidade:

Será mantido o sigilo e o caráter confidencial das informações, e a sua identificação não será exposta nas conclusões ou explicações.

Ressarcimento:

Os procedimentos serão realizados no Laboratório de Neuroimagem do Departamento de Neurologia do HC Unicamp. Você não receberá qualquer valor em dinheiro e não haverá ressarcimento.

Recusa ou descontinuação da participação:

A participação é voluntária, você pode se recusar a participar deste estudo e interromper sua participação sem comprometer os cuidados médicos que recebe ou receberá no futuro.

Eu _____, aceito participar neste projeto de pesquisa, a mesma é voluntária e eu posso recusar ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem comprometer os cuidados médicos que recebo ou receberei no futuro.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador